

Pflanzenmeristeme

Stammzellen für unbegrenztes Leben

DIANA STERN UND THOMAS LAUX
INSTITUT FÜR BIOLOGIE III, UNIVERSITÄT FREIBURG

Der pflanzliche Embryo besitzt im Gegensatz zu den Tieren nur die Grundelemente einer „erwachsenen“ Pflanze: Wurzel, Keimblätter, Hypokotyl und zwei Scheitelmeristeme am unteren und oberen Ende (Abb. 1), von denen aus die erwachsene Pflanze erst nach der Keimung gebildet wird. Dabei ist ihr Bauplan nicht festgelegt: Die Anzahl der Blätter, Blüten, Zweige und Wurzeln eines Baumes wird nicht nur vom genetischen Programm sondern auch von Umweltfaktoren geprägt. Die Bildung neuer Organe kann sich dabei in Pflanzen im Prinzip unbegrenzt wiederholen

Stammzellen und ihre Nischen

Ein Meristem ist ein Bildungsgewebe, das sowohl neue Zellen nachliefern als auch Organanlagen (Primordien) bilden kann. Im Prinzip sind alle Meristeme ähnlich aufgebaut: Es gibt undifferenzierte Stammzellen und Tochterzellen, die differenzieren, d. h. spezialisierte Entwicklungswege einschlagen. Daraus ergibt sich eine einfache Definition von Stammzellen: Wenn Stammzellen sich teilen, entstehen einerseits neue Stammzellen und andererseits differenzierende Tochterzellen.

Um Stammzellen nachzuweisen, werden einzelne Zellen im Meristem genetisch markiert, wie z. B. durch eine Mutation, die zum Ausfall des Blattgrüns führt^[1]. Bei jeder Zell-

teilung erben die Tochterzellen das defekte Gen und können ebenfalls kein Blattgrün bilden, es entsteht also ein heller Bereich dessen Größe und darin enthaltene Zelltypen Aufschluß über Aktivität und Pluripotenz der Stammzelle gibt (Abb. 2).

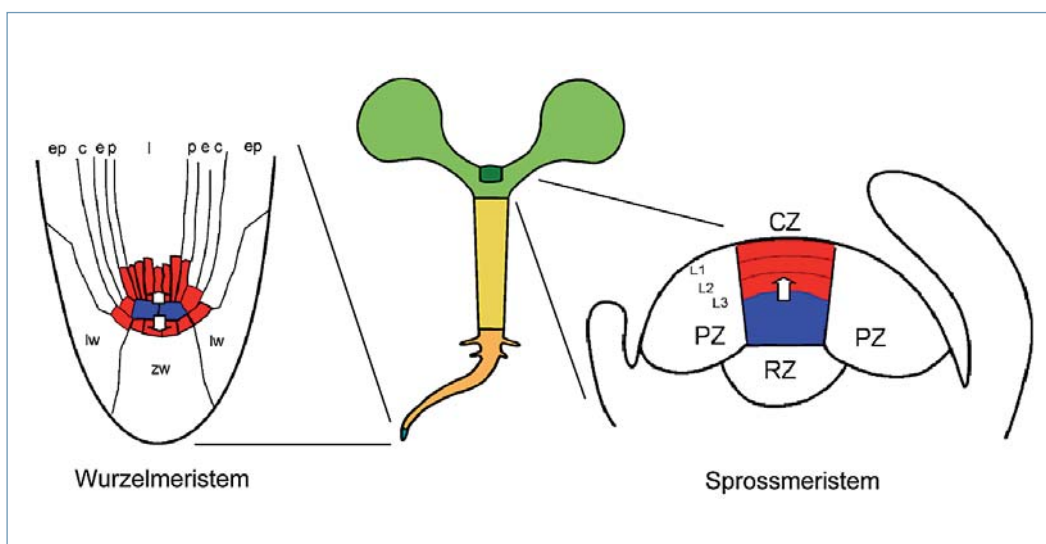
Bei Teilung einer Stammzelle entstehen Tochterzellen, die differenzieren und solche, die undifferenziert bleiben. Viele Experimente haben gezeigt, dass die notwendige Information nicht in den Stammzellen selbst steckt, sondern durch Signale aus den Nachbarzellen induziert wird^[2, 3]. Stammzellen in unterschiedlichen Geweben besitzen oft gewebespezifische Eigenschaften. Die vorherrschende Meinung ist deshalb, dass Stammzellen „unreife“ Zwischenprodukte der Dif-

ferenzierung sind, die am Weiterdifferenzieren gehindert werden und sich fortwährend teilen^[4].

Eine Mikroumgebung in einem Organismus, in der Differenzierung unterbleibt, nennt man Stammzellnische. Jede Zelle, die sich in der Stammzellnische befindet und jede pluripotente Tochterzelle, die nach einer Stammzellteilung darin bleibt, wird durch Signale aus der Umgebung an der Differenzierung gehindert. Und jede Zelle, die die Nische verlässt, kommt in eine Umgebung, in der andere Signale Differenzierung einleiten^[5].

Regulation von Stammzellen im Sprossmeristem

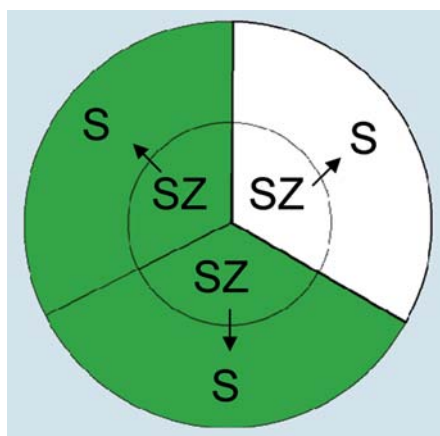
Wie reguliert die Pflanze Stammzellen? Sehen wir uns zunächst ein Sprossmeristem etwas genauer an. Bei einfachen Moosen und Farne gibt es nur eine einzige Stammzelle an der Spitze des Sprosses, die apikale Scheitelzelle^[6]. Die Stammzelle ist in vielen Fällen wesentlich größer als andere Zellen und teilt sich asymmetrisch: Die apikale Tochterzelle wird zur neuen Stammzelle, die nach unten abgegebene Tochterzelle differenziert und trägt zur Bildung des Sprosses bei. Bei den Bedecktsamern, wie z. B. dem Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) enthält die Zentrale Zone, in der sich die Zellen etwas seltener teilen, die Stammzellen an der



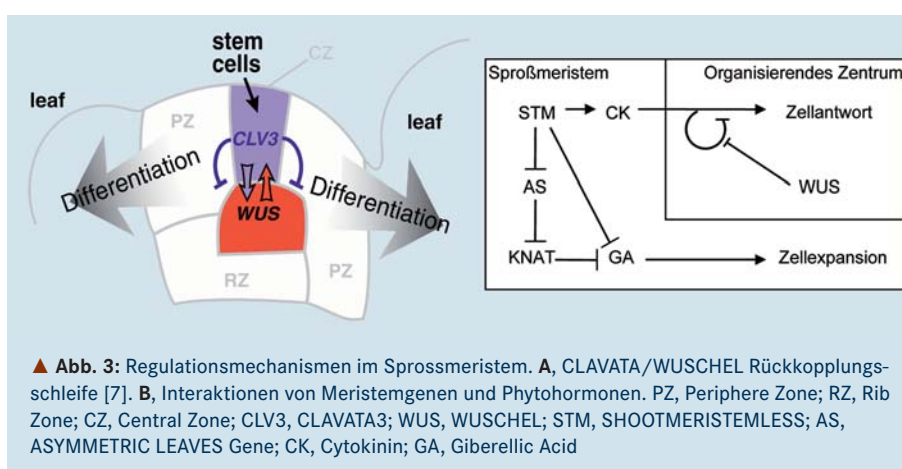
◀ **Abb. 1:** Polare Stammzellnischen in Pflanzen. Der Keimling besitzt zwei Scheitelmeristeme, das Sprossmeristem und das Wurzelmeristem, welche eine Stammzellnische mit den Stammzellen (rot) und stammzellregulierenden Signalzentren (blau) enthalten. ep, Epidermis; c, Cortex; e, Endodermis; p, Perizykel; l, Leitgewebe; zw, Zentrale Wurzelhaube; lw, Laterale Wurzelhaube; CZ, Central Zone; PZ, Periphere Zone; RZ, Rib Zone; L1/L2/L3, Layer 1-3 (äußere Zellschichten)

Spitze und das Organisierende Zentrum (Organizing Centre, OC) direkt darunter (Abb. 3). Wenn eine einzige Stammzelle markiert wird, dann entsteht aus den Tochterzellen ein markierter Sektor, der zwischen einem Drittel und der Hälfte des Sprossumfangs umfasst. Also muss es in jeder Zellschicht des Sprossmeristems nur zwei bis drei Stammzellen geben, bei den zweikeimblättrigen Bedecktsamern mit drei Meristemschichten also lediglich neun Zellen, aus denen der ganze Spross hervorgeht. Außerhalb der Zentralen Zone findet dann die Organbildung statt.

Im Gegensatz zur apikalen Scheitelzelle der niederen Pflanzen teilen sich die Stammzellen im Sprossmeristem der höheren Pflanzen nicht unbedingt asymmetrisch. Es können entweder beide, eine, oder gar keine Tochterzelle einer Stammzellteilung in der Nische verbleiben oder die Nische verlassen. Das Schicksal einer bestimmten Tochterzelle ist also nicht vorbestimmt und die regulatorischen Mechanismen müssen deshalb die Größe der Stammzellpopulation messen und auf einen bestimmten Wert einstellen können. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) wurden wichtige genetische Kontrollmechanismen identifiziert. Die Analyse von Mutanten, die entweder Stammzellen nicht undifferenziert halten können wie die *wuschel* (*wus*) Mutante oder die zu viele Stammzellen akkumulieren wie die *clavata* (*clv*) Mutanten, hat gezeigt, dass durch Kommunikation zwischen Stammzellen und Organisierendem Zentrum ein sich selbst regulierender Rückkopplungskreis entsteht^[7]. Das Organisierende Zentrum exprimiert das *WUS*-Gen, das für einen Transkriptionsfaktor mit Homöodomäne kodiert (Abb. 3). Fehlt das *WUS*-Protein, kommt es zur Differenzierung der darüber liegenden Stammzellen und zum Arrest des Sprossmeristems^[8]. Künstlich herbeigeführte Expression des *WUSCHEL*-Gens in Organprimordien hingegen führt zur Bildung von zusätzlichen Stammzellen. Daher ist die Begrenzung des von *WUS* ausgelösten Signals für das Gleichgewicht zwischen Stammzellerhaltung und Differenzierung essenziell. Dies geschieht dadurch, dass die Stammzellen als Rückantwort das Signalpeptid *CLAVATA3* (*CLV3*) exprimieren^[9]. *CLV3* breitet sich extrazellulär aus und bindet an die Rezeptorkinase *CLAVATA1* (*CLV1*) auf der Oberfläche von Meristemzellen, wodurch letztlich die Expression des *WUS*-Gens gehemmt wird^[10, 11]. Diese Rückkopplungsschleife zwischen Organisierendem Zentrum



◀ **Abb. 2:** Untersuchung von Stammzeleigenschaften. Chimären geben Aufschluss über die Zahl und Eigenschaften von Stammzellen. Schematischer Querschnitt durch eine Stammzellgruppe im Sprossmeristem. SZ, Stammzelle; S, Sektor mit markierten Tochterzellen



▲ **Abb. 3:** Regulationsmechanismen im Sprossmeristem. **A,** CLAVATA/WUSCHEL Rückkopplungsschleife [7]. **B,** Interaktionen von Meristemgenen und Phytohormonen. PZ, Periphere Zone; RZ, Rib Zone; CZ, Central Zone; *CLV3*, CLAVATA3; *WUS*, WUSCHEL; *STM*, SHOOTMERISTEMLESS; *AS*, ASYMMETRIC LEAVES Gene; *CK*, Cytokinin; *GA*, Gibberellinsäure

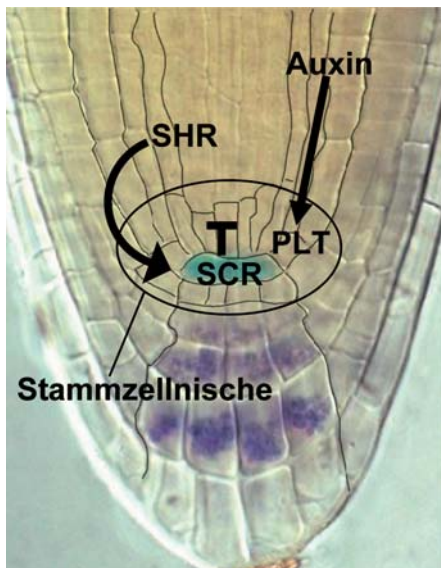
und Stammzellen erlaubt eine dynamische Regulation und zeitnahe Korrektur der Stammzellzahl.

Seit langem ist die Bedeutung von Wachstumsfaktoren (Phytohormonen) für die Pflanzenentwicklung bekannt. Zytokinine fördern die Zellteilung und ein hohes Zytokinin/Auxin-Verhältnis fördert die Sprossbildung, während ein niedriges Verhältnis die Wurzelbildung fördert. Gibberellinsäure wirkt als Antagonist zu Zytokinin und fördert die Zellstreckung. Zytokinine binden an Rezeptoren und aktivieren dadurch intrazelluläre Signalketten, was zu zellspezifischen Wirkungen führt. Im Organisierenden Zentrum reduziert *WUS* die Expression von spezifischen Inhibitoren des intrazellulären Zytokinin-Signalweges^[12], womit die Regulation der Zellantwort auf Zytokinine wahrscheinlich eine zentrale Rolle in der Stammzellnische einnimmt.

Die Stammzellnische im Wurzelmeristem

Das Wurzelmeristem unterscheidet sich im Aufbau, in der Funktionsweise und bezüglich der beteiligten regulatorischen Gene vom

Sprossmeristem. Im Zentrum liegt das Ruhezentrum (Quiescent Center, QC), eine Gruppe von sich selten teilenden Zellen, das ringsherum von Stammzellen umgeben ist (Abb. 1). Das Abtöten einzelner Zellen des Ruhezentriums durch Laserbestrahlung führt dazu, dass die direkt angrenzende Stammzelle differenziert^[13]. Außerdem teilt sich jede Stammzelle strikt asymmetrisch, so dass immer eine Tochterzelle entsteht, die in Kontakt mit dem Ruhezentrum bleibt und sich weiterhin als Stammzelle verhält, während die andere Tochterzelle den Kontakt verliert und differenziert. Die Stammzellnische am Wurzelpol unterscheidet sich also deutlich von der im Sprossmeristem und ist so aufgebaut wie die meisten der untersuchten Stammzellnischen im Tierreich^[2]. Auch die Regulationsmechanismen scheinen unterschiedlich zu denen im Spross und umfassen zwei Hauptwege: lokale Auxinanreicherung und der *SHORTROOT/SCARECROW*-Signalweg (Abb. 4). In der Wurzel wird Auxin zur Wurzelspitze hin transportiert und akkumuliert im Bereich des Ruhezentriums. Das dadurch entstehende Auxinmaximum ist für die Expression der *PLETHORA*-Transkrip-



▲ **Abb. 4:** Genetische Regulation des Wurzelmeristems. SHORTROOT-Protein aktiviert SCARECROW-Genexpression im Ruhezentrum der Wurzel (hellblau angefärbt). SCARECROW verhindert die Differenzierung der umliegenden Stammzellen. In einem parallelen Signalweg wird Auxin ins Wurzelmeristem transportiert, wo es die Expression der PLETHORA-Gene induziert, die für die Erhaltung der Stammzellpopulation im Wurzelmeristem notwendig sind. SHR, SHORTROOT; SCR, SCARECROW; PLT, PLETHORA-Gene

tionsfaktoren in der Stammzellnische notwendig, die wiederum für die Erhaltung der Stammzellen essenziell sind^[14]. Der SHORTROOT (SHR)/SCARECROW (SCR)-Signalweg dagegen verbindet das Leitgewebe mit der Stammzellnische. Der Leitgewebeskegel im Zentrum der Wurzel exprimiert den Transkriptionsfaktor SHR, der anschließend in die an das Leitgewebe direkt angrenzende Zellschicht wandert^[15]. Neben verschiedenen anderen Aspekten in den seitlichen Nachbarzellen, induziert SHR im darunter liegenden Ruhezentrum die Expression des Transkriptionsfaktors SCR, der für die Stammzellerhaltung essenziell ist^[16]. Letztlich wird durch diese Einflüsse die Zelldifferenzierung reguliert, wobei jedoch viele spannende Details noch aufzuklären sind.

Anwendungen und offene Fragen

Nach der Identifizierung wichtiger Regulatoren werden neue Technologien helfen, ein Gesamtmodell für die Regulation und Funktion pflanzlicher Stammzellen zu erstellen. Eine Besonderheit des Sprossmeristems ist, dass ein räumliches Muster von Genexpressionsdomänen und Zellstadien kontinuierlich beibehalten wird, obwohl die dem Muster zugrunde liegenden Zellen sich teilen und

ständig ändern. Das erfordert präzise und robuste Musterbildung in dynamischen Zellpopulationen. Computergestützte Modellierungen zeigen, dass Rückkopplungsmechanismen wie der zwischen Organisierendem Zentrum und Stammzellen eine große Robustheit verleihen, in die aber zusätzliche Parameter wie sich ändernde Meristemgröße und Meristemaktivität integriert werden müssen^[17].

Eine wichtige Herausforderung wird die räumliche und zeitliche Auflösung von Zellverhalten durch direkte Beobachtung am lebenden Objekt (Life imaging) sein. Außerdem wird die Identifizierung von Regulatorgenen und das Verständnis der Regelkreise, durch die das Gleichgewicht zwischen Stammzellerhaltung und Organbildung eingestellt wird, einen wichtigen Beitrag zur biotechnologischen Nutzung von Pflanzen leisten. So ermöglicht die kontrollierte Expression von Stammzell-Regulatorgenen die effiziente Erzeugung somatischer Embryonen, was die Vermehrung schwer zu regenerierender Pflanzen erleichtern sollte^[18]. ■

Literatur

- [1] Stewart, R.N., Dermen, H. (1970): Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *Am. J. Bot.* 57: 816–826.
- [2] Spradling, A.D., Drummond-Barbosa, T., Kai. (2001): Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98–104.
- [3] Laux, T. (2003): The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell* 113: 281–3.
- [4] Mikkers, H., Frisen, J. (2005): Deconstructing stemness. *Embo J* 24: 2715–9.
- [5] Blau, H.M., Brazelton, T.R., Weimann, J.M. (2001): The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105: 829–41.
- [6] Steeves, T.A., Sussex, I.M. (1989): Patterns in Plant Development. (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- [7] Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., Laux, T. (2000): The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100: 635–644.
- [8] Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., Laux, T. (1998): Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95: 805–815.
- [9] Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., Meyerowitz, E.M. (1999): Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* 283: 1911–1914.

- [10] Rojo, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Fletcher, J.C. (2002): CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* 14: 969–77.
- [11] Lenhard, M., Laux, T. (2003): Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development* 130: 3163–73.
- [12] Leibfried, A., To, J.P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., Lohmann, J.U. (2005): WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172–5.
- [13] van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B. (1997): Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390: 287–9.
- [14] Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., Scheres, B. (1999): An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99: 463–72.
- [15] Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., Benfey, P. (2001): Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307–311.
- [16] Heidstra, R., Welch, D., Scheres B. (2004): Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev* 18: 1964–9.
- [17] Jonsson, H., Heisler, M., Reddy, G.V., Agrawal, V., Gor, V., Shapiro, B.E., Mjolsness, E., Meyerowitz, E.M. (2005): Modeling the organization of the WUSCHEL expression domain in the shoot apical meristem. *Bioinformatics* 21 Suppl 1: i232–40.
- [18] Mordhorst, A.P., Hartog, M.V., El Tamer, M.K., Laux, T., de Vries, S.C. (2002): Somatic embryogenesis from Arabidopsis shoot apical meristem mutants. *Planta* 214: 829–36.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Thomas Laux
Institut für Biologie III
Universität Freiburg
Schänzlestraße 1
D-79104 Freiburg
Tel.: 0761-203 2943
Fax: 0761-203 2745
laux@biologie.uni-freiburg.de

AUTOREN



Thomas Laux

Studium der Biologie in Erlangen, 1988 Promotion bei Michael Schweizer an der Universität Erlangen, von 1988–1991 Postdoc bei Robert Goldberg UC Los Angeles, 1992–1994 Postdoc bei Gerd Jürgens an der LMU München, 1994–2000 Arbeitsgruppe am ZMBP in Tübingen, seit 2000 Professor an der Universität Freiburg.



Diana Stern

1996–2002 Studium der Biologie in Freiburg und Leeds, Großbritannien, Diplomarbeit und seit 2002 Doktorarbeit bei Thomas Laux an der Universität Freiburg