



Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand)

Peter Nick

- 5.1 Arabidopsis als Modellsystem: wozu und warum? – 118**
- 5.2 Methoden und Ansätze – 124**
 - 5.2.1 Mutantenkollektionen – 125
 - 5.2.2 Transformation – 128
 - 5.2.3 Vom Phänotyp zum Gen – *Map-based Cloning* und T-DNA – 130
 - 5.2.4 Zelluläre Entwicklungsgenetik: Enhancer-Trap-Linien – 132
- 5.3 Biologie und Entwicklung von Arabidopsis – 134**
 - 5.3.1 Arabidopsis ist ein Therophyt – 135
 - 5.3.2 Embryonalentwicklung – 135
 - 5.3.3 Vegetative Entwicklung – 137
 - 5.3.4 Generative Entwicklung – 141
- 5.4 Verwandte Modellorganismen – 145**
- 5.5 Limitierungen des Modells Arabidopsis – 146**
- 5.6 Neue Entwicklungen – 148**
 - Literatur – 149**

Überblick für schnelle Leser

Das kleine unscheinbare „Unkraut“ *Arabidopsis thaliana* nutzt in der freien Natur kurzzeitige Störungen der Vegetationsdecke, um in kürzester Zeit seinen Lebenszyklus zu vollenden und dann in Form von Samen auf die nächste günstige Gelegenheit zu warten. Aufgrund dieser sogenannten Therophyten-Strategie ist alles bei der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) auf schnelle Entwicklung und maximale Samenbildung hin ausgerichtet. Das Genom ist die Minimalversion dessen, was eine Pflanze braucht, und der Lebenszyklus ist in weniger als zwei Monaten vollendet. Diese Eigenschaften machen die Ackerschmalwand zum idealen Modell für Pflanzengenetik. Da gezieltes Ausschalten von Genen (noch) nicht zur Verfügung steht, spielen weltweit vernetzte und über Datenbanken erschlossene Mutantensammlungen die entscheidende Rolle. Am Beispiel des Phototropismus wird erklärt, wie man damit von einer Funktion (Wahrnehmung der Lichtrichtung) zum verantwortlichen Gen gelangt. Infolge der ökologischen Strategie weist die Entwicklung von *Arabidopsis* einige Besonderheiten auf, beispielsweise sehr festgelegte Abfolgen von Zellteilungen. Diese stereotype *Cell-Lineage* gaukelt vor, dass das Entwicklungsschicksal einer Zelle schon sehr früh festgelegt werde. Mithilfe von *Enhancer-Trap*-Linien in Verbindung mit der gezielten Entfernung einzelner Zelltypen mithilfe eines starken Lasers gelang es jedoch zu zeigen, dass auch bei *Arabidopsis* (so wie bei anderen Pflanzen auch) die Zellen ständig Signale aus ihrer Nachbarschaft aufnehmen und dementsprechend ihren Entwicklungsweg flexibel anpassen. Auch wenn *Arabidopsis thaliana* selbst nicht wirtschaftlich genutzt wird, dient es als wichtiges genetisches Bezugssystem für die Arbeit mit verwandten Modellpflanzen – etwa *Arabidopsis halleri*, die auf schwermetallhaltigen Böden gedeiht und daher für die Sanierung von Bergbauschäden interessant ist, oder der Raps (*Brassica napus*), der als ölliefernde Energiepflanze (Biodiesel) inzwischen erhebliche wirtschaftliche Bedeutung innehat.

Aktuelle Forschungen am Modellorganismus *Arabidopsis* zielen darauf, das Genom kontrolliert verändern zu können. Hier hat sich unter mehreren Alternativansätzen vor allem das CRISPR/Cas-System als Methode der Wahl herausgestellt. Die an *Arabidopsis* mögliche methodische Optimierung des CRISPR/Cas-Systems hat es nun möglich gemacht, auch bei anderen Pflanzen Mutationen gezielt einfügen zu können. Dies hebt die Möglichkeiten der pflanzlichen Gentechnik auf ein völlig neues Niveau.

5.1 Arabidopsis als Modellsystem: wozu und warum?

■ Pflanzen sind anders. Warum?

Pflanzen liefern die Grundlage für fast alles Leben auf diesem Planeten, den Menschen und seine technische Zivilisation eingeschlossen. Die Nutzung von Licht als Energiequelle des Lebens begann vor mehr als drei Mrd. Jahren und führte zu Lebensformen, deren gesamte Organisation und Funktion auf die Photosynthese hin ausgerichtet wurde. Durch die photosynthetische Erzeugung von Sauerstoff und energiereichen organischen Molekülen prägten und formten Pflanzen die Lebensbedingungen auch für alle anderen Organismen.

Da Pflanzen ohne Licht nicht existieren können, gab es für pflanzliches Leben im Meer nur zwei Wege: Pflanzliches Plankton schwebt nahe der Wasseroberfläche und muss, damit es nicht sinkt, klein sein, wodurch es leicht zur Beute von Fressfeinden wird. In der Nähe der Uferlinie konnten fest-sitzende (benthische) Pflanzen zwar größer werden und sich damit besser vor Tierfraß schützen, drängten sich jedoch auf einem sehr begrenzten Lebensraum. Als es Pflanzen vor knapp einer halben Milliarde Jahren gelang, das feste Land zu besiedeln und damit unbegrenzten Zugang zum Licht zu gewinnen, wurde das Land damit auch für andere Lebensformen erschlossen.

Unter den knapp 400.000 Pflanzenarten bilden die Bedecktsamer (Angiospermen) mit etwa 226.000 Arten die vielfältigste und ökologisch bedeutsamste Gruppe. Beispielsweise hängt die Landwirtschaft fast komplett von den Angiospermen ab, sei es direkt durch den Anbau von Nutzpflanzen, sei es indirekt durch die Fütterung von Tieren.

Leben heißt wachsen. In einem wachsenden Körper steigt die Oberfläche in der zweiten, das Volumen jedoch in der dritten Potenz des Radius. Dadurch klaffen Stoffzufuhr und Verbrauch immer mehr auseinander. Alle Lebewesen erweitern daher ihre Oberfläche durch Einstülpungen oder Auffaltungen, ein Phänomen, das sich schon bei Einzellern beobachten lässt. Groß werden bringt einen Selektionsvorteil, weil größere Organismen nicht nur besser gegen Schwankungen der Umwelt gepuffert sind, sondern auch weniger leicht gefressen werden können.

Als Folge ihrer photosynthetischen Lebensweise müssen Pflanzen ihre Oberfläche nach außen vergrößern, was bei mehrzelligen Organismen eine beträchtliche mechanische Belastung mit sich bringt. Diese mechanische Belastung hat die pflanzliche Architektur bis auf die Ebene der einzelnen Zelle hinab geprägt: Pflanzen sind daher zur Bewegungslosigkeit verdammt. Damit ändert sich auch die Strategie, wie Pflanzen den Widrigkeiten des Lebens begegnen müssen: Tiere laufen davon, Pflanzen passen sich an.

Die gesamte pflanzliche Entwicklung wird daher in weit höherem Maße abhängig von Signalen aus der Umwelt gesteuert und ist insgesamt viel weniger festgelegt und weit flexibler als bei tierischen Organismen. Dies wird sehr eindrücklich in der sogenannten **Totipotenz** pflanzlicher Zellen sichtbar: selbst differenzierte Zellen einer Pflanzen sind imstande, in Antwort auf bestimmte Signale (Pflanzenhormone) noch einmal die gesamte Entwicklung zu durchlaufen und aus einer einzigen Zelle eine komplette, neue Pflanze zu bilden, eine Fähigkeit, die in vielzelligen Tieren nur den heiß diskutierten Stammzellen zukommt.

■ Warum wir für Pflanzen eigene Modelle brauchen

Eine Entwicklung, die über drei Mrd. Jahre hinweg auf die Nutzung von Licht hin optimiert wurde, schuf natürlich Lebensformen, die sich grundsätzlich von anderen unterscheiden. Selbst bei den am höchsten entwickelten Pflanzen sind die einzelnen Zellen weniger differenziert, als man es etwa von tierischen Organismen her kennt. Alles in Pflanzen erscheint diffuser, variabler, weniger festgelegt. Anders als bei Tieren finden sich keine klar getrennten Organe. Selbst die landläufigen „Organe“ der Pflanze – Wurzel, Spross und Blatt – zeigen vielfältige Übergänge und können sich über sogenannte Metamorphosen sogar ineinander umwandeln. Viele Funktionen sind reichlich diffus über große Bereiche der Pflanze verteilt – so gibt es etwa keine Augen, sondern alle oberirdischen Zellen einer Pflanze sind mehr oder minder in der Lage, Licht wahrzunehmen; es gibt keine Nieren, sondern alle Zellen müssen ihre osmotische Balance selbst aufrechterhalten. Diese Unterschiede in der Organisation sind so grundsätzlich, dass es nur selten möglich ist, Schlussfolgerungen aus tierischen Modellen auf Pflanzen zu übertragen. Die Entwicklung eigener pflanzlicher Modellorganismen war daher ein zentraler Schritt, um die Biologie dieser für unseren Planeten wichtigsten Lebensform zu verstehen.

Natürlich geht es auch bei der modernen Pflanzenbiologie darum, die Funktion von Genen und ihr Zusammenspiel während der Entwicklung zu untersuchen (s. auch [Das Gen hinter Darwins Entdeckung](#)). Der Weg vom Genotyp zum Phänotyp ist bei Pflanzen weit stärker durch die Umwelt geprägt als bei den meisten anderen Organismen. Pflanzliche Modellorganismen sind daher besonders wichtig, wenn man klären will, wie Entwicklung, Morphogenese und Genexpression abhängig von Signalen aus der Umwelt gesteuert werden. Dies hat auch handfeste angewandte Aspekte: Die nachhaltige Sicherung der Ernährung beruht in Zeiten knapper werdender Ressourcen auf der

Fähigkeit von Kulturpflanzen, sich an Stressbedingungen wie Trockenheit, extreme Temperaturen oder Schadorganismen anpassen zu können. In Antwort auf Signale aus der Umwelt können Pflanzen zahllose Sekundärstoffe bilden, womit sie nicht nur die Herausforderungen ihrer Umwelt meistern, sondern auch in subtiler und hochkomplexer Weise andere Organismen manipulieren. Die meisten dieser mehr als einer Million nur bei Pflanzen vorkommenden Sekundärstoffe entfalten daher sehr spezifische Wirkungen auf Tiere und natürlich auch den Menschen – ein Reservoir, dessen Potenzial für die medizinische Anwendung nach wie vor erst ansatzweise ausgeschöpft ist.

■ Warum gerade *Arabidopsis*?

Dass ein recht unscheinbare Pflänzchen, das vor allem an Wegrändern und anderen, eher unwirtlichen Lebensräumen eine reichlich kümmerliche Existenz fristet (▣ Abb. 5.1),



▣ **Abb. 5.1** Die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L.) in ihrem natürlichen Habitat. (Bild Botanischer Garten, KIT)

sich seit den 1980er-Jahren zum *Shooting Star* der pflanzlichen Modellorganismen mauserte, mag zunächst verwundern. Aber die Ackerschmalwand (so der deutsche Name für *Arabidopsis*) kann eine ganze Reihe von Vorteilen vorweisen:

Mit ihren nur fünf Chromosomen, auf denen etwa 25.000 Gene untergebracht sind, die nur von etwa 10 % repetitiven Sequenzen begleitet werden, stellt *Arabidopsis* so etwas wie die genetische Minimalversion einer Pflanze dar. Selbst Reis, das Getreide mit dem kleinsten Genom, benutzt die dreifache Menge an Basenpaaren (► Kap. 6), und Weizen bringt gar 20-mal mehr DNA auf die Waage, wovon freilich 80 % auf repetitive Sequenzen entfallen. Das Genom von *Arabidopsis* war in seiner Kompaktheit daher das erste Pflanzen-genom, das vollständig entschlüsselt werden konnte.

Als sogenannter **Therophyt** (so nennt man Pflanzen, die aufgrund ihrer geringen Konkurrenzkraft als Samen im Boden überdauern und bei Störung der Vegetationsdecke in kurzer Zeit ihren Lebenszyklus vollziehen, bevor sie von stärkeren Konkurrenten überholt werden) ist die Ackerschmalwand auf Geschwindigkeit hin optimiert: Sechs Wochen von Keimung bis Samenbildung ist das Schnellste, was das Pflanzenreich für die genetische Forschung zu bieten hat.

Da *Arabidopsis* auch in freier Wildbahn nicht gerade verwöhnt ist, lässt sich diese Modellpflanze sehr einfach im Labor kultivieren, stellt nur wenig Ansprüche und überlebt problemlos sogar suboptimale Behandlung durch gärtnerische Dilettanten.

Die robuste und im Vergleich zu den meisten Pflanzen etwas stereotype Entwicklung von *Arabidopsis* machte es leicht, den phänotypischen Effekt von Mutationen zu deuten. Weltweit genutzte und vernetzte riesige Sammlungen mit mehr als 300.000 gut charakterisierten und in öffentlichen Datenbanken beschriebenen Mutanten decken inzwischen fast alle Gene ab. Dies erleichtert die Aufklärung von Funktionen neu entdeckter Gene (reverse Genetik) ungemein.

Das Gen hinter Darwins Entdeckung – hundert Jahre Phototropismus

Fasziniert von ihrer Andersartigkeit stellte Darwin gemeinsam mit seinem Sohn Francis in dem Buch „The Power of Movement in Plants“ (1881) die Frage, wie Pflanzen, ohne ein Nervensystem zu besitzen, sich durch gezieltes Wachstum an ihre Umwelt anpassen können. Eines der Phänomene, das ihn besonders beschäftigte, war der Phototropismus, also die Fähigkeit vieler Pflanzen, auf eine Lichtquelle hin zu wachsen. Er grub Keimlinge bis zur Spitze in Sand ein und stellte fest, dass die Richtung des Lichts in der Spitze der Pflanze wahrgenommen wird, während die Krümmung in einer Zone weiter unten stattfand – also dort, bis wohin bei diesem Versuch gar kein Licht vordringen konnte (▣ Abb. 5.2a). Er schloss daraus, dass die belichtete Spitze einen Reiz durch die Pflanze nach unten in die wachsende Zone des Sprosses schicken musste. Etwa ein halbes Jahrhundert später gelang es aufgrund der Erkenntnisse von Frits Went (1928) und Nikolai Cholodny (1927), dieses Signal zu identifizieren: Auxin, das wohl wichtigste Pflanzenhormon. In den hundert Jahren nach Darwins Entdeckung wurde der Phototropismus in großer Ausführlichkeit formalphysiologisch untersucht. Die molekulare Natur des Photorezeptors, der das Licht wahrnimmt, blieb jedoch im Dunkeln.

Es war die Ackerschmalwand, die den Durchbruch brachte: In der Arbeitsgruppe von Winslow Briggs wurden Mutanten identifiziert, die nicht mehr in der Lage waren, sich phototropisch zu krümmen (Liscum und Briggs 1995). Dazu wurde zunächst eine Mutagenese mit schnellen Neutronen durchgeführt. Die gewaltige Zahl von 140.000 Pflanzen wurde durchmustert (sog. *Screening*). Die Dosis der Neutronenbestrahlung

war so gewählt, dass im Mittel in jedem Samen eine Mutation zu erwarten war. Da Mutationen zufällig auftreten, sollte man mit dieser Zahl von Pflanzen für die meisten Gene eine mutierte Version finden. Nun wurden diese Keimlinge mit seitlichem Blaulicht einer zuvor definierten Dauer und Intensität bestrahlt, sodass sich die meisten Keimlinge zum Licht hin krümmten. Einige Keimlinge blieben gerade – darunter waren natürlich auch solche, die einfach kurz geblieben waren. Hier war also einfach das Wachstum gehemmt, womit gleichzeitig auch keine phototropische Reaktion möglich war – diese Mutanten waren natürlich nicht so interessant. Einige Mutanten waren jedoch genauso lang wie die unbestrahlten Kontrollpflanzen und krümmten sich dennoch nicht – diese Pflanzen waren das, was man gesucht hatte. Hier war das Wachstum nicht betroffen, aber offenbar die Wahrnehmung oder Verarbeitung des Lichtreizes unterbrochen (▣ Abb. 5.2b). Um ein Bild zu gebrauchen: Wenn ein Gefangener nicht zur geöffneten Tür gehen kann, weil ihm die Beine fehlen, heißt das noch lange nicht, dass er blind ist. Man suchte in diesem Screen jedoch nach Mutanten, die blind sind. Durch Kreuzung fand man heraus, dass diese Mutanten vier unterschiedlichen Genorten (sog. *Loci*) entsprachen. Wie lässt sich so eine Aussage treffen, wenn man die Natur des betroffenen Gens doch noch gar nicht kennt? Ganz einfach: durch klassische Kreuzung. Wenn zwei Mutanten, die an verschiedenen Loci betroffen sind, gekreuzt werden, sollten ihre Nachkommen jeweils eine intakte Kopie erhalten und daher „geheilt“ sein (▣ Abb. 5.2c), also wieder Phototropismus zeigen (jedenfalls im Falle von rezessiven Mutationen). Unter diesen vier Gruppen von Mutanten, die

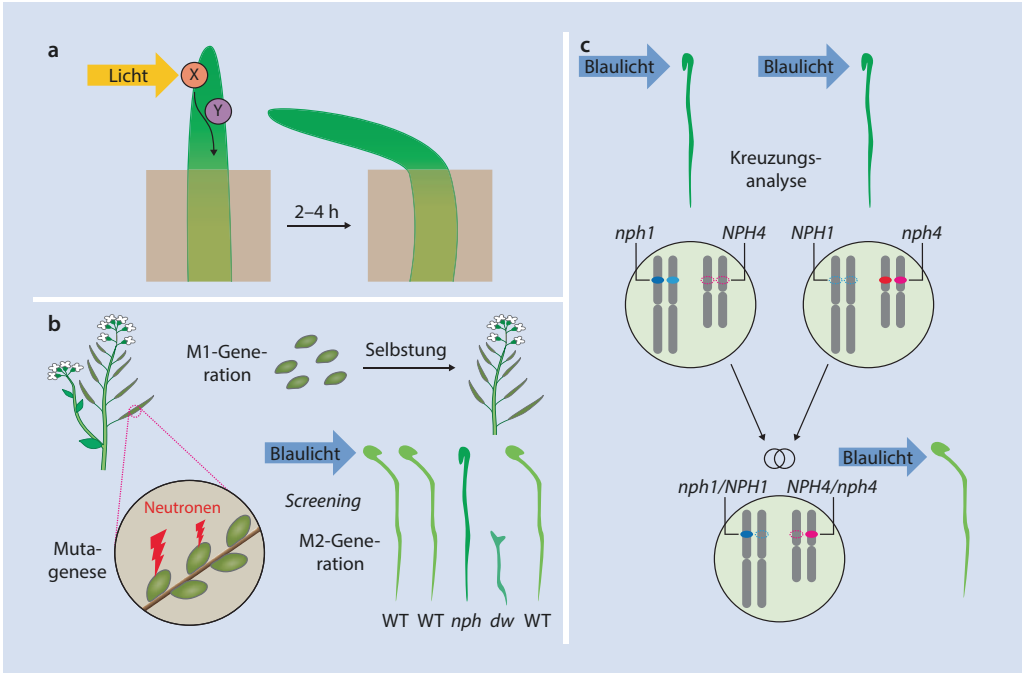


Abb. 5.2 Wie man Mutanten für den Photorezeptor des Phototropismus fand. **a** Darwins Nachweis, dass die Lichtrichtung in der Spitze von Süßgraskeimlingen über einen Photorezeptor (X) wahrgenommen und über ein unbekanntes Signal (Y) nach unten in die Wachstumszone geleitet wird. Das Signal Y wurde später als das Pflanzenhormon Auxin identifiziert. **b** Isolierung von Arabidopsis-Mutanten, bei denen der Photorezeptor X betroffen ist. Es wurden Samen ungerichtet mutagenisiert (in diesem Falle durch schnelle Neutronen). Diese Samen der M1 (mutagenisierte Generation 1) wurden hochgezogen und die Pflanzen geselbstet (Selbstbefruchtung). Grund: Die meisten Mutationen sind rezessiv, werden also in der M1 nicht ausgeprägt. In der nächsten Generation sollten sie in einem Viertel der Nachkommenschaft sichtbar werden. Die Keimlinge dieser M2-Generation werden einem sogenannten Screening unterzogen: Man bestrahlt mit seitlichem Blaulicht, um eine phototropische Krümmung auszulösen. Die meisten Keimlinge krümmen sich, sind also hinsichtlich des Phototropismus normal (Wildtyp, WT), manche krümmen sich nicht, weil sie im Wachstum betroffen sind (Zwerg- oder Dwarf-Mutanten, dw). Gesucht wird nach Mutanten, die normal wachsen, sich aber dennoch nicht krümmen. Bei diesen *nph*- (für *non-phototropic*) Mutanten ist also möglicherweise der gesuchte Photorezeptor mutiert. **c** Funktionelle Komplementierung durch Kreuzung. Wenn eine homozygote *nph1*-Mutante (betroffen in Chromosom 3) mit einer homozygoten *nph4*-Mutante (betroffen in Chromosom 5) gekreuzt wird, entstehen in der F1 Pflanzen, die in beiden Genorten heterozygot sind. Der Phototropismus wird durch die Kreuzung also „geheilt“, und das ist ein Hinweis, dass die beiden Mutanten in unterschiedlichen Genorten mutiert sind

nph1 bis -4 (für *non-phototropic*) getauft wurden, war *nph1* am spannendsten, weil hier der Phototropismus komplett ausgefallen war. Mehrere unterschiedliche Linien waren in diesem Locus mutiert. Bei allen fehlte eine durch Blaulicht ausgelöste Phosphorylierung eines noch nicht identifizierten, 120 kDa großen

Membranproteins, die im Wildtyp wenige Sekunden nach Belichtung zu beobachten war. Signale werden in den meisten Fällen durch membranständige Rezeptorproteine wahrgenommen, was dann oft durch eine Kinase-Kaskade von der Plasmamembran zum Zellkern weitergemeldet wird. Aus diesen

Überlegungen heraus wurde *nph1* als heißer Kandidat für den Rezeptor des Phototropismus gehandelt. Molekular identifiziert war der Photorezeptor damit noch lange nicht. Jahrelang hatte man versucht, aus Plasmamembranen verschiedener Pflanzen solche Proteine zu reinigen, die durch Blaulicht schnell phosphoryliert werden. Dies war unendlich mühsam und brachte nicht den erhofften Durchbruch. Auch hier war es letztendlich ein genetischer Ansatz, der zum Ziel führte. Mit ihrer extrem kurzen Generationsfolge war *Arabidopsis* hier das Modell der Wahl, weil sich hier eine Mutation mit dem in ► Abschn. 5.2.3 beschriebenen Verfahren des *Map-based Cloning* gut und schnell kartieren lässt: Hierzu wird die Mutante mit einer möglichst unterschiedlichen *Arabidopsis*-Pflanze (die einem anderen sog. Ökotyp entspricht) gekreuzt, eine möglichst große F₂-Population erzeugt und dann über genetische Kartierung der Ort der Mutation möglichst genau eingegrenzt. Im Falle von *nph1* konnte gezeigt werden, dass die Mutation nur etwa 26 cM (Centimorgan) von dem morphologisch gut erkennbaren Marker *glabra1* (der für die Bildung von Haaren wichtig ist – solche Mutanten sind also gleichsam „nackt“) entfernt war. Das ist molekulargenetisch gesehen immer noch eine riesige Distanz, auf der Hunderte von Genen liegen können. Man wiederholte daher das Verfahren nun mit molekularen Markern, die über PCR nachweisbar sind, und suchte nach solchen, die näher an *nph1* lagen. Tatsächlich gelang es, zwei solcher Marker zu finden, die am Ende nur noch 0,3 cM entfernt lagen. An dieser Stelle nutzte man nun die Hilfe eines ganz anderen Modellorganismus, nämlich Hefe (► Kap. 3). Man hatte nämlich das gesamte Genom von *Arabidopsis* in handliche Stücke zerschnitten, diese in

sogenannte *Yeast Artificial Chromosomes* (YACs) verpackt und das Ganze in Hefe eintransformiert. Die Mengen wurden so eingestellt, dass jede Hefezelle im Mittel ein solches YAC abbekam. Man erhielt also eine Sammlung von Hefeklonen, die das gesamte *Arabidopsis*-Genom abbildeten (eine sog. YAC-Bibliothek). Nun musste man nur noch den Hefeklon finden, der das YAC mit dem *nph1* enthielt (► Abb. 5.3). Dies gelang über PCR mit den neu gefundenen eng benachbarten Markern. Jetzt musste das in der PCR amplifizierte DNA-Fragment nur noch sequenziert werden.

In diesem YAC waren natürlich immer noch mehrere Gene enthalten. Aber durch Vergleich der Sequenzen aus Wildtyp und den *nph1*-Mutanten gelang es, den DNA-Abschnitt zu finden, wo sich beide Versionen unterschieden. Bei manchen der *nph1*-Mutanten war nur eine einzige Base ausgetauscht, bei anderen war der ganze Bereich bei der Neutronenbestrahlung zerschlagen und dann verkehrt wieder zusammengesetzt worden.

Was war das nun für ein Gen? NPH1 stellte sich als eine 120 kDa große Serin-Threonin-Proteinkinase heraus, hatte also genau die gleiche Größe wie das schon bekannte Membranprotein, dessen Phosphorylierung bei der *nph1*-Mutante nicht nachweisbar war. Weiterhin enthielt dieses Protein zwei sogenannte LOV-Domänen, die man von anderen Organismen schon als Bindestelle für Flavine kannte. Flavine absorbieren blaues Licht, ihr Spektrum ähnelt bis ins Detail dem Wirkungsspektrum des Phototropismus. Das klingt alles sehr überzeugend, war aber noch kein echter Beweis dafür, dass die Mutation dieses Proteins wirklich die Ursache des fehlenden Phototropismus war. Es könnte ja dennoch sein (auch wenn es nicht sehr wahrscheinlich wirkt),

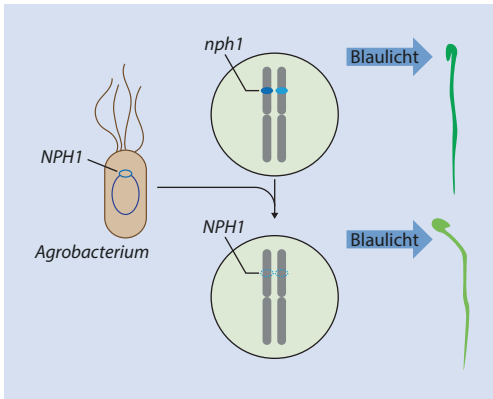


Abb. 5.3 Beweis, dass *NPH1* den Photorezeptor des Phototropismus codiert. Dieser Beweis wurde über funktionelle Komplementation durch Transformation geführt. Aus umfangreichen genetischen Kartierungen wurden die Chromosomenbereiche identifiziert, wo die *nph1*-Mutation sitzt. Durch Transformation der Mutanten mit Chromosomenstücken von *Arabidopsis*-Wildtyp, die in den Modellorganismus Hefe eingeführt wurde (*yeast artificial chromosomes*), konnte der Phototropismus wiederhergestellt werden (sog. *rescue*). Durch Eingrenzung der eingebrachten Gene konnte man so schließlich den mutierten *NPH1*-Locus genau bestimmen

dass eine zweite, unerkannte Mutation verantwortlich ist. Der Beweis wurde nun so geführt, dass man eine intakte Version des mutmaßlichen *NPH1*-Gens in die *nph1*-Mutante eintransformierte. Siehe da, die transgenen Mutanten waren nun wieder in der Lage, sich phototropisch zu krümmen (Abb. 5.3). Durch diese funktionelle Komplementation (sog. *rescue*) war gezeigt, dass eine intakte Version des *NPH1*-Gens *notwendig* und *hinreichend* ist, um nach Belichtung Phototropismus auszulösen. Mehr als hundert Jahre nach Darwins Entdeckung war es damit gelungen, den Photorezeptor zu isolieren. Dass dies ausgerechnet mithilfe des Modellorganismus *Arabidopsis* gelang, war für viele in diesem Feld überraschend: Der Phototropismus von *Arabidopsis* ist

nämlich nicht sehr ausgeprägt und auch nicht so „ordentlich“ wie der von Getreidekeimlingen, dem System, mit dem Darwin, Cholodny und Went gearbeitet hatten. Auch die Biochemie von *Arabidopsis* ist aufgrund der Zwergenhaftigkeit dieser Pflanze und der zahlreichen sekundären Pflanzenstoffe alles andere als einfach. Es war letztlich die exzellente Genetik in diesem Modellorganismus, die den Durchbruch brachte.

5.2 Methoden und Ansätze

Die Zuordnung biologischer Funktionen zu einzelnen Genen nutzt bei vielen Modellorganismen (z. B. Hefe) die Technik der **homologen Rekombination**. Dabei werden einzelne Gene *gezielt* ausgeschaltet oder verändert. Dazu wird ein Konstrukt eingebracht, das bestimmte Erkennungssequenzen trägt, die das Konstrukt zu ganz bestimmten Stellen des Genoms leitet und dort integriert. Bei Pflanzen gibt es eine solche homologe Rekombination jedoch nicht (in ▶ Abschn. 5.5 sind neueste Entwicklungen beschrieben, um diese Limitierung des Modells *Arabidopsis* zu überwinden). Bei der Transformation werden die eingebrachten Konstrukte also irgendwo ins Genom der Zielzelle eingebaut. Diese Besonderheit der höheren Pflanzen – auch bei der Modellpflanze Reis ist das so, ▶ Kap. 6, während bei Moosen, zu denen die Modellpflanze *Physcomitrella* gehört, eine homologe Rekombination möglich ist – beeinflusst natürlich die Strategie, wie man Vorwärts- und reverse Genetik durchführen kann, ganz entscheidend. Da Mutationen und Transformationen nicht gezielt durchgeführt werden können, sind für *Arabidopsis thaliana* genetische Screens umfangreicher Mutantensammlungen zentral. In weltweit vernetzten Datenbanken und Mutantensammlungen werden die dabei gewonnenen Informationen und Mutanten einer großen Zahl von Forschungsgruppen zugänglich gemacht. Bei

der Arbeit mit *Arabidopsis thaliana* ist daher die Zusammenarbeit der zahlreichen Labors, die über diesen Modellorganismus forschen, besonders wichtig (sog. *Network Payoff*).

5.2.1 Mutantenkollektionen

Da die molekulare Maschinerie für eine homologe Rekombination bei *Arabidopsis thaliana* nicht vorhanden ist oder zumindest bislang nicht aktiviert werden konnte, kann man ein Gen von Interesse nicht gezielt ausschalten. Man ging daher einen alternativen Weg und baute umfangreiche Kollektionen von Mutanten auf, in denen man dann nach einem bestimmten Phänotyp (Vorwärtsgenetik) oder einem bestimmten mutierten Gen (reverse Genetik) sucht. Hierfür werden, je nach Zielrichtung, unterschiedliche Strategien der Mutagenese eingesetzt, die unten beschrieben sind. Die Zahl von Mutanten ist über die Jahre inzwischen so groß geworden, dass für fast alle Gene mehrere Mutanten zur Verfügung stehen. Damit nicht jedes Labor von Neuem die aufwendige genetische und phänotypische Aufklärung dieser Mutanten durchführen muss, wird in weltweit zugänglichen Datenbanken alles genetische und phänotypische Wissen, was es jeweils zu einer Mutante gibt, vernetzt. Das erspart viel Arbeit und erlaubt es, deutlich schneller die Verbindung zwischen Gen und Funktion zu ziehen.

Um solche Mutantenkollektionen zu erzeugen, geht man im Wesentlichen zwei unterschiedliche Wege:

- Bei der **induzierten Mutagenese** werden über Bestrahlung oder über chemische Substanzen Mutationen erzeugt, die entweder auf dem Austausch einzelner Basen (Punktmutationen, die Regel für chemische Mutagenese) oder dem Verlust kurzer, manchmal auch längerer Basenfolgen (Deletionen, die Regel für strahlungsinduzierte Mutagenese) beruhen.

- Bei der **Insertionsmutagenese** wird mithilfe des pflanzenpathogenen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* ein mobiles DNA-Stück (die sog. T-DNA) aus dem Ti-Plasmid (für *tumour-inducing*) in das Genom von *Arabidopsis thaliana* eingefügt. Man nimmt an, dass die T-DNA zufällig im Genom eingebaut wird. Da die Sequenz der T-DNA bekannt ist, kann man nun mithilfe von PCR-basierten Verfahren die flankierenden Sequenzen identifizieren. Da das Genom von *Arabidopsis* bekannt ist, kann man damit auch sagen, wo die T-DNA-Insertion sitzt. Diese Information wird in einer Datenbank abgelegt und ist zunächst eigentlich nicht sehr spannend. Spannend wird es erst, wenn irgendwo auf der Welt jemand sich für dieses Gen interessiert, in der Datenbank diese Mutantenlinie herausucht und dann Samen davon bestellt. Eine ähnliche, historisch ältere Strategie benutzt springende Gene (sog. Transposonen), hat aber bei *Arabidopsis thaliana* gegenüber der T-DNA-Mutagenese stark an Bedeutung verloren (für andere Modellpflanzen, vor allem Reis, sieht das anders aus, Näheres in ► Kap. 6).

Im Folgenden werden diese beiden Strategien etwas genauer betrachtet, damit die jeweiligen Vor- und Nachteile dieser Ansätze sichtbar werden.

■ Induzierte Mutagenese

Klassische Mutagenese wird vor allem auf chemischem Wege durch Ethylmethansulfonat (EMS) erreicht, in manchen Fällen setzt man auch Bestrahlung mit schnellen Neutronen ein. Im Vergleich zur Insertionsmutagenese ist die induzierte Mutagenese tatsächlich weitgehend symmetrisch. Ein kritischer Punkt, an dem sich Erfolg und Misserfolg dieser Strategie letztlich entscheiden,

sind die Intensität der Mutagenese und die Größe der mutagenisierten Population. Hier geht es einerseits darum, möglichst für alle Gene von *Arabidopsis* eine Mutation zu erzeugen, andererseits sollten die Mutantenlinien möglichst nur an einer Stelle mutagenisiert sein, weil andernfalls die Zuordnung von Genotyp und Phänotyp zweideutig wird (und Beispiele für solche Fehlinterpretationen sind recht zahlreich). Bei dieser Kalkulation überlegt man, wie viele Zellen des Embryos (aus praktischen Gründen werden vor allem Samen mutagenisiert) zu den Keimzellen der nächsten Generation beitragen (nur die Mutationen in diesen Zellen werden schließlich vererbt). Außerdem gibt es Erfahrungswerte für die durch eine bestimmte Behandlung erzeugte Wahrscheinlichkeit, dass ein Gen mutiert wird. Diese Wahrscheinlichkeit folgt einer Poisson-Verteilung – diese asymmetrische Verteilung kann man zum Beispiel auch anwenden, wenn man ausrechnen will, wie viele Pflastersteine von einem, von zwei oder von drei Regentropfen getroffen werden. Aus solchen Berechnungen kommt man zu Schätzungen, dass eine Behandlung von wenigen tausend Samen mit 15 mM EMS für 12 h ausreichend ist, um mindestens drei Allele pro Genort zu erzielen. Da die meisten Mutationen rezessiv sind (es geht ja eine Funktion verloren; solange ein funktionelles Allel vorhanden ist, sieht man daher oft keinen Phänotyp), muss man wieder erst eine Runde Selbstbefruchtung einlegen, bis man dann in der folgenden Generation (der sog. M2) nach dem Phänotyp von Interesse suchen kann. Da im reifen Embryo etwa zwei Zellen zur Keimbahn der nächsten Generation beitragen werden, hat man in der M1 in der Regel genetische Chimären. Man muss die Samen also von verschiedenen Regionen des Blütenstandes ernten, um sicher zu sein, dass man homozygot mutierte Samen findet. Die induzierte Mutagenese erlaubt Vorwärtsgenetik, eine reverse Genetik (Zuordnung einer Funktion zu einem zuvor bekannten Gen) ist hier im Gegensatz zu den

Insertionsmutanten zunächst einmal nicht möglich.

■ Insertionsmutagenese durch T-DNA

Agrobacterium tumefaciens ist ein Bodenbakterium, das durch Verwundungstoffe angelockt wird und sich an verletzten Wurzeln von zweikeimblättrigen Pflanzen ansiedelt. Mithilfe des Ti-Plasmids kann es die Wirtszellen so umsteuern, dass ein wucherndes Gewebe entsteht, das besondere Aminosäuren herstellt, die Opine, die sonst in der Pflanze gar nicht vorkommen und die das Bakterium als exklusive Nahrungsquelle nutzen kann. *Agrobacterium* lebt also in diesem Tumorgewebe wie die Made im Speck. Das Ti-Plasmid codiert verschiedene Proteine, die für diese komplexe Umsteuerung notwendig sind, beispielsweise Proteine, die einen Kanal bilden, durch den dann der eigentliche Übeltäter, die T-DNA, in die Wirtszelle eindringen kann. Diese T-DNA wird dann fest ins Genom des Wirts eingebaut und bei jeder Zellteilung als Trittbrettfahrer weitergegeben. Die T-DNA trägt einerseits Gene für hormonelle Wachstumsfaktoren der Pflanze (dadurch kommt es zur Tumorbildung), andererseits Gene, die für die Bildung der unkonventionellen Aminosäuren (der Opine) verantwortlich sind (damit stellt *Agrobacterium* sicher, dass ihm niemand die Beute vom Teller stiehlt, weil andere Zellen mit diesen Opinen nichts anfangen können). Die Details dieses Piratenstücks finden sich in ► Kap. 1. Für die Insertionsmutagenese hat man nun die T-DNA „entwaffnet“, diese Gene herausgeschnitten und nur die Sequenzteile übriggelassen, die für den Transfer in die Wirtszelle und den Einbau ins Genom notwendig sind. Damit wird verhindert, dass die Mutanten Tumoren tragen, wodurch sie für die Untersuchung von Funktionen wertlos würden. Neben der „Entwaffnung“ wird an der T-DNA noch eine zweite Änderung angebracht – man fügt einen sogenannten **Selektionsmarker** ein. In der Regel handelt es sich um ein Enzym, das ein bestimmtes Antibiotikum (zumeist

Hygromycin oder Kanamycin), alternativ das Totalherbizid BASTA, abbauen kann. In Gegenwart der selektiven Substanz (Hygromycin, Kanamycin oder BASTA) überleben also nur jene Zellen, die eine T-DNA in ihr Genom eingebaut haben. Die überlebenden Pflanzen sind also mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch tatsächlich transgen – eine solche Selektion spart viel Zeit, Geld und Arbeit. Die Entwicklung solcher Selektionsmarker war einer der Gründe, warum die T-DNA-Mutagenese so erfolgreich wurde. Der zweite Grund war die Entwicklung einer Methode, womit die Zielpflanze mit einer sehr hohen Effizienz transformiert werden kann. Dies wurde durch die sogenannte *Floral-Dip*-Methode (► Abschn. 5.2.2) möglich gemacht. Damit konnten binnen kurzer Zeit Zehntausende von transformierten Linien erzeugt werden. Da die T-DNA ungerichtet ins Genom eingebaut wird, entstehen aus einem Transformationsansatz mehrere unterschiedliche Mutantenlinien. Daher wird die Nachkommenschaft einer solchen Transformation (die T1) erst noch einmal selbstbefruchtet und dann die T2-Generation analysiert. Obwohl diese Strategie ungeheuer erfolgreich war, sind viele Einzelheiten der T-DNA-Insertion noch nicht verstanden. Beispielsweise ist es noch unklar, warum die T-DNA an bestimmten Stellen des Genoms inseriert (die Insertion erfolgt zwar ungerichtet, ist aber nicht vollkommen symmetrisch – es gibt also durchaus Stellen des Genoms, die von der T-DNA „verschmäht“ werden, und für diese Stellen ist es dann auch schwierig, Insertionsmutanten zu finden). Außerdem hängt die Wahrscheinlichkeit für den Einbau der T-DNA davon ab, in welchem physiologischen Zustand sich die Zielzelle befindet. Vor Kurzem konnte man zeigen, dass die Insertion beim *Floral Dip* relativ spät in der Entwicklung erfolgt, wenn die „Keimbahn“ für die männlichen und die weiblichen Keimzellen schon festgelegt ist. Vor allem der Embryosack (also der weibliche Gametophyt) scheint bevorzugtes Ziel der T-DNA zu sein. Häufig kommt es bei der

Insertion zu komplizierten Abweichungen – so können Tandems oder Fragmente von T-DNA-Sequenzen eingebaut werden, oder es gibt Mehrfachinsertionen an verschiedenen Stellen. Dies wird häufig ignoriert und führt dann zu Fehlschlüssen. Daher ist es wichtig, dass für T-DNA-Linien immer eine sogenannte **Genotypisierung** durchgeführt wird. Dabei wird mithilfe von *Southern Blotting*, ergänzt durch PCR-basierte Verfahren, überprüft, ob die T-DNA vollständig und nur an dieser Stelle eingebaut wurde. Wie bei allen Mutantenansätzen sollte man durch mehrere Generationen von Selbstbefruchtung sicherstellen, dass man es mit einer Einfach-Insertion zu tun hat. Nur so kann die eindeutige Zuordnung Gen-Funktion sichergestellt werden. Der ganz große Vorteil der T-DNA-Mutagenese ist die Möglichkeit, reverse Genetik zu betreiben – wenn, mithilfe einer Datenbank, Mutanten im Gen von Interesse aufgespürt sind, kann man sich diese aus der Sammlung zuschicken lassen und dann, natürlich nach Überprüfung des Genotyps, den zugehörigen Phänotyp suchen.

■ Insertionsmutagenese durch Transposonen

Die Entdeckung der „springenden Gene“ (Transposonen) durch Barbara McClintock (1950) war die Grundlage einer alternativen Form der Insertionsmutagenese. Die biologische Funktion dieser mobilen genetischen Elemente liegt vermutlich darin, die genetische Variabilität als Rohmaterial für evolutionäre Veränderungen zu steigern. Technisch kann man mit Transposonen aber auch recht einfach Mutationen erzeugen. Hierfür wurden durch Transformation zwei Transposonsysteme aus Mais (*Ac/Ds* bzw. *En/I*) in *Arabidopsis thaliana* eingebracht. Diese Systeme bestehen aus zwei Komponenten – einem Aktivator (z. B. *Ac*), der die Mobilisierung der zweiten Komponente (z. B. *Ds*) aktiviert. Beide Komponenten müssen also zusammenkommen, damit die Gene zu springen beginnen. Man benutzt daher zwei Starterlinien von *Arabidopsis*, denen jeweils eine der beiden Komponenten

des Mais-Transposonsystems eingefügt wurde (z. B. eine Ac- und eine Ds-Linie). Durch Kreuzung kommen die beiden Elemente zusammen, und es entstehen Mosaikpflanzen, die dann in der F₂-Generation unterschiedliche Mutanten liefern. Um die Mutanten stabil zu halten, muss man das System aber auch wieder abschalten können. Dies geschieht durch relativ komplexe Selektionsstrategien (die beiden Transgene sind mit unterschiedlichen Selektionsmarkern gekoppelt), die auch nicht hundertprozentig zuverlässig sind. Aufgrund dieser Komplexität spielt Transposonmutagenese im Vergleich zu T-DNA-Insertionsmutagenese inzwischen eine nur noch untergeordnete Rolle und sei hier nur der historischen Vollständigkeit halber erwähnt.

■ Nutzung natürlicher Diversität

Als Ausgangsmaterial für die Mutantensammlungen ging man von einer Handvoll sogenannter **Ökotypen** (wie Landsberg *erecta*, Columbia oder Wassilewska) aus. Diese leiten sich eigentlich von Feldsammlungen ab. Da aber *Arabidopsis thaliana* sich natürlicherweise nur zu einem sehr geringen Grade auskreuzt, sind diese Ökotypen im Grunde genetisch in den meisten Loci einheitlich. Wenn ein bestimmtes Gen in einem solchen Ökotyp ohnehin schon inaktiviert ist (dies kann entweder durch eine Mutation, aber auch durch sog. *Silencing* auftreten), ist es in der aus einem solchen Ökotyp abgeleiteten Mutantensammlung natürlich schwer oder gar unmöglich, sogenannte *Loss-of-Function*-Mutationen in dem entsprechenden Gen zu finden. In solchen Fällen kann man jedoch die große natürliche Variation innerhalb der Art *Arabidopsis thaliana* nutzen, die ja weltweit vorkommt, sodass zahlreiche solcher Ökotypen zur Verfügung stehen. Dies ist vor allem auch dann interessant, wenn man es mit Merkmalen zu tun hat, die fließend sind (sog. *quantitative Traits*). Man kann dann Ökotypen kreuzen, die sich hinsichtlich dieses Merkmals stark unterscheiden und dann mithilfe spezieller statistischer Verfahren herausfinden, welcher der zahlreichen

Markerunterschiede mit dem Merkmal korreliert ist. Auf diese Weise gelang es zum Beispiel durch eine Kreuzung zwischen Landsberg *erecta* und einem Ökotyp von den Kapverdischen Inseln, molekulare Komponenten der circadianen Uhr zu identifizieren.

5.2.2 Transformation

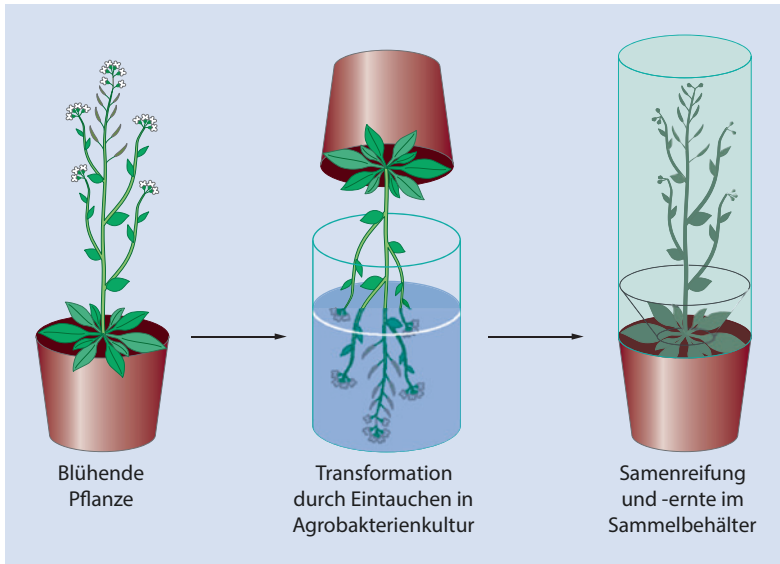
Mutationen führen in der Regel zu einem Ausfall der entsprechenden Genfunktion (*Loss of Function*). Im Gegensatz dazu kann auch ein Gen neu eingeführt oder verstärkt exprimiert werden, um Einblick in seine Funktion zu erhalten. Eine solche *Gain-of-Function*-Strategie setzt voraus, dass der Modellorganismus genetisch transformiert werden kann. Die Transformation von Pflanzen wurde deutlich früher entwickelt als die Transformation vielzelliger Tiere. Hintergrund ist die sogenannte Totipotenz der pflanzlichen Zelle, eine Eigenschaft, die bei Tieren nur den viel diskutierten pluripotenten Stammzellen zukommt.

Eigentlich ist Totipotenz eine Eigenschaft, die sich aus der Mitte des 19. Jahrhunderts formulierten Zelltheorie von Schwann und Schleiden ableitet. Wenn wirklich die Zelle als Grundeinheit des Lebens fungiert, sollte sie auch für vielzellige Organismen in der Lage sein, alle Lebensfunktionen hervorzubringen. Der experimentelle Nachweis dieser Voraussage war freilich nicht einfach. Zwar gelang es schon 1907, Zellkulturen aus tierischem Gewebe herzustellen, aber daraus tierische Organe zu regenerieren, blieb fast ein Jahrhundert ein unerfülltes Ziel und wurde letztendlich erst durch die Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen ermöglicht. Die Erzeugung pflanzlicher Zellkulturen hinkte zunächst hinterher und war erst 1939 erfolgreich, aber als man in den 1950er-Jahren entdeckte, dass sich die Entwicklung pflanzlicher Zellen durch Phytohormone, vor allem Auxine und Cytokinine, in weiten Grenzen steuern lässt, war der Weg frei: Schon 1965 gelang Vasil und Hildebrandt die erste vollständige Regeneration einer Pflanze aus einer einzelnen

Körperzelle. Bei dieser somatischen Embryogenese wird ein differenziertes Gewebe (etwa ein Blattstück) durch Behandlung mit Auxinen in ein ungezügelt proliferierendes, sogenanntes Kallusgewebe umgewandelt. Diese Kalluszellen können nun, beispielsweise über das oben beschriebene *Agrobacterium*-System, transformiert werden. Durch einen auf der T-DNA eingebauten Selektionsmarker (in der Regel ein Gen, das eine Antibiotikaresistenz vermittelt, häufig auch ein Gen, das eine Resistenz gegen ein Totalherbizid kodiert) kann man die nicht transformierte Zellen des Kallus durch Anzucht auf dem selektiven Medium (also dem Antibiotikum) ausmerzen, sodass nur die erfolgreich transformierten Zellen übrigbleiben. Nun wird im nächsten Schritt das Phytohormon Cytokinin zugesetzt und Auxin weggelassen. Dadurch werden die Zellen angeregt, sich zu differenzieren und einen Embryo zu bilden, der schon nach kurzer Zeit nicht von einem auf natürlichem Wege entstandenen Embryo zu unterscheiden ist. Die aus dem Kallus auswachsenden Pflänzchen tragen nun das eingeführte Gen und können entnommen und in ganz gewöhnliche Erde umgesetzt werden. Nach der Blüte bilden sie Samen, die teilweise transgen sind (Achtung: die T-DNA wurde ja nur in eine Kopie des jeweiligen Chromosoms eingefügt, die transgene Pflanze ist also bezüglich des Transgens heterozygot). Durch eine zweite Selektionsrunde, oft ergänzt durch molekulargenetische Untersuchungen (das Transgen oder, noch einfacher, der Selektionsmarker, lassen sich durch PCR-basierte Methoden oder einen Southern Blot nachweisen) kann man dann homozygot transgene Linien erzeugen. Diese geben das eingeführte Gen auf natürlichem Wege genauso weiter wie die anderen Gene auch.

Genetische Transformation von Pflanzen beruht also auf der Fähigkeit zur **somatischen Embryogenese**. Die ersten transgenen

Pflanzen stammten daher aus Arten, die sehr leicht einen Kallus bilden und daraus nach Cytokininbehandlung eine neue Pflanze bilden können. Das ist vor allem für die Nachtschattengewächse der Fall. Die ersten transgenen Pflanzen waren daher Tabak, bald gefolgt von Tomate und Kartoffel. Die Brassicaceen, zu denen auch *Arabidopsis* zählt, galten viele Jahre lang als nicht vernünftig transformierbar. Dies änderte sich schlagartig durch eine neue und einfache Methode, die zudem noch eine sehr hohe Rate von transformierten Pflanzen liefert. Bei dem *Floral Dip* wird eine kurz vor der Blüte befindliche Pflanze einfach kopfüber in eine Suspension von Agrobakterien getaucht, die zuvor mit dem Zielgen transformiert worden waren (■ Abb. 5.4). Durch Anlegen eines milden Vakuums dringt die Suspension in die Interzellularen ein. Dadurch werden viele Zellen transformiert, mit einer recht hohen Wahrscheinlichkeit sind darunter auch die Vorläuferzellen der Keimbahn. Offenbar scheint vor allem der weibliche Gametophyt (der sog. Embryosack) sehr leicht T-DNA aufzunehmen. Damit wird also auch die Eizelle transgen, die daraus entstehenden Samen sind also für das Transgen heterozygot. Werden die Sämlinge mithilfe eines ebenfalls eingebrachten Selektionsmarkers selektiert, überleben nur diese Transformanten. Durch eine – bei *Arabidopsis* natürlicherweise ohnehin dominierende – Selbstbefruchtung entstehen dann in der nächsten Generation zu einem Viertel homozygot transgene Pflanzen, die dann diese Eigenschaft stabil weitervererben. Das *Floral Dip* erlaubt also eine Transformation, ohne dass dazu der Weg über somatische Embryogenese notwendig ist. Dieser Durchbruch bei der Transformationstechnologie ergänzt damit die Mutantensammlungen und macht *Arabidopsis* zum zentralen genetischen Modellsystem der Pflanzen.



▣ **Abb. 5.4** Transformation von *Arabidopsis* mithilfe der *Floral-Dip*-Methode

5.2.3 Vom Phänotyp zum Gen – *Map-based Cloning* und T-DNA

Wenn das Genom eines Organismus sequenziert ist, kann man damit zunächst noch nicht sehr viel anfangen. Erst wenn man herausgefunden hat, welche Funktion die einzelnen Gene ausüben, wird dieses molekulare Wissen fruchtbar. Um bei *Arabidopsis* den einzelnen Genen ihre biologische Funktion zuzuordnen zu können, sind die in Mutantenkollektionen aufgespürten Phänotypen nach wie vor sehr wichtig. Auch wenn dies häufig übersehen wird, hängt der Erfolg einer Zuordnung von Gen und Funktion letztlich daran, ob es gelingt, einen Phänotyp zu finden, der geeignet ist. Warum?

Es wäre naiv zu glauben, dass jedem Gen nur ein einzelnes Merkmal zugeordnet werden kann. Ein Organismus ist keine Maschine, bei dem man ein Zahnrad herausnimmt und alle anderen Teile so bleiben, wie sie vorher waren. Eher hat man es mit kommunizierenden Röhren zu tun – wird an einer Stelle etwas verändert, wird der Defekt an anderer

Stelle kompensiert. Pflanzen, die aufgrund ihrer Sesshaftigkeit eine besonders hohe Flexibilität entwickeln mussten, um überleben zu können, sind in Sachen Kompensation besondere Meister. Häufig wird beim Ausfall eines Gens also gar kein Phänotyp sichtbar. Außerdem sind viele Gene in sogenannten Genfamilien organisiert – von dem Photorezeptor Phytochrom kennt man in *Arabidopsis* zum Beispiel fünf Versionen –, wenn eine davon mutiert wird, kann das in den meisten Fällen von einem der anderen vier ausgegügelt werden, ohne dass sich ein Phänotyp (zu erwarten wäre eine „Rotblindheit“) aufspüren lässt. Auch den umgekehrten Fall gibt es – ein Gen fällt aus und dies führt zu drastischen Veränderungen in überraschend vielen Merkmalen (in der Genetik spricht man von **Pleiotropie**). So etwas kann etwa passieren, wenn das betroffene Gen relativ weit oben in der Hierarchie einer Signalkaskade als Schalter für verschiedene Vorgänge wirkt. Man weiß dann zwar, dass man ein wichtiges Gen an der Angel hat, aber wirklich schlauer wird man davon nur, wenn man herausfindet, wie die veränderten Vorgänge miteinander verwoben

sind. In anderen Worten: Genfunktionen lassen sich nur dann verstehen, wenn man die Physiologie des jeweiligen Modellorganismus recht genau kennt. Dafür müssen die verschiedenen Organisationsebenen (Physiologie des Gesamtorganismus, Morphologie und Anatomie, Zellbiologie, Genaktivierung, Biochemie) in einer integrierten Betrachtung miteinander vernetzt werden (► Kap. 8). Je genauer man einen Phänotyp erklären kann, umso einfacher wird es, die Zuordnung zur Funktion einzelner Gene zu erschließen. Das heißt aber auch: Je spezifischer ein Phänotyp, umso einfacher wird es. Ein Phänotyp wie „generell leicht verlangsamtes Wachstum“ ist sicherlich schwerer zu knacken als ein Phänotyp wie „völlig normal, nur bei schwachem Blaulicht verlangsamtes Wachstum“.

Ist es nun gelungen, in einer Mutantensammlung einen geeigneten Phänotyp zu finden, gibt es zwei Möglichkeiten:

Hat man es mit einer Insertionsmutante zu tun, kann man nun die (bekannte) Sequenz der Insertion (in den meisten Fällen handelt es sich ja um die T-DNA aus *Agrobacterium*) dazu einsetzen, die Nadel im Heuhaufen zu finden. Das klassische Verfahren bestand darin, dass man die DNA durch geeignete Kombinationen von Restriktionsenzymen in Stücke schnitt, diese auf großen Sequenziergelen auftrennte und dann mithilfe einer radioaktiv markierten Sonde gegen die T-DNA im Southern Blot nachwies, welches Stück die T-DNA enthielt. Dieses Stück wurde dann kloniert und sequenziert. Inzwischen werden jedoch vor allem PCR-basierte Verfahren eingesetzt, wobei man einen Oligonucleotid-Primer innerhalb der T-DNA-Sonde platziert und dann versucht, ein Stück der flankierenden Sequenzen zu amplifizieren. Da das *Arabidopsis*-Genom inzwischen durchsequenziert ist, kann man mithilfe dieser flankierenden Sequenz in der Regel schnell herausfinden, welches Gen in der vorliegenden Mutante betroffen ist.

Wurde die Mutante über Induktionsmutagenese erzeugt, ist der Weg zum Gen deutlich langwieriger. Hierbei muss man in einem *Map-based Cloning* genannten Verfahren über

Kreuzungen den Ort der Mutation kartieren. Im ersten Schritt versucht man durch Kreuzung mit anderen Referenzmutationen, deren Genort schon aus früheren Studien bekannt ist, herauszufinden, auf welcher Kopplungsgruppe (also Chromosom) die Mutation liegt. Liegt die neue Mutation auf demselben Chromosom wie die Referenzmutation, erscheinen sie genetisch gekoppelt, segregieren in der F₂ also nicht gemäß dem zweiten Mendel'schen Gesetz. Für *Arabidopsis* sind inzwischen neben klassischen morphologisch sichtbaren Markern eine große Zahl von Sequenzmarkern verfügbar, die sich über PCR nachweisen lassen, was solche Kartierungen ungemein beschleunigt. Nachdem das Chromosom bestimmt ist, kann man nun eine große Kreuzungspopulation herstellen und dann für verschiedene Referenzmarker, die für dieses Chromosom bekannt sind, messen, wie oft die betroffene Mutation über Crossing-over aus der Kopplung mit dem jeweiligen Referenzmarker ausbricht. Je höher diese Häufigkeit, umso weiter sind Mutation und Referenzmarker voneinander entfernt, und so lässt sich der Ort des mutierten Gens schnell so weit eingrenzen, dass man bald weiß, welche Kandidatengene in Frage kommen. Über Komplementierung (■ Abb. 5.3) kann man nun feststellen, welches dieser Kandidatengene die Mutante „retten“ kann. Auf der Basis des entschlüsselten *Arabidopsis*-Genoms ist dieses Verfahren inzwischen bei Weitem weniger zeitaufwendig wie zu Anfangszeiten. Wie oben erwähnt, sind nicht für alle Gene T-DNA-Mutanten verfügbar, weil die Insertion nicht vollständig symmetrisch über das Genom verteilt ist. Außerdem lassen sich für ein tieferes Verständnis von Genfunktionen wertvolle Punktmutationen eben nur über chemische Mutagenese erreichen.

Ein Fallbeispiel aus der Anfangszeit der funktionellen Genomik zeigt, welchen Zeitvorteil die damals neu entwickelte Insertionsmutagenese mit sich brachte: Im Labor von Gerd Jürgens war es in einem heroischen Ansatz gelungen, Mutationen zu finden, die auf die Entstehung der Körper-Grundgestalt

des *Arabidopsis*-Embryos Einfluss nehmen (Mayer et al. 1991). Besonders spannend war eine Mutante, bei der die Meristeme in der Spitze von Spross und Wurzel fehlten, sodass letztlich ein mehr oder minder richtungsloser Gewebeklumpen entstand. Diese Mutante bekam daher den Namen *gnom* und erinnerte in ihrem Habitus an die bei der Fruchtfliege *Drosophila* aufgeklärten Mutanten *bicoid*, *oskar* und *nanos*, wo die Entstehung der anterior-posterioren Polarität (also die Ausbildung von „vorne“ und „hinten“) gestört war. Mithilfe von *Map-based Cloning* wurde dann mit Hochdruck versucht, den mutierten Genort zu finden. Da das Genom von *Arabidopsis* zu dieser Zeit noch nicht sequenziert war, musste man vor allem mit morphologischen Merkmalen arbeiten und hatte dadurch weit weniger Marker zur Verfügung. Die Kartierung zog sich also über mehrere Jahre hin. Zu diesem Zeitpunkt wurden im Labor von Ken Feldmann in USA die ersten T-DNA-Mutantenkollektionen aufgebaut. Unter diesen Mutanten gab es auch sogenannte *emb-* (*Embryogenesis*-)Mutanten, und eine davon, *emb30*, zeigte eine frappierende Ähnlichkeit zu *gnom*. Tatsächlich konnten sich die beiden Mutanten durch Kreuzung nicht komplementieren, was darauf hindeutete, dass dasselbe Gen betroffen war. Übrigens: Dieser trivial daher kommende Befund ist experimentell alles andere als trivial, da homozygote *gnom/emb30*-Mutanten derartig gestört sind, dass sie niemals auswachsen, geschweige denn Nachkommen zeugen können – man musste hier also mit heterozygoten Pflanzen arbeiten und überprüfen, ob in etwa 25 % der Nachkommenschaft den *gnom/emb30*-Phänotyp zeigten. Leider konnte Gerd Jürgens die Früchte dieser mühsamen Vorarbeiten nicht selbst ernten – die Information, dass *emb30* im selben Gen betroffen war wie *gnom*, gelangte in die Hände eines konkurrierenden Labors, und dann war es nur noch eine Sache von Wochen, bis die in der Linie *emb30* durch die T-DNA markierte Sequenz dieses spannenden Gens aufgeklärt und sehr hochrangig publiziert war – überraschenderweise entpuppte sich *gnom* nämlich nicht als Transkriptionsfaktor

(im Unterschied zu den Polaritätsfaktoren bei *Drosophila*). Übrigens zeigte dieser unerwartete Befund auch, dass der **Symmetriebruch** bei Pflanzen nach anderen Gesetzmäßigkeiten funktionieren muss.

5.2.4 Zelluläre Entwicklungsgenetik: Enhancer-Trap-Linien

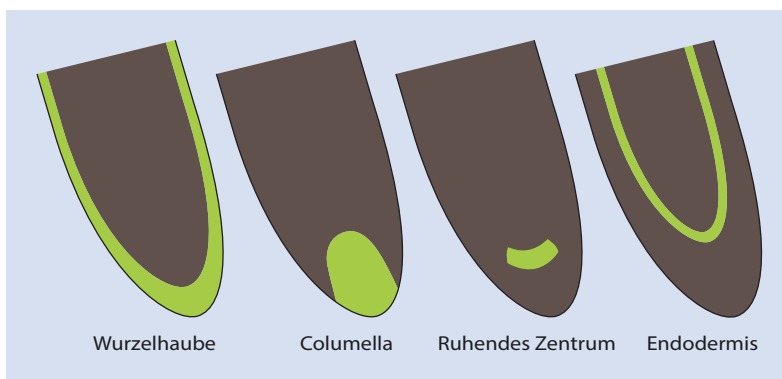
Die Aufklärung der *gnom*-Mutante zeigt beispielhaft die für das Modell *Arabidopsis* besonders fruchtbare Verbindung aus Genetik, Entwicklungsbiologie und Zellbiologie. Da Pflanzenzellen sich nicht bewegen, vollzieht sich die Gestaltbildung bei Pflanzen überwiegend durch *Zelldifferenzierung*. Die Frage, wie einzelne Zellen dazu kommen, sich von ihren Nachbarinnen zu unterscheiden, ist mit einem klassisch biochemischen Ansatz nur schwer zugänglich. Schon das Problem, wie man experimentell einen bestimmten Typ von Zellen so weit aufreinigen kann, dass biochemische Untersuchungen möglich werden, ist nur für ganz wenige Fälle erfolgreich gelöst worden. Auch hier war es schließlich ein auf Mutantenkollektionen basierender Ansatz, der für das Modell *Arabidopsis* eine Lösung brachte.

Dazu wurde eine sogenannte *Enhancer Trap* konstruiert: Diese umfasst ein Reporter-gen, das unter die Kontrolle eines sogenannten Minimalpromotors gestellt wurde. Dieser Minimalpromotor enthält zwar alles, was notwendig ist, um die Transkription durchzuführen, aber ihm fehlen jegliche stromaufgelegene Motive, um eine solche Transkription auch tatsächlich anzuschalten. Als Reporter-gene werden wahlweise entweder das Grün fluoreszierende Protein (GFP) oder Glucuronidase (GUS) eingesetzt. Auf der Basis diesen Konstrukts wird nun mithilfe von *Agrobacterium* eine Sammlung transgener Linien erzeugt. An sich ist keine Expression der Reporter-gene zu erwarten, es sei denn, ein anderer Promotor in der Nähe der *Enhancer Trap* ist aktiv und erzeugt daher aktivierende Signale, sogenannte

Enhancer, wodurch der nahebei eingefügte, an sich schlummernde Minimalpromotor aktiviert wird. Im Fall von GFP lässt sich dann eine grüne Fluoreszenz nachweisen, im Fall von GUS kann man durch Zugabe des künstlichen Substrats X-Gluc eine blaue Färbung erzeugen. Da das transgene Konstrukt bei der Transformation zufällig ins Genom eingefügt wird, bekommt man eine Vielzahl unterschiedlicher Linien, bei denen die *Enhancer Trap* jeweils in der Nachbarschaft unterschiedlicher Gene inseriert wurde. Im nächsten Schritt durchsucht man diese Mutantenkollektion nach interessanten Expressionsmustern. Wurde die *Enhancer Trap* beispielsweise nahe bei einem Gen eingefügt, das in den Schließzellen der Spaltöffnungen aktiv ist, wird man eine Pflanze erhalten, bei denen der Reporter in den Schließzellen zu sehen ist, nicht aber in den anderen Zellen. Mit etwas Glück und Geduld erhält man so eine Sammlung von Pflanzen, bei denen bestimmte Gewebe oder Zelltypen markiert sind. Eine berühmte Sammlung solcher Linie wurde von Jim Haseloff in Cambridge erzeugt (Laplace et al. 2005), um unterschiedliche Zelltypen in der Wurzel von *Arabidopsis* markieren zu können (■ Abb. 5.5).

Was lässt sich nun mit solchen Linien anfangen? Man kann damit beobachten, wie sich ein bestimmter Zelltyp während der Entwicklung verhält und auf diese Weise

etwa klären, ob es festgelegte Abstammungslinien gibt. Bei *Arabidopsis* gibt es solche *Cell Lineage* tatsächlich, was eine ziemliche Überraschung war. Die pflanzliche Entwicklung ist ja stark von der Umwelt abhängig, und daher hatte man nicht damit gerechnet, dass die Abstammungslinie eines Zelltyps festgelegt ist. Wie in ► Abschn. 5.3 noch näher diskutiert wird, handelt es sich dabei um eine Besonderheit von *Arabidopsis*. Man kann die *Enhancer Trap* aber auch dazu einsetzen, bestimmte Zelltypen anzureichern, sodass sie für biochemische oder molekulargenetische Untersuchungen zugänglich werden. Dazu wird das in der Medizin gängige Verfahren des *Fluorescence-assisted Cell Sorting* (FACS) eingesetzt. Dabei werden in einem Gemisch von Zellen bestimmte Typen fluoreszierend markiert (in der Medizin setzt man dafür fluoreszierend markierte Antikörper ein, die bestimmte Zellen erkennen, andere aber nicht) und dann so durch eine dünne Kapillare geleitet, dass die Zellen in Reihe hintereinander passieren müssen. Dann fallen sie einzeln an einem Laserstrahl vorbei, der im Fall einer fluoreszierenden Zelle einen elektrischen Impuls an zwei elektrostatisch aufgeladene Metallplatten schiekt, sodass die fluoreszierend markierte Zelle elektrostatisch abgelenkt wird und aus der Kette der fallenden Zellen heraus in ein anderes Sammelgefäß gelangt. Auf diese Weise



■ **Abb. 5.5** *Enhancer-Trap*-Linien mit GFP als Reporter, mit denen verschiedene Zelltypen markiert werden können. Von links nach rechts: Wurzelkappe, Columella, ruhendes Zentrum, Endodermis und Cortex, Zentralzylinder. (Haselofflab, Cambridge)

können die Zellen also automatisch sortiert werden. Diese Methode funktioniert mit vereinzelt Zellen sehr gut – beispielsweise kann man damit sehr schnell und kostensparend die verschiedenen Zellen in einer Blutprobe trennen und auszählen. Bei Zellen im Gewebeverband, wie den durch Zellwände verbundenen Pflanzenzellen, ist das Verfahren zunächst einmal nicht ohne Weiteres anwendbar – mit einem Trick aber doch: Man verdaut einfach die Zellwand mithilfe von Enzymen. Die zellwandlosen Protoplasten lösen sich voneinander, sodass man einzelne Zellen erhält (es muss nur in einem isotonischen Medium gearbeitet werden, weil sonst die wandlosen Zellen anschwellen und platzen würden). Wird nun die Wurzel einer Pflanze verdaut, wo der *Enhancer Trap* beispielsweise in der Endodermis aktiv ist, erhält man eine Mischung aus fluoreszierenden Zellen (das sind diejenigen, die das Transgen exprimieren, also die Zellen der Endodermis) und vielen nicht fluoreszierenden Zellen (das sind Zellen, die aus anderen Geweben der Wurzel stammen). Diese Protoplastenmischung kann man nun über FACS auftrennen und dann Transkriptom oder Proteom der getrennten Zelltypen vergleichen. Mit etwas Glück findet man so molekulare Faktoren, die sich bei Endodermiszellen unterscheiden, und gewinnt Einblick in die molekularen Grundlagen der Zelldifferenzierung.

5.3 Biologie und Entwicklung von *Arabidopsis*

Als kleine, konkurrenzwache Pflanze hat *Arabidopsis* die ökologische Strategie vervollkommenet, kurzzeitige Störungen der Vegetationsdecke zu nutzen, um schnell seine Entwicklung zu vollziehen und dann in Form von Samen so lange zu überdauern, bis sich eine neue Chance zur Fortpflanzung bietet. In Anpassung an diese Strategie entwickelten sich genau jene Merkmale, die *Arabidopsis* zu einer idealen Modellpflanze machen: kurzer Lebenszyklus, viele Nachkommen, kleines Genom

und robuste Entwicklung. Die Embryonalentwicklung von *Arabidopsis* ist durch stereotype Reihenfolgen von Zellteilungen gekennzeichnet. Schon während der späteren Embryonalentwicklung werden in den beiden Polen des Embryos Bildgewebe (**Meristeme**) angelegt, die während der gesamten Lebensdauer der Pflanze neue Zellen nachliefern, aus denen die Organe (Blätter und Wurzeln) gebildet werden. Diese Meristeme werden, ausgehend von wenigen Stammzellen, stetig aufrechterhalten. Die Aktivität dieser Stammzellen wird durch Signale aus ihrer Umgebung so reguliert, dass ein Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Zellteilung erhalten bleibt. Da die pflanzliche Entwicklung an die Umwelt angepasst und daher offen ist, muss auch nach der Anlage von Organen die Differenzierung von Zellen flexibel bleiben. Beispielsweise wird im wachsenden Blatt durch Ausschüttung hemmender Peptide durch schon differenzierte Spaltöffnungen verhindert, dass sich in der Nachbarschaft weitere Epidermiszellen zu Spaltöffnungen umbilden. Erst, wenn durch zusätzliche Zellteilungen die Distanz zwischen den Spaltöffnungen angestiegen ist, kann an den Stellen, an denen die Menge des hemmenden Signals niedrig genug ist, eine weitere Spaltöffnung entstehen. Durch solche Regelkreise wird sichergestellt, dass trotz der offenen Entwicklung stets ein Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Zellteilung aufrechterhalten wird. Das Sprossmeristem kann abhängig von der Tageslänge von der offenen vegetativen Entwicklung auf eine abgeschlossene generative Entwicklung umgestimmt werden. Dafür wird in den Blättern abhängig von Licht ein Transkriptionsfaktor gebildet, der über das Leitssystem ins Meristem transportiert wird und dort die Umstimmung der Stammzellen auslöst. Dabei entstehen vier Blattkreise, die durch verschiedene Kombinationen dreier weiterer Transkriptionsfaktoren (A, B, C) zu Kelch-, Kron-, Staub- und Fruchtblättern differenzieren. In Staub- und Fruchtblättern entstehen durch Meiose die haploiden Keimzellen, die jedoch nicht sofort in einer Befruchtung

verschmelzen, sondern zunächst einen wenigzelligen, haploiden **Gametophyten** bilden (männlich: Pollenschlauch, weiblich: Embryosack). Zwei der drei Zellen des Pollenschlauchs machen dann eine Befruchtung mit Zellen des Embryosacks durch. Daraus entsteht zum einen der neue (diploide) Embryo, zum anderen eine triploide Endosperm-Mutterzelle, die das den Embryo versorgende Nährgewebe hervorbringt.

5.3.1 *Arabidopsis* ist ein Therophyt

Arabidopsis hat seine schnelle Entwicklung und sein Minimalgenom natürlich nicht entwickelt, „damit“ eines Tages die funktionelle Pflanzengenetik davon profitieren kann. Wie bei anderen Modellorganismen auch sind diese besonderen Eigenschaften als Teil einer Überlebensstrategie entstanden. Bei Pflanzen heißt Überleben vor allem: Licht als Nahrungsquelle möglichst gut nutzen zu können. Pflanzen können nicht mal kurz eben „an die Sonne gehen“, daher sind kleine Pflanzen wie *Arabidopsis* in der Konkurrenz um das Licht gegenüber anderen Arten, vor allem Sträuchern und Bäumen, eindeutig im Nachteil. Eine Chance haben solch kleine Pflanzen eigentlich nur, wenn die Vegetationsdecke kurzzeitig gestört wird – das kann passieren, wenn der Sturm eine Schneise in den Wald schlägt, an einem steilen Flussufer ein Stück abbricht und offenliegt, oder wenn durch Waldbrände die Bäume eliminiert werden. Um solche Gelegenheiten nutzen zu können, muss die Keimung lange Zeit unterdrückt werden können (**Dormanz**). Erst, wenn die Gelegenheit günstig ist, wird die Dormanz abgeschaltet und die Entwicklung aktiviert, sodass sehr schnell viele neue Samen gebildet werden, bevor die kurzzeitig gestörte Vegetationsdecke sich wieder schließt. Die Schnelligkeit der Entwicklung von *Arabidopsis* ist also in Anpassung an solche (zumeist nur für eine gewisse Zeit gegebenen) Störungen der Vegetationsdecke entstanden. Pflanzen mit diesem Lebensstil heißen Therophyten.

Warum sind Therophyten für den Menschen interessant? Die meisten unserer Kulturpflanzen sind einjährig und folgen daher dieser Strategie. Im Grunde hat der Mensch künstlich durch den Ackerbau ein Biotop geschaffen, dessen Vegetationsdecke ständig durch regelmäßiges Pflügen und Jäten offen gehalten wird. Übrigens ist diese Ackernische nicht nur für die Kulturpflanzen attraktiv, sondern auch für andere Therophyten, die aber freilich nicht durch Ablieferung ihrer Produkte „zurückzahlen“, sondern gleichsam als „Kulturparasiten“ von der menschlichen Anstrengung profitieren. Häufig sind solche „Unkräuter“ nahe Verwandte der jeweiligen Kulturpflanze.

Eine evolutionär entstandene Strategie zur Verminderung der Konkurrenz hat also dazu geführt, dass die Schmalwand genau diese Eigenschaften auf die Spitze getrieben hat, die für ein genetisches Modellsystem glänzend geeignet sind. Freilich sollten wir nicht vergessen, dass manche Besonderheiten von *Arabidopsis* ebenfalls Ausdruck einer Therophytenstrategie sind und daher nicht unüberlegt als „modellhaft“ auf Pflanzen mit einer anderen ökologischen Strategie übertragen werden sollten.

Beispielsweise ist die Embryonalentwicklung (► Abschn. 5.3.2) mit ihrer fast schon stereotypen Folge von Zellteilungen eine Besonderheit von *Arabidopsis*, die ähnlich wie die stereotype Zellteilungsfolge des Wurms *Caenorhabditis elegans* in Anpassung an besonders kurze Vermehrungszyklen entstand. Vermutlich aus einem ähnlichen Grund zählt *Arabidopsis* zu den wenigen Bedecktsamern, die nicht in Symbiose mit Mykorrhizapilzen leben und hierfür natürlich nicht als Modellorganismus taugen.

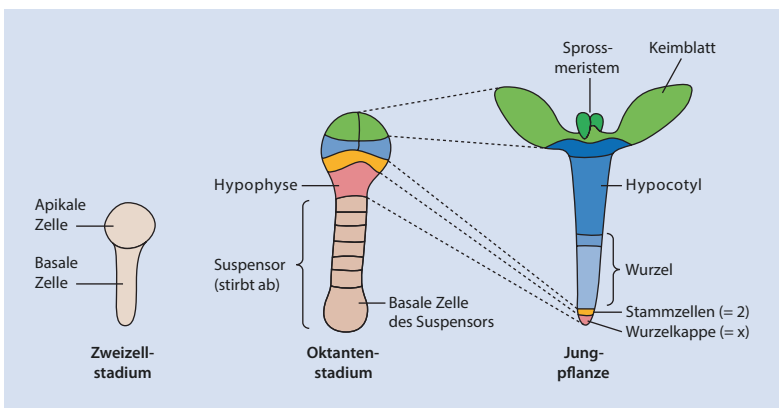
5.3.2 Embryonalentwicklung

Die Embryonalentwicklung von *Arabidopsis* beginnt mit einer bei allen Bedecktsamern vorkommenden exotischen Besonderheit (die man weder bei der Schwestergruppe

der Nacktsamer noch bei den Vorfahren der Bedecktsamer, den Farnpflanzen, beobachten kann): Die Befruchtung ist doppelt. Ein Spermakern des Pollenschlauchs verschmilzt mit der Eizelle und bildet die diploide Zygote als erste Zelle des Embryos. Es gibt jedoch noch einen zweiten Spermakern. Dieser sucht sich den diploiden Zentralzellkern, sodass also ein Zellkern mit drei Chromosomensätzen entsteht. Der Zentralzellkern ist deswegen diploid, weil er während der Entwicklung des Embryosacks (mehr dazu in ► Abschn. 5.2.1) aus der Fusion zweier haploider sogenannter Polzellkerne hervorgegangen ist. Aus dieser zweiten Befruchtung wird also ein triploider Kern gebildet, dieser liefert das Endosperm, ein Nährgewebe für den jungen Embryos. Bei vielen Pflanzen (beispielsweise bei den Getreiden, ► Kap. 6) spielt das Endosperm später eine wichtige Rolle für die Keimung. Es ist sozusagen die Mitgift der Mutter, die in den ersten Tagen nach der Keimung von dem jungen Keimling mobilisiert und aufgenommen wird. Bei *Arabidopsis* (so wie bei allen anderen Kreuzblütlern oder Brassicaceen) ist die Bedeutung des Endosperms für den Keimling jedoch nur marginal – hier

werden schon in der späteren Embryonalentwicklung die Ressourcen aus Endosperm und Mutterpflanze *innerhalb* des Embryos gespeichert. Dazu schwellen die Keimblätter an und bilden sich zu Speicherorganen um, die dann nach der Keimung „angezapft“ werden können und auch ganz schnell zusammenschrumpfen (■ Abb. 5.6).

Die befruchtete Zygote teilt sich asymmetrisch in eine basal stark vakuolisierte Zelle, aus der ein embryonales Versorgungsorgan, der **Suspensor** (eine Art Nabelschnur des Pflanzenembryos), hervorgeht, und eine apikale, wenig vakuolisierte Zelle, aus der der eigentliche Embryo entsteht (■ Abb. 5.6). Die basale Zelle wandelt sich nun durch mehrere gerichtete Teilungen in einen mehrgliedrigen Stil mit einer stark aufgeblähten Basalzelle um. Der Suspensor stirbt gegen Ende der Embryonalentwicklung durch programmierten Zelltod ab, trägt also nicht zur späteren Pflanze bei – auch darin ähnelt er übrigens der Nabelschnur. Freilich gibt es eine Ausnahme, die oberste Zelle des Suspensors, die **Hypophyse**, teilt sich abweichend von den anderen Suspensorzellen längs und wird letztendlich zur **Columella**, dem Herzen der Wurzelkappe



■ **Abb. 5.6** Embryogenese bei *Arabidopsis*. Die künftigen Organe des Keimlings lassen sich bis in bestimmte Zellen des frühen Embryos zurückverfolgen. Aus einer asymmetrischen Teilung der Zygote gehen die Vorläufer von Suspensor und eigentlichem Embryo hervor. Im globulären Stadium (zweites Bild von links) wird die oberste Zelle des Suspensors, die Hypophyse, gebildet, die später zur Wurzelkappe wird. Im Herzstadium sind die Bereiche des Keimlings alle schon abgebildet und werden nur noch durch Zellteilungen und anschließende Zellvergrößerung entfaltet. (Zdenek Opatrný aus Nick und Opatrný, Applied Plant Cell Biology (Springer))

in der jungen Keimwurzel. Die aus der ersten Teilung der Zygote entstandene apikale Zelle durchläuft währenddessen eine stereotypische Folge von Längs- und Querteilungen, bis sich eine kleine Kugel, der **globuläre Embryo**, herausgebildet hat. Schon im Achtzellstadium kann man hier den Grundaufbau des späteren Keimlings erkennen: Aus den beiden Spitzenzellen gehen die beiden Keimblätter und das Apikalmeristem hervor, aus dem basal davon gelegenen Gürtel Hypocotyl und Wurzel (die also entwicklungsgeschichtlich sehr eng zusammenhängen) und aus den Zellen, die der Hypophyse angrenzen, das ruhende Zentrum der Wurzel, das später das Wurzelmeristem hervorbringt. Diese polare Anordnung wird schon in diesem frühen Stadium durch einen gerichteten Transport des Pflanzenhormons Auxin geordnet, und hier fand man auch den Ansatzpunkt zum Verständnis der *gnom*-Mutante. Bei dieser Mutante ist nämlich eine Komponente des Vesikeltransports betroffen. Dies hat zur Folge, dass ein Membrantransporter für Auxin nicht korrekt platziert werden kann. Dadurch wird schon die erste Teilung der Zygote verschoben – diese teilt sich in der *gnom*-Mutante nämlich symmetrisch (also abweichend zur asymmetrischen Teilung im Wildtyp). Im Gefolge wird dann auch die durch den Auxinfluss geordnete Zuweisung von Entwicklungswegen im jungen Embryo durcheinandergebracht, es entsteht weder eine richtige Hypophyse, noch können die beiden Meristeme an den Polen des Embryo angelegt werden. Das Resultat ist ein ungeordneter Gewebsklumpen. Werden die Meristeme jedoch richtig angelegt (was einen geordneten Auxinfluss von apikal nach basal voraussetzt), bringen diese nicht nur alle weiteren Organe des Embryos hervor, sondern bleiben auch im Laufe der weiteren Entwicklung der Pflanze aktiv – das ganze weitere Leben hindurch. Erst wenn *Arabidopsis* Blüten bildet, verbraucht sich das apikale Meristem bei der Bildung der Blütenorgane (daher endet das Wachstum – so wie bei vielen anderen Blütenpflanzen auch – in dem Moment, wo die Blüte vollständig ist).

5.3.3 Vegetative Entwicklung

Das nie endende Wachstum von Pflanzen setzt voraus, dass in den Meristemen die sich differenzierenden Zellen immer wieder nachgeliefert werden. Dies geschieht sowohl in der Spitze der Wurzel wie in der Spitze des Sprosses mithilfe von Stammzellen. Diese Stammzellen teilen sich selbst eher selten, liefern aber immer wieder Tochterzellen nach, die sich stark teilen und einen bestimmten Zelltyp hervorbringen. Diese Stammzellen wirken also wie eine Art Auge des Sturms und werden daher als **ruhendes Zentrum** bezeichnet. Angelegt werden die ruhenden Zentren schon sehr früh in der Entwicklung, nämlich im Achtzellstadium – das ruhende Zentrum der Wurzel entsteht aus den Zellen des Embryo, die an die Hypophyse grenzen (■ Abb. 5.6).

Da die pflanzliche Gestaltbildung sehr ergebnisoffen ist, kann die Zahl von Stammzellen nicht genetisch festgelegt sein, sondern muss abhängig von den Bedingungen ständig neu angepasst werden. Eine Stammzelle muss sich teilen, um etwa die Nachlieferung der Gewebe in den im Sprosskegel auswachsenden Blättern zu gewährleisten. Andererseits muss diese Teilung begrenzt werden, weil sonst der Sprosskegel zu abnormer Größe anschwellen würde und die neu angelegten Blätter dann keine Verbindung zum Leitsystem der Pflanze bekämen. Woher „weiß“ die Stammzelle, wie oft sie sich teilen muss, damit diese Balance eingehalten wird? Auch hier brachten Mutanten den entscheidenden Durchbruch: Bei der Mutante *wuschel* verbrauchen sich die Stammzellen in einer Vielzahl von kleinen Blättern, bis der Sprosskegel gleichsam „aufgebraucht“ ist und die Pflanze dadurch nicht mehr weiterwachsen kann. Im Gegenteil teilen sich bei den *clavata*-Mutanten (lat. für „keulenförmig“) die Stammzellen, ohne zu Blättern zu differenzieren, wodurch der Sprosskegel nackt bleibt und keulenförmig aufschwillt. Über Vorwärtsgenetik gelang es, die molekulare Natur von *wuschel* und *clavata* aufzuklären und molekulare Sonden zu konstruieren, mit denen sichtbar gemacht werden konnte, in

welchen Zellen des Sprosskegels diese Faktoren aktiv sind. Dabei stellte sich heraus, dass beide Faktoren gar nicht in den Stammzellen selbst erzeugt werden, sondern in den benachbarten (schon differenzierten) Zellen – *wuschel* unterhalb der Stammzellen, *clavata* oberhalb. Die Genprodukte werden jedoch in die Stammzellen transportiert und entfalten dort entgegengesetzte Wirkungen: *wuschel* erhält den Zustand der Stammzelle aufrecht, *clavata* fördert hingegen die Differenzierung. Das Verhältnis der beiden Faktoren hängt davon ab, welcher Anteil der Zellpopulation schon differenziert ist und wie viele Zellen noch in Wartestellung verharren. Wenn diese Anteile vom Gleichgewicht abweichen, wird also automatisch entsprechend mehr oder weniger von den beiden Gegenspielern gebildet. Wie bei einer Art chemischem Thermostat wird so flexibel und robust über Rückkopplung eine Balance aus Stammzellen und differenzierenden Zellen eingestellt. Für die Stammzellnische der Wurzel hat man nah verwandte Gene identifiziert, die auf ähnliche Weise zusammenwirken. Durch Pflanzenhormone, neben dem schon erwähnten Auxin ist es vor allem das Hormon Cytokinin, lässt sich der Sollwert verschieben. Dies erlaubt es der Pflanze, in Abhängigkeit von der Umwelt (vor allem abhängig von Licht) mehr oder weniger Blätter zu bilden – die Synthese von Pflanzenhormonen, aber auch die Verarbeitung hormoneller Signale ist in hohem Maße umweltabhängig und ermöglicht der Pflanze, ihre Entwicklung flexibel an die Umweltbedingungen anzupassen.

Die vielfältigen und verwobenen Signalwege, die alle Aspekte der vegetativen Entwicklung von Pflanzen steuern, sind molekular mithilfe entsprechender Mutanten untersucht worden und für viele Entwicklungsleistungen – etwa die Verarbeitung verschiedener Lichtsignale oder die Bildung von Wurzelhaaren oder Trichomen – kennt man inzwischen schon eine große Zahl der daran beteiligten Proteine. Wie in [Pflanzen sind anders. Warum?](#) geschildert, war die Identifizierung vor allem erfolgreich, wenn ein klar umgrenzter Phänotyp

resultierte und wenn die Biologie des betroffenen Entwicklungsschrittes schon relativ gut durchdrungen war. Vor allem durch Mutationen in der Synthese, der Perzeption und der Verarbeitung hormoneller Signale ist der Modellorganismus *Arabidopsis* für das Verständnis pflanzlicher Entwicklung sehr wertvoll geworden.

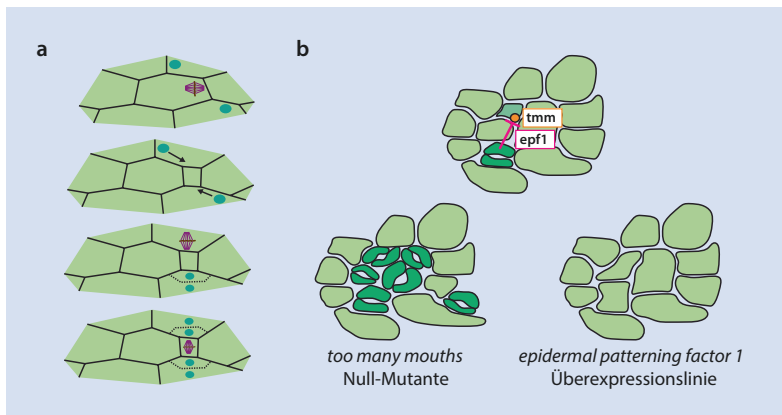
Beispielhaft für die zahlreichen, mithilfe dieses Modells verstandenen Entwicklungsvorgänge ist unter [Too many mouths](#) die Aufklärung von Spaltöffnungsmustern dargestellt.

Too many mouths – woher weiß ein Blatt, wieviel Spaltöffnungen es brauchen wird?

Landpflanzen besitzen eine luft- und wasserundurchlässige Außenschicht, die **Cuticula**, um den unkontrollierten Verlust von Wasser unterbinden zu können. Für die Photosynthese ist jedoch der Zutritt von Kohlendioxid notwendig, ebenso wird der Transport des in den Wurzeln aufgenommenen Wassers durch die Verdunstung an den Blättern (**Transpiration**) getrieben. Der gesteuerte Austausch von Wasser und Kohlendioxid in den Blättern geschieht mithilfe eines von Gefäßpflanzen neu entwickelten Zelltyps, den Schließzellen. Abhängig von Wassergehalt des Gewebes und Intensität der Photosynthese können diese Schließzellen ihre Turgeszenz unter Kontrolle eines komplexen Signalnetzwerks verändern. Zwischen den Schließzellen ist die Cuticula durch einen Spalt durchbrochen, der in eine sogenannte Atemhöhle führt, von wo aus das eingewanderte Kohlendioxid zu den photosynthetisch aktiven Zellen vordringen kann. Nicht nur der Öffnungszustand dieser Spaltöffnungen muss genau reguliert werden, auch ihre Anzahl bedarf einer Steuerung: Wäre die Dichte der Spaltöffnungen zu hoch, verlöre das Blatt auf unkontrollierte Weise Wasser und welkte, wäre sie zu gering,

wäre durch den nicht ausreichende Zutritt von Kohlendioxid die Ausbeute der Photosynthese geschmälert. Nun wäre denkbar, dass die Spaltöffnungen gleich bei der Anlage des Blatts im Sprosskegel festgelegt werden (ähnlich wie beim Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* der Zelltyp durch eine stereotype Zellteilungslinie bestimmt ist). Freilich stünde ein solcher Mechanismus der notgedrungen flexiblen Entwicklung von Pflanzen diametral entgegen. Ob ein Blatt groß wird und daher viele Spaltöffnungen benötigt oder ob es klein bleibt und daher nur wenige Spaltöffnungen anlegen muss, entscheidet sich ja erst während der Entwicklung und hängt zum Beispiel entscheidend davon ab, ob durch die Beschattung eines benachbarten Blattes die Lichtintensität herabgesetzt ist oder nicht. Schließzellen entstehen daher erst *während* des Blattwachstums. Dabei aktivieren schon differenzierte

Epidermiszellen ein neues Entwicklungsprogramm, wobei sie sich in räumlich streng festgelegter Weise erneut zu teilen (Abb. 5.7a). Sie benehmen sich also eigentlich wie ein kleines Meristem – freilich ist die Zahl der Teilungen begrenzt (zumeist nur auf 2–5 Teilungen), im Gegensatz zu den „echten“ Meristemen in der Wurzelspitze, im Sprosskegel oder dem für das Dickenwachstum wichtigen Kambium fehlen also Stammzellen, und man spricht daher von **Meristemoiden**. Die Anlage dieser Meristemoide folgt einem klaren Muster – nie findet man Spaltöffnungen, die unmittelbar aneinander angrenzen, stets wird ein Mindestabstand eingehalten. Schon bestehende Schließzellen scheinen in ihrer Nachbarschaft die Bildung weiterer Meristemoide zu unterdrücken. Erst, wenn durch das Blattwachstum die Spaltöffnungen auseinanderrücken, entsteht in ihrer Mitte, dort wo diese



■ **Abb. 5.7** Aufklärung von Spaltöffnungsmustern mithilfe des Modellsystems Arabidopsis. **a** Anlage einer neuen Spaltöffnung aus einer gewöhnlichen Epidermiszelle durch eine räumlich orientierte und abgeschlossene Sequenz von Zellteilungen (Fallbeispiel *Tradescantia tricolor*). **b** Molekulares Modell der Spaltöffnungsmusterung bei *Arabidopsis*. Angelegte Spaltöffnungs-Meristemoide sezernieren das Peptid *epidermal patterning factor 1* (*epf1*). Dieses wird als Ligand von der Rezeptorkinase *too many mouths* (*tmm*) gebunden, worauf in der Empfängerzelle ein MAPK-Weg aktiviert wird, der den Zellzyklus anhält und so verhindert, dass sich diese Zelle durch Teilung in einen Spaltöffnungsapparat weiterentwickeln kann. Bei Ausfall von *too many mouths* entstehen Klumpen aneinanderhängender Spaltöffnungen. Bei Überexpression von *epidermal patterning factor 1* wird in allen Epidermiszellen der MAPK-Weg aktiviert, sodass keine Spaltöffnungen entstehen können

hypothetische Hemmwirkung am geringsten sein sollte, ein neues Meristemoid.

Das Muster der Spaltöffnungen ist also nicht *a priori* festgelegt, sondern muss während der Entwicklung immer wieder neu bestimmt werden. Eine solche *offene Musterbildung* ist für die vegetative Entwicklung von Pflanzen sehr typisch und ist daher am Modell *Arabidopsis* intensiv beforscht worden: Das Muster von Wurzelhaaren, Trichomen auf den Blättern, Blattnerven für den Stofftransport oder die Anlage neuer Blattprimordien im Sprosskegel sind weitere Beispiele für offene Musterbildung und folgen ähnlichen Prinzipien.

Es ist plausibel und vermutlich auch zutreffend, offene Musterbildung über Hemmfelder zu erklären, die in der Nachbarschaft der schon bestehenden Strukturen die Neubildung weiterer solcher Strukturen unterdrücken. Freilich: Ohne eine Kenntnis der molekularen Natur dieses Hemmsignals lassen sich solche Erklärungsmodelle nicht experimentell überprüfen. Wieder einmal war es die Kombination aus Mutantenkollektion und Vorwärtsgenetik, die hier zum Durchbruch führte: In der Arbeitsgruppe von Fred Sack wurden Tausende von Mutanten mikroskopisch nach abweichenden Spaltöffnungsmustern durchmustert (Yang und Sack 1995). Als Ergebnis dieser heroischen Anstrengung konnten tatsächlich verschiedene Gruppen von Mutanten gefunden werden. Die berühmteste davon wurde auf den Namen *too many mouths* getauft (▣ Abb. 5.7b), weil bei ihr die Spaltöffnungen (Stomata, von griechisch *stoma* für „Mund“) keinen Mindestabstand mehr einhielten, sodass die Blattunterseite mit ungeordneten Klumpen von Spaltöffnungen übersät waren. Bei dem in dieser Mutante betroffenen Gen handelte es sich also

offenbar um einen negativen Regulator der Meristemoidanlage. In der Tat konnte *too many mouths* über Vorwärtsgenetik als Mutation in einer Rezeptor-Kinase identifiziert werden. Diese Kinase aktiviert einen MAP-Kinaseweg, der wiederum den Zellzyklus stoppt, sodass keine Zellteilung stattfinden kann. Ein Rezeptor braucht einen Liganden – dieser blieb jedoch lange unbekannt. Die Lösung ergab sich unerwarteterweise aus einem genetischen Screen, der aus ganz anderen Gründen durchgeführt worden war: Aus dem *Arabidopsis*-Genomprojekt waren zahlreiche kleine Peptide vorausgesagt worden, von denen noch nicht einmal bekannt war, ob sie tatsächlich existierten, geschweige denn, wofür die Pflanze sie gebrauchen kann, von denen man jedoch aufgrund eines Sequenzmotivs annahm, dass sie sezerniert wurden und daher möglicherweise als Signale für die Zell-Zell-Kommunikation eingesetzt würden. Um diese Frage zu klären, wurde ein typischer Reverse-Genetik-Ansatz durchgeführt. Die mutmaßlich sezernierten Peptide wurden unter Kontrolle eines starken viralen Promotors (hierbei wird bei Pflanzen häufig der 35 S-Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus eingesetzt) zur Überexpression gebracht und dann der Phänotyp dieser Überexpressionslinie untersucht. Eine dieser Linien war sozusagen das Gegenstück zur Mutante *too many mouths*: Hier fehlten die Spaltöffnungen fast vollkommen. Das Peptid bekam folglich den Namen *epidermal patterning factor 1*, weil es offensichtlich mit der Musterung der Spaltöffnungen zu tun hatte und möglicherweise der lange gesuchte Hemmfaktor war (▣ Abb. 5.7b). Aber wie ließ sich feststellen, ob *epidermal patterning factor 1* tatsächlich der Ligand von *too many mouths* war? Auch dieser

Nachweis erfolgte genetisch, über eine sogenannte **Epistasie**-Analyse. Man kreuzte einfach den homozygoten Überexprimierer von *epidermal patterning factor 1* mit der homozygoten Mutante *too many mouths*. Wenn *epidermal patterning factor 1* tatsächlich der Ligand von *too many mouths* war, sollte der Effekt dieses überreichlich gebildeten Hemmsignals verschwinden, wenn da niemand war, der dieses Hemmsignal wahrnehmen konnte. In der Tat war die Doppelmutante nicht von der Einzelmutante *too many mouths* zu unterscheiden. Würde *epidermal patterning factor 1* seine Hemmung der Spaltöffnungsbildung auf einem anderen Wege bewirken, hätte man erwartet, dass die Spaltöffnungsklumpen zumindest teilweise verschwunden wären. Die Mutation *too many mouths* war also epistatisch über die Überexpression von *epidermal patterning factor 1*, und das war ein überzeugender Beleg für die These, dass mit *epidermal patterning factor 1* tatsächlich den lange gesuchten Bindepartner von *too many mouths* entdeckt war. Die molekulare Identifizierung der beiden Gegenspieler erlaubte es nicht nur, zelluläre Sonden zu entwickeln, mit denen sich das Verhalten der beiden Proteine bei der Musterbildung direkt beobachten ließ, sondern auch weitere Mitspieler zu finden, die bei der Feinjustierung dieser Musterung eine Rolle spielen. Nur wenig später gelang der Nachweis, dass die Musterung der Epidermis auch schon während der Embryogenese über einen ähnlich aufgebauten Regelkreis funktioniert, der verwandte molekulare Komponenten nutzt.

5.3.4 Generative Entwicklung

Die generative Entwicklung, also die Bildung von Blüten und Samen, folgt völlig anderen Gesetzen als die vegetative Entwicklung. Die Blüte ist nämlich in ihrem Wachstum begrenzt. Im Gegensatz zur offenen Entwicklung des vegetativen Meristems, das im Grunde unbegrenzt weiterwachsen kann und abhängig von den Umweltbedingungen unterschiedliche Mengen von Organen liefert, geht das Blütenmeristem in der Bildung der Fortpflanzungsorgane auf, ist also in seiner Entwicklung vorbestimmt. In der Tat ist die Morphologie der Blüte einer Pflanzenart immer festgelegt, ganz gleich, unter welchen Bedingungen die Pflanze angezogen wird. Das ist auch der Grund, warum die Taxonomie und Systematik von Blütenpflanzen sich vor allem auf Blütenmerkmale bezieht. Schon Carl von Linné hatte erkannt, dass Zahl und Gestalt von Blütenorganen sich zwar zwischen Arten unterscheiden, aber innerhalb einer Art in hohem Masse konstant sind.

Die Ausführung des generativen Entwicklungsprogramms ist also genetisch festgelegt, der Zeitpunkt, wann dieses Programm aktiviert wird, ist jedoch durchaus von der Umwelt abhängig. Das ist auch leicht zu verstehen, weil eine Pflanze, die zur falschen Jahreszeit blüht, nur geringe Chancen hat, sich erfolgreich fortzupflanzen. Solche „Ausreißer“ haben also im Lauf der Evolution wenig zum Genpool der entsprechenden Art beigetragen. Obwohl die Umwelt also das „Wie“ der Blütenentwicklung nicht zu beeinflussen scheint, entscheidet sie doch über das „Wann“. Wichtigster Taktgeber ist dabei die Tageslänge, weil damit die Pflanze unabhängig von der jeweiligen Temperatur ihre zeitliche Position im Jahreslauf bestimmen kann. Pflanzen in gemäßigten Zonen, so auch

Arabidopsis, sind zumeist sogenannte Langtag-Pflanzen – wenn die Tage länger werden, kündigt das den Sommer an. Bei vielen Pflanzen der subtropischen Wüsten und Halbwüsten wird das Blühen jedoch durch kurze Tage ausgelöst und fällt dadurch mit der Zeit der winterlichen Niederschläge zusammen. Die Abhängigkeit des Blühzeitpunkts von der Tageslänge wird mit dem Begriff **Photoperiodismus** bezeichnet und wurde seit den 30er-Jahren des letzten Jahrhunderts intensiv untersucht. Mithilfe von ausgeklügelten formalphysiologischen Untersuchungen fand man heraus, dass die Messung der Tageslänge durch einen Photorezeptor erfolgt, der den langwelligen Teil des Spektrums wahrnimmt und einer tagesrhythmischen Dynamik unterliegt. Dieser Photorezeptor konnte später, nicht zuletzt aufgrund seiner Rolle beim Photoperiodismus, als Phytochrom identifiziert werden.

Aus klassischen Pfropfversuchen war schon lange bekannt, dass die Wahrnehmung der Tageslänge nicht im Sprossmeristem selbst stattfindet, sondern in den Blättern. Dabei wurde eine Pflanze durch die richtige Tageslänge „in Stimmung gebracht“ und danach in eine obere Hälfte (die also das Sprossmeristem enthielt) und in eine untere Hälfte getrennt (die also die Laubblätter enthielt). Eine nicht induzierte Pflanze erfuhr dieselbe Behandlung. Die Teile wurden kreuzweise über Pfropfung wieder zusammengefügt, und dann wartete man darauf, was passieren würde. Das Sprossmeristem der induzierten Pflanze saß nun also auf einer Unterlage aus nicht induzierten Blättern. Dieses Meristem blühte nicht. Dagegen kam das Sprossmeristem der nicht induzierten Pflanze auf der induzierten Unterlage zur Blüte. Daraus folgerte man, dass die Blätter die Tageslänge messen und dann ein Signal erzeugen, das nach oben ins Sprossmeristem geschickt wird und dort das Sprossmeristem von vegetativer auf generative Entwicklung umschaltet. Für dieses Blühsignal prägte Michael Chailakhyan schon 1936 den Begriff **Florigen** (von lat. *flor* Blüte und *genere* hervorbringen). Obwohl

man intensiv nach diesem Florigen suchte, gelang es sieben Jahrzehnte lang nicht, ein Florigen-Molekül dingfest zu machen. Erst 2005 kam der Durchbruch – mittels Mutanten der Modellpflanze *Arabidopsis*.

Mutanten des Photoperiodismus zu finden ist eine relativ einfache Angelegenheit, man kann die Pflanzen beispielsweise in Phytokammern unter Kurztag-Bedingungen anziehen und nach Mutanten suchen, die trotz dieser für *Arabidopsis* unterdrückenden Bedingungen frühzeitig blühen. Umgekehrt kann man unter Langtag-Bedingungen nach Mutanten suchen, die verzögert blühen. Innerhalb weniger Jahre wurden auf diesen Wegen eine stattliche Anzahl von mutmaßlichen Mutanten des Photoperiodismus isoliert und auch die betroffenen Gene identifiziert. Wirklich erhellend war das zunächst einmal nicht. Um unter den vielen Kandidaten die wirklich relevanten Gene herauszufiltern, musste man auf die in den Jahrzehnten zuvor entwickelten formalphysiologischen Untersuchungen zurückgreifen. Aus den Pfropfversuchen war ja schon bekannt, dass die Wahrnehmung der Tageslänge in den Blättern erfolgt. Also begann man damit, die identifizierten Gene danach zu durchmustern, ob ihre Aktivität in den Blättern rhythmisch gesteuert wurde. In der Tat stellte sich heraus, dass das Gen *CONSTANS* besonders interessant war: Dieses Gen wird etwa zwölf Stunden nach Tagesbeginn abgelesen, das neu gebildete Protein ist jedoch nur im Licht stabil, im Dunkeln wird es augenblicklich ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Da im Kurztag die Sonne schon untergegangen ist, bevor *CONSTANS* transkribiert wird, findet man also zwar die Transkripte dieses Gens, aber nicht das Protein. Im Langtag wird das Protein jedoch vor Sonnenuntergang gebildet, und unter Einfluss von Phytochrom (und des Blaulichtrezeptors Cryptochrom) bleibt das *CONSTANS* Protein stabil. Man findet dieses Protein nur im Phloem von Blättern, trotz intensiver Suche konnte weder das Protein noch seine Transkripte im Apikalmeristem nachgewiesen werden, trotz seines

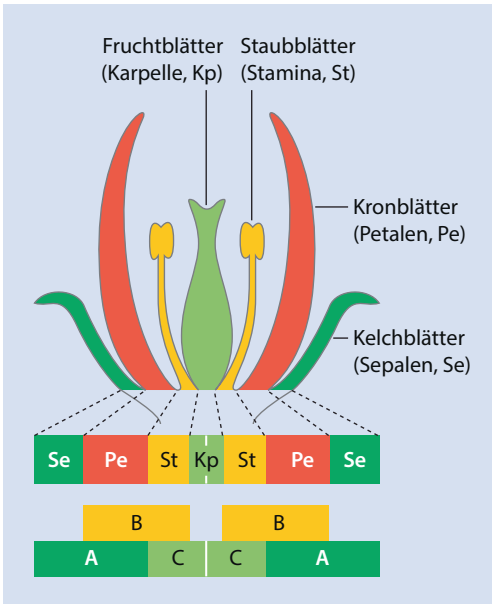
spannenden Regulationsmusters kommt es daher nicht als Florigen infrage. *CONSTANS* ist ein Transkriptionsfaktor, der in den Kern einwandert und dort die Aktivität anderer Gene steuert. Darunter ist auch das Gen *Flowering Locus T (FT)*, das man ebenfalls schon einige Jahre zuvor entdeckt hatte, das aber seinerzeit nicht als besonders spannend empfunden worden war. Erst als man sich anschaute, welche Gene durch *FT* (auch dies ein Transkriptionsfaktor), gesteuert werden, änderte sich das: eines der Ziele des *FT*-Proteins ist nämlich ein Gen (mit dem Kürzel *FD*) das die Stammzellen im Meristem so umsteuern kann, dass sie sich nicht mehr als Stammzellen weitererhalten, sondern in Form von Blütenorganen differenzieren. Folglich war das *FD*-Protein auch nicht in Blättern, sondern nur in den Spitzen der Sprosse zu finden (wo die Blüten entstehen). Wenn das *FD*-Gen ein Ziel für das *FT*-Protein darstellt, muss also dieses Protein, dessen Gen ja in den Blättern abgelesen wird, in das Apikalmeristem gelangen. Zunächst nahm man an, dass die in den Blättern abgelesenen Transkripte von *FT* in die Spitze des Sprosses transportiert und dort in Protein übersetzt würden. Dies stellte sich später als falsch heraus – mithilfe einer GFP-Fusion konnte gezeigt werden, dass das *FT*-Protein selbst ins Apikalmeristem einwandert und dort über *FD* die Umsteuerung zur Blütenentwicklung einleitet. Die mehr als sieben Jahrzehnte währende Jagd nach dem Florigen war also am Ziel angekommen, und die Gruppe von George Coupland am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln bekam für diese bahnbrechende Entdeckung 2008 den Nobelpreis für Chemie (Überblick in Corbesier und Coupland 2006).

Was ist nun der nächste Schritt? Unter der Wirkung des *FD*-Proteins werden die Stammzellen im Apikalmeristem umgesteuert. Während der vegetativen Entwicklung durchlaufen diese Zellen asymmetrische Teilungen: Während eine Tochterzelle das Stammzellverhalten ihrer Mutter übernimmt und also „ewig jugendlich“ bleibt, bildet die andere Zelle Nachkommen, die sich zu den verschiedenen

Geweben des Sprosses differenzieren, vor allem zu den Anlagen der Blättern, den Blatt-Primordien. In Antwort auf die Aktivierung des *FD*-Gens durch das *FT*-Protein geben die Stammzellen ihre „ewige Jugend“ auf und differenzieren sich vollständig, wobei die Blütenorgane entstehen. Schon Goethe hatte entdeckt, dass die Organe der Blüte eigentlich nichts anderes sind als umgewandelte Blätter. In seinem Buch „Metamorphose der Pflanze“ erfasste er auch schon mit erstaunlicher Klarheit, nach welchen Gesetzmäßigkeiten die Blüte entsteht: Die Organe der Blüte sind nämlich nichts anderes als Blattkreise, die unterschiedlich ausgeprägt werden. Dabei entstehen die außen liegenden Blütenorgane zeitlich früher als die inneren: Zunächst werden also die Kelchblätter angelegt, danach die Kronblätter, danach die männlichen Organe (die Staubblätter) und zuletzt die weiblichen Organe (die Fruchtblätter). In seinem Buch beschrieb Goethe auch schon Abweichungen von der Normalentwicklung – beispielsweise konnte er nachweisen, dass bei den sogenannten gefüllten Blüten einfach nur die beiden inneren Organkreise durch Blütenblätter ersetzt sind. Heutzutage werden solche Fälle als **homöotische** Mutanten bezeichnet – ein an einer bestimmten Stelle vorkommendes Organ wird durch ein anderes Organ ersetzt, das gewöhnlich an einer anderen Stelle gebildet würde. Das Organ selbst sieht normal aus, abnormal ist nur sein Ort. Die berühmte Fruchtfliegen-Mutante *antennapedia*, bei der anstelle einer Antenne ein Bein gebildet wird, das aber ansonsten aussieht wie ein ganz gewöhnliches Bein, wäre ein typisches Beispiel für eine solche homöotische Mutation.

Mithilfe solcher homöotischer Mutanten gelang es nun, die Morphogenese der Blüte aufzuklären: Die Blütenorgane werden abhängig von drei Typen von genetischen Schaltern (Transkriptionsfaktoren) festgelegt, die man der Einfachheit halber als A, B und C bezeichnete (■ Abb. 5.8).

Die A-Gene sind in den beiden am ersten angelegten Blattkreisen aktiv, die B-Gene folgen um genau einen Blattkreis versetzt



▣ **Abb. 5.8** ABC-Modell der Blütenbildung. (► <http://www.adonline.id.au/flowers/images/abc-model.png> (Vorlage))

später, und zuletzt werden die C-Gene aktiv (also in den letzten beiden Blattkreisen). Dieses Zeitmuster führt nun also dazu, dass im äußersten Blattkreis nur A-Gene aktiviert sind. Diese Blätter bilden sich dann als Kelchblätter aus. Im nächsten Wirtel sind zusätzlich zu den A-Genen auch B-Gene am Werk, und es entstehen Kronblätter. Noch einen Blattkreis später sind die A-Gene ausgeschaltet, dafür wirken die B-Gene gemeinsam mit den nun angeschalteten C-Genen. Diese Blätter werden Staubblätter, und im letzten Kreis sind nur noch C-Gene aktiv und es entstehen Fruchtblätter (▣ [Abb. 5.8](#)). Die Verbindung von einem bestimmten zeitlichen Muster der Expression und der Fähigkeit, verschiedene Kombinationen einzugehen, führt so in jedem der vier Blattkreise zu einer eigenen, spezifischen Aktivität dieser Genschalter (man vermutet, dass diese Transkriptionsfaktoren verschiedene Dimere bilden können, entweder mit ihresgleichen oder mit einem Faktor einer anderen homöotischen Klasse). Das Homodimer AA schaltet vermutlich Kelchblattgene

an, während das Heterodimer AB Kronblattgene aktiviert. Im nachfolgenden Blattkreis wird durch das Heterodimer BC die Entwicklung männlicher Geschlechtsorgane (Staubblätter) angestoßen, während im letzten, innersten Blattkreis das Homodimer CC die Entstehung der Fruchtblätter als weiblicher Geschlechtsorgane aktiviert wird. Dieses elegante Modell kann zahlreiche Beobachtungen, auch zur Entstehung von Blütenmutanten, erklären. Beispielsweise ergibt sich der Phänotyp der Mutante *pistillata 2* (Ausfall der B-Funktion) zwanglos, wenn man annimmt, dass AA Homodimere nicht nur im äußersten, sondern auch im nächstinneren Wirtel aktiv sind, sodass zwei Kreise von Kelchblättern entstehen, die Kronblätter also fehlen. In den beiden innersten Wirteln sind durch das Fehlen der B-Funktion nur CC-Homodimere aktiv, sodass die Staubblätter durch Fruchtblätter ersetzt sind.

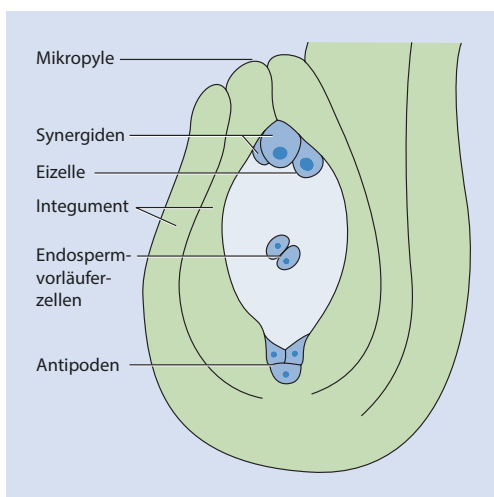
Das ursprüngliche Modell ist inzwischen etwas erweitert worden – beispielsweise konnte eine weitere D-Funktion nachgewiesen werden, die innerhalb der Fruchtblätter die Bildung von Samenanlagen anschaltet. Gleichzeitig konnte eine E-Funktion identifiziert werden, die für die Umsteuerung des Meristems von vegetativer (unbegrenzter) in eine generative (begrenzte) Entwicklung wichtig ist und aus der die A-Funktion durch eine Genverdopplung hervorgegangen ist. Trotz dieser Erweiterungen von Details liefert das ABC-Modell nach wie vor die fundamentale Erklärung für die Festlegung der Blütenorgane.

Innerhalb der beiden inneren Blattkreise, in Staub- und Fruchtblättern, findet dann die Meiose statt. Im Gegensatz zu den meisten vielzelligen Tieren gehen die entstehenden haploiden Keimzellen nicht unmittelbar einer Verschmelzung zu einer diploiden Zygote ein, sondern führen erst einmal ein (freilich sehr begrenztes) Eigenleben, indem sie mehrere Mitosen durchlaufen, sodass also ein kleiner haploider Organismus, der **Gametophyt**, entsteht. In den Fruchtblättern wird ein Embryosack aus acht Zellen gebildet, der eine ausgeprägte Polarität aufweist: Die Eizelle und

5.4 · Verwandte Modellorganismen

zwei sogenannte Synergiden sind auf der Seite der Eintrittsöffnung (Mikropyle) angeordnet, am gegenüberliegenden Pol finden sich drei Antipoden und in der Mitte des Embryosacks zwei haploide Zellen, die zu einer diploiden Polzelle verschmelzen (■ Abb. 5.9).

Auf der männlichen Seite ist die Entwicklung des Gametophyten noch stärker reduziert. Im Pollensack entsteht der haploide Pollen und durchläuft bei vielen Pflanzen noch im Pollensack eine erste Mitose. Diese Mitose ist formativ, da den beiden Tochterzellen ein unterschiedliches Entwicklungsschicksal zugewiesen wird: Die Spermazelle teilt sich innerhalb des auswachsenden Pollenschlauchs ein zweites Mal, während die vegetative Zelle sich nicht mehr teilt und auch nicht in die folgende Generation eingeht. Sie hat die Funktion, den auswachsenden Pollenschlauch (der also einem aufs Äußerste reduzierten Gametophyten entspricht) zu versorgen. Nachdem der Pollenschlauch im Inneren des Fruchtblatts die Mikropyle erreicht hat und nun in den Embryosack eindringt, verschmilzt der eine Spermakern mit der Eizelle zur Zygote, der andere Spermakern mit der (diploiden) Polzelle, sodass also eine triploide Zelle entsteht. Während sich aus der



■ **Abb. 5.9** Embryosack. (Vorlage aus einer alten Arbeit von van Lammeren (nicht mehr feststellbar))

Zygote der eigentliche Embryo entwickelt, bildet diese triploide Zelle das Endosperm, also das Nährgewebe, das den wachsenden Embryo versorgt. Ähnlich wie die vegetative Zelle des Pollenschlauchs trägt also dieser zweite Spermakern nicht zur Vererbung bei.

5.4 Verwandte Modellorganismen

Arabidopsis thaliana ist viel zu klein, um als Nutzpflanze von wirtschaftlichem Interesse zu sein. Sein Nutzen für die Menschheit ergibt sich ausschließlich aus seiner Modellhaftigkeit. Allerdings gibt es nahe Verwandte von *Arabidopsis thaliana*, die als Modellorganismen unmittelbar angewandten Wert besitzen:

Die nahe verwandte Art *Arabidopsis halleri* (Hallersches Schaumkraut) hat sich darauf spezialisiert, auf schwermetallverseuchten Böden zu wachsen. Sie kann vor allem Zink aus dem Boden aufnehmen und in großen Mengen in ihre Blätter einlagern. Verantwortlich für diese Eigenschaft ist das Enzym Nicotianamin-Synthase, dessen Produkt Nicotianamin Schwermetallionen sehr gut komplexieren kann. Auf dieses Enzym wurde man aufmerksam, als man die durch Schwermetall induzierten Gene in *Arabidopsis halleri* mit der Expression in *Arabidopsis thaliana* verglich. Wenn man die Expression von Nicotianamin durch einen RNAi-Ansatz verhinderte, verschwand die Fähigkeit zur Zinkaufnahme.

Die starke Anreicherung von Zink in den Blättern dieser Pflanze sollte eigentlich dazu führen, dass sich diese Art mit Zink förmlich vergiftet. Freilich zeigte sich, dass *Arabidopsis halleri* nicht nur ein Hyperakkumulator für Zink ist, sondern auch eine stark erhöhte Toleranz für Zink besitzt. Beide Eigenschaften sind jedoch nicht gekoppelt und werden getrennt voneinander vererbt. Die Aufnahme von Zink ist von großem angewandtem Interesse: Einerseits lässt sich diese Art zum Dekontaminieren von schwermetallverseuchten Böden einsetzen (sog. **Phytoremediation**). Andererseits kann man nun in Nutzpflanzen wie Reis oder Weizen auf

züchterischem Wege versuchen, die Nicotianamin-Pegel zu steigern. Hintergrund ist der in vielen Gegenden der Welt verbreitete Zinkmangel, den man ausgleichen könnte, indem man die Zinkaufnahme von Getreide steigert (sogenannte **Biofortifikation**).

Etwas weiter entfernt steht die wichtige Gattung *Brassica* (Kohl), die nicht nur als Gemüse (Kohl mit zahlreichen Kulturformen) genutzt wird, sondern mit dem Raps (*Brassica napus*) einen der wichtigsten nachwachsenden Rohstoffe liefert. Raps ist eigentlich keine ursprüngliche Pflanzenart, sondern entstand aus einer natürlichen Kreuzung zwischen Gemüsekohl (*B. oleraceae*) und dem „Unkraut“ Rübse (*B. rapa*). Der zunächst sterile Hybrid erlangte dann durch eine spontane Verdopplung seiner Chromosomen (**Allopolyploidie**) seine Fruchtbarkeit wieder und wurde zu einer eigenen Art, die unter den Verwandten von *Arabidopsis* wohl die ökonomisch bedeutsamste Rolle spielt. Grund dafür ist das Öl, das in den Keimblättern der reifen Embryonen gespeichert wird und schon vor vier Jahrtausenden in Indien als Lampenöl genutzt wurde. Gehalt und Zusammensetzung des Öls wurde schon seit Mitte des 20. Jahrhunderts intensiv züchterisch bearbeitet. Zum einen wurde durch Reduktion („Null-Raps“) und schließlich völlige Elimination der gesundheitsschädlichen Erucasäure („Doppel-Null-Raps“) das Öl auch für die menschliche Ernährung erschlossen, zum anderen wurde seine ursprüngliche Nutzung für technische Öle vorangetrieben. Inzwischen gehen etwa drei Viertel des in Deutschland angebauten Rapsöls in die Erzeugung von Biodiesel mit stark steigender Tendenz. Dazu wird das Öl mit Methanol verestert, um als Kraftstoff tauglich zu werden. Weltmarktführer für Raps sind freilich Kanada und China, wo ein sehr hoher Anteil von über 90 % als transgener Raps angebaut wird. Eintransformiert wurden vor allem Resistenzen gegen sogenannte Totalherbizide wie „BASTA“ oder „Roundup“, um so konkurrierende Unkräuter eindämmen zu können. Vor allem in Kanada kam es dabei durch Rückkreuzung mit der Elternart

Rübse zur Auskreuzung des Transgens, was unter Bedingungen einer Behandlung mit diesen Totalherbiziden einen Selektionsvorteil verleiht, sodass inzwischen große Anbauflächen in Kanada mit herbizidresistenten Raps-Rübse-Hybriden zu kämpfen haben (sog. *Super Weeds*). Weitere gentechnische Ansätze versuchen, den Fettsäurestoffwechsel über sogenanntes *Metabolic Engineering* so zu verändern, dass Produkte mit zugeschnittenen technischen Eigenschaften (z. B. hohen Schmelzpunkten für Schmieröle) entstehen. In der Öffentlichkeit bekannt wurde hierbei vor allem der sogenannte „Plastikraps“, bei dem durch Einführung bakterieller Gene der Fettsäurestoffwechsel so umgebaut wurde, dass Polyhydroxybutanoat entsteht, aus dem Weichplastik hergestellt werden kann. Aufgrund des nach wie vor niedrigen Ölpreises ist dieses Verfahren zurzeit jedoch noch nicht marktfähig.

5.5 Limitierungen des Modells *Arabidopsis*

So wie für andere Modellorganismen auch gibt es für *Arabidopsis* gewisse Grenzen der Übertragbarkeit, an denen nicht unbedenken von diesem Modell auf andere Pflanzen geschlossen werden kann. Im Grunde haben diese Grenzen mit der sogenannten Verkürzung zu tun, die ein Kennzeichen aller Modelle ist (eine genauere Betrachtung dieses wichtigen Punkts findet sich in ► Kap. 8). Bei *Arabidopsis* ergeben sich die Grenzen der Übertragbarkeit vor allem aus seiner ökologischen Strategie, als Therophyt durchs Leben zu kommen. Zentral für diese Strategie ist ein extrem schneller Entwicklungszyklus. Vor allem die für Pflanzen untypischen stereotypen Zellteilungsfolgen während der Embryogenese sind vermutlich als Anpassung an diese spezielle ökologische Strategie von *Arabidopsis* zu sehen. Diese fixierten Teilungsmuster führten zu dem Eindruck, dass die Differenzierung von Zellen schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung stattfindet,

wodurch die Analyse von Entwicklungsmutanten stark vereinfacht erschien. Aus diesem Grund wurde *Arabidopsis* gelegentlich als „*Caenorhabditis* der Pflanzenbiologie“ bezeichnet - auch für das Modell *Caenorhabditis elegans* (das übrigens eine ähnliche Strategie verfolgt) beobachtet man nämlich solche stereotypen Zellteilungen (s. auch **Zellschicksal durch Zellteilung**).

Dieser Aspekt der Embryonalentwicklung scheint also völlig aus der für Pflanzen typischen, flexiblen Entwicklung herauszufallen. Es bedurfte hier recht raffinierter Laser-Ablationsversuche, um zu zeigen, dass auch bei *Arabidopsis* das Zellschicksal flexibel ist und durch Signale der benachbarten Zellen bestimmt wird und nicht durch einen Determinationsvorgang ganz am Anfang der Embryonalentwicklung (**Zellschicksal durch Zellteilung**).

Zellschicksal durch Zellteilung – Arabidopsis als „Caenorhabditis“ der Pflanzenwelt?

Da sich viele Zelltypen bei *Arabidopsis* bis in die frühe Embryonalentwicklung zurückverfolgen lassen, die Abfolge von Zellteilung also (für Pflanzen untypisch) sehr stereotyp verläuft, entstand der Eindruck, dass die Zelldifferenzierung möglicherweise durch diese starre Folge von Zellteilungen festgelegt sei. Zellschicksal durch Zellteilung ist ein Mechanismus, der für die Entwicklung des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* gezeigt wurde. Im Grunde wäre dann der endgültige Bauplan schon als festgelegte Karte im befruchteten Ei niedergelegt und würde nur noch mosaikartig in den Endzustand übersetzt. Um ein solches Mosaikmodell überprüfen zu können, müsste man eigentlich Transplantationsversuche durchführen, wobei eine Zelle aus ihrer normalen Umgebung entnommen und an einen neuen Ort verpflanzt wird. Danach kann man

fragen, ob sie sich gemäß ihrer Herkunft entwickelt (Mosaikentwicklung) oder ob sie das für den neuen Ort angemessene Schicksal annimmt (Regulationsentwicklung). Mit solchen Versuchen konnten etwa Spemann und Mangold zu Beginn des 20. Jahrhunderts zeigen, dass Zellen in Amphibien über Signale determiniert werden, die sie von den Nachbarzellen erhalten (Spemann 1936; ► Kap. 7). Für Pflanzen sind solche Transplantationen nicht durchführbar, denn die Zellen sind über starre Zellwände miteinander verbunden. Über einen kleinen Trick gelang es dann aber doch, für die Wurzel von *Arabidopsis* die Idee von Spemann und Mangold zu kopieren: Dazu wurde eine sogenannte Laserablation eingesetzt, wobei zwei Infrarotlaser auf ein Ziel im Gewebe fokussiert und synchronisiert werden, sodass die von ihnen abgegebenen Quanten genau gleichzeitig in dieser Zielstelle ankommen und sich durch komplexe quantenoptische Effekte aufaddieren. Dabei entsteht in der Zielstelle (und nur dort) sehr starkes sichtbares Licht (Zweiphotonen-Prinzip), während in der Umgebung nur biologisch wirkungslose Infrarotstrahlung auftritt. Wenn die Energie der beiden Laser hochgefahren wird, kann nun die Zielzelle im Fokus förmlich bis zum Kollaps ausgebrannt werden, ohne dass die Nachbarzellen darunter leiden. Da pflanzliche Gewebe wegen des Turgordrucks unter einer starken Gewebespannung stehen, werden nun benachbarte Zellen in die Leerstelle hineingedrückt und haben, so wie bei einer Transplantation, ihren Ort verändert. Am Wurzelmeristem von *Arabidopsis*, das durchsichtig ist, lässt sich diese Laserablation besonders gut durchführen. Innerhalb dieses Meristems findet man Bereiche aus wenigen Zellen, die sich danach in die unterschiedlichen

Gewebe der Wurzel wie Wurzelhaube, Rindengewebe, Endodermis oder Zentralzylinder differenzieren. Über einen *Enhancer-Trap*-Ansatz wurden auch Mutantenlinien erzeugt, bei denen ein Reportergen (zumeist GFP) nur in einem bestimmten Zelltyp exprimiert wird. Nun kann man einzelne dieser Zellen mit dem Laser zerstören und dann fragen, ob die einwandernde Zelle sich herkunfts- oder ortsgemäß entwickelt. Dies lässt sich daran erkennen, ob sie ihren bisherigen Expressionstyp des Reporters beibehält (herkunftsgemäße Zelldifferenzierung) oder den Expressionstyp der eliminierten Zelle annimmt (ortsgemäße Zelldifferenzierung). Dies wurde in einer Reihe von spektakulären Arbeiten von Van den Berg in den 1990er-Jahren untersucht (Van den Berg et al. 1995). Dabei zeigte sich, dass die Zellen sich immer ortsgemäß verhalten – sie „vergessen“ also vollständig, wie sie vorher differenziert waren, und passen ihre Differenzierung an die neue Umgebung an. Dieser „zelluläre Alzheimer“ zeigte eindeutig, dass *Arabidopsis* eben nicht der „*Caenorhabditis* der Pflanzenwelt“ ist, sondern sich so verhält wie andere Pflanzen auch: Das Zellschicksal ist nicht festgelegt, sondern wird durch Signale von den Nachbarzellen bestimmt.

Bei anderen Pflanzen wäre man auf die kuriose Idee der determinierten Zelldifferenzierung nie gekommen, weil dort die Zellteilungsfolgen sehr variabel sind. Hier wurde also aufgrund einer biologischen Besonderheit des Modellorganismus *Arabidopsis* ein Konzept entwickelt, das überhaupt nicht „für Pflanzen“ modellhaft war. Nur mithilfe von sehr ausgebufften Techniken konnte man zeigen, dass das Modell in diesem Punkt nicht „völlig aus der Art geschlagen“ ist.

5.6 Neue Entwicklungen

Mit Ausnahme der Moose geht Pflanzen die homologe Rekombination weitgehend ab, was die Analyse transgener Pflanzen sehr erschwert. Das eingeführte Gen wird weitgehend zufällig irgendwo im Genom eingesetzt und dann abhängig von seiner Umgebung unterschiedlich stark exprimiert. Man erhält aus einem Transformationsversuch daher die ganze Bandbreite von starker bis völlig fehlender Expression und muss mühsam mehrere Linien mit unterschiedlichen Expressionsniveaus vergleichend untersuchen, um zu Schlüssen über die Funktion des exprimierten Transgens zu gelangen.

Gezielte Transformation steht daher schon seit Langem auf der Wunschliste der Pflanzenwissenschaften. Hier konnten nun in den letzten Jahren mithilfe des Modellorganismus *Arabidopsis* entscheidende Fortschritte erzielt werden. Wenn das Transgen stabil in das Genom integriert wird, setzt dies voraus, dass die DNA an dieser Stelle unterbrochen wird und dann wieder mit den Enden des Transgens verschmilzt. Wenn es nun gelänge, solche Strangbrüche gezielt an ganz bestimmten Stellen des Genoms zu setzen, würde das Transgen dann bevorzugt an diesen Stellen über einen *non-homologous end-joining* (NHEJ) genannten Prozess eingesetzt werden.

Genau diese Idee wurde über verschiedene Ansätze verfolgt. Über Einführung von veränderten Nucleasen wurde versucht, gezielt an bestimmten Stellen Strangbrüche zu setzen. Vor allem Zinkfinger-Nucleasen standen hier im Brennpunkt, weil sich die Bindedomänen von Zinkfinger-Proteinen so entwerfen lassen, dass sie an bestimmte Nucleotidmotive der DNA binden. Auch sogenannte *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *Xanthomonas* wurde eingesetzt, um gezielte Strangbrüche zu erzeugen. Der große Durchbruch kam aber mit dem CRISPR/Cas-System. Die Abkürzung steht für *clustered regularly interspaced short*

palindromic repeats/CRISPR-associated und bezeichnet ein bei Bakterien und Archaeen vorkommendes System von Nucleasen, die über kurze (nur 23 Basenpaare sind nötig) RNA-Sequenzen an ihren Zielort geleitet werden und dort dann Doppelstrangbrüche erzeugen. Da die eigentliche Nuclease (Cas) konstant ist und die Spezifität durch die leitende RNA-Sequenz entsteht, hat man hier ein modular („LEGO-artig“) aufgebautes Werkzeug, mit dem man jede beliebige Zielstruktur auf der DNA schneiden und dort über NHEJ ein Transgen einfügen kann.

Durch diese ganz neue Entwicklung wurde eine im Vergleich zu Modellsystemen mit homologer Rekombination entscheidende Begrenzung des Modells *Arabidopsis* durchbrochen. Vom bescheidenen „Mauerblümchen“, das nur in einer sehr begrenzten Therophyten-Nische überleben konnte, entwickelte sich *Arabidopsis* durch die wissenschaftlichen Fortschritte der letzten zwei Jahrzehnte zu einem sehr wichtigen Modellorganismus und liefert ein schönes Beispiel für die These, dass ein Modellorganismus etwas ganz anderes ist als eine in der Natur entstandene Lebensform. Der Modellorganismus *Arabidopsis* ist vielmehr ein in hohem Maße „künstliches“, sprich: durch wissenschaftliche Kunst für experimentelle Zwecke abgeändertes System.

Literatur

- Chailakhyan MK (1936) Nowye fakty za gormonnoy teorii rastitel'nowo razwiwenja. CR Akad Nauk SSSR 13:79–83 (Neue Fakten für eine Hormontheorie der pflanzlichen Entwicklung)
- Cholodny N (1927) Wuchshormone und Tropismen bei Pflanzen. Biol Zentralblatt 47:604–626
- Corbesier L, Coupland G (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. J Exp Bot 57:3395–3403
- Darwin F, Darwin C (1881) The power of movements in plants. John Murray, London
- Laplaze L, Parizot B, Baker A, Ricaud L, Martinière A, Auguy F, Franche C, Nussaume L, Bogusz D, Haseloff J (2005) GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot 56:2433–2442
- Liscum E, Briggs WR (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. Plant Cell 7:473–485
- Mayer U, Torres-Ruiz RA, Berleth T, Miséra S, Jürgens G (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. Nature 353:402–407
- McClintock B (1950) The origin and behaviour of mutable loci in maize. Proc Natl Acad Sci USA 36:344–355
- Spemann H (1936) Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Springer, Berlin
- Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. Nature 378:62–65
- Vasil V, Hildebrandt AC (1965) Differentiation of Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Microcultures. Science 150:889–892
- Went FW (1928) Wuchsstoff und Wachstum. Rec des Travaux Botaniques Néerlandais 25:1–116
- Yang M, Sack FD (1995) The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. Plant Cell 7:2227–2239

Weiterführende Literatur

- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353:31–37 (Historische und sehr klare Darstellung des ABC-Modells der Blütenbildung)
- Fausser F, Roth N, Pacher M, Ilg G, Sánchez-Fernández R, Biesgen C, Puchta H (2012) In planta gene targeting. Proc Natl Acad Sci USA 109:7535–7540 (Fundierte und gut zusammengefasste Übersicht zum Thema gezielte Transgenese in Pflanzen)
- Page DR, Grossniklaus U (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. Nature Genetics 3:124–136 (Eine Übersichtsdarstellung zur Mutagenese und zur Nutzung von Mutantensammlungen für die funktionelle Genomik in *Arabidopsis*)