

Molekulare und genetische Analyse
natürlich-vorkommender *Antisense*-Transkripte
an *Cytokininoxidase/-dehydrogenase*-Genloci in
Arabidopsis thaliana

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jenny Engelmann

Berlin 2020

Diese Arbeit wurde von Mai 2013 bis August 2020 unter der Leitung von Prof. Dr. Tomáš Werner am Institut für Biologie - Angewandte Genetik in der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik der Freien Universität Berlin angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Tomáš Werner
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Disputation am 03.11.2020

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Phytohormon Cytokinin.....	1
1.1.1 Cytokininmetabolismus.....	2
1.1.1.1 Biosynthese und Interkonversion von Cytokinin	3
1.1.1.2 Konjugation von Cytokinin	5
1.1.1.3 Abbau von Cytokinin.....	6
1.1.2 Cytokinin-signaltransduktion.....	12
1.1.3 Transport von Cytokinin.....	15
1.1.4 Cytokininwirkung in Pflanzen.....	17
1.1.4.1 Cytokinin während der pflanzlichen Entwicklung.....	17
1.1.4.2 Bedeutung von Cytokinin bei der pflanzlichen Reaktion auf Stress.....	20
1.1.4.3 Crosstalk mit anderen Hormonen	21
1.1.4.4 Modulation der Cytokininantwort.....	23
1.2 Nicht-proteinkodierende Transkripte.....	26
1.2.1 Natürliche <i>Antisense</i> -Transkripte	28
1.2.1.1 Mechanismen zur Regulation der Genaktivität durch lncRNAs.....	28
1.2.1.2 Biologische Relevanz von lncRNAs in Pflanzen.....	32
1.2.2 Evolutionäre Konservierung von lncRNAs.....	33
1.3 Zielsetzung der Arbeit	35
2 MATERIAL UND METHODEN	36
2.1 Material	36
2.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	36
2.1.2 Analysesets (Kits).....	36
2.1.3 Oligonukleotide.....	37
2.1.4 Plasmide.....	37
2.1.5 Nährmedien und Zusätze	37
2.1.6 Bakterienstämme	38
2.1.7 Pflanzenlinien	38
2.1.8 Verwendete Datenbanken	38
2.1.9 Verwendete Programme.....	39
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Arbeiten mit Mikroorganismen.....	41
2.2.1.1 Kultivierung und Selektion von Mikroorganismen	41
2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen	41
2.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterienzellen	42
2.2.2 Arbeiten mit <i>A. thaliana</i>	42
2.2.2.1 Kultivierung und Selektion von <i>A. thaliana</i>	42
2.2.2.2 Transformation von <i>A. thaliana</i> und Selektion transgener Pflanzen	43
2.2.2.3 Analyse der β -Glukuronidase-Aktivität in Geweben von <i>A. thaliana</i>	43
2.2.2.4 Untersuchung des Wurzelwachstums von <i>A. thaliana</i>	44
2.2.2.5 Induktion von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen mit Cytokinin	44
2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden	44
2.2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	44
2.2.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	45
2.2.3.3 Extraktion von DNA aus einem präparativen Agarosegel.....	46
2.2.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	46
2.2.3.5 Extraktion genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	46
2.2.3.6 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	46
2.2.3.7 Restriktionsverdau von DNA.....	47

2.2.3.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	47
2.2.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	47
2.2.3.10	Aufreinigung von DNA nach einer Behandlung mit Enzymen.....	47
2.2.3.11	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	47
2.2.4	Klonierungsstrategien.....	48
2.2.5	Bestimmung der Transkriptabundanz.....	48
2.2.5.1	Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>A. thaliana</i>	48
2.2.5.2	DNaseI-Verdau.....	49
2.2.5.3	Gesamt-cDNA-Synthese.....	49
2.2.5.4	Strangspezifische cDNA-Synthese.....	49
2.2.5.5	Semiquantitative RT-PCR.....	50
2.2.5.6	Quantitative PCR.....	50
2.2.5.7	Etablierung eines qPCR-Assays.....	51
2.2.6	Experimentelle Analyse der subzellulären Lokalisation von Transkripten.....	52
2.2.7	Charakterisierung von Transkriptenden.....	52
2.2.7.1	Identifikation von Transkriptenden mittels RACE-Analyse.....	52
2.2.7.2	Analyse der 5'-Cap-Struktur.....	53
2.2.8	Bioinformatische Analysen.....	53
2.2.8.1	<i>In silico</i> -Analysen.....	53
2.2.8.2	Analyse der evolutionären Konservierung.....	57
2.3	Statistische Analysen.....	58
3	ERGEBNISSE.....	59
3.1	Identifikation von NATs an CKX-Loci.....	59
3.1.1	<i>In silico</i> -Analyse von Transkripten an CKX-Loci.....	59
3.1.2	Experimenteller Nachweis von CKX-NATs.....	61
3.2	Strukturelle Charakterisierung von CKX-NATs.....	62
3.2.1	CKX-NATs besitzen diverse alternative Transkriptenden, einen Poly-A-Schwanz und eine 5'-Cap-Struktur.....	62
3.2.2	CKX-NATs bilden diverse Isoformen mit variablen Exon-Intron-Strukturen.....	67
3.2.3	<i>In silico</i> -Analyse der Proteinkodierungskapazität der CKX-NATs.....	69
3.3	CKX-NATs werden gewebespezifisch exprimiert.....	72
3.4	Subzelluläre Lokalisierung der CKX-NATs.....	75
3.5	Untersuchung der transkriptionellen Regulierung von CKX-NATs.....	77
3.5.1	CKX-NAT-Level werden durch verschiedene Stimuli reguliert.....	77
3.5.2	CKX5-NATs werden schnell durch Cytokinin induziert.....	80
3.6	Analyse der biologischen Relevanz von CKX-NATs.....	82
3.6.1	Identifikation und Analyse von <i>knock-out</i> -Mutanten der CKX1-NATs.....	82
3.6.1.1	Isolierung von CKX1-NAT T-DNA-Insertionsmutanten.....	82
3.6.1.2	T-DNA-Insertionsmutanten zeigen keine Reduktion des CKX1-NAT-Levels.....	83
3.6.1.3	Isolierung von amiRNA-Mutanten.....	84
3.6.1.4	amiRNA-Mutanten zeigen keine Reduktion des CKX1-NAT-Levels.....	85
3.6.2	Isolierung und Analyse von CKX1-NAT-Überexpressionsmutanten.....	85
3.6.2.1	Selektion geeigneter 35S:CKX1-NAT-Linien.....	85
3.6.2.2	Molekulare Analyse der 35S:CKX1-NAT-Linien.....	86
3.6.3	Isolierung und Analyse von <i>knock-out</i> -Mutanten der CKX5-NATs.....	90
3.6.3.1	Isolierung von CKX5-NAT T-DNA-Insertionsmutanten.....	90
3.6.3.2	Molekulare Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten von CKX5-NAT.....	91
3.6.3.3	Phänotypische Analyse von <i>ckx5-nat-S3</i>	93
3.7	Untersuchung der evolutionären Konservierung von CKX-NATs.....	94
3.7.1	CKX-NATs existieren an homologen Loci verschiedener Pflanzenspezies.....	95
3.7.2	Konservierung der NAT-Sequenz.....	98
4	DISKUSSION.....	102
4.1	An einigen CKX-Loci werden aktiv NATs transkribiert.....	102
4.2	NATs an CKX-Loci zeigen ein ähnliches Muster struktureller Variabilität.....	103

4.3	Die Expression von <i>CKX-NATs</i> wird aktiv reguliert.....	105
4.4	Mögliche Regulationsmechanismen der <i>CKX-NATs</i>	109
4.5	Mögliche biologische Funktionen der <i>CKX-NATs</i>	115
4.6	Der Großteil der <i>CKX-NATs</i> kodiert wahrscheinlich nicht für Proteine	119
4.7	Die Existenz von lncNATs ist ein gemeinsames Merkmal homologer <i>CKX1</i> - und <i>CKX6</i> -Loci in Angiospermen.....	123
4.8	<i>CKX1</i> - und <i>CKX6</i> -lncNATs verschiedener Spezies sind strukturell konserviert.....	123
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	SUMMARY.....	128
	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
	ANHANG	152
	DANKSAGUNG	181

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturen von Cytokinin.	2
Abbildung 2: Übersicht über den pflanzlichen Cytokininmetabolismus.....	3
Abbildung 3: CKX-Reaktion.....	6
Abbildung 4: Signaltransduktion und Transport von Cytokinin.	13
Abbildung 5: Klassifikation von Transkripten.	27
Abbildung 6: Regulationsmechanismen von lncNATs.	29
Abbildung 7: <i>In silico</i> -Analyse zur Identifikation von <i>CKX-NATs</i>	60
Abbildung 8: Experimenteller Nachweis von <i>CKX-NATs</i>	62
Abbildung 9: Isolierung der <i>CKX-NAT</i> -Transkriptenden.	63
Abbildung 10: <i>CKX1</i> , <i>CKX5</i> , <i>CKX6</i> und ihre <i>cis-NATs</i>	65
Abbildung 11: Transkriptenden der <i>CKX-NATs</i>	66
Abbildung 12: Nachweis der 5'-Cap-Struktur an <i>CKX-NATs</i>	67
Abbildung 13: Abundanz der <i>CKX-NAT</i> -Isoformen in unterschiedlichen Geweben.	69
Abbildung 14: <i>CKX-NAT</i> Abundanz in verschiedenen Geweben.	72
Abbildung 15: Promotoraktivität der <i>CKX-NATs</i>	74
Abbildung 16: <i>CKX-NATs</i> sind im Zellkern und Cytoplasma lokalisiert.	76
Abbildung 17: Regulation der <i>Sense</i> - und <i>Antisense</i> -Transkripte am <i>CKX1</i> -, <i>CKX5</i> - und <i>CKX6</i> -Locus.	79
Abbildung 18: <i>CKX5</i> - und <i>CKX5-NAT</i> -Level werden durch Cytokinin reguliert.	81
Abbildung 19: Identifikation und Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten des <i>CKX1-NAT</i> -Gens... ..	83
Abbildung 20: Analyse der <i>35S:ckx1-nat-miR</i> -Linien.....	85
Abbildung 21: Überexpression von <i>CKX1-NAT</i> in transgenen Arabidopsislinien.	87
Abbildung 22: Anstieg des <i>CKX1</i> -Transkriptlevels in den <i>CKX1-NAT</i> -Überexpressionslinien.	88
Abbildung 23: Identifikation von T-DNA-Insertionsmutanten des <i>CKX5-NAT</i> -Gens.....	91
Abbildung 24: Molekulare Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten des <i>CKX5-NAT</i> -Gens.....	92
Abbildung 25: Phänotypische Analyse der <i>knock-down</i> -Mutante <i>ckx5-nat-S3</i>	94
Abbildung 26: Identifikation <i>CKX-NATs</i> in weiteren Pflanzenspezies.....	96
Abbildung 27: Mittels BLAST identifizierte Transkriptisoformen mit größter Sequenzhomologie zu <i>CKX1-NAT</i> bzw. <i>CKX6-NAT</i>	101
Abbildung 28: Vektorkarte von <i>pCKX1-NAT pCB308</i>	152
Abbildung 29: Vektorkarte von <i>pCKX5-NAT pCB308</i>	153
Abbildung 30: Vektorkarte von <i>pCKX6-NAT pCB308</i>	154
Abbildung 31: Übersicht über Transkripte, Primerpositionen und Mutanten am <i>CKX1</i> -Locus.	158
Abbildung 32: Übersicht über Transkripte, Primerpositionen und Mutanten am <i>CKX5</i> -Locus.	159
Abbildung 33: Übersicht über Transkripte, Primerpositionen und Mutanten am <i>CKX6</i> -Locus.	159
Abbildung 34: Genloci von <i>PtCKX1-X1</i> , <i>PtCKX1-X2</i> und <i>BrCKX1-X3</i>	177
Abbildung 35: Darstellung der als Kontrollen genutzten intergenischen Bereiche <i>downstream</i> von <i>At3g63230</i> und <i>downstream</i> von <i>At3g63240</i>	180

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Enzyme.	36
Tabelle 2: Verwendete Kits.	36
Tabelle 3: Verwendete Ausgangsplasmide.	37
Tabelle 4: Verwendete Nährmedien.	37
Tabelle 5: Verwendete Zusätze zur <i>in vitro</i> -Selektion.	37
Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme.	38
Tabelle 7: Verwendete Datenbanken.	38
Tabelle 8: Verwendete Software.	39
Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Ansätze.	45
Tabelle 10: PCR-Programme.	45
Tabelle 11: Reaktionsansatz einer Ligation.	47
Tabelle 12: Reaktionsansatz für Gesamt-cDNA-Synthese.	49
Tabelle 13: Reaktionsansatz für strangspezifische cDNA-Synthese.	50
Tabelle 14: Reaktionsansätze einer RT-PCR.	50
Tabelle 15: Zusammensetzung einer qPCR-Reaktion.	51
Tabelle 16: qPCR-Programm.	51
Tabelle 17: Zusammensetzung einer TEX-Reaktion.	53
Tabelle 18: Für Transkriptlevelanalyse genutzte RNA-Seq-Datensätze.	55
Tabelle 19: Genutzte Filter zur Quantifizierung der <i>reads</i> der verschiedenen Transkripte in den RNA-Seq-Datensätzen.	56
Tabelle 20: Anzahl sequenzierter RACE-Fragmente.	66
Tabelle 21: Peptide bzw. Proteine der längsten ORFs der <i>CKX-NAT</i> -Isoformen und deren homologe Proteine.	70
Tabelle 22: <i>In silico</i> identifizierte Stimuli, welche möglicherweise die <i>CKX-NAT</i> -Level regulieren.	78
Tabelle 23: Analyse der Sequenzidentität zwischen <i>CKX-NATs</i> bzw. <i>CKX</i> -Transkripten aus <i>A. thaliana</i> und den entsprechenden orthologen Transkripten verschiedener Spezies.	100
Tabelle 24: Verwendete T-DNA-Insertionslinien.	155
Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide.	156
Tabelle 26: Nukleotidsequenzen der mittels RACE-Analyse identifizierten <i>CKX-NAT</i> -Isoformen.	160
Tabelle 27: Bioinformatische Vorhersage subzellulärer Lokalisation der <i>CKX-NAT</i> -Isoformen mittels Locate-R und IncLocator.	167
Tabelle 28: Vorhergesagte miRNA-Zielsequenzen in <i>CKX</i> -Transkripten laut psRNA Target.	169
Tabelle 29: Hinweise auf die Existenz von NATs an <i>CKX</i> -Loci verschiedener Pflanzenspezies.	173
Tabelle 30: Identifizierung von homologen Transkriptsequenzen mittels BLAST. Homologe Sequenzen mit gegenläufiger Orientierung sind in grau dargestellt.	178
Tabelle 31: Analyse der Sequenzidentität homologer intergenischer Bereiche verschiedener Spezies.	180

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. lyrata</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>E. salsiguneum</i>	<i>Eutrema salsugineum</i>
aa	<i>amino acid</i>	<i>E-value</i>	<i>Expect value</i>
ABA	Abscisinsäure	eEF	EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR
ADK	Adenosinkinase	EIN	ETHYLENE INSENSITIVE
ADP	Adenosindiphosphat	ENT	Äquilibrierender Nukleosidtransporter
AHK	ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE	ER	Endoplasmatisches Retikulum
AHP	Histidinphosphotransferproteins	ERAD	ER-assoziierten Proteindegradation
AMP	Adenosinmonophosphat	ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR
APT	Adenin- Phosphoribosyltransferasen	EST	<i>expressed sequence tag</i>
AP4M	AP4 COMPLEX SUBUNIT MU	ETR	ETHYLENE RECEPTOR
ATP	Adenosintriphosphat	EWS	EWING SARCOMA BREAK POINT REGION 1
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette-</i> Transporter	FAD	Flavinadenindinukleotid
ABI	ABA INSENSITIVE	FANoS	<i>fluorescence-activated nucleolar sorting</i>
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa</i>	FANS	<i>fluorescence-activated nuclear sorting</i>
BA	Benzyladenin	FLC	FLOWERING LOCUS C
BACE	β -SITE OF APP CLEAVING ENZYME 1	GAS	GROWTH ARREST SPECIFIC
BACE1-AS	<i>BACE1-ANTISENSE TRANSCRIPT</i>	GUS	β -Glukuronidase
bp	Basenpaar	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>C. rubella</i>	<i>Capsella rubella</i>	HID	HIDDEN TRISURE
<i>C. sativa</i>	<i>Camelina sativa</i>	HSFB2A	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR B2A
<i>C. sativus</i>	<i>Cucumis sativus</i>	iP	Isopentenyladenin
CBF	C REPEAT/DEHYDRATION- RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR	IPT	Isopentenyltransferase
CDF	CYCLING DOF FACTOR	KMD	KISS ME DEADLY
CDS	<i>coding sequence</i>	<i>LAIR</i>	<i>LRK ANTISENSE INTERGENIC RNA</i>
CES	Cellulose Synthase	lincRNA	<i>long intergenic non-coding RNA</i>
circRNA	<i>circular RNA</i>	lncNAT	<i>long non-coding natural antisense transcript</i>
CFL	COFILIN	lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
CHASE-Domäne	<i>cyclases/histidine kinases associated sensor extracellular-</i> Domäne	LOG	LONELY GUY
CKX	Cytokininoxidase/- dehydrogenase	LRK	LEUCIN-RICH REPEAT RECEPTOR KINASE
CRISPR/Cas9	<i>clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9</i>	<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
CRF	CYTOKININ RESPONSE FACTOR	MAF	<i>MADS AFFECTING FLOWERING</i>
<i>CTN-RNA</i>	<i>CAT2 TRANSCRIBED NUCLEAR RNA</i>	MAS	<i>MAF4 ANTISENSE RNA</i>
CYP	Cytochrom-P450	mCAT	MOUSE CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER
cZ	<i>cis-Zeatin</i>	MCS	<i>multiple cloning site</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	MEP	Methylerythritolphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	miRNA	<i>micro RNA</i>
DHZ	Dihydrozeatin	MP	MONOPTEROS
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat	mRNA	<i>messenger RNA</i>
		MVA	Mevalonat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MYB	MYB DOMAIN PROTEIN	sORF	<i>short ORF</i>
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre	SPCH	SPEECHLESS
NAT	natürliches <i>Antisense</i> -Transkript	SRA	<i>STEROID RECEPTOR ACTIVATOR</i>
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>	sRNA	<i>small RNA</i>
NPC	<i>NON-PROTEIN CODING</i>	SRO	SIMILAR TO RCD ONE
nt	Nukleotid	CKP	CYTOKININ RIBOSIDE PHOSPHORYLASE
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	SVK	SVALKA
OD	optische Dichte	TAF	TBP-ASSOCIATED FACTOR
ORF	<i>open reading frame</i>	TASR	<i>terminus-associated small RNA</i>
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	TCP	TEOSINT
<i>P. trichocarpa</i>	<i>Populus trichocarpa</i>		BRANCHED1/CYCLOIDEA/ PROLIFERATING CELL FACTOR
PASR	<i>promoter-associated small RNA</i>		
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>		
PHO	PHOSPHATE	TEX	Terminator™ 5'-Phosphate- Dependent Exonuclease
PIF	PHYTOCHROME- INTERACTING FACTOR	TL	<i>TWISTED LEAF</i>
PIN	PIN-FORMED	TMO	TARGET OF MONOPTEROS
PIR	Protein Information Resource	TNK	Tage nach Keimung
PP2A	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A	tRNA	Transfer-RNA
PRF	Protein Research Foundation	Typ-A ARR	Typ-A Responseregulator
PUP	Purin Permease	Typ-B ARR	Typ-B Responseregulator
PXN	PAXILLIN	tZ	<i>trans</i> -Zeatin
<i>PXN-AS</i>	<i>PXN ANTISENSE TRANSCRIPT</i>	UBC	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME
qPCR	quantitative PCR	UCHL	UBIQUITIN CARBOXYTERMINAL HYDROLASE
P5CDH	Δ1-PYRROLINE-5- CARBOXYLATE DEHYDROGENASE	UDP	Uridindiphosphat
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>	UGT	UDP-Glucosyltransferase
RAM	<i>root apical meristem</i>	<i>V. vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>
RCD	RADICAL-INDUCED CELL DEATH	WDR	TRANSDUCIN/WD40 REPEAT- LIKE SUPERFAMILY PROTEIN
RDP	RCSB Protein Data Bank	WOL	WOODEN LEG
RNA	Ribonukleinsäure	WUS	WUSCHEL
RNAi	RNA-Interferenz	X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β-D-Glucuronsäure
RNP	RNA-BINDING PROTEIN	Z	Zeatin
rRNA	ribosomale RNA	<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>
RPM	<i>reads per million</i>	ZEB	ZINC FINGER E BOX-BINDING HOMEBOX
RSM	RIBOSOMAL RNA SMALL SUBUNIT METHYLTRANSFERASE		
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR		
<i>S. moellendorffii</i>	<i>Selaginella moellendorffii</i>		
SAM	<i>shoot apical meristem</i>		
SAS	<i>SOMETHING-ABOUT- SILENCING</i>		
scRNA	<i>small cytoplasmic RNA</i>		
SHY	SHORT HYPOCOTYL		
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>		
SINEUP	<i>SINE element-containing translation UP-regulator</i>		
siRNA	<i>small interfering RNA</i>		
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>		
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>		

1 Einleitung

1.1 Das Phytohormon Cytokinin

Cytokinine sind eine Gruppe von pflanzenspezifischen Signalmolekülen, welche ihren Namen der zellteilungsfördernden Wirkung verdanken, aufgrund derer sie ursprünglich entdeckt wurden (Miller et al., 1955; Skoog et al., 1965). Chemisch gesehen handelt es sich bei den natürlich vorkommenden Cytokininen um N^6 -substituierte Adeninderivate (Sakakibara, 2006; Skoog et al., 1965). In Abbildung 1 sind wichtige natürlich vorkommende Cytokinine dargestellt. Seit ihrer Entdeckung wurden sie aus den verschiedensten Pflanzenspezies isoliert und analysiert (Kamínek, 2015; Mok und Mok, 2001). Dabei stellte sich heraus, dass Cytokinine in nahezu allen pflanzlichen Entwicklungsprozessen und bei der Antwort von Pflanzen auf verschiedenste Umwelteinflüsse eine Rolle spielen. Dazu gehören beispielsweise das Wachstum des Spross- und Wurzelsystems, die Phyllotaxis, die Seneszenz, die Entwicklung der Chloroplasten, der Leitgewebe, der Gameten und des Embryos und die Transition von juveniler zu adulter Phase (Hönig et al., 2018; Kieber und Schaller, 2014; Shi und Vernoux, 2019; Werner, 2016; Werner und Schmülling, 2009; Zürcher und Müller, 2016). Zudem ist Cytokinin in die Nährstoffaufnahme sowie die Reaktion auf biotische Umwelteinflüsse wie beispielsweise Pathogene und abiotische Faktoren wie Licht oder Trockenheit involviert (Albrecht und Argueso, 2017; Cortleven et al., 2019; Pavlů et al., 2018; Zwack und Rashotte, 2015). Die meisten dieser Prozesse werden durch die Wechselwirkung mit anderen Pflanzenhormonen kontrolliert, was durch die gegenseitige Regulation der Konzentration, des Transports und der Signaltransduktion der Hormone realisiert wird (El-Showk et al., 2013; Liu et al., 2017; O'Brien und Benková, 2013; Vanstraelen und Benková, 2012).

Anhand der Struktur ihrer N^6 -Seitenkette werden grundsätzlich isoprenoide und aromatische Cytokinine unterschieden (Abbildung 1) (Mok und Mok, 2001). Die stärkste Abundanz in Pflanzen haben isoprenoide Cytokinine, welche in Zein (Z)-Typ Cytokinine und Isopentenyladenin (iP) unterteilt werden, je nachdem, ob ihre Isoprenoidseitenkette hydroxyliert ist oder nicht (Heyl et al., 2018). Zeatin besitzt die zwei Isoformen trans-Zeatin (tZ) und cis-Zeatin (cZ). Bei Dihydrozeatin (DHZ) liegt der Isoprenoidrest gesättigt vor. Die Zusammensetzung der verschiedenen Cytokininformen und deren Aktivität variiert in Abhängigkeit von Pflanzenspezies, Entwicklungszeitpunkt und Gewebe (Osugi und Sakakibara, 2015; Sakakibara, 2006; Stolz et al., 2011). Im Gegensatz zu iP und tZ, deren Aktivität und biologische Relevanz für die pflanzliche Entwicklung vielfach bestätigt wurden, zeigen cZ und DHZ nur wenig Aktivität in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) und ihre Funktion in der Pflanze ist noch weitgehend unbekannt (Heyl et al., 2012; Osugi und Sakakibara, 2015; Spíchal et al., 2004). In anderen Spezies, wie z.B. *Zea mays* (*Z. mays*) oder *Oryza sativa* (*O. sativa*) zeigt cZ eine ähnlich starke Aktivität wie dessen trans-Isomer (Kudo et al., 2012; Yonekura-Sakakibara et al., 2004). Aromatische Cytokinine wie Benzyladenin (BA) und Topoline wurden in einigen Pflanzenarten gefunden und weisen teilweise eine starke Aktivität in Pflanzen auf, über ihre Biosynthesewege und ihre physiologische Relevanz ist allerdings nur wenig bekannt (Spíchal et al., 2004; Strnad, 1997).

Cytokinine treten als freie Basen auf, welche die aktive Form in Pflanzen darstellen, und in unterschiedliche Modifikationsformen, welche in der Regel weniger oder keine Aktivität besitzen (Hothorn et al., 2011; Lomin et al., 2015; Spíchal et al., 2004). Zu letzteren zählen die Riboside und Ribotide der jeweiligen Cytokininbasen, deren N^6 -Position des Purinrings mit Ribose bzw. Ribose-5'-Phosphat konjugiert ist (Mok und Mok, 2001). Zudem können chemische Modifikationen des Purinrings und der Seitenkette auftreten (Sakakibara, 2006).

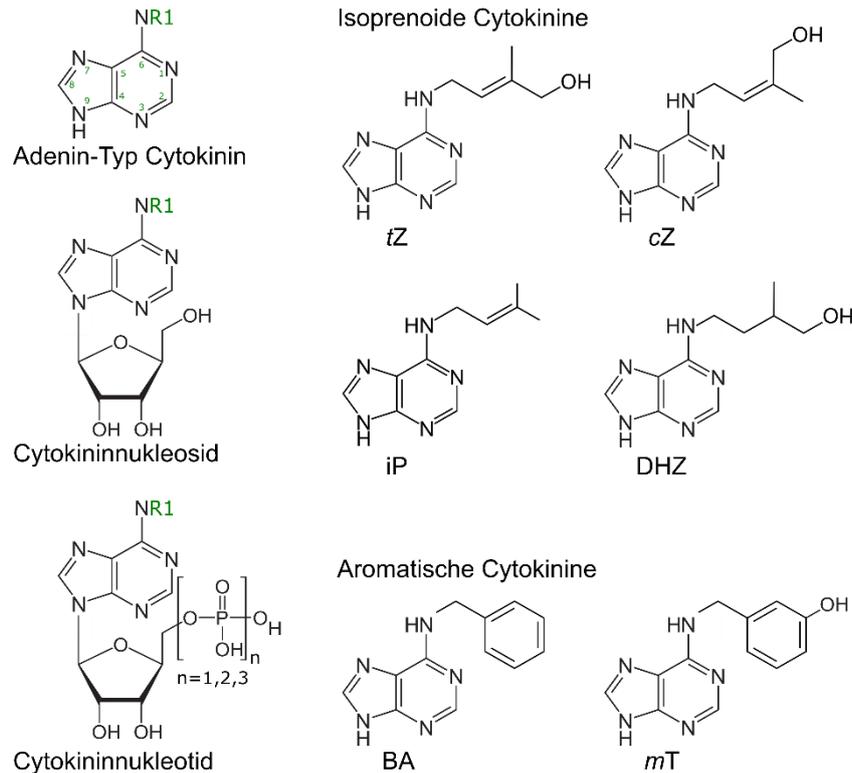


Abbildung 1: Chemische Strukturen von Cytokininen.

Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur von Adenin-Typ-Cytokininen sowie ihrer Nukleoside und Nukleotide und der Struktur natürlich vorkommender isoprenoider sowie aromatischer Cytokinine. R1 = N^6 -substituierte Seitenkette, *tZ* = *trans*-Zeatin, *cZ* = *cis*-Zeatin, *iP* = N^6 -Isopentenyladenin, DHZ = Dihydrozeatin, BA = 6-Benzyladenin, *mT* = *meta*-Topolin

1.1.1 Cytokininmetabolismus

Obwohl die freien Basen die aktiven Cytokininformen darstellen (Hothorn et al., 2011), bilden sie nur einen geringen Teil der Cytokininmenge in Pflanzen (Osugi und Sakakibara, 2015). Den maßgeblichen Anteil der pflanzlichen Cytokininmetabolite bilden hingegen die Nukleotide, Riboside und Glucoside, was darauf hinweist, dass die Konzentration der bioaktiven Cytokininformen streng kontrolliert wird (Osugi und Sakakibara, 2015). Diese Kontrolle erfolgt durch die Regulation von *de novo*-Synthese, Interkonversion, Konjugation, Abbau sowie Transport der Cytokinine (Osugi und Sakakibara, 2015; Zürcher und Müller, 2016). Eine Übersicht über den Cytokininmetabolismus ist in Abbildung 2 dargestellt.

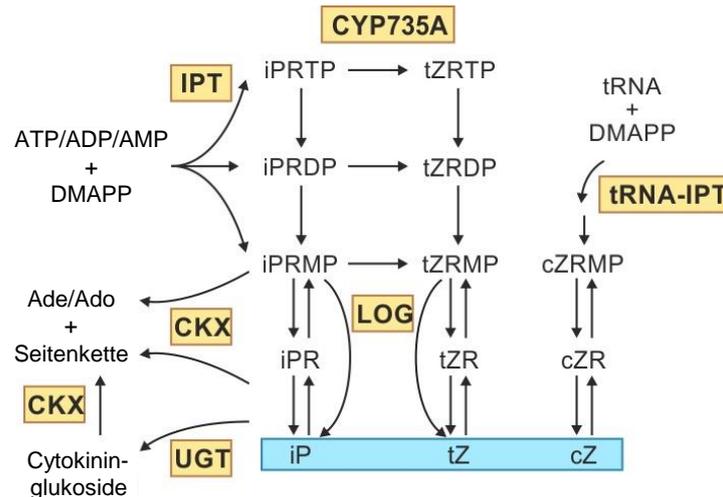


Abbildung 2: Übersicht über den pflanzlichen Cytokininmetabolismus.

Die *de novo*-Synthese von Mono-, Di- und Triphosphaten der Cytokininriboside (iPRMP, tZRMP, cZRMP, iPRDP, tZRDP, iPRTP, tZRTP) aus Adenosinmonophosphat, -diphosphat und -triphosphat (AMP, ADP, ATP) bzw. einer tRNA sowie Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) wird durch Isopentenyltransferasen (IPT) katalysiert. iP-Typ-Cytokininribotide werden durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP735A) zu tZ-Typ-Cytokininribotide hydroxyliert. Aktiviert werden Cytokininribosidmonophosphatformen hauptsächlich durch die Interkonversion in freie Cytokininbasen (iP, tZ, cZ) durch LONELY GUY-Enzyme (LOG). Die Inaktivierung von Cytokinin erfolgt durch Glucosylierung mittels UDP-Glucosyltransferasen (UGT) oder Degradation in Adenin bzw. Adenosin (Ade, Ado) und die isoprenoide Seitenkette mittels Cytokininoxidase/-dehydrogenase-Enzymen (CKX). Abbildung modifiziert nach Werner und Schmülling (2009).

1.1.1.1 Biosynthese und Interkonversion von Cytokinin

Der erste Schritt der Biosynthese von Cytokinin besteht aus der *N*-Prenylierung des Adeninrests und wird in *A.thaliana* von neun homologen Enzymen, den Isopentenyltransferasen (IPTs), katalysiert (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001a). Als Prenyldonor dient den IPTs Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), das in Pflanzen entweder durch den Mevalonat (engl.: *mevalonic acid*, MVA)–weg entsteht, welcher im Cytosol stattfindet, oder durch den Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg gebildet wird, welcher in den Plastiden stattfindet (Eisenreich et al., 1998; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999). Die IPTs werden je nach Art ihres Prenylakzeptors in zwei Klassen unterteilt: Die Adenosin-triphosphat/Adenosin-diphosphat (ATP/ADP)-IPTs IPT1 und IPT3 bis IPT8 sowie die Transfer-RNA (tRNA)-IPTs IPT2 und IPT9. Die ATP/ADP-IPTs übertragen die Prenylgruppe auf Adenosin-5'-phosphate, wobei bevorzugt ATP sowie ADP und kaum Adenosinmonophosphat (AMP) genutzt wird, und bilden so in erster Linie die iP-Vorläufer iP-Ribosid-triphosphat sowie iP-Ribosiddiphosphat (Kakimoto, 2001). Ein solches iP-Typ-Nukleotid kann in ein tZ-Typ-Nukleotid umgewandelt werden, indem seine Seitenkette durch eine Cytochrom-P450 (CYP)-Monooxygenase hydroxyliert wird. In *A. thaliana* wurden die zwei Homologe CYP735A und CYP735B identifiziert, welche diese Reaktion katalysieren (Takei et al., 2004b). Alle Nukleotidformen, jedoch weder Nukleoside noch freie Basen werden dabei als Substrate genutzt und hydroxyliert (Takei et al., 2004b). Daneben existiert möglicherweise ein zweiter, iP-unabhängiger Weg zur tZ-Biosynthese, in dem eine hydroxylierte Prenylgruppe von einem bislang unbekanntem Prenyldonor auf ein Adenosin-5'-phosphat übertragen wird (Åstot et al., 2000). Die zweite Klasse der

IPTs, die tRNA-IPTs, katalysieren die Prenylierung eines Adenins, welches in einer tRNA gebundenen ist, und generieren so cZ (Miyawaki et al., 2006). Die Biosynthesewege von tZ und cZ sind voneinander unabhängig, da kaum eine Konversion zwischen den beiden Cytokinintypen erfolgt (Gajdošová et al., 2011).

Zur Aktivierung müssen die inaktiven Cytokininnukleotide in freie Basen umgewandelt werden. Zunächst wurde angenommen, dass die Diphosphat- und Triphosphatformen zuerst stufenweise von Phosphatasen dephosphoryliert werden und anschließend in zwei Schritten von der 5'-Monophosphatform über die Nucleoside in die freien Basen umgewandelt werden (Chen und Kristopeit, 1981; Frebort et al., 2011). Diese Dephosphorylierung und die anschließende Deribosylierung könnten durch Enzyme des allgemeinen Purinstoffwechsels katalysiert werden, welche Adenosin und AMP mit hoher Affinität umsetzen, aber auch die jeweiligen Cytokininformen als Substrat akzeptieren (Chen und Kristopeit, 1981; Galuszka et al., 2008; Kamada-Nobusada und Sakakibara, 2009). Cytokininspezifische Phosphatasen und Ribonucleotid-Phosphohydrolasen wurden in *A. thaliana* jedoch bislang nicht identifiziert. Mittlerweile wurde gezeigt, dass der Großteil der Cytokininasen in einem einzigen enzymatischen Schritt, der Abspaltung der Phosphoribose von den Ribosid-5'-Monophosphaten durch die Phosphoribohydrolasen der LONELY GUY (LOG)-Familie, gebildet werden (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009; Tokunaga et al., 2012). In *A. thaliana* werden sieben funktionelle LOG-Enzyme exprimiert (Kuroha et al., 2009). Obwohl die Vertreter der LOGs teilweise spezifisch in einzelnen Zelltypen lokalisiert sind, wird mindestens ein LOG in allen pflanzlichen Geweben exprimiert, was sicherstellt, dass überall in der Pflanze aktives Cytokinin bereitgestellt werden kann (Chickarmane et al., 2012; Kuroha et al., 2009).

Im Gegensatz dazu kann die Konzentration aktiver Cytokininasen reduziert werden, indem diese in deren jeweiligen Nucleoside und Nucleotide revertiert werden. In *Solanum tuberosum* wurde die Purin-Nucleosid-Phosphorylase CYTOKININ RIBOSIDE PHOSPHORYLASE 1 (CKP1) identifiziert, welche einen Riboserest auf freie Cytokininasen überträgt, wodurch diese in Cytokininnucleoside umgewandelt werden (Bromley et al., 2014). In *A. thaliana* ist bisher kein solches Enzym bekannt, jedoch zeigen Fütterungsexperimente, dass eine Konversion von exogen applizierten Cytokininasen in Nucleoside stattfindet (Letham und Palni, 1983; Moffatt et al., 1991; Niemann et al., 2015). Ribosid-5'-Monophosphate können in *A. thaliana* durch die Phosphorylierung der jeweiligen Cytokininnucleoside mittels der Adenosinkinasen (ADKs) ADK1 und ADK2 gebildet werden (Moffatt et al., 2000). Sie weisen eine höhere Affinität gegenüber Adenosin als gegenüber Cytokininribosiden auf und sind vermutlich Enzyme des allgemeinen Adeninstoffwechsels (Moffatt et al., 2000). Allerdings weisen Untersuchungen von *gain-* bzw. *loss-of-function*-Mutanten darauf hin, dass sowohl CKP1 als auch die ADK-Isoformen die Cytokininaktivität *in vivo* beeinflussen (Bromley et al., 2014; Schoor et al., 2011). Komplementär zur Konversion von Cytokininnucleotiden in freie Basen können auch freie Cytokininasen in einem einzigen enzymatischen Schritt in die zugehörige Ribosid-5'-Monophosphatform umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch Adenin-Phosphoribosyltransferasen (APTs) katalysiert (Moffatt et al., 1991). In *A. thaliana* werden sie von einer Genfamilie mit fünf Mitgliedern kodiert. Obwohl diese nicht spezifisch Cytokinin, sondern auch

Adenin als Substrat nutzen, deuten Untersuchungen von *apt*-Mutanten auf eine biologische Relevanz der Enzyme für die Cytokininhomöostase *in vivo* hin (Allen et al., 2002; Zhang et al., 2013).

1.1.1.2 Konjugation von Cytokinin

Neben der Interkonversion der Cytokininformen, treten Modifikationen des Purinrings mit Glucose, Alanin oder einer Methylthiolgruppe und Modifikationen der Isoprenoidseitenkette mit Glucose oder Xylose auf, wobei die Glucosemodifikationen den größten Teil ausmachen (Sakakibara, 2006). Die Konjugation der freien Cytokininbasen mit Glucose bietet eine Möglichkeit, deren Aktivität zu regulieren und wird grundsätzlich in zwei Arten unterschieden (Sakakibara, 2006). Wird das Glucosemolekül mit dem Sauerstoffatom der Isoprenylseitenkette verknüpft, entstehen O-Glucoside. N-Glucoside werden hingegen durch die Modifikation der N3-, N7-, oder N9-Position des Purinrings gebildet. Da diese modifizierten Cytokinine die Fähigkeit verlieren, an die Cytokininrezeptoren zu binden, gilt die Glucosylierung der Cytokinine als Inaktivierungsmöglichkeit (Mok und Mok, 2001). O-Glucosylierungen inaktivieren Cytokinine nur transient, da β -Glucosidasen das Glucosemolekül wieder abgespalten können (Brzobohaty et al., 1993). O-Glucoside sind zudem resistent gegenüber dem Abbau durch Cytokinoxidasen/-dehydrogenasen (CKX), weshalb ihnen eine Funktion als stabile Speicherform zugeschrieben wird (Galuszka et al., 2007). Die gezielte Glucosylierung und Hydrolyse des Glucoserests ermöglichen so eine schnelle Regulierung der Menge aktiver Cytokinine. Entsprechende β -Glucosidasen wurden in Mais und Raps, jedoch bislang nicht in *A. thaliana*, identifiziert (Brzobohaty et al., 1993; Falk und Rask, 1995). Im Gegensatz dazu führt die N-Glucosylierung zu einer irreversiblen Inaktivierung und N-Glucoside gelten als Stoffwechselprodukte, was auch durch die Beobachtung gestützt wird, dass sie im Laufe der pflanzlichen Entwicklung sehr stark akkumulieren (Letham und Palni, 1983; Šmehilová et al., 2016; van Staden und Drewes, 1992). Eine Ausnahme davon bilden die Cytokinin-N3-Glucoside, welche zwar biologisch inaktiv sind, deren Modifikation jedoch reversibel ist und die vermutlich ebenfalls als Speicherform dienen (Bajguz und Piotrowska, 2009; van Staden und Drewes, 1992). Die O- bzw. N-Glucosylierung von Cytokinin und somit deren Inaktivierung wird von den Uridindiphosphat (UDP)-Glucosyltransferasen (UGTs) katalysiert (Bowles et al., 2005). In *A. thaliana* wurden zwei bzw. vier UGTs identifiziert, welche in die N- bzw. O-Glucosylierung von Cytokinin involviert sind (Cucinotta et al., 2018; Hou et al., 2004).

UGT76C1 und UGT76C2 modifizieren die N7- und N9-Position des Purinrings isoprenoider und aromatischer Cytokinine, nicht jedoch deren N3-Position (Hou et al., 2004; Wang et al., 2011a, 2013). Enzyme, welche die Bildung von Cytokinin-N3-Glucosiden katalysieren, sind bisher nicht bekannt.

Für die O-Glucosyltransferasen UGT85A1, UGT73C1 und UGT73C5 wurde gezeigt, dass sie Z-Typ-Cytokininbasen als Substrat nutzen können (Hou et al., 2004). UGT73C1 und UGT73C5 scheinen dabei nicht cytokininspezifisch zu sein, denn sie akzeptieren auch Trinitrotoluol sowie Steviol bzw. Brassinosteroiden (Gandia-Herrero et al., 2008; Poppenberger et al., 2005; Zhou et al., 2018). Unter den untersuchten O-Glucosyltransferasen nimmt UGT85A1 vermutlich eine Schlüsselrolle für die Cytokinin-O-Glucosylierung ein. Einerseits wurde für UGT85A1 *in vitro* ein deutlich höherer Substratumsatz verglichen mit dem von UGT73C1 und UGT73C5 gemessen und

andererseits weisen Überexpressionsmutanten sowohl ein stark erhöhtes tZ-O-Glucosidlevel als auch eine Insensitivität gegenüber exogenem Cytokinin auf (Hou et al., 2004; Jin et al., 2013). UGT85A3, das UGT mit der größten Sequenzhomologie zu UGT85A1, wird ebenfalls als Cytokinin-O-Glucosyltransferase diskutiert (Cucinotta et al., 2018).

1.1.1.3 Abbau von Cytokinin

Der wahrscheinlich physiologisch bedeutendste Weg der Cytokinininaktivierung besteht in der irreversiblen Abspaltung der *N*⁶-substituierten Seitenkette vom Purinring durch die CKXs (Abbildung 3), bei denen es sich um Flavinadenindinukleotid (FAD)-abhängigen Oxidoreduktasen handelt (Brownlee et al., 1975; McGaw und Horgan, 1983). Bei dieser Reaktion entsteht in einem einzigen Schritt ein Adenin oder Adenosin und ein Seitenkettenaldehyd (Brownlee et al., 1975). Zunächst wurde angenommen, dass während der Reaktion die Elektronen zuerst auf FAD und anschließend auf Sauerstoff übertragen werden, dies konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden. Unter anaeroben Bedingungen war die Enzymaktivität nicht verringert und eine Reihe künstlicher Elektronenakzeptoren bewirkten einen starken Anstieg der CKX-Aktivität (Galuszka et al., 2001; Laskey et al., 2003). Es handelt sich daher bei der Reaktion eher um eine Dehydrogenierung als um eine Oxidierung von Cytokinin (Galuszka et al., 2001). Als natürliche sekundäre Elektronenakzeptoren werden Chinone, die Oxidationsprodukte phenolischer Verbindungen, sowie die oxidierten Radikale der Hydroxamsäure DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) und dessen Oxidationsprodukt Coniferron (5-Methoxy-2-nitrosophenol) diskutiert (Frébortová et al., 2004; Frébortová et al., 2010; Galuszka et al., 2005).

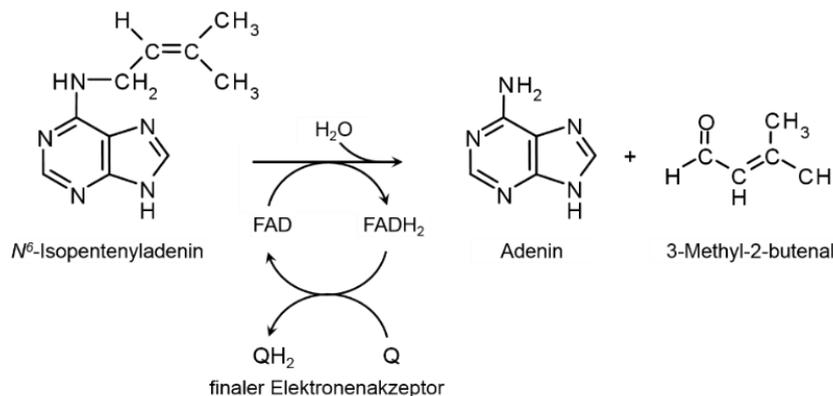


Abbildung 3: CKX-Reaktion.

Dargestellt ist die beispielhafte Degradation von *N*⁶-Isopentenyladenin. CKX-Enzyme spalten die isoprenoide Cytokininbase in Adenin und das Seitenkettenaldehyd 3-Methyl-2-butenal. Dabei werden Elektronen zunächst auf FAD und anschließend auf einen finalen Elektronenakzeptor übertragen.

Die Analyse der dreidimensionalen Struktur der ZmCKX1 aus Mais gab Aufschluss über den Aufbau und den Funktionsmechanismus der CKX-Enzyme (Malito et al., 2004). CKX-Enzyme besitzen zwei Domänen: eine Substratbindedomäne, an der sich Cytokinin anlagert und eine FAD-Bindedomäne, an welcher der FAD-Cofaktor kovalent gebunden vorliegt (Bilyeu et al., 2001; Malito et al., 2004). Einige Aminosäurereste der funktionellen Domänen sind in den untersuchten CKX-Enzymen hochkonserviert und vor allem die Aminosäurereste His105, Asp169 und Glu381 spielen

eine wichtige Rolle bei der kovalenten Bindung von FAD, der enzymatischen Spaltung bzw. der Bindung von Cytokinin (Galuszka et al., 2007; Kopečný et al., 2016; Malito et al., 2004; Schmülling et al., 2003). Kleine Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung werden als Ursache für unterschiedliche Substratspezifitäten verschiedener CKX-Enzyme vermutet (Galuszka et al., 2007).

1.1.1.3.1 CKX-Genfamilie

Houba-Herin et al. (1999) und Morris et al. (1999) isolierten erstmals funktionelle CKX-Enzyme aus Mais. Seitdem wurden CKX-Homologe in zahlreichen Pflanzenspezies auf allen systematischen Ebenen der Evolution von Landpflanzen, von den Laubmoosen bis hin zu den Dikotyledonen, identifiziert (Gu et al., 2010; Liu et al., 2013; Mameaux et al., 2012; Schmülling et al., 2003; Song et al., 2012). Phylogenetische Analysen zeigen, dass die verschiedenen CKX-Gene einerseits durch die Bildung neuer Spezies als Orthologe und andererseits durch Gen- oder Genomduplikationen innerhalb einer Spezies als Paraloge entstanden (Gu et al., 2010; Liu et al., 2013; Mameaux et al., 2012; Schmülling et al., 2003). Die CKX-Proteine der verschiedenen Spezies weisen hochkonservierte Domänen auf. Zum einen sind das die bekannten funktionellen Domänen für die Bindung von Substrat und FAD, zum anderen existieren konservierte Bereiche, deren Funktion bislang unbekannt ist (Gu et al., 2010; Schmülling et al., 2003).

Am detailliertesten untersucht wurden bislang die sieben CKX-Enzyme aus *A. thaliana* (CKX1-CKX7). Der strukturelle Aufbau der Gene CKX1 bis CKX6 ist mit fünf Exons und vier Introns stark konserviert und für alle der Enzyme wurde eine CKX-Aktivität experimentell nachgewiesen (Bilyeu et al., 2001; Köllmer et al., 2014; Werner et al., 2003; Werner et al., 2001). Allerdings weisen die einzelnen Enzyme Unterschiede in Bezug auf Expressionsmuster, subzelluläre Lokalisation, Substratspezifität und andere biochemischen Eigenschaften auf, was auf eine funktionelle Spezialisierung als Folge evolutionärer Adaptionen hindeutet (Kowalska et al., 2010; Schmülling et al., 2003; Werner et al., 2006). CKX7 weist als einziges der Enzyme kein N-terminales Signalpeptid auf und ist im Cytoplasma lokalisiert (Köllmer et al., 2014). CKX1 ist in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert, wobei sich der enzymatisch aktive C-terminale Teil des Proteins im ER-Lumen befindet (Niemann et al., 2018). CKX3 ist vermutlich ebenfalls in der ER-Membran und im Lumen der Vakuole lokalisiert (Niemann et al., 2018; Werner et al., 2003). Bioinformatische und Reporteranalysen weisen darauf hin, dass CKX2, CKX4 und CKX5 im ER synthetisiert und schließlich sekretiert werden (Niemann et al., 2018; Werner et al., 2003). Es wird vermutet, dass auch CKX6 sekretiert wird, jedoch wurde für das Protein ebenso ein hydrophober Peptidanker vorausgesagt, sodass es sich auch bei diesem um ein permanent im Endomembransystem verankertes Protein handeln könnte (Niemann et al., 2018; Werner et al., 2003). Im Allgemeinen zeigen die sekretorischen Proteine CKX2 und CKX4 die stärkste CKX-Aktivität, allerdings variieren die Aktivitätsmaxima der jeweiligen CKX-Enzyme abhängig vom pH-Wert, was die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation widerspiegelt (Galuszka et al., 2007; Kowalska et al., 2010). Isoprenoide Cytokinine mit ungesättigter Seitenkette und ihre jeweiligen Riboside und Ribotide dienen als bevorzugte Substrate, wobei auch die Substratspezifitäten der einzelnen CKXs pH-abhängig sind und sich voneinander unterscheiden (Galuszka et al., 2007; Kowalska et al., 2010). CKX2 und CKX4 haben beispielsweise die höchste Affinität gegenüber den freien Basen iP

und tZ, wohingegen das cytosolische CKX7 das N9-Glucosid von iP präferiert (Galuszka et al., 2007; Kowalska et al., 2010).

Die Anzahl der CKX-Gene variiert von Art zu Art, in vielen Monokotyledonen kodieren oft mehr als zehn Gene für CKX-Enzyme (Gu et al., 2010; Mameaux et al., 2012). Auch in basalen Landpflanzen wie dem Bärlappgewächs *Selaginella moellendorffii* (*S. moellendorffii*) und dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (*P. patens*) existieren Gene, welche für CKX-Proteine kodieren (Gu et al., 2010). Diese weisen untereinander eine höhere strukturelle Ähnlichkeit auf als zu den CKX-Enzymen höherer Pflanzen (Gu et al., 2010). Auch die Orthologe des cytosolischen CKX7 aus *A. thaliana* bilden ein eigenes Cluster und stellen vermutlich eher ursprüngliche Varianten der CKX-Enzyme dar (Gu et al., 2010). Die phylogenetischen Untersuchungen legen nahe, dass die drastische Zunahme der Genkopien, welche verschiedenen Clustern zugeordnet werden können, erst in höheren Pflanzen stattfand (Gu et al., 2010). Die konstitutive Expression der ursprünglichen CKX-Varianten in höheren Landpflanzen deutet darauf hin, dass diese die Aufgabe besitzen, basale zelluläre Funktionen aufrecht zu erhalten, wohingegen die stärker diversifizierten Varianten differenziertere Expressionsmuster aufweisen und vermutlich spezialisierte Funktionen bei der Organentwicklung und Reaktion auf Umwelteinflüsse besitzen (Wang et al., 2020).

Die sequenzierten Genome einiger Grünalgen wurden nach homologen CKX-Genen durchsucht, jedoch konnten bislang keine CKX-Gene in Algen identifiziert werden (Gu et al., 2010). Im Genom einiger Cyanobakterien und *Chlamydiae* wurden CKX-Homologe gefunden und es wird vermutet, dass die CKX-Gene höherer Landpflanzen auf CKX aus endosymbiotischen *Chlamydiae* zurückgehen (Frebort et al., 2011; Schmölling et al., 2003; Wang et al., 2020). Allerdings unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der CKX-Proteine aus Cyanobakterien in den konservierten Domänen von denen der pflanzlichen Enzyme und für das rekombinante CKX von *Nostoc spec.* konnte keine CKX-Aktivität beobachtet werden (Frebort et al., 2011; Frébortová et al., 2015). Es ist demnach noch nicht geklärt, ob die CKX-Homologe aus Cyanobakterien und *Chlamydiae* eine enzymatische Funktion zum Abbau von Cytokinin besitzen.

Darüber hinaus wurden hypothetische CKX-Homologe in weiteren Bakterienspezies wie *Rhodococcus fasciens*, *Streptoalloteichus hindustanus*, *Myxococcus xanthus*, *Saccharopolyspora erythrae*, *Herpetosiphon aurantiacus*, *Stigmatella aurantiaca* und *Streptomyces pristinaespiralis* identifiziert (Pertry et al., 2010). Das CKX-Homolog des Pflanzenpathogens *Rhodococcus fasciens* FasE spielt eine Rolle für die Virulenz des Bakteriums und seine enzymatische Aktivität wurde experimentell bestätigt, wohingegen die anderen Homologe bisher nicht funktionell charakterisiert wurden und ihre Aktivität im Cytokininmetabolismus vorerst hypothetisch bleibt (Pertry et al., 2010).

1.1.1.3.2 Biologische Funktion der CKX-Gene in Pflanzen

Cytokinin, als zellteilungsförderndes Signalmolekül, muss während der pflanzlichen Entwicklung streng kontrolliert werden, um ein normales Wachstum der Pflanze zu gewährleisten. Die Zunahme des Hormons während des Zellzyklus wird z.B. jeweils von einem Anstieg der CKX-Aktivität begleitet, was vermuten lässt, dass die Enzyme eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Cytokininkonzentration während des Zellzyklus spielen, um die Cytokininoszillation aufrecht zu erhalten (Hartig und Beck, 2005). Auch wenn der Cytokininhaushalt der Pflanzen dereguliert ist, z.B. durch

den Verlust von Cytokininmetabolismusgenen, werden unter anderem die Transkriptlevel von *CKX*-Genen reguliert, um die Cytokininhomöostase zu stabilisieren (Brock, 2020; Šmečilová et al., 2016; Wang et al., 2011a).

Um Entwicklungsprozesse zu identifizieren, die von *CKX*-Genen reguliert werden, wurden *loss-of-function*-Mutanten in *A. thaliana* untersucht (Bartrina, 2006; Bartrina et al., 2011). Interessanterweise zeigen die Einzelmutanten im Allgemeinen keine phänotypischen Veränderungen, was auf die Redundanz der *CKX*-Gene hinweist (Bartrina, 2006). Doppelmutanten der Gene *CKX3* und *CKX5* aus *A. thaliana* weisen zum einen dickere Infloreszenzstängel auf, was auf eine negative Regulation der Kambiumaktivität durch die Gene hindeutet, zum anderen wird eine negative Wirkung dieser Gene auf die Größe und Aktivität des Infloreszenzmeristems, die Blütenanzahl, die Schotenlänge und letztendlich den Samenertrag deutlich (Bartrina et al., 2011). In *O. sativa* wurde ein Quantitative Trait Locus (QTL), welcher mit einem höheren Samenertrag verbunden ist, auf eine Mutation des *OsCKX2*-Gens zurückgeführt und in *Hordeum vulgare* wurde eine Erhöhung der Ährenzahl sowie der Kornanzahl und –größe erreicht, indem die Genaktivität von *HvCKX1* durch RNA-Interferenz (RNAi) reduziert wurde (Ashikari et al., 2005; Zalewski et al., 2010; Zalewski et al., 2014). Auch der Blühbeginn unter Kurztagbedingungen ist in *CKX*-Mehrfachmutanten von *A. thaliana* signifikant früher verglichen mit dem Wildtyp (Bartrina, 2006). Neben der Bedeutung der *CKX*-Gene für das Sprosswachstum während der reproduktiven Phase wurde auch ein Einfluss auf die Wurzelentwicklung beobachtet. Dabei scheint *CKX2* eine dominante Rolle für das Primärwurzelwachstum zu spielen, da Mutantenkombinationen mit dem *ckx2*-Allel eine kürzere Primärwurzel ausbilden (Bartrina, 2006). Zudem wurde ein Einfluss von *CKX2* auf den Biegungswinkel der Lateralwurzeln und somit die radiale Ausbreitung des Wurzelsystems beschrieben (Waidmann et al., 2019). Obwohl Einzelmutanten von *CKX4* keine veränderte Blattmorphologie aufweisen, wird vermutet, dass *CKX4* gemeinsam mit dem Typ-A Responseregulator (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR, *ARR16*) und eventuell anderen *CKX*-Genen den Cytokininstatus während der Entwicklung der Stomata regulieren, da beide Gene spezifisch in den Stomatavorläuferzellen exprimiert werden und gezeigt wurde, dass Cytokinin einen Einfluss auf die Anzahl und den Abstand der Stomata besitzt (Pillitteri et al., 2011; Vatén et al., 2018).

Zudem wird vermutet, dass die *CKX*-Gene an der Reaktion auf verschiedene biotische und abiotische Umwelteinflüsse beteiligt sind. Für *CKX6* wurde eine regulatorische Funktion bei der Reaktion von *A. thaliana* auf Beschattung gezeigt (Carabelli et al., 2007). Ein niedriges rot/dunkelrot-Verhältnis bewirkte eine auxininduzierte Erhöhung des *CKX6*-Transkriptlevels und im Gegensatz zum Wildtyp führt dieses Lichtverhältnis in *ckx6*-Mutanten nicht zu einem Stopp des Blattwachstums (Carabelli et al., 2007). *CKX5* wird mit dem circadianen Rhythmus in Verbindung gebracht (Nomoto et al., 2012). Das Transkriptlevel von *CKX5* wird spezifisch unter Kurztagbedingungen am Ende der Nacht induziert und sowohl Transkriptanalysen als auch Chromatin-Immunopräzipitation-Sequenzierung weisen darauf hin, dass *CKX5* eines der direkten Zielgene des circadian regulierten Transkriptionsfaktors PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (*PIF4*) ist (Nomoto et al., 2012; Oh et al., 2012). Es wird angenommen, dass *CKX5* die Cytokininkonzentration tagesabhängig kontrolliert und so dem Tagesrhythmus angepasste Entwicklungsvorgänge steuert.

Die Überexpression der *CKX*-Gene in *A. thaliana* resultiert in einer starken Reduktion des Cytokiningehaltes, was die biochemische Funktion und die Funktionalität der Enzyme *in planta* belegt und eine gute Möglichkeit liefert, die physiologische Bedeutung von Cytokinin zu untersuchen (Werner et al., 2003). Die Überexpression von *CKX1* bis *CKX6* führt zu drastischen morphologischen Veränderungen, die unter dem Begriff Cytokinindefizienzsyndrom zusammengefasst werden (Werner et al., 2003). Entsprechend des Einflusses von Cytokinin auf die pflanzliche Entwicklung weisen die transgenen Pflanzen ein stark reduziertes Sprosswachstum, dünnere Infloreszenzstängel, weniger Blüten und eine verringerte Apikaldominanz, jedoch ein verstärktes Wurzelwachstum mit längeren Primärwurzeln und mehr Lateralwurzeln auf (Werner et al., 2003). Die Überexpression des cytosolischen *CKX7* weist im Gegensatz dazu ein stark reduziertes Wurzelwachstum auf (Köllmer et al., 2014).

1.1.1.3.3 Regulation der *CKX*-Expression und *CKX*-Aktivität

Untersuchungen der *CKX*-Genexpression mittels *in silico*-Analysen sowie Promotor-Reporter-genanalysen, *in situ* Hybridisierung und messenger RNA (mRNA)-Levelmessungen zeigen, dass die Mitglieder der *CKX*-Genfamilie aus *A. thaliana* im Allgemeinen schwach exprimiert werden und ihre Transkriptlevel sowohl gewebespezifisch als auch durch verschiedene Reize reguliert werden (Bartrina et al., 2011; Köllmer et al., 2014; Werner et al., 2006; Werner et al., 2003).

Die Promotoraktivität der meisten *CKX*-Gene ist nur in eng abgegrenzten Expressionsdomänen zu beobachten, welche zumeist in teilungsaktivem Gewebe zu finden sind (Werner et al., 2003). So wurde eine Expression im Sprossapex (*CKX1*, *CKX2*), in den Meristemen von Infloreszenzen, Blüten, Staubblättern und Gynoeceen (*CKX5*), in jungen Blättern (*CKX4*, *CKX5*), in axillären Knospen (*CKX5*), in den Vorläuferzellen der Stomata (*CKX4*) und im Prokambium des Wurzelmeristems, der Infloreszenzstängel und der Blüten (*CKX5*) detektiert (Bartrina et al., 2011; Köllmer et al., 2014; Werner et al., 2003). Zudem konnten weitere Gewebe wie Stomata (*CKX4*, *CKX6*), Trichome und Stipuli (*CKX4*), Gynoeceum (*CKX6*, *CKX7*), Wurzelhaube (*CKX4*), Lateralwurzelprimordien (*CKX5*, *CKX6*) und Vaskulatur von Spross (*CKX7*) und Wurzel (*CKX6*, *CKX7*) als *CKX*-exprimierende Domänen identifiziert werden (Bartrina et al., 2011; Köllmer et al., 2014; Vatén et al., 2018; Werner et al., 2003).

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass einige *CKX*-Gene durch das Substrat Cytokinin reguliert werden. In *A. thaliana* werden insbesondere *CKX3*, *CKX4*, *CKX5* und *CKX6*, durch die Behandlung mit Cytokinin stark induziert (Bhargava et al., 2013; Brenner et al., 2012; Brenner et al., 2005; Werner et al., 2006). Auch in anderen Pflanzenspezies wie *Z. mays*, *Brassica rapa* (*B. rapa*) und *Brassica napus*, kann eine Regulation einiger *CKX*-Gene durch Cytokinin beobachtet werden, wobei manche der Isoformen induziert und andere reprimiert werden (Brugière et al., 2003; Gu et al., 2010; Liu et al., 2018a; Liu et al., 2013). Es wird angenommen, dass diese *Feedback*-Regulation der *CKX*-Enzyme zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Hormons beiträgt. Desweiteren wurde gezeigt, dass auch das Phytohormon Auxin, welches im Allgemeinen als Gegenspieler von Cytokinin während der pflanzlichen Entwicklung gilt, die *CKX*-Gene reguliert. *In silico*-Analysen der *CKX*-Transkriptlevel zeigen eine starke Erhöhung der *CKX1*- und *CKX6*-Transkriptlevel aus *A. thaliana* und auch die Transkriptlevel der *CKX*-Homologe *CKX6*, *CKX5-1*, *CKX5-2* und *CKX7-1* aus *Brassica*

napus werden durch Auxin positiv reguliert (Liu et al., 2018a; Werner et al., 2006). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass der Cytokiningehalt in Pflanzen durch Auxin reduziert wird, was zumindest zum Teil auf eine erhöhte Degradation von Cytokinin zurückzuführen ist (Beinsberger et al., 1991; Eklof et al., 1997; Palni et al., 1988; Vařková et al., 1992; Zhang et al., 1995). *In vitro*-Experimente mit aufgereinigtem CKX-Enzym weisen darauf hin, dass Auxin die CKXs nicht ausschließlich transkriptionell reguliert, sondern auch die Aktivität der Proteine positiv beeinflusst (Palni et al., 1988; Zhang et al., 1995). Womöglich sind diese Regulationsmechanismen daran beteiligt, die Wechselwirkung zwischen Auxin und Cytokinin zu vermitteln. Die Transkriptlevel einiger Isoformen, wie z.B. der Gene *CKX2*, *CKX4* und *CKX7* aus *A. thaliana*, werden hingegen durch Auxin negativ reguliert, was auf eine spezifische Rolle der einzelnen Enzyme im Hormon-*Crosstalk* hindeutet (Goda et al., 2004; Rashotte et al., 2005; Werner et al., 2006). Neben diesen wurde auch vom regulatorischen Einfluss anderer Hormone auf die CKX-Gene berichtet. Daten aus Microarray-Analysen sowie semi-quantitativen Transkriptlevelmessungen deuten darauf hin, dass die Transkriptlevel der meisten CKX-Gene aus *A. thaliana* und *B. rapa* sowie von *CKX1* aus *Z. mays* durch Abscisinsäure (engl.: *abscisic acid*, ABA) reduziert werden (Brugière et al., 2003; Liu et al., 2013; Werner et al., 2006). Dies stimmt mit der antagonistischen Wirkung überein, welche die beiden Hormone in diversen Entwicklungsprozessen, wie beispielsweise der Keimlingsentwicklung, der Verzweigung der Sprossachse, der Seneszenz, der Schließung der Stomata sowie der Reaktion auf Salz- und Trockenstress aufweisen (Chang et al., 2003; Corot et al., 2017; Gan und Amasino, 1995; O'Brien und Benková, 2013; Subbiah und Reddy, 2010; Tanaka et al., 2006; Zdunek und Lips, 2001). Microarray-Daten weisen darauf hin, dass die Transkriptmenge einzelner CKX-Gene aus *A. thaliana* außerdem durch weitere Pflanzenhormone wie Ethylen, Salicylsäure, Methyljasmonat und Brassinosteroide beeinflusst wird, was vermuten lässt, dass die Gene eine Rolle bei der Wechselwirkung verschiedener Hormone spielen (Werner et al., 2006).

Die Expression von CKX-Genen aus verschiedenen Spezies wie *A. thaliana*, *Z. mays*, *Glycine max*, *B. rapa* und *Lupinus albus* wird durch diverse abiotische Stimuli, z.B. Trocken-, Salz- und Hitzestress sowie Phosphatmangel reguliert, was auf mutmaßliche Entwicklungsprozesse hindeutet, die von diesen Enzymen beeinflusst werden (Brugière et al., 2003; Le et al., 2012; Liu et al., 2013; Nishiyama et al., 2011; Uhde-Stone et al., 2003; Vyroubalová et al., 2009; Werner et al., 2006). Auch biotische Faktoren gehören zu den Stimuli, welche CKX-Enzyme regulieren, wozu unter anderem die sehr starke Induktion der *CKX1*- und *CKX3*-Expression infolge einer Infektion von *A. thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) zählt (Werner et al., 2006).

Die Aktivität eines Enzyms kann nicht nur durch seine Expression, sondern auch durch post-translationale Modifikationen reguliert werden. Für alle CKX-Enzyme aus *A. thaliana* und einige CKXs anderer Spezies werden Glykosylierungsstellen vorhergesagt und sowohl die Kristallstrukturanalyse als auch die Glykopeptidsequenzierung des rekombinanten ZmCKX1 bestätigte die Existenz von mehreren Glykosylierungsstellen (Malito et al., 2004; Schmölling et al., 2003). Aus verschiedenen Pflanzenspezies wurden sowohl glykosylierte als auch nicht oder nur gering glykosylierte CKXs isoliert und es wird diskutiert, dass diese Modifikationen das pH-Optimum, die Translokation oder die Proteinstabilität beeinflussen könnten (Kaminek und Armstrong, 1990; Motyka

et al., 1996; Motyka und Kamínek, 1994; Motyka et al., 2003; Niemann et al., 2018; Zhang et al., 1995). Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Aktivität von rekombinantem ZmCKX1 durch dessen Deglykosylierung verringert wird und die cytokinininduzierte Erhöhung der CKX-Aktivität in Tabak vor allem mit glykosylierten CKX-Isoformen assoziiert ist (Franc et al., 2012; Motyka et al., 1996; Motyka et al., 2003). Die Glykosylierung der CKX-Enzyme könnte demnach ein Mechanismus sein, die CKX-Aktivität und somit den Cytokiningehalt in den Pflanzen zu regulieren. Zudem sind die Enzyme CKX1, CKX2 und CKX3 Substrate der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) und ihre Stabilität und dementsprechend ihre Aktivität wird durch diesen Prozess kontrolliert (Niemann et al., 2015). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CKX1 aus *A. thaliana* Homooligomere bildet (Niemann et al., 2018). Pflanzen, die eine mutierte Version des CKX1-Proteins überexprimieren, welche nicht mehr zur Bildung dieser Oligomere fähig ist, zeigen einerseits ein geringeres CKX1-Level sowie eine schwächere Reduktion des Cytokiningehalts verglichen mit Pflanzen, welche die Wildtypform von CKX1 überexprimieren, andererseits bilden sie nicht den charakteristischen Cytokinin-Defizienz-Phänotyp aus (Niemann et al., 2018). Es wird vermutet, dass die Bildung der Homooligomere für die Lokalisation des Enzyms im ER sowie die Stabilität des Proteins notwendig ist und das die monomere CKX1-Variante stärker durch die ERAD abgebaut werden könnte (Niemann et al., 2018).

1.1.2 Cytokininsignaltransduktion

Die Erkennung des Signalmoleküls Cytokinin und die Transduktion des Signals innerhalb der Zelle erfolgen, ähnlich dem klassischen bakteriellen Zweikomponentensystem, durch einen membranständigen Rezeptor gefolgt von einer Phosphorylierungskaskade, welche schließlich die zelluläre Antwort in Form von Transkriptleveländerungen der Cytokininantwortgene auslöst (To und Kieber, 2008). In Abbildung 4 ist die Transduktion des Cytokininsignals schematisch dargestellt.

In *A. thaliana* wird Cytokinin durch die drei membranständigen Rezeptorhistidinkinasen ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2 (AHK2), AHK3 und AHK4 erkannt (Hwang und Sheen, 2001; Inoue et al., 2001; Mähönen et al., 2000; Suzuki et al., 2001a; Yamada et al., 2001). Alle Rezeptoren besitzen zwei Transmembrandomänen, zwischen denen die Ligandenbindung stattfindet, sowie einen cytoplasmatischen C-Terminus, auf dem sich eine Transmitter- und eine Empfängerdomäne befinden (Heyl et al., 2012; Steklov et al., 2013). Sowohl in *A. thaliana* als auch in *Z. mays* sind die Rezeptoren hauptsächlich in der ER-Membran lokalisiert (Caesar et al., 2011; Lomin et al., 2015; Wulfetange et al., 2011). Cytokinin bindet an die cyclases/histidine kinases associated sensor extracellular (CHASE)-Domäne des Rezeptors im ER-Lumen, was zur Dimerisierung des Rezeptors führt (Anantharaman und Aravind, 2001; Caesar et al., 2011; Dortay et al., 2006; Heyl et al., 2007; Hothorn et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Das bewirkt wiederum die Transphosphorylierung der dimerisierten Rezeptoren an den konservierten Histidinresten der Transmitterdomäne (West und Stock, 2001). Obwohl alle AHKs eine hohe Affinität gegenüber isoprenoiden Cytokininbasen aufweisen und sowohl Adenin als auch Cytokininconjugate kaum als Liganden nutzen, präferieren die verschiedenen AHKs unterschiedliche Cytokintypen als Liganden (Romanov et al., 2006; Spíchal et al., 2004; Stolz et al., 2011). Diese Ligandenspezifitäten und die unterschiedlichen Expressionsdomänen tragen unter anderem dazu bei, dass eine Kommunikation zwischen Spross

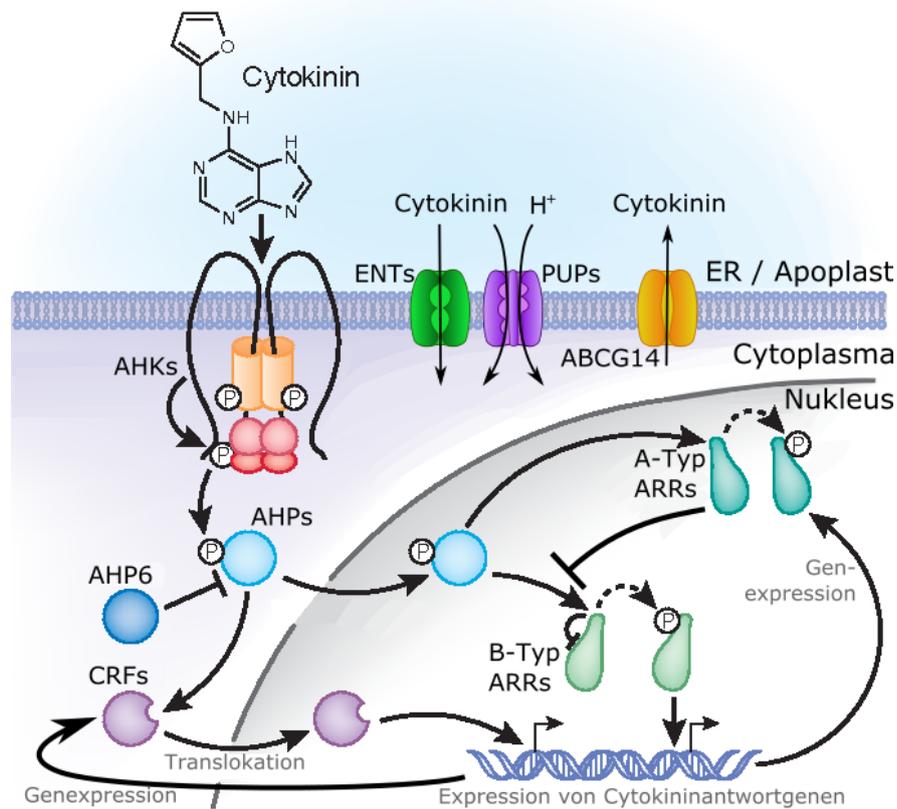


Abbildung 4: Signaltransduktion und Transport von Cytokinin.

Cytokinin bindet vorwiegend im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder im Apoplast an Rezeptorhistidinkinasen (AHK), welche dimerisieren und durch Transphosphorylierung aktiviert werden. Durch die Übertragung des Phosphorylrests auf mobile Histidinphosphotransmitter (AHPs) werden diese aktiviert und leiten einerseits das Signal in Form einer Phosphorylierung an die B-Typ Responseregulatoren (B-Typ ARRs) im Nucleus weiter und bewirken andererseits die Translokation und Aktivierung der Cytokinin-Response-Faktoren (CRFs). Die Mitglieder beider Transkriptionsfaktorfamilien induzieren die Expression von Cytokininantwortgenen. Zu diesen gehören unter anderem die CRFs und die A-Typ Responseregulatoren (A-Typ ARRs). Sowohl die A-Typ ARRs als auch der Pseudophosphotransmitter AHP6 inhibieren die Cytokininsignaltransduktion. Purinpermeasen (PUPs) sowie äquilibrierende Nucleosidtransporter (ENTs) transportieren Cytokinin in das Cytoplasma und der *ATP-binding cassette*-Transporter ABCG14 exportiert Cytokinin aus dem Cytoplasma. Abbildung modifiziert nach Santner et al. (2009).

und Wurzel mit Cytokinin als Langstreckensignal stattfinden kann. AHK4 ist am stärksten in der Wurzel exprimiert und besitzt eine höhere Affinität gegenüber iP, welches über das Phloem vom Spross in die Wurzel transportiert wird (Corbesier et al., 2003; Higuchi et al., 2004; Hirose et al., 2008; Mähönen et al., 2000; Nishimura et al., 2004; Stolz et al., 2011). Der im Spross vorrangig exprimierte Rezeptor AHK3 bevorzugt tZ, welches hauptsächlich über das Xylem von der Wurzel in den Spross transportiert wird (Higuchi et al., 2004; Hirose et al., 2008; Romanov et al., 2006; Takei et al., 2001b; Zhang et al., 2014a). Generell sind die Rezeptoren vorrangig in meristematischen Geweben und dem Leitgewebe zu finden, eine moderate Expression ist jedoch in der gesamten Pflanze zu beobachten (Birnbaum et al., 2003; Nishimura et al., 2004; Yadav et al., 2009). Die Phosphorylgruppe am Histidinrest der Transmitterdomäne wird intramolekular auf einen konservierten Asparaginsäurerest der Empfängerdomäne und von dort weiter auf einen konservierten Histidinrest eines Histidinphosphotransferproteins (*ARABIDOPSIS HISTIDIN-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER*; AHP) übertragen (Hwang und Sheen, 2001; Suzuki et

al., 2001a; Tanaka et al., 2004). Interessanterweise wurde bei AHK4 zusätzlich eine Phosphataseaktivität beobachtet (Mähönen et al., 2006b). Fällt die Cytokininkonzentration unter einen kritischen Wert, agiert der Rezeptor als Phosphatase, welche die aktivierende Phosphorylgruppe von AHP abspaltet und trägt so aktiv dazu bei, die Cytokininsignaltransduktion bei nachlassender Cytokininkonzentration wieder zu beenden (Mähönen et al., 2006b).

Wurde der Phosphorylrest von dem Rezeptor auf ein AHP übertragen, wandert dieser mobile Transmitter vom ER-lokaliserten Rezeptor in den Zellkern, um das Signal dort an einen Typ-B ARR weiterzugeben (Hwang und Sheen, 2001). In *A. thaliana* kodieren die fünf Gene *AHP1* bis *AHP5* für funktionelle Phosphotransmitter, welche alle mit den AHKs und Typ-B ARRs interagieren können (Dortay et al., 2006; Hutchison et al., 2006; Miyata et al., 1998; Schaller et al., 2008; Suzuki et al., 1998; Suzuki et al., 2002). Das Pseudophosphotransferprotein AHP6 ähnelt strukturell den AHPs, kann an AHKs und B-Typ ARRs binden, besitzt jedoch nicht den für die Signalweiterleitung nötigen konservierten Histidinrest und agiert so durch kompetitive Hemmung als negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion (Bishopp et al., 2011a; Mähönen et al., 2006a).

Im Zellkern wird der Phosphorylrest von AHP auf den konservierten Asparaginsäurerest der N-terminalen Empfängerdomäne eines Typ-B ARR übertragen (Hwang und Sheen, 2001; Tanaka et al., 2004). B-Typ ARRs sind Transkriptionsfaktoren, welche neben der Empfängerdomäne eine C-terminale Transaktivierungsdomäne besitzen, die sequenzspezifisch an Elemente der Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*, DNA) bindet (Hosoda et al., 2002; Hwang und Sheen, 2001; Imamura et al., 2003; Lohrmann et al., 2007; Sakai et al., 2008). In *A. thaliana* kodieren elf Gene für Typ-B ARRs (*ARR1*, *ARR2*, *ARR10* bis *ARR14*, *ARR18* bis *ARR21*), welche die Transkription primärer Cytokininantwortgene induzieren (D'Agostino et al., 2000; Hwang und Sheen, 2001; Mason et al., 2005; Sakai et al., 2008). Die bevorzugten DNA-Bindemotive der B-Typ ARRs enthalten die Kernsequenz (A/G)GAT(T/C), welche je nach ARR-Isoform durch spezifische Basen erweitert wird und eine Bindung an diese Zielsequenzen konnte *in planta* bestätigt werden (Hosoda et al., 2002; Imamura et al., 2003; Sakai et al., 2008; Taniguchi et al., 2007; Zubo et al., 2017). In Anwesenheit von Cytokinin wird die Bindung der B-Typ ARRs *ARR1*, *ARR10* und *ARR12*, welche in *A. thaliana* an den meisten der cytokininspezifischen Entwicklungsprozesse maßgeblich beteiligt sind, auf das Motiv AGAT(T/A/C)(T/C) spezifiziert (Argyros et al., 2008; Ishida et al., 2008; Xie et al., 2018). In den Promotoren vieler primären Cytokininantwortgene finden sich diese Bindemotive (Brenner et al., 2012; Ramireddy et al., 2013; Taniguchi et al., 2007; Zürcher et al., 2013). Für eine starke Induktion als Antwort auf Cytokinin werden zwei oder mehr der Bindemotive in gleicher Orientierung benötigt, was die Vermutung unterstützt, dass die Aktivität der B-Typ ARRs durch die Bildung von Homo- und Heterodimeren beeinflusst wird (Ramireddy et al., 2013; Taniguchi et al., 2007; Veerabagu et al., 2012; Zürcher et al., 2013).

Cytokinin induziert eine starke Veränderung des Expressionsprofils in *A. thaliana* und durch vergleichende Analysen von Transkriptomdaten verschiedener Cytokinininduktionsexperimente konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren Transkriptlevel robust durch Cytokinin reguliert wird (Bhargava et al., 2013; Brenner et al., 2012). Unter diesen Genen befinden sich unter anderem viele Gene des Cytokininmetabolismus und der Signaltransduktion von Cytokinin, Auxin-

assoziierte Gene und Gene, welche mit abiotischem Stress verbunden werden (Bhargava et al., 2013; Brenner et al., 2012). Außerdem waren viele der regulierten Gene Transkriptionsfaktoren, was die Annahme unterstützt, dass die B-Typ ARR an der Spitze einer transkriptionellen Kaskade stehen und sekundäre Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche jeweils einen Teil der Cytokininantwort kontrollieren (Bhargava et al., 2013; Brenner et al., 2012). Unter anderem wird durch Cytokinin die Expression von A-Typ ARRs induziert, welche in *A. thaliana* durch zehn Gene kodiert werden (*ARR3* bis *ARR9* und *ARR15* bis *ARR17*) und strukturell den B-Typ ARRs ähneln (Bhargava et al., 2013; Brandstatter und Kieber, 1998; Brenner et al., 2012; D'Agostino et al., 2000; Taniguchi et al., 1998). Sie besitzen eine N-terminale Empfängerdomäne, jedoch fehlt ihnen die DNA-Bindedomäne, weshalb sie nicht als aktive Transkriptionsfaktoren agieren, sondern die Cytokinin-signaltransduktion hemmen, indem sie mit den B-Typ ARRs um die von den AHPs übertragenen Phosphorylgruppen konkurrieren (D'Agostino et al., 2000; Hwang und Sheen, 2001; Kiba et al., 2003; Lee et al., 2007; To et al., 2007; To et al., 2004). Cytokinin induziert jedoch nicht nur die Transkription der A-Typ ARRs, sondern erhöht auch die Stabilität der A-Typ ARR-Proteine, wodurch die negative Regulation der Cytokininantwort durch die A-Typ ARRs durch zwei unabhängige Mechanismen realisiert wird (Li et al., 2013b; To et al., 2007). Eine weitere Gruppe cytokinininduzierter Gene in *A. thaliana* sind die acht Transkriptionsfaktoren der *CYTOKININ RESPONSE FACTOR (CRF)*-Genfamilie (Rashotte et al., 2003; Rashotte et al., 2006). Zusätzlich zur Erhöhung des CRF-Transkriptlevels wird durch Cytokinin eine Translokation dieser Transkriptionsfaktoren aus dem Cytoplasma in den Zellkern bewirkt und diese Translokation ist abhängig von AHKs und AHPs, nicht jedoch von ARRs (Rashotte et al., 2006). CRFs können Homodimere sowie Heterodimere mit anderen CRFs und mit AHPs bilden, wobei die Interaktion mit AHPs die cytokininabhängige Translokation der CRFs in den Kern oder die Aktivität der CRFs als Transkriptionsfaktoren regulieren könnte (Cutcliffe et al., 2011).

1.1.3 Transport von Cytokinin

Cytokinin wurde als parakrines Signal wie auch als Langstreckensignal beschrieben. Obwohl die Orte der *de novo*-Synthese von Cytokininribotiden auf die Expressionsdomänen der IPTs beschränkt sind, welche vor allem in meristematischen Bereichen zu finden sind, kann durch die LOGs, welche in nahezu allen Geweben exprimiert werden, die Aktivierung von Cytokinin überall dort stattfinden, wo das Cytokinin-signal benötigt wird (Kuroha et al., 2009; Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004a).

Die Beobachtung, dass die Expressionsdomänen einzelner IPT- und CKX-Gene in räumlich begrenzten, meristematischen Gewebe überlappen, deutet auf eine para- oder autokrine Cytokininwirkung in diesen Bereichen hin (Werner et al., 2006; Zürcher et al., 2016). In Pfropfungsexperimente, bei denen spezifisch der Cytokiningehalt in Wurzeln verändert wurde, waren viele der von Cytokinin beeinflussten Entwicklungsprozesse wie Apikaldominanz, Blattseneszenz oder Aktivität des Sprossapikalmeristems (engl.: *shoot apical meristem*, SAM) unverändert, was auf eine parakrine Cytokininwirkung in diesen Prozessen schließen lässt (Faiss et al., 1997; Werner et al., 2010). Möglicherweise wird Cytokinin in diesen Geweben symplastisch transportiert. Bislang wurden

keine Prozesse belegt, in denen Cytokinin als autokrines Signal wirkt, jedoch wird diese Wirkungsweise bei der Kontrolle des Zellzyklus durch Cytokinin und bei der Antwort auf verschiedene Stressstimuli diskutiert (Romanov et al., 2018).

Das Vorkommen von Komponenten des Cytokininmetabolismus wie z.B. IPT3 und CKX6 sowie der Cytokininrezeptoren in der Vaskulatur lässt auch eine Funktion von Cytokinin als Langstreckensignal vermuten (Miyawaki et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Werner et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Cytokinine sich durch die Leitgewebe zwischen Spross und Wurzel bewegen, wodurch eine Kommunikation zwischen oberirdischen und unterirdischen Organen möglich ist (Kudo et al., 2010). Da die CYP735A-Enzyme vorrangig in den Wurzeln exprimiert werden, ist davon auszugehen, dass die Produktion von tZ-Typ Cytokininen hauptsächlich in der Wurzel stattfindet (Takei et al., 2004b). Diese tZ-Typ Cytokinine werden über das Xylem aus den Wurzeln in den Spross transportiert, wobei tZ-Ribosid als vorrangige Transportform genutzt wird (Hirose et al., 2008; Kiba et al., 2013; Matsumoto-Kitano et al., 2008; Osugi et al., 2017; Takei et al., 2001b; Takei et al., 2004b). Akropetal transportierte tZ-Typ Cytokinine beeinflussen z.B. die Größe der Rosettenblätter sowie die Aktivität des Infloreszenzmeristems (Kiba et al., 2013; Osugi et al., 2017). Zudem wird vermutet, dass die Pflanzen Cytokinin als Langstreckensignal nutzen, um das Sprosswachstum an Änderungen der Nährstoffversorgung, welche durch die Wurzel detektiert werden, anzupassen (Hirose et al., 2008; Osugi et al., 2017; Rahayu et al., 2005; Sakakibara et al., 1998; Takei et al., 2001b). Im Gegensatz zu tZ-Typ Cytokininen, bewegen sich iP-Typ Cytokinine hauptsächlich durch symplastischen Transport im Phloem vom Spross in die Wurzel, wobei auch hier vor allem iP-Ribosid als Transportform dient (Bishopp et al., 2011b; Hirose et al., 2008; Matsumoto-Kitano et al., 2008; Sasaki et al., 2014). Diese basipetal transportierten Cytokinine des iP-Typs spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Wurzelvaskulatur sowie Nodulation in Leguminosen (Bishopp et al., 2011b; Sasaki et al., 2014).

Sowohl für die lokale als auch für die distale Wirkung, ist es notwendig, dass Cytokinine Membranen passieren. Von den Orten der Biosynthese, wobei es sich aufgrund der subzellulären Lokalisation der IPTs entweder um Chloroplasten, Mitochondrien oder das Cytoplasma handelt, müssen sie für eine auto- oder parakrine Wirkung die Endomembranen zum Ort der Signalperzeption, welche hauptsächlich im ER-Lumen stattfindet, durchqueren. Für eine Wirkung als Langstreckensignal muss das Hormon aus den biosynthetisch-aktiven Zellen ins Leitgewebe exportiert und daraus in die Empfängerzellen importiert werden. Eine Diffusion des Hormons durch Membranen wurde nicht beobachtet, was zu der Annahme führt, dass Proteine für den Export und Import des Hormons existieren müssen (Cedzich et al., 2008). Bisher bekannte Cytokinintransporter sind in Abbildung 4 gezeigt. In *A. thaliana* wurde der in der Plasmamembran lokalisierte ATP-binding cassette (ABC)-Transporter ABCG14 identifiziert, welcher Cytokinin aus den Wurzelzellen in das Xylem exportiert (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014a). Ein Verlust der ABCG14-Genfunktion führt zu einer starken Reduktion der Cytokininkonzentration im Xylem und einer gestörten Sprossentwicklung (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014a). Als Importproteine für Cytokinin agieren vermutlich Mitglieder aus zwei Proteinfamilien, den Purin Permeasen (PUPs) und den äquilibrierenden Nukleosidtransportern (engl.: EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER, ENTs) (Bürkle et

al., 2003; Gillissen et al., 2000; Hirose et al., 2005; Hirose et al., 2008; Sun et al., 2005; Zürcher et al., 2016). Weder PUPs noch ENTs transportieren spezifisch Cytokinin, sondern sie transportieren diverse Purine wie Adenin und Purinderivate inklusive Cytokinin bzw. verschiedene Nukleoside, unter anderem Cytokininriboside (Bürkle et al., 2003; Gillissen et al., 2000; Hirose et al., 2005; Wormit et al., 2004). In *A. thaliana* existieren mehr als 20 PUPs, der Transport von Cytokininbasen wurde allerdings nur für PUP1, PUP2 und PUP14 nachgewiesen (Bürkle et al., 2003; Gillissen et al., 2000; Zürcher et al., 2016). Von den Mitgliedern der ENT-Proteinfamilie wurde für ENT3, ENT6, ENT7 und ENT8 aus *A. thaliana* sowie ENT2 aus *O. sativa* ein Transport von Cytokininribosiden gezeigt (Hirose et al., 2005; Hirose et al., 2008; Sun et al., 2005). *Loss-of-function*-Mutanten von *ENT3* und *ENT8* nahmen weniger Cytokinin in die Zellen auf und konnten die Effekte einer erhöhten endogenen Cytokininproduktion supprimieren, was eine Funktion von diesen Genen als Cytokinintransporter unterstützt (Sun et al., 2005). *ENT6* wird in der Vaskulatur von Spross und Wurzel exprimiert, was für einen Einfluss des Gens auf den Langstreckentransport von Cytokinin spricht (Hirose et al., 2008).

1.1.4 Cytokininwirkung in Pflanzen

Nachdem die zellteilungsfördernde Wirkung von Cytokinin entdeckt wurde, wurden zahlreiche Untersuchungen unternommen, die Funktionen Hormons für Pflanzen aufzuklären. Durch die Analyse von *loss-* und *gain-of-function*-Mutanten wichtiger Gene des Metabolismus sowie der Signaltransduktion von Cytokinin konnten diverse Prozesse während der pflanzlichen Entwicklung und der Antwort auf äußere Einflüsse aufgeklärt werden, an denen das Hormon beteiligt ist.

1.1.4.1 Cytokinin während der pflanzlichen Entwicklung

Während der pflanzlichen Entwicklung besitzt Cytokinin eine Schlüsselrolle für die Zellteilung und -differenzierung in den meristematischen Regionen und beeinflusst somit maßgeblich die Aktivität und Größe der Meristeme sowie die Anzahl und Größe der sich entwickelnden Organe (Hwang et al., 2012; Kieber und Schaller, 2014; Zürcher und Müller, 2016). Mutanten mit erhöhtem oder verringertem endogenen Cytokininstatus weisen dabei auf eine positive Regulation des Wachstums von vegetativem und reproduktivem SAM sowie der Blütenmeristeme (Bartrina et al., 2011), jedoch eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Primär- und Lateralwurzeln durch Cytokinin hin (Bartrina et al., 2011; Higuchi et al., 2004; Jensen, 2014; Mason et al., 2005; Miyawaki et al., 2006; Nishimura et al., 2004; Werner, 2016; Werner et al., 2003). Pflanzen mit einem stark verringertem Cytokiningehalt, wie z.B. *ipt*-Mehrfachmutanten oder *CKX*-überexprimierende Pflanzen, zeigen ein extrem reduziertes Sprosswachstum, jedoch längere und stärker verzweigte Wurzeln (Miyawaki et al., 2006; Werner et al., 2003).

Die Kontrolle des Sprosswachstums durch Cytokinin wird maßgeblich durch dessen Einfluss auf die Größe und Aktivität des SAM bestimmt. Das SAM bildet alle oberirdischen Pflanzenorgane, wobei während der vegetativen Wachstumsphase Blätter sowie Stängelsegmente und während der reproduktiven Phase der Infloreszenzstängel mitsamt der Blüten gebildet werden (Pfeiffer et al., 2017). Cytokinin ist ein positiver Regulator des Transkriptionsfaktors *WUSCHEL* (*WUS*), welcher die Teilungsfähigkeit der Stammzellen aufrecht erhält und somit die Größe der Stammzellpopulation

definiert (Gordon et al., 2009; Lindsay et al., 2006; Mayer et al., 1998). Dementsprechend besitzen Pflanzen mit stark verringertem endogenen Cytokininstatus ein kleineres SAM, Pflanzen mit erhöhtem endogenen Cytokininstatus ein vergrößertes SAM und eine erhöhte *WUS*-Expression (Kiba et al., 2013; Miyawaki et al., 2006; Nishimura et al., 2004; Werner et al., 2003; Werner et al., 2001). Die veränderte Anzahl an Stammzellen wirkt sich auf die Aktivität des SAM aus. So zeigen beispielsweise Pflanzen mit erhöhter *CKX*-Aktivität eine verringerte Blattbildungsrate, wohingegen *ckx*-Vierfachmutanten eine erhöhte Blattbildungsrate aufweisen (Werner, 2016). Auch die Größe der Rosettenblätter wird durch Cytokinin positiv beeinflusst, was hauptsächlich auf die Erhöhung der Zellanzahl durch eine verlängerte Proliferationsphase während der Blattentwicklung zurückzuführen ist (Bartrina et al., 2017; Holst et al., 2011; Nishimura et al., 2004; Riefler et al., 2006; Skalák et al., 2019; Werner et al., 2003).

Eine zellteilungsfördernde Wirkung wird Cytokinin ebenfalls während der Stomataentwicklung zugeschrieben. Spaltöffnungen werden aus den undifferenzierten Protodermzellen der Epidermis junger Blätter durch eine Folge asymmetrischer Zellteilungen gebildet (Larkin et al., 1997). Die Entwicklung zur Spaltöffnung wird dabei von dem Masterregulator *SPEACHLESS* (*SPCH*) eingeleitet, welcher sowohl die Differenzierung der Protodermzelle zur Meristemoidmutterzelle als auch deren anschließende erste asymmetrische Teilung fördert (Zoulias et al., 2018). Vatén et al. (2018) zeigten, dass *SPCH* sich in einem regulatorischen Netzwerk mit Cytokinin und Komponenten des Cytokininsignalwegs befindet. Als Zielgen von *ARR10* wird *SPCH* durch Cytokinin positiv reguliert und eine Behandlung von Pflanzen mit Cytokinin erhöht nicht nur die Gesamtzellanzahl der Epidermis, sondern auch den Stomataindex, also den relativen Anteil der Stomata an der Gesamtanzahl der Epidermiszellen (Vatén et al., 2018; Zubo et al., 2017). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung ist der Stomataindex in Mehrfachmutanten der *IPT*-Gene und *AHK*-Gene mit reduziertem Cytokininstatus verringert, wohingegen *arr16,17*-Doppelmutanten mit verstärkter Cytokininsignaltransduktion mehr Stomata produzieren (Vatén et al., 2018). *SPCH* reguliert seinerseits das Transkriptlevel mehrerer Gene, welche die Cytokininhomöostase und dessen Signalübertragung kontrollieren, und einige davon wurden durch Chromatin-Immunopräzipitation als direkte *SPCH*-Zielgene identifiziert (Adrian et al., 2015; Lau et al., 2014). So verringert *SPCH* beispielsweise durch die Induktion von *ARR16* und *ARR17* zelltypspezifisch die Cytokininsensitivität und inhibiert so die Zellteilungsaktivität, wodurch der Abstand zwischen den Stomata reguliert wird (Vatén et al., 2018).

Nicht nur während der vegetativen, auch während der reproduktiven Phase spielt Cytokinin für mehrere Aspekte der Sprossentwicklung eine Rolle, wobei das Hormon wiederum als positiver Regulator von Organbildung und -wachstum auftritt. Im Vergleich zum Wildtyp bilden Pflanzen mit reduziertem endogenen Cytokininstatus kürzere Infloreszenzstängel mit weniger Blüten aus, wohingegen Pflanzen mit erhöhtem endogenen Cytokininstatus längere Infloreszenzen und mehr Blüten ausbilden (Bartrina et al., 2017; Bartrina et al., 2011; Kuroha et al., 2009; Nishimura et al., 2004; Werner et al., 2003). Die erhöhte Blütenproduktion führt letztendlich zu einer höheren Schotenanzahl und einem gesteigerten Ertrag. Darüber hinaus sind die Blütenorgane der Pflanzen mit erhöhtem Cytokininstatus größer, was auf eine höhere Zellanzahl in den Organen und somit auf eine

gesteigerte Zellproliferation während der Blütenentwicklung zurückzuführen ist (Bartrina et al., 2017; Bartrina et al., 2011). Die Wirkung von Cytokinin auf die Entwicklung der männlichen Blütenorgane wird beispielsweise darin deutlich, dass die Antheren von Dreifachmutanten der *AHK*-Gene weniger Pollen bilden und sich nicht öffnen (Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). Die Pollen unterscheiden sich zwar morphologisch nicht von Pollen des Wildtyps, aber sowohl *in vitro* als auch auf einem wildtypischen Stigma keimen sie sehr schlecht (Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). Auch *CKX1* überexprimierende Pflanzen, die eine geringere endogene Cytokininkonzentration besitzen, zeigen eine stark reduzierte Fruchtbarkeit, unter anderem wegen der geringeren Anzahl gebildeter Pollen (Werner et al., 2003). Während der Gynoeceenentwicklung wird das Cytokininsignal auf das Innere des Fruchtblattes begrenzt, welches sich schließlich zum Septum und Plazentagewebe entwickelt, das die Samenanlagen produziert (Müller et al., 2017; Sehra und Franks, 2015). Die exogene Zugabe von Cytokinin auf sich entwickelnde Blüten verursacht eine erhöhte Zellteilung in diesen medialen Geweben, verändert jedoch auch den strukturellen Aufbau des Gynoeceums (Zúñiga-Mayo et al., 2014). In Pflanzen mit erhöhter endogener Cytokininkonzentration aufgrund des gleichzeitigen Verlusts von *CKX3* und *CKX5* oder der ektopischen Expression von *LOG4* wurden vergrößerte Schoten mit normaler Struktur, aber erhöhter Samendichte beobachtet, was auf eine positive Wirkung des Hormons auf die Plazentaaktivität hinweist (Bartrina et al., 2011; Werner, 2016). Neben der Entstehung der Samenanlagen beeinflusst Cytokinin auch die Entwicklung der Megasporen und folglich der weiblichen Gametophyten (Zúñiga-Mayo et al., 2019). Mehrfachmutanten der *AHKs* und der *AHPs* zeigen Defekte während der Megagametogenese und eine stark reduzierte Fruchtbarkeit (Deng et al., 2010; Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). Cheng et al. (2013) zeigten, dass für eine normale Entwicklung des weiblichen Gametophyten eine lokale Erhöhung des Cytokininsignals im sporophytischen Gewebe nahe der späteren Megaspore benötigt wird. Darüber hinaus scheint Cytokinin auch bei der Induktion der Keimung des Pollens durch das Stigma eine Rolle zu spielen, da Pollen des Wildtyps auf Stigmen von Mehrfachmutanten der *AHK*-Gene nicht keimen (Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). Eine verringerte Fruchtbarkeit, unter anderem aufgrund der veränderten Morphologie der Reproduktionsorgane, wurde auch in Pflanzen mit reduzierter Menge aktiver Cytokinine anderer Spezies wie *Z. mays* und *O. sativa* beobachtet, was auf eine konservierte Funktion von Cytokinin während der reproduktiven Entwicklungsprozesse hindeutet (Pineda Rodo et al., 2008; Yamaki et al., 2011).

Das Wachstum und die Entwicklung des Wurzelsystems werden von Cytokinin negativ reguliert. Besonders deutlich wird dies bei der Analyse von Pflanzen mit reduziertem Cytokininstatus, welche stark verlängerte Primärwurzeln sowie eine erhöhte Lateralwurzelanzahl aufweisen (Mason et al., 2005; Miyawaki et al., 2006; Riefler et al., 2006; Werner et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Cytokinin die Größe des Wurzelapikalmeristems (engl.: *root apical meristem*, RAM) negativ beeinflusst, indem es die Differenzierung der meristematischen Zellen kontrolliert (Dello Iorio et al., 2007). In Übereinstimmung damit sind die Primärwurzellänge sowie die RAM-Größe in Pflanzen mit erhöhter Cytokininrezeptoraktivität reduziert (Bartrina et al., 2017). Während der Bildung der Lateralwurzeln wirkt Cytokinin direkt inhibierend auf die Initiation der Lateralwurzeln, indem es das Muster der aufeinanderfolgenden Zellteilungen stört (Laplaze et al., 2007). Die Anzahl der Lateralwurzeln

wird sowohl durch exogenes Cytokinin als auch durch eine endogen gesteigerte Cytokininsensitivität reduziert, durch einen endogen verringerten Cytokininstatus hingegen erhöht (Bartrina et al., 2017; Laplaze et al., 2007; Mason et al., 2005; Miyawaki et al., 2006; Riefler et al., 2006; To et al., 2004; Werner et al., 2003).

Cytokinin reguliert ebenfalls die Entwicklung des vaskulären Kambiums, welches die Zellen der Leitgewebe bildet, und beeinflusst folglich die Entwicklung der Leitgewebe in Spross, Hypocotyl und Wurzel sowie das sekundäre Dickenwachstum der Pflanze (Nieminen et al., 2015; Ragni und Greb, 2018). In Pflanzen mit stark verringertem Cytokininstatus, wie *ipt1,3,5,7*, *ahk2,3* und *35S:CKX1*, geht mit dem charakteristischen Zwergwuchs auch ein verringerter Stängeldurchmesser einher, was auf eine verringerte Kambiumaktivität zurückzuführen ist (Hejatko et al., 2009; Matsumoto-Kitano et al., 2008). Obwohl die Länge der Infloreszenzspresse von *ipt3* Mutanten unverändert ist, entwickeln auch diese einen dünneren Stängel und weniger Zellen der vaskulären Gewebe, was darauf hinweist, dass die schwächere Kambiumaktivität kein indirekter Effekt des reduzierten Sprosswachstums ist, sondern direkt auf die lokal verringerte Cytokininkonzentration zurückgeht (Matsumoto-Kitano et al., 2008). Im Gegensatz dazu bewirken die Erhöhung des Cytokininlevels in *ckx3,5*, die Überexpression der konstitutiv aktiven Rezeptorhistidinkinase CYTOKININ-INDEPENDENT 1 (CKI1) in *A. thaliana* sowie die ektopische Expression des Cytokininbiosynthesegens *AtIPT7* in *Populus trichocarpa* (*P. trichocarpa*) ein verstärktes Dickenwachstum aufgrund einer erhöhten Kambiumaktivität (Bartrina et al., 2011; Hejatko et al., 2009; Immanen et al., 2016). Auch in der Wurzel agiert Cytokinin als positiver Regulator des vaskulären Kambiums sowie der Protoxyldifferenzierung. Der Wurzeldurchmesser von Pflanzen mit reduzierter Cytokininbiosynthese oder inhibierter Cytokininsignaltransduktion ist stark verringert, die Vaskulatur besteht ausschließlich aus Protoxylem und es wird kein vaskuläres Kambium gebildet (Hutchison et al., 2006; Mähönen et al., 2000; Matsumoto-Kitano et al., 2008; Yokoyama et al., 2007).

1.1.4.2 Bedeutung von Cytokinin bei der pflanzlichen Reaktion auf Stress

Als sessile Organismen haben Pflanzen diverse Strategien entwickelt, sich an wechselnde Umweltbedingungen in ihrem Lebensraum anzupassen. Um die Entwicklung der gesamten Pflanze entsprechend der biotischen und abiotischen Faktoren zu regulieren, werden endogene Signale genutzt (He et al., 2018). Zu diesen gehört auch Cytokinin, welches zum einen im Xylem akropetal transportiert wird und so als Langstreckensignal für die Bedingungen im Erdreich dienen kann. Zum anderen wird Cytokinin im Phloem basipetal transportiert und kann so die Wurzelarchitektur den überirdischen Einflüssen anpassen (Cortleven et al., 2019; Pavlů et al., 2018; Zürcher und Müller, 2016). Es wird beispielsweise vermutet, dass unter anderem das Verhältnis von Cytokinin und ABA im Xylemsaft als Signal für Dehydration dient, da sich ihre Konzentrationen unter Trockenheit verändern (Alvarez et al., 2008; Hansen und Dörffling, 2003; Schachtman und Goodger, 2008). Viele abiotische Faktoren wie Trockenheit, Salzstress oder Hitze senken den endogenen Cytokininingehalt von Pflanzen, was zumeist mit Transkriptleveländerungen von Genen der Biosynthese und des Abbaus von Cytokinin verbunden ist (Brugière et al., 2003; Itai et al., 1973; Le et al., 2012; Nishiyama et al., 2011; Ramireddy et al., 2014; Vyroubalová et al., 2009). Auch die Expression von Komponenten der Cytokininsignaltransduktion wird durch abiotischen Stress im Allgemeinen

gehemmt, wohingegen die Expression der A-Typ ARRs erhöht wird (Kang et al., 2012; Nguyen et al., 2016; Nishiyama et al., 2013; Ramireddy et al., 2014).

Mutanten mit verringerter endogener Cytokininkonzentration oder gestörter Cytokininsignaltransduktion weisen eine höhere Resistenz gegenüber Stressfaktoren wie Trocken-, Salz- oder Kältestress auf, was für eine negative regulatorische Rolle von Cytokinin in Bezug auf diese Faktoren spricht (Jeon et al., 2010; Kang et al., 2012; Nguyen et al., 2016; Nishiyama et al., 2011; Nishiyama et al., 2013; Prerostova et al., 2018; Tran et al., 2007). In den Mutantenlinien sind verschiedene physiologische und molekulare Veränderungen zu beobachten, die zur Erhöhung der Stresstoleranz beitragen. Für die Pflanze bedeuten sowohl trockene oder salzige Böden als auch Kälte eine limitierte Wasserverfügbarkeit. Viele der Mutanten zeigen geringere Transpirationsraten, vor allem durch die reduzierte Öffnung der Stomata, was vor Wasserverlust schützt (Liao et al., 2017; Nguyen et al., 2016). Zudem besitzen sie ein stärker entwickeltes Wurzelsystem, wodurch die Wasserressourcen des Bodens besser genutzt werden können (Liao et al., 2017; Ramireddy et al., 2018; Vojta et al., 2016). In den Cytokininmutanten war zudem eine bessere Membranstabilität während des Wassermangels zu beobachten, welche eine wichtige Eigenschaft für die Stresstoleranz darstellt (Nguyen et al., 2016; Nishiyama et al., 2011; Nishiyama et al., 2013). Als Hauptregulator in der pflanzlichen Trocken-, Salz- und Kältestressantwort spielt das Phytohormon ABA eine wichtige Rolle für die Stressresistenz und durch Cytokinin, welches als Antagonist von ABA gilt, kann der ABA-Status der Pflanzen moduliert werden (Zeevaart, 2003; Zhu, 2002). Ein verringerter Cytokininstatus ist mit einer Hypersensitivität gegenüber ABA sowie einer Transkriptleveländerung von stress- und ABA-induzierten Genen assoziiert, was vermutlich zur Stresstoleranz der Pflanzen beiträgt (Jeon et al., 2010; Nguyen et al., 2016; Nishiyama et al., 2012; Nishiyama et al., 2011; Nishiyama et al., 2013; Tran et al., 2007; Vojta et al., 2016).

1.1.4.3 Crosstalk mit anderen Hormonen

Pflanzliche Entwicklungsvorgänge werden durch das Zusammenspiel verschiedener Hormone gesteuert, welche sich gegenseitig durch direkte und indirekte Kontrollmechanismen auf den Ebenen der Homöostase, des Transports und der Signaltransduktion positiv sowie negativ beeinflussen können (Vanstraelen und Benková, 2012). Vor allem die Interaktion von Auxin und Cytokinin beeinflusst maßgeblich Zellteilungs- und Zelldifferenzierungsvorgänge während fundamentaler Wachstumsprozesse, wie der Embryogenese, des Wachstums und der Verzweigung von Wurzel und Spross und der Entwicklung der Vaskulatur (Chandler und Werr, 2015; Fukuda und Ohashi-Ito, 2019; Jing und Strader, 2019; Liu et al., 2017; Müller und Sheen, 2008; Pierre-Jerome et al., 2018; Shi und Vernoux, 2019).

Einige Prozesse regulieren Cytokinin und Auxin synergistisch. Die auxininduzierte Organbildung wird beispielsweise durch Cytokinin positiv reguliert, was sich darin zeigt, dass sowohl exogen appliziertes Cytokinin als auch ein endogen erhöhter Cytokininstatus zum einen die Auxinbiosyntheserate im Sprossapex steigern, was zu einem Anstieg der lokalen Auxinkonzentration führt, und zum anderen die Expression des polaren Auxinexporters *PIN-FORMED 1* (*PIN1*) erhöhen, wodurch der gezielte Auxintransport in die Blattprimordien gefördert wird (Lee et al., 2009; Pernisová et al., 2009). Für die Kontrolle der Stammzellpopulation im SAM reprimiert der auxininduzierte

Transkriptionsfaktor MONOPTEROS (MP) die Expression der A-Typ ARRs *ARR7* und *ARR15*, um so die Cytokininsensitivität zu verstärken (Zhao et al., 2010). Während der embryonalen Wurzelentwicklung kontrolliert das Zusammenspiel von Auxin und Cytokinin durch die Induktion von periklinalen Zellteilungen die Etablierung des Prokambiums in der Wurzel (Fischer et al., 2019). Dabei reguliert MP den Transkriptionsfaktor TARGET OF MONOPTEROS 5 (TMO5), welcher an den Promotor von *LOG4* bindet und durch dessen Expressionsinduktion die Aktivierung von Cytokinin und folglich die periklinalen Zellteilungen positiv beeinflusst (De Rybel et al., 2014; Ohashi-Ito et al., 2014; Schlereth et al., 2010). Die Expression der Transkriptionsfaktoren *REVOLUTA*, *PHAVOLUTA* und *CORONA*, welche für die Anordnung des Vaskularsystems eine entscheidende Rolle spielen, wird ebenfalls sowohl durch Auxin als auch durch Cytokinin positiv reguliert (Du und Wang, 2015; Miyashima et al., 2019).

Während vieler Entwicklungsprozesse stehen sich Cytokinin und Auxin jedoch als Antagonisten gegenüber. Beispielsweise reduziert Auxin die Transkriptlevel von *CYP735A1* und *CYP735A2* und erhöht die Transkriptlevel von *CKX*-Genen (Takei et al., 2004b; Werner et al., 2006). Um die Zellteilung und -differenzierung im RAM zu koordinieren, induzieren die durch das Cytokininsignal aktivierten B-Typ ARRs *ARR1* und *ARR12* die Expression von SHORT HYPOCOTYL 2 (*SHY2*), welches zum einen die Auxinsignaltransduktion reprimiert und zum anderen die Expression von PIN-Proteinen hemmt (Dello Iorio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Taniguchi et al., 2007; Tian et al., 2002). Bei der Initiierung von Lateralwurzelprimordien verhindert Cytokinin die Bildung eines Auxingradienten in den Gründerzellen, indem es einerseits die *PIN*-Transkriptlevel reduziert und andererseits die Lokalisation von PIN-Proteinen von der basalen zur lateralen Zellmembran bewirkt (Laplaze et al., 2007; Marhavý et al., 2014). Marhavý et al. (2011) zeigten, dass die PIN-Aktivität durch Cytokinin auch post-transkriptional reguliert werden kann, indem das Hormon spezifisch die Endozytose von *PIN1*, *PIN3* und *PIN7* und deren anschließende Degradation auslöst. Während der Entwicklung der Vaskulatur reguliert Cytokinin die *PIN*-Transkription, wodurch Auxin in die zentrale Domäne des vaskulären Gewebes transportiert und eine bisymmetrische Struktur der Wurzel erzeugt wird (Bishopp et al., 2011a). Auxin wiederum verstärkt die Transkription des Pseudophosphotransmitters *AHP6*, welcher die Cytokininsensitivität der zentralen Zellen stark inhibiert (Bishopp et al., 2011a). Durch diesen interaktiven Regulationsmechanismus wird die bisymmetrische Anordnung der Wurzelleitgewebe sichergestellt. Bei der Etablierung der Wurzelstammzellen während der frühen embryonalen Entwicklung wird das Cytokininsignal in deren Vorläuferzelle durch Auxin inhibiert, indem Auxin direkt die Transkription der A-Typ ARRs *ARR7* und *ARR15* induziert (Müller und Sheen, 2008).

Auch andere Phytohormone wechselwirken durch diverse Kontrollmechanismen mit Cytokinin, um verschiedene pflanzliche Entwicklungsprozesse zu steuern. Beispielsweise werden die Größe des RAM und das Wurzelwachstum durch Gibberellinsäure positiv reguliert, da Gibberellinsäure das Transkriptionslevel des B-Typ ARRs *ARR1* reduziert und damit die Cytokininantwort sowie die negative Regulation des Auxinsignals durch Cytokinin minimiert (Moubayidin et al., 2010). Zudem werden einige Reaktionen auf abiotische Faktoren durch das Zusammenspiel von Cytokinin mit anderen Hormonen gesteuert. Cytokininrezeptormutanten, welche eine gesteigerte Resistenz

gegenüber Trocken- und Salzstress aufweisen, zeigen beispielsweise eine Hochregulation vieler ABA-Antwortgene (Tran et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die A-Typ ARR_s ARR4, ARR5 und ARR6 sowohl die Transkriptlevel von *ABA INSENSITIVE 5 (ABI5)*, einem positiven Regulator der ABA-Antwort, negativ regulieren als auch mit diesem physisch interagieren, wodurch sie dessen Aktivität und folglich die ABA-Antwort inhibieren (Wang et al., 2011b). Bei der pflanzlichen Antwort auf Kälte spielt die Interaktion von Cytokinin und Ethylen eine Rolle (Liu et al., 2017). Ethylen verringert die Kältetoleranz von Pflanzen und es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3)*, welcher die Ethylenantwort vermittelt, an die Promotoren der A-Typ ARR_s *ARR5*, *ARR7* und *ARR15* bindet und diese reprimiert (Shi et al., 2012). Diese ARR_s haben einen positiven Einfluss auf die Kältetoleranz und sie bilden somit einen Kreuzungspunkt der Signalwege von Ethylen und Cytokinin, welche beide zur Reaktion der Pflanze auf Kälte beitragen können (Shi et al., 2012). Darüber hinaus scheint Ethylen eine Rolle bei der Wirkung von Cytokinin auf die Wurzelelongation zu spielen, da die cytokinininduzierte Primärwurzelverkürzung auf eine intakte Ethylensignaltransduktion angewiesen ist (Cary et al., 1995; Růžicka et al., 2009). Die Interaktion der beiden Hormone findet zumindest teilweise durch Komponenten der Cytokininsignaltransduktion statt. Der Ethylenrezeptor *ETHYLENE RECEPTOR 1 (ETR1)*, welcher in Abwesenheit von Ethylen aktiv ist, interagiert mit einigen AHPs und fördert die Aktivierung von ARR2 (Hass et al., 2004; Scharein et al., 2008; Urao et al., 2000). ARR2 wiederum bindet an den Promotor des *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1)* und reguliert so die Ethylenantwort (Hass et al., 2004). So wird einerseits das Ethylensignal zum Teil über die Komponenten der Cytokininsignaltransduktion übertragen und gleichzeitig wirkt Ethylen als negativer Regulator des Cytokininsignals, da das Fehlen von Ethylen dessen Signaltransduktion induziert. Darüber hinaus reguliert Cytokinin das Ethylensignal, indem es post-transkriptional die Stabilität einiger 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE (ACC)-Synthasen erhöht, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Ethylenbiosynthese katalysieren (Hansen et al., 2009).

Da ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Kontrollmechanismen existiert, durch welches sich die einzelnen Hormone gegenseitig direkt oder indirekt beeinflussen, sind alle Hormone miteinander verbunden und die Wirkung eines Hormons kann in Bezug auf einen Entwicklungsprozess nicht isoliert betrachtet werden. Es bedarf stets der Berücksichtigung aller involvierten Komponenten.

1.1.4.4 Modulation der Cytokininantwort

Bei Pflanzen mit stark verringertem Cytokiningehalt oder stark beeinträchtigter Cytokininsignaltransduktion sind drastische morphologische Veränderungen zu beobachten, was demonstriert, wie wichtig die Kontrolle des Levels aktiver Cytokinine ist. Um diese Kontrolle zu realisieren, verfügen Pflanzen über diverse Stoffwechselprozesse, die Menge aktiver Cytokinine positiv sowie negativ zu beeinflussen (siehe Kapitel 1.1.1). Zudem besitzen Pflanzen eine enorm hohe Kapazität, Konzentrationsänderungen einzelner Cytokininmetabolite durch metabolische Veränderungen zu kompensieren. Dies wird besonders durch die Analyse von Doppelmutanten der Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* deutlich (Brock, 2020). Obwohl diese nahezu keine *N7*- und *N9*-Glucosidformen der Cytokinine besitzen, sind die Konzentrationen anderer Cytokininmetabolite wenig verändert und

morphologischen Abweichungen sehr schwach. Um die exakte Feinregulierung des Cytokininstatus zu gewährleisten, haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, welche die Cytokinmenge und die Cytokinwahrnehmung kontrollieren.

Zum einen werden die Homöostase und die Signaltransduktion durch die Redundanz der beteiligten Enzyme sichergestellt. Nahezu alle Gene des Cytokinmetabolismus und der Signaltransduktion gehören Multigenfamilien an (Kieber und Schaller, 2014). Einerseits kann so der Ausfall eines Genes kompensiert werden. So zeigen beispielsweise Einzelmutanten der *IPTs*, *LOGs*, *CKXs*, *AHKs*, *AHPs*, *B-Typ ARR*s oder *CRFs* kaum phänotypischen Veränderungen, sondern erst durch den Verlust mehrerer Mitglieder einer Genfamilie wird deren biologische Funktion sichtbar (Argyros et al., 2008; Bartrina et al., 2011; Higuchi et al., 2004; Hutchison et al., 2006; Ishida et al., 2008; Mason et al., 2005; Miyawaki et al., 2006; Nishimura et al., 2004; Raines et al., 2016; Rashotte et al., 2006; Riefler et al., 2006; Tokunaga et al., 2012; Yokoyama et al., 2007). Andererseits zeigen die Untersuchungen der Mutanten auch Spezialisierungen einzelner Mitglieder der Genfamilien, wodurch eine exakte Feinregulierung des Cytokininstatus angemessen auf den Entwicklungsstatus und auf Umwelteinflüsse ermöglicht wird (Bartrina, 2006; Bartrina et al., 2011; Carabelli et al., 2007; Higuchi et al., 2004; Mason et al., 2005; Miyawaki et al., 2006; Nishimura et al., 2004; Raines et al., 2016; Rashotte et al., 2006; Riefler et al., 2006; Tokunaga et al., 2012; Zwack et al., 2013). Neben der Redundanz der verschiedenen Mitglieder der Proteinfamilien existieren am Ende der Signaltransduktion zwei parallele Übertragungswege des Cytokininsignals von den AHPs auf die Transkriptionsfaktorfamilien der B-Typ ARRs sowie der CRFs, welche zum größten Teil die gleichen Antwortgene induzieren (Hwang und Sheen, 2001; Rashotte et al., 2006; Sakai et al., 2008). Allerdings deutet die starke Reduktion der Cytokinantwort in Mehrfachmutanten der *B-Typ ARR*-Gene auf eine zentrale Rolle dieser Gene bei der Weiterleitung des Signals hin (Argyros et al., 2008; Mason et al., 2005; Yokoyama et al., 2007). Die Expression der *CRF*-Gene wird im Gegensatz zu jener der *B-Typ ARR*-Gene durch Cytokinin verstärkt, wodurch dieser Cytokininsignalweg durch das Signal selbst positiv reguliert wird (Bhargava et al., 2013; Brenner et al., 2012).

Desweiteren werden Cytokininhomöostase und -sensitivität durch Rückkopplungshemmung kontrolliert. Die Expression der Cytokinbiosynthesegene *IPT1*, *IPT3*, *IPT5* und *IPT7* wird durch Cytokinin reprimiert (Miyawaki et al., 2004). Einige Metabolismusgene für die Inaktivierung von Cytokinin, z.B. *CKX4*, *CKX5* und *UGT76C2*, sowie die negativen Regulatoren der Signalkaskade, die *A-Typ ARR*s, gehören zu den Genen, deren Transkription durch Cytokinin hochreguliert wird (Bhargava et al., 2013; Brenner et al., 2012). Unabhängig von der Transkriptlevelerhöhung wurde nach Zugabe von Cytokinin eine erhöhte Stabilität einiger A-Typ ARRs beobachtet (To et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird die Stabilität des B-Typ ARR ARR2 in Antwort auf Cytokinin verringert, da die cytokinininduzierte Phosphorylierung des Proteins dessen Abbau durch das Proteasom steigert (Kim et al., 2012). Die Stabilität der meisten B-Typ ARRs wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System kontrolliert, jedoch cytokininunabhängig (Kim et al., 2013). Dieser Regulationsmechanismus ist abhängig von den KISS ME DEADLY (KMD) F-box-Proteinen, welche direkt mit den B-Typ ARRs interagieren (Kim et al., 2013). Es wird spekuliert, dass dieser Mechanismus zum einen die maximale Sensitivität der Pflanze gegenüber Cytokinin definiert und zum anderen daran beteiligt ist,

phosphorylierte B-Typ-ARRs abzubauen, um so die Spezifität des Cytokininsignals zu erhalten (Kim et al., 2013). Cytokinin bewirkt außerdem eine Erhöhung des Anteils der CKX-Enzyme mit Glycosylierung, welche einen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme zu spielen scheint (Franc et al., 2012; Motyka et al., 1996; Motyka et al., 2003). Darüber hinaus wird vermutet, dass Cytokinin die vermehrte Sekretion von CKX-Enzymen in den Extrazellularraum bewirkt, um das von den biosynthetisch aktiven Zellen ausgeschüttete Cytokinin zu inaktivieren (Motyka et al., 2003).

Zudem sind weitere Mechanismen bekannt, welche die Cytokininsignaltransduktion modulieren können, um die maximal mögliche Sensitivität der Pflanze gegenüber dem Hormon festzulegen. An mehreren Stellen während der Signaltransduktion existieren Kontrollmöglichkeiten durch kompetitive Hemmung. So werden beispielsweise die AHPs durch den Pseudophosphotransmitter AHP6 negativ reguliert und auch die Aktivität der B-Typ ARRs wird durch die A-Typ ARRs reduziert, unter anderem weil sie um die Phosphorylierung durch die AHPs konkurrieren (Kieber und Schaller, 2014). Außerdem wurde sowohl für die AHKs als auch für die B-Typ ARRs gezeigt, dass diese Homo- und Heterodimere mit anderen AHKs bzw. B-Typ ARRs bilden können, was vermutlich deren Aktivität beeinflusst (Dortay et al., 2006; Veerabagu et al., 2012).

Die Cytokininsignaltransduktion wird durch einige weitere Regulatoren moduliert. Neben den drei bereits erwähnten AHKs aktiviert auch die Histidinkinase CKI1 die Phosphorylierungskaskade, vor allem während der Entwicklung der weiblichen Gametophyten (Deng et al., 2010). CKI1 agiert jedoch cytokininunabhängig, da es Cytokinin weder bindet, noch durch das Hormon aktiviert wird (Deng et al., 2010). Während spezifischer Entwicklungsprozesse kann somit die Cytokininantwort vom Cytokininsignal entkoppelt werden. Darüber hinaus existiert eine weitere Klasse von Response-regulatoren, die C-Typ ARRs ARR22 und ARR24, welche wie A-Typ ARRs keine DNA-Bindedomäne besitzen, sich von diesen allerdings strukturell unterscheiden und transkriptionell auch nicht durch Cytokinin induziert werden (Kiba et al., 2004). Die Expression der Gene ist auf sehr kleine Domänen in sich entwickelnden Samen bzw. Pollen limitiert (Gattolin et al., 2006). Mindestens ARR22 kann *in vitro* durch AHP5 phosphoryliert werden (Kiba et al., 2004). Die ektopische Expression des Gens bewirkt eine verringerte Cytokininsensitivität sowie ein stark beeinträchtigt Wurzel- und Sprosswachstum, ähnlich der *AHK4 loss-of-function*-Mutante *wooden leg (wol)*, was vermuten lässt, dass die C-Typ ARRs die Cytokininantwort negativ regulieren (Kiba et al., 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass einige Mitglieder der TEOSINT BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR (TCP)-Transkriptionsfaktoren, die Sensitivität gegenüber Cytokinin modulieren können. Dabei wird die Cytokininsensitivität von einigen Mitgliedern der Genfamilie, wie *TCP14* und *TCP15*, verstärkt und von anderen, wie *TCP4*, reprimiert (Efroni et al., 2013; Steiner et al., 2012). Für *TCP4* wurde gezeigt, dass es an den Promotor von *ARR16* bindet und vermutlich durch die Erhöhung der Transkription dieses negativen Regulators der Cytokininsignaltransduktion die Cytokininvahrnehmung verringert (Efroni et al., 2013). Zudem interagieren einige AHPs direkt mit *TCP10*, was eine weitere Regulationsmöglichkeit der Phosphorylierungskaskade bietet (Suzuki et al., 2001b).

Darüber hinaus wurden weitere Regulationsmöglichkeiten aufgezeigt, wie die Cytokininantwort durch andere Stimuli beeinflusst und so an die entsprechenden Umweltbedingungen angepasst

werden kann. Die Biosynthese von Cytokinin wird beispielsweise durch die Nitratverfügbarkeit beeinflusst, da das *IPT3*-Transkriptlevel durch Nitrat erhöht wird (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004a). Interessanterweise wird die *IPT3*-Expression ebenso durch die Verfügbarkeit von Eisen, Phosphat und Sulfat moduliert, was eine Funktion von *IPT3* bei der Integration verschiedener Nährstoffsignale vermuten lässt (Hirose et al., 2008; Séguéla et al., 2008). Stickstoffmonoxid weist eine inhibierende Wirkung auf die Cytokininsensitivität auf (Feng et al., 2013). Diese wird durch einen konservierten Cysteinrest der AHPs ermöglicht, der durch Stickstoffmonoxid S-nitrosyliert werden kann, wodurch die Phosphorylierung und folglich die Aktivität der AHPs vermindert wird (Feng et al., 2013). Auch IPTs, CYP735A1, CYP735A2, CKXs, AHPs, A-Typ ARRr sowie CRFs sind Kreuzungspunkte verschiedener Signalwege, da sie nicht nur durch Cytokinin, sondern auch durch andere Faktoren wie z.B. Auxin, ABA oder Strigolactone reguliert werden (Bishopp et al., 2011a; Hoth et al., 2002; Miyawaki et al., 2004; Müller und Sheen, 2008; Palni et al., 1988; Schlereth et al., 2010; Takei et al., 2004b; Werner et al., 2006; Zhang et al., 1995)

1.2 Nicht-proteinkodierende Transkripte

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie, welches 1970 von James Crick aufgestellt wurde, besagt, dass die Erbinformation in der DNA über RNA-Zwischenprodukte in spezifische Proteine übersetzt werden (Crick, 1970). Lange Zeit wurde RNA lediglich als Intermediat bei der Proteinbiosynthese angesehen. Die in den letzten Jahren stetig steigenden Genom- und Transkriptomsequenzdaten stellen dies jedoch in Frage. Obwohl nur ein geringer Anteil eukaryontischer Genome für Proteine kodiert, wird dennoch der größte Teil in RNA umgeschrieben (Dinger et al., 2009). Beispielsweise werden mehr als 85 % des menschlichen Genoms transkribiert, jedoch kodieren lediglich 1,2 % der Genomsequenz für Proteine (Consortium, 2012; Hangauer et al., 2013). Aufgrund ihrer hohen Anzahl in der Zelle wurden strukturelle RNAs wie ribosomale RNAs (rRNAs) und tRNAs schon früh entdeckt und ihre Funktion während der Proteinbiosynthese umfassend analysiert (Moore und Steitz, 2011). Mit der Zeit wurden einige weitere Klassen nicht-kodierender RNAs (engl.: *non-coding RNAs*, ncRNAs) mit regulatorischen Funktionen entdeckt. Die Anzahl von ncRNAs variiert zwischen verschiedenen Organismen und es wird spekuliert, dass der Gehalt nicht-proteinkodierender Transkriptsequenzen im Genom mit der Komplexität des Organismus korreliert (Kapusta und Feschotte, 2014; Mattick, 2001; Mattick und Gagen, 2001).

Entsprechend ihrer Länge werden die regulatorischen ncRNAs in drei Gruppen unterteilt (Abbildung 5). Small RNAs (sRNAs) haben eine Länge von weniger als 50 Nukleotiden (nt) und umfassen in Pflanzen micro RNAs (miRNAs) und small interfering RNAs (siRNAs), welche beide eine wichtige Rolle bei der sequenzspezifischen, negativen Regulation der Genexpression spielen, sowie promoter-associated small RNAs (PASRs) und terminus-associated small RNAs (TASRs), welche von Regionen nahe der Transkriptionsstart- bzw. -endpunkte transkribiert werden (Singh et al., 2018; Yu et al., 2018). Medium ncRNA sind 50 bis 200 nt lang und umfassen in Pflanzen small cytoplasmic RNAs (scRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), welche in die Prozessierung der prä-mRNAs involviert sind und small nucleolar RNAs (snoRNAs), die eine Rolle bei der rRNA-Modifikation spielen (Alessio et al., 2020; Bhan und Mandal, 2014). Zu den langen ncRNAs (lncRNAs) zählen jene ncRNAs, deren Länge 200 nt übersteigt, was auch circular RNAs (circRNAs),

deren Transkriptenden durch *backsplicing* kovalent verbunden sind, mit einschließt (Alessio et al., 2020; Szabo und Salzman, 2016). Entsprechend der Position ihres Transkriptionsursprungs in Bezug auf andere Gene, werden die lincRNAs in verschiedene Gruppen eingeordnet (Abbildung 5). *Long intergenic ncRNAs* (lincRNAs) bilden eine funktionell heterogene Gruppe von Transkripten, welche außerhalb von Genen liegen und zu denen auch *promoter lincRNAs* zählen, die mit Promotoren funktioneller Gene überlappen (Ariel et al., 2015; Ransohoff et al., 2018). Diesen gegenüber stehen *genic lincRNAs*, welche mit funktionellen Genen überlappen und sich in *intronic lincRNAs*, welche komplett innerhalb eines Introns liegen, und *exonic lincRNAs*, welche in Exonbereichen liegen, einteilen lassen (Alessio et al., 2020; Louro et al., 2009). *Exonic lincRNAs* werden in *overlapping lincRNAs* und *long non-coding natural antisense transcripts* (lincNATs) unterschieden, je nachdem, ob ihre Transkriptionsrichtung identisch mit oder entgegengesetzt der Transkriptionsrichtung des funktionellen Gens ist (Alessio et al., 2020).

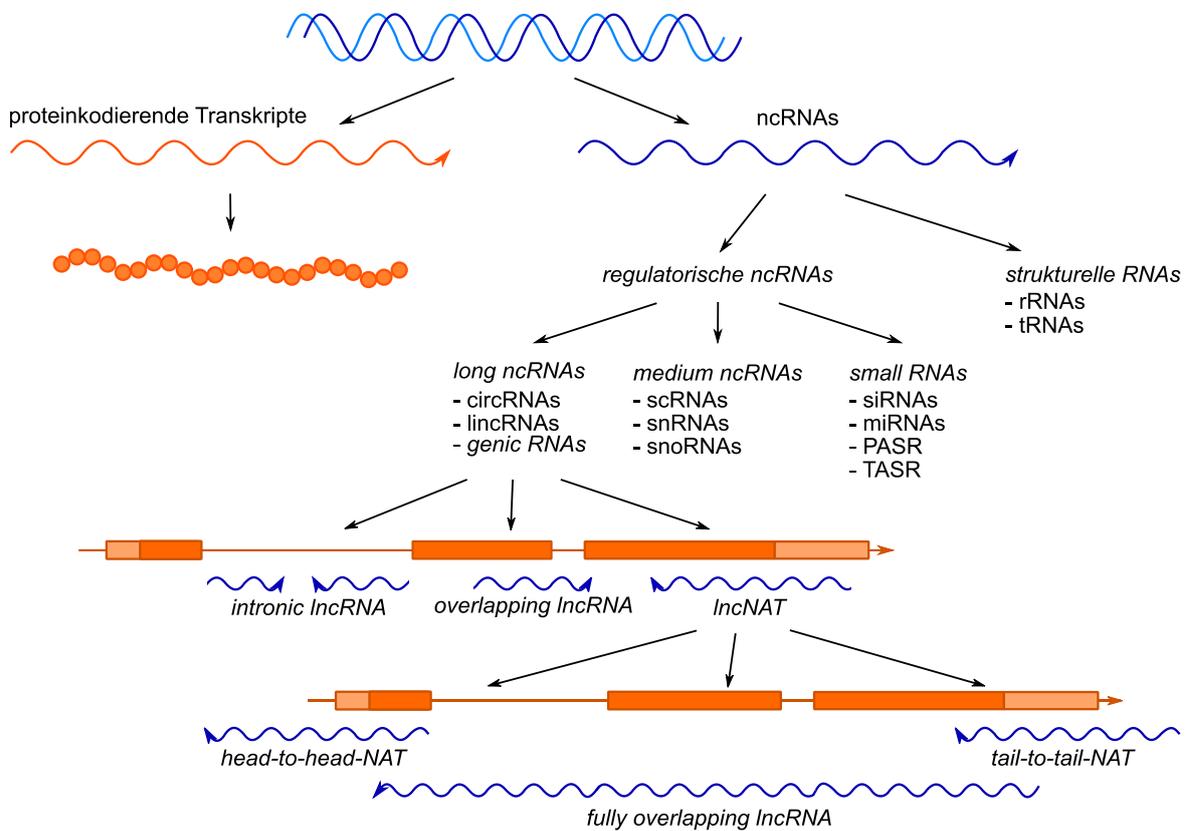


Abbildung 5: Klassifikation von Transkripten.

Von der DNA werden verschiedene Arten von RNAs transkribiert. Proteinkodierende Transkripte enthalten die Informationen zur Synthese von Polypeptidketten. Nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) kodieren nicht für Proteine und umfassen strukturelle RNAs sowie regulatorische ncRNAs. Letztere werden entsprechend ihrer Länge in *small*, *medium* und *long ncRNAs* eingeteilt. Je nach Funktion bzw. Position und Orientierung in Bezug auf funktionelle Gene werden die ncRNAs in verschiedene Klassen eingruppiert. circRNAs = *circular RNAs*, lincRNAs = *long intergenic RNAs*, miRNAs = *microRNAs*, PASR = *promoter-associated small RNAs*, rRNAs = ribosomale RNAs, scRNAs = *small cytoplasmic RNAs*, siRNAs = *small interfering RNAs*, snoRNAs = *small nucleolar RNAs*, snRNAs = *small nuclear RNAs*, TASR = *terminus-associated small RNAs*, tRNAs = Transfer-RNAs

1.2.1 Natürliche *Antisense*-Transkripte

Ein beträchtlicher Anteil eukaryontischer Transkripte ist mit mindestens einem natürlichen *Antisense*-Transkript (NAT) assoziiert. Im Menschen wie auch in *A. thaliana* wird für etwa 70 % aller Transkripte ein NAT vermutet (Katayama et al., 2005; Wang et al., 2006). Die häufigsten *Sense-Antisense*-Paare bestehen aus einer proteinkodierenden und einer ncRNA, jedoch wurden auch Paarungen aus zwei proteinkodierenden oder zwei nicht-kodierenden Transkripten beobachtet (Katayama et al., 2005; Wang et al., 2006). NATs können entweder teilweise oder komplett mit ihrem *Sense*-Partner überlappen und entsprechend ihres Überlapps werden sie in verschiedene Gruppen eingeordnet (Abbildung 5). *Head-to-head*-NATs überlappen im 5'-Bereich mit dem *Sense*-Transkript, wohingegen *tail-to-tail*-NATs im 3'-Bereich und *fully overlapping* NATs über den gesamten Bereich überlappen (Britto-Kido Sde et al., 2013). Weiterhin werden NATs nach der Lokalisation ihres Zielgens in *cis*- und *trans*-NATs klassifiziert (Rosikiewicz und Makalowska, 2016). *Cis*-NAT-Paare werden vom gleichen genomischen Locus transkribiert und besitzen typischerweise lange Sequenzbereiche mit perfekter Komplementarität. *Trans*-NATs werden von einem anderen Genomort transkribiert als ihr *Sense*-Partner und obwohl die Sequenzen von *trans*-NAT-Paaren in den überlappenden Bereichen meist nicht perfekt komplementär sind, ist die Sequenzhomologie groß genug für eine Doppelstrangbildung (Wang et al., 2006). Im Gegensatz zu *cis*-NATs, welche meist nur ein Gen regulieren, können *trans*-NATs häufig Paare mit mehreren verschiedenen Transkripten bilden (Wang et al., 2006).

In der Regel weisen lncNATs geringere Expressionslevel als ihre *Sense*-Partner auf, weshalb sie lange Zeit nicht als funktionelle RNAs, sondern als „*transcriptional noise*“ angesehen wurden (He et al., 2008; Ling et al., 2013; Struhl, 2007). In den vergangenen Jahren wurden jedoch immer mehr lncNATs funktionell charakterisiert und ihre molekularen Mechanismen aufgezeigt (Britto-Kido Sde et al., 2013; Wanowska et al., 2018).

1.2.1.1 Mechanismen zur Regulation der Genaktivität durch lncNATs

Funktionelle Untersuchungen von *Sense-Antisense*-Paaren zeigen, dass lncNATs die Expression ihrer *Sense*-Partner durch unterschiedliche Mechanismen regulieren können (Khorkova et al., 2014; Wanowska et al., 2018). Dafür bringen sie zwei äußerst hilfreiche strukturelle Eigenschaften mit. Zum einen besitzen sie komplementäre Sequenzabschnitte zum entsprechenden *Sense*-Transkript. Durch diese wird einerseits die Spezifität der regulatorischen Wirkung auf das Zielgen sichergestellt und andererseits die Interaktion mit der *Sense*-mRNA oder dem entsprechenden DNA-Strang durch die Duplexbildung ermöglicht. Zum anderen können sie Motive in der Nukleotidsequenz besitzen oder Sekundärstrukturen ausbilden, an denen regulatorische Proteine binden können. Der spezifische Funktionsmechanismus eines lncNAT ist maßgeblich von dessen subzellulärer Lokalisation abhängig. So sind beispielsweise lncNATs, welche die Chromatinmodifikationen oder das Spleißen beeinflussen, im Zellkern lokalisiert, wohingegen lncNATs, welche z.B. die Translation des *Sense*-Partners kontrollieren, im Cytoplasma zu finden sind (Alessio et al., 2020). Abbildung 6 zeigt eine Übersicht über einige Mechanismen, mit deren Hilfe lncNATs ihre *Sense*-Transkripte regulieren.

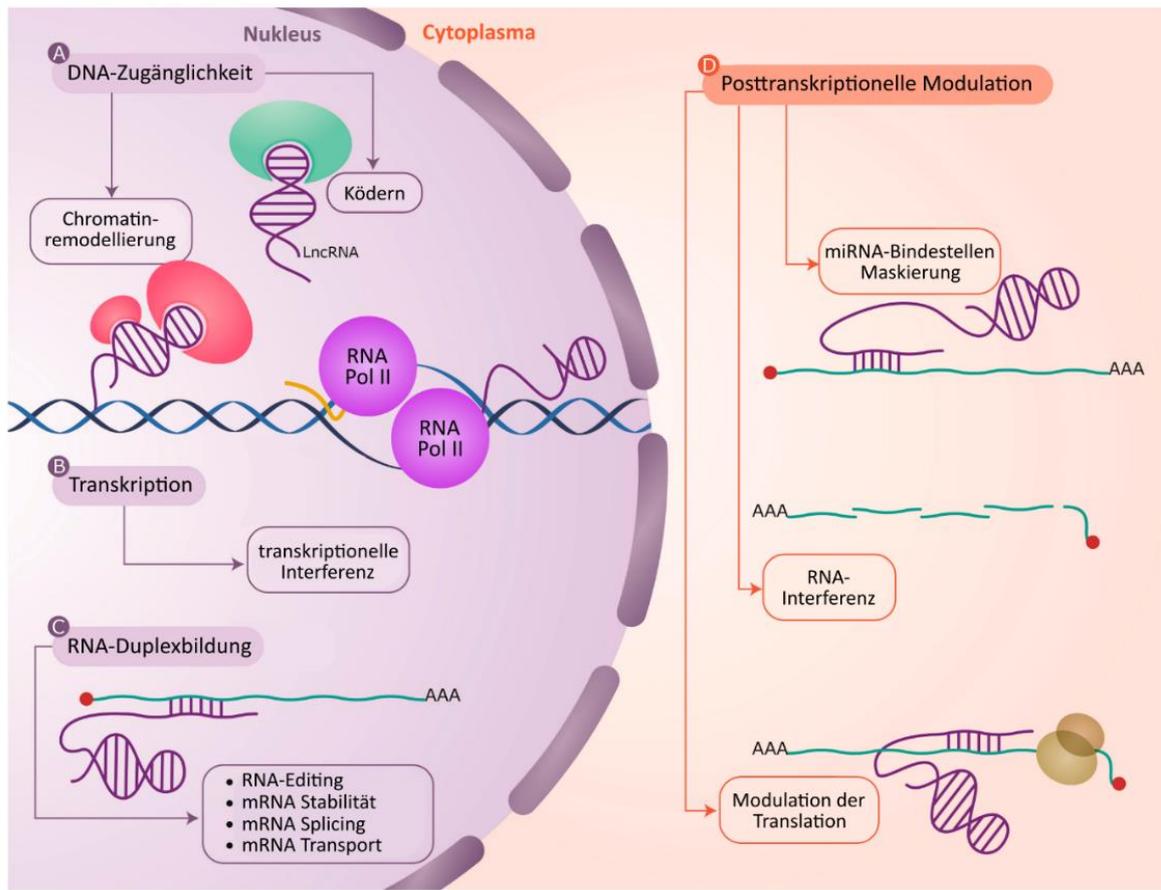


Abbildung 6: Regulationsmechanismen von lncRNAs.

lncRNAs können die Expression ihrer *Sense*-Transkripte mithilfe verschiedener Mechanismen im Zellkern und im Cytoplasma kontrollieren. Die Regulierung der DNA-Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase mittels Inhibierung oder Rekrutierung von chromatinmodifizierenden Enzymen wird die Transkriptionsstärke beeinflusst. Die Transkription selbst kann z.B durch transkriptionelle Interferenz beeinträchtigt werden. Die Bildung eines RNA-Duplex kann zum RNA-Editing oder der Maskierung von Sequenzmotiven der mRNA führen, wodurch Stabilität, Prozessierung und Transport des *Sense*-Partners beeinflusst werden kann. Im Cytoplasma kann die mRNA-Stabilität durch Maskierung von miRNA-Bindestellen oder durch RNA-Interferenz reguliert werden. Die Translation des *Sense*-Transkripts kann durch Rekrutierung oder Blockierung der Translationsmaschinerie positiv bzw. negativ beeinflusst werden. Abbildung modifiziert nach Villegas und Zaphiropoulos (2015).

1.2.1.1.1 lncRNAs im Zellkern

Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, wie lncRNAs die Genexpression ihrer Zielgene im Zellkern regulieren. Dazu gehören die Modulierung von Chromatinmodifikationen und DNA-Methylierung, die transkriptionelle Interferenz sowie die Kontrolle der mRNA-Prozessierung (Rosikiewicz und Makalowska, 2016).

Die Transkriptionsrate eines Gens wird maßgeblich von der Zugänglichkeit der DNA für RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren bestimmt, welche im Verlauf der Entwicklung und als Reaktion auf Umwelteinflüsse einer stetigen dynamischen Veränderung unterliegt (Klemm et al., 2019). Reguliert wird die Zugänglichkeit der DNA durch strukturelle Veränderungen, Modifikation und Translokation der aus DNA und Histonen bestehenden Untereinheiten des Chromatins, der Nucleosome, durch *chromatin remodeling complexes* (Saha et al., 2006). lncRNAs können eben

solche *chromatin remodeling complexes* rekrutieren, welche z.B. aktivierende oder reprimierende Histonmodifikationen verändern und so die Zugänglichkeit der DNA beeinflussen (Magistri et al., 2012). Das lncNAT *MAF4 ANTISENSE RNA (MAS)* aus *A. thaliana* reguliert beispielsweise die Expression seines Sense-Partners *MADS AFFECTING FLOWERING 4 (MAF4)*, einem *FLOWERING LOCUS C (FLC)*-Paralog und Regulator des Blühzeitpunktes, indem es die Chromatinmodifikationen am *MAF4*-Locus moduliert (Ratcliffe et al., 2003; Zhao et al., 2018). *MAS* interagiert physisch sowohl mit dem Chromatin am *MAF4*-Locus als auch mit *TRANSDUCIN/WD40 REPEAT-LIKE SUPERFAMILY PROTEIN (WDR5a)*, einem Bestandteil des *COMPASS-like complex*, welcher die transkriptionsaktivierenden Histon H3 Lysin-4-Trimethylierungen katalysiert (Jiang et al., 2011; Zhao et al., 2018). Durch eine langanhaltende Kälteperiode wird *MAS* induziert, rekrutiert *WDR5a* zum *MAF4*-Locus und sorgt damit für eine erhöhte Zugänglichkeit der DNA und folglich für eine gesteigerte Expression von *MAF4* (Zhao et al., 2018). Die lncRNA *LRK ANTISENSE INTERGENIC RNA (LAIR)* aus *O. sativa*, in dessen ersten Intron das *LEUCIN-RICH REPEAT RECEPTOR KINASE 1 (LRK1)*-Gen lokalisiert ist, wirkt als positiver Regulator der Transkription von *LRK1* sowie einiger weiterer Mitglieder des *LRK*-Genclusters (Wang et al., 2018). Indem *LAIR* an *OsWDR5* und an die Histon-Acetyltransferase *MALES ABSENT ON THE FIRST (OsMOF)* bindet und sie einerseits zum *LRK1*-Gencluster rekrutiert und ihnen andererseits als Gerüst dient, reguliert es die Modifikationen der Histone und wirkt damit als Transkriptionsaktivator einiger *LRK*-Gene und somit als positiver Regulator des Sprosswachstums und des Ertrags (Wang et al., 2018).

Einige lncNATs inhibieren ihren Sense-Partner allein durch die zeitgleiche Transkription beider DNA-Stränge, welche z.B. zu einer Kollision der RNA-Polymerasen führen kann und als transkriptionelle Interferenz bezeichnet wird (Rosikiewicz und Makalowska, 2016; Shearwin et al., 2005). Kürzlich wurde in *A. thaliana* gezeigt, dass die Transkription von *SVALKÄ (SVK)*, welche durch Kältebehandlung induziert wird, die Expression des gegensätzlich orientierten *C-REPEAT/DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1 (CBF1)* durch transkriptionelle Kollision inhibiert und somit die Kälteresistenz reduziert (Kindgren et al., 2018).

Es wird angenommen, dass alle Prozesse, welche eine Bindung zwischen mRNA und Protein bzw. Ribonukleoproteinkomplexen benötigen, durch die Bildung von RNA-Doppelsträngen mit lncNATs inhibiert werden können, wenn dadurch die entsprechenden Bindemotive der mRNA verdeckt werden (Lavorgna et al., 2004). Dieser Mechanismus wird RNA-Maskierung genannt und kann sowohl das Spleißen, die Polyadenylierung und das *capping* als auch den Transport von mRNAs beeinflussen. Beispielsweise wird das Spleißen des Transkripts von *ZINC-FINGER E-BOX-BINDING HOMEODOMAIN 2 (ZEB2)*, welches eine Rolle bei der Transformation von menschlichen Epithelzellen zu mesenchymatischen Zellen spielt, durch sein lncNAT *ZEB2 NAT* kontrolliert (Beltran et al., 2008). *ZEB2 NAT* überlappt mit dem 5'-Ende des im 5'-UTR lokalisierten Introns von *ZEB2* und verhindert dessen Spleißen. Da sich innerhalb dieses Introns eine interne ribosomale Eintrittsstelle befindet, wird durch den Erhalt des Introns die Translation von *ZEB2* ermöglicht und *ZEB2 NAT* wirkt somit als positiver Regulator der *ZEB2*-Expression.

Lange komplementäre RNA-Doppelstränge können einen Prozess auslösen, der als RNA-Editierung bekannt ist und eine Desaminierung von Adenin zu Inosin innerhalb der RNA-Sequenzen

beschreibt, welche unter anderem zu einem Abbau der doppelsträngigen RNA im Cytoplasma führen kann (Bass, 2002; Scadden und Smith, 2001). Das Gen SOMETHING-ABOUT-SILENCING 10 (*SAS10*) aus *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), welches nur 95 nt von dem entgegengesetzt orientierten Gen RNA-BINDING PROTEIN 4F (*RNP4F*) entfernt liegt, besitzt abhängig vom Entwicklungsstadium Isoformen mit verlängertem 3'-UTR (Peters et al., 2003). Diese überlappen mit dem 3'-Ende von *RNP4F* und es konnte beobachtet werden, dass in den überlappenden Bereichen eine Umwandlung von Adenin zu Inosin stattfindet und dass die Expressionslevel von *RNP4F* und den langen *SAS10*-Isoformen negativ korrelieren (Peters et al., 2003).

1.2.1.1.2 IncNATs im Cytoplasma

Viele IncNATs werden ins Cytoplasma transportiert, wo sie die Stabilität oder die Translation ihrer *Sense*-Partner regulieren (Faghihi und Wahlestedt, 2009).

Die Stabilität von mRNAs kann durch siRNAs oder miRNAs verringert werden und IncNATs können die Wirkung dieser sRNAs sowohl positiv und als auch negativ beeinflussen (Rosikiewicz und Makalowska, 2016). Zum einen können NAT-Paare, welche lange RNA-Doppelstränge bilden, als Substrate für RNA-Interferenz und somit zur Produktion von siRNAs dienen (Zinad et al., 2017). Das Cellulose Synthase-Gen *CES6A* aus *Hordeum vulgare* besitzt z.B. ein IncNAT, dessen Expression während der Blattentwicklung mit der Produktion von siRNAs des überlappenden Bereichs positiv, mit dem Transkriptlevel von *CES6A* jedoch negativ korreliert (Held et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass das NAT durch die Hybridisierung mit *CES6A* die Bildung von siRNAs verursacht, was zur Degradierung von *CES6A* führt. Zum anderen können IncNATs durch die Bindung an das *Sense*-Transkript miRNA-Bindestellen maskieren und so die Stabilität des *Sense*-Transkripts erhöhen. Die Stabilität der mRNA des menschlichen Gens β -SITE OF APP CLEAVING ENZYME 1 (*BACE1*), welches eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit spielt, wird beispielsweise durch sein IncNAT BACE1-ANTISENSE TRANSCRIPT (*BACE1-AS*) erhöht, indem dieses an das *BACE1*-Transkript bindet und so die Zielsequenz der miRNA miR-485-5p verdeckt (Faghihi et al., 2008).

LncRNAs können auch auf Ebene der Translation die Expression des Zielgens positiv oder negativ regulieren (Wight und Werner, 2013). In *O. sativa* wurde gezeigt, dass die Translation von PHOSPHATE 1;2 (*PHO1;2*), einem Protein, das in der Phosphathomöostase der Pflanze eine Rolle spielt, durch das *cis*-NAT *NAT_{PHO1;2}* positiv reguliert wird (Jabnour et al., 2013). Im Gegensatz zum Transkriptlevel von *PHO1;2* wird das Transkriptlevel von *NAT_{PHO1;2}* durch Phosphatmangel induziert und erhöht das *PHO1;2*-Proteinlevel, indem es die Assoziation der *PHO1;2*-mRNA an die Ribosomen steigert (Jabnour et al., 2013). *NAT_{PHO1;2}* fungiert so als stressspezifischer Regulator der Phosphathomöostase. Für das Gen UBIQUITIN CARBOXYTERMINAL HYDROLASE L1 (*UCHL1*) aus *Mus musculus* (*M. musculus*), welches in die Funktion und Degeneration des Nervensystems involviert ist, wurde der Mechanismus, mit dem das IncNAT ANTISENSE-UCHL1 (*AS-UCHL1*) die Translation fördert, aufgeklärt (Carrieri et al., 2012; Setsuie und Wada, 2007). Das 5'-Ende von *AS-UCHL1* bindet an das komplementäre 5'-Ende des *Uchl1*-Transkripts. Das 3'-Ende von *AS-UCHL1* beinhaltet eine inverse Sequenz des short interspersed nuclear element (SINE) B2-Retroelements, welche die Rekrutierung von aktiven Ribosomen an das *Sense-Antisense*-

Hybridmolekül und folglich die Translationsrate von UCHL1 positiv beeinflusst (Carrieri et al., 2012). LncNATs, welche diese beiden Eigenschaften, einen *head-to-head*-überlappenden Bereich mit dem *Sense*-Partner und eine inverse SINE-Sequenz im 3'-Bereich, besitzen und so genspezifisch die Translation verstärken können, werden als *SINE element-containing translation UP-regulators* (SINEUPs) bezeichnet und kommen an diversen Genloci in Säugetieren vor (Carrieri et al., 2012; Schein et al., 2016; Zucchelli et al., 2015). Für das *2-OXOGLUTARAT AND FE(II)-DEPENDENT OXYGENASE SUPERFAMILY PROTEIN-Gen 2A6 (At1g03410)* aus *A. thaliana* wurde ein *head-to-head*-NAT identifiziert, welches die Translation seines *Sense*-Partners positiv reguliert und interessanterweise ein *Sadhu*-Retroelement enthält, welches den SINE-Retroelementen strukturell ähnelt (Deforges et al., 2019; Rangwala und Richards, 2010). Eine Inhibition der Translation durch lncNATs wurde z.B. für den Transkriptionsfaktor PU.1, welcher eine wichtige Rolle bei der Blutbildung spielt, gezeigt (Ebralidze et al., 2008; Tenen, 2003). Das *tail-to-tail*-NAT von *PU.1*, bindet physisch an den Elongationsfaktor *EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA* (eEF1A) und verhindert so nach der Translationsinitiation die Formierung des Translationselongationskomplexes und folglich die Expression von PU.1 (Ebralidze et al., 2008).

1.2.1.2 Biologische Relevanz von lncNATs in Pflanzen

Obwohl die Mechanismen und biologischen Funktionen von lncNATs in tierischen Systemen stärker untersucht wurden, als in Pflanzen, konnten auch für letzere verschiedene Wachstums- und Entwicklungsprozesse der vegetativen und reproduktiven Phase sowie Reaktionen auf abiotische und biotische Umwelteinflüsse identifiziert werden, welche durch lncNATs reguliert werden (Britto-Kido Sde et al., 2013; Rai et al., 2019; Rosikiewicz und Makalowska, 2016).

Die Blattmorphologie von *O. sativa* wird durch das lncNAT *TWISTED LEAF (TL)* beeinflusst, welches durch Modulation von Chromatinmodifikationen die Expression seines *Sense*-Partners, des Transkriptionsfaktors *MYB DOMAIN PROTEIN 60 (OsMYB60)*, inhibiert (Liu et al., 2018b). Pflanzen mit reduziertem *TL*-Transkriptlevel weisen eine veränderte Form und Anordnung bulliformer Zellen auf, was eine Drehung der Blätter zur Folge hat (Liu et al., 2018b).

Für den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase spielen verschiedene interne sowie externe Signale eine wichtige Rolle (Conti, 2017). Ein Mediator des Blühbeginns ist *FLC* (Conti, 2017). Das epigenetische *Silencing* von *FLC* während der Vernalisation wird unter anderem durch das Zusammenspiel von dessen lncNAT *COOLAIR* und der *intronic* lncRNA *COLD AIR* kontrolliert, welche beide durch Kälte induziert werden und Veränderungen des Chromatinstatus am *FLC*-Locus hervorrufen können (Crevillen et al., 2014; Csorba et al., 2014; Heo und Sung, 2011; Liu et al., 2010). Auch die Expression des Blühzeitregulators *MAF4* wird durch sein lncNAT *MAS* durch die Veränderung von Histonmodifikationen reguliert (Zhao et al., 2018). Die photoperiodische Blühinduktion stimmt den Blühbeginn auf die Tageslänge ab und wird unter anderem durch die *CYCLING DOF FACTORS* (CDFs) reguliert (Conti, 2017). *CDF5* besitzt ein lncNAT, *FLORE*, welches verglichen mit *CDF5* ein antiphasisches, circadianes Expressionsmuster aufweist (Henriques et al., 2017). Beide Gene inhibieren sich gegenseitig auf Transkriptlevelbene, was vermutlich eine gegenseitige Feinregulierung ihrer circadianen Oszillation und folglich der tageslängenabhängigen Blühinduktion ermöglicht (Henriques et al., 2017).

Während der reproduktiven Entwicklung von *O. sativa* besitzt das lncNAT *LAIR* einen positiven Effekt auf den Ertrag (Wang et al., 2018). Durch die Modulierung der Chromatinmodifikationen aktiviert das lncNAT die Transkription seines *Sense*-Partners *LRK1*, was sowohl eine höhere Anzahl von Rispen pro Pflanze als auch mehr Reiskörner pro Rispe verursacht (Wang et al., 2018). Die Bedeutung eines NAT-Paares während der Entwicklung des weiblichen Gametophyten konnte in *A. thaliana* beobachtet werden. *HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR B2A (HSFB2A)* und sein lncNAT *asHSFB2A* werden im weiblichen Gametophyt exprimiert und sind für dessen normale Entwicklung essentiell (Wunderlich et al., 2014). Mutantanalysen zeigen, dass beide Transkripte die Expression des jeweils anderen inhibieren und der Verlust des *Sense*- oder des *Antisense*-Partners zu Defekten während der Entwicklung der weiblichen Gametophyten führt (Wunderlich et al., 2014).

Verschiedene Studien weisen direkt oder indirekt auf die Beteiligung von lncNATs an der Reaktion auf Umwelteinflüsse wie Licht, Nährstoffversorgung, Kälte, Salzstress und Pathogene hin. Genomweite Expressionsanalysen von NAT-Paaren etiolierter Keimlinge nach ein- bzw. sechsständiger Belichtung zeigen, dass die Expression von 626 bzw. 766 NAT-Paaren in Reaktion auf Licht positiv bzw. negativ korrelieren (Wang et al., 2014a). Für das *trans*-lncNAT *HIDDEN TREASURE 1 (HID1)* wurde eine Funktion für die Photomorphogenese nachgewiesen. Durch die physische Chromatininteraktion im Bereich des ersten Introns von *PIF3*, einem Repressor der Photomorphogenese im Rotlicht, reprimiert *HID1* die Expression von *PIF3* und fördert so die Photomorphogenese im Rotlicht (Wang et al., 2014b). Neben den lncNATs *NAT_{PHO1,2}*, das in die Phosphat-homöostase von *O. sativa* involviert ist und *SVALKKA*, das die Kältetoleranz von *A. thaliana* reguliert, wurde auch *NON-PROTEIN CODING RNA 536 (NPC536)*, dem *head-to-head* NAT des bislang nicht charakterisierten Gens *AT1g67920* eine biologische Relevanz bei der Reaktion auf abiotischen Stress zugeschrieben (Ben Amor et al., 2009). Die Expression von *NPC536* wird durch Salzstress erhöht und seine ektopische Expression führt zu einem verstärkten Wurzelwachstum unter Salzstressbedingungen (Ben Amor et al., 2009). Eine Transkriptomanalyse von *A. thaliana*-Pflanzen nach einer Infektion mit *Fusarium oxysporum* weist auf eine Bedeutung von lncNATs in der Pathogenantwort hin. An diversen Genloci, welche mit der pflanzlichen Abwehr assoziiert sind, wurden lncNATs identifiziert, deren Transkriptlevel durch die Infektion verändert wurden und es wird vermutet, dass diese eine regulatorische Wirkung auf die entsprechenden *Sense*-Transkripte besitzen und eine Rolle bei der Pathogenantwort spielen (Zhu et al., 2014).

1.2.2 Evolutionäre Konservierung von lncRNAs

Neben der direkten Identifikation einer biologischen Funktion durch experimentelle Daten ist die Konservierung von genetischen Elementen über einen evolutionär gesehen langen Zeitraum das wichtigste Argument für dessen funktionelle Relevanz.

Im Allgemeinen ist die Nukleotidsequenz von lncNATs und anderen lncRNAs evolutionär nur schwach konserviert (Engström et al., 2006; Wood et al., 2013). Dennoch zeigt ein beträchtlicher Anteil der lncRNAs in Säugetieren eine sichtbare, wenn auch verglichen mit proteinkodierenden Transkripten deutlich geringere Konservierung der Primärsequenz (Chernikova et al., 2016; Guttman et al., 2009; Marques und Ponting, 2009; Ponjavic et al., 2007). Insbesondere die Position von Exon-

Intron-Grenzen und die Promotorsequenz von lncRNAs unterliegen einem stärkeren Selektionsdruck, als es für neutrale, nicht-transkribierte Sequenzbereiche zu beobachten ist (Derrien et al., 2012; Guttman et al., 2009; Ponjavic et al., 2007). Ein Großteil von lncNATs ohne konservierte Primärsequenz ist auf Ebene der Sekundärstruktur, d.h. der dreidimensionalen Faltung des RNA-Strangs, konserviert (Torarinsson et al., 2006; Washietl et al., 2005).

Auch die Konservierung spezifischer Expressionsmuster weist auf eine Funktionalität von Transkripten hin. Ein Vergleich der Spezies *Homo sapiens* (*H. sapiens*) und *Pan troglodytes* zeigt eine Konservierung der gewebespezifischen Expression von lncRNAs vergleichbar mit der proteinkodierender Gene (Khaitovich et al., 2006). Die gewebespezifische Expression der lncNATs von *H. sapiens*, *M. musculus* und *Rattus norvegicus* zeigt ebenfalls eine signifikante Konservierung, wenngleich sie geringer war, als jene proteinkodierender Gene (Ling et al., 2013).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die genomische Struktur, also die Anordnung von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten zueinander, sowohl bei NAT-Paaren aus einem proteinkodierenden und einem nicht-kodierenden Transkript als auch bei NAT-Paaren aus zwei proteinkodierenden Transkripten zwischen verschiedenen Vertebratenspezies konserviert ist (Dahary et al., 2005; Wood et al., 2013; Zhang et al., 2006).

In Pflanzen wurden bislang keine umfassenden Untersuchungen zur Analyse der Konservierung von lncNATs durchgeführt, jedoch zeigten verschiedene genomweite Studien mit lncRNAs aus bis zu 39 Pflanzenspezies, dass die Nukleotidsequenzen von lncRNAs innerhalb einer Art zwischen verschiedenen Ökotypen oder Populationen ähnlich hoch ist, wie jene proteinkodierender Transkripte, lncRNAs verschiedener Spezies jedoch nur eine geringe Konservierung der Primärsequenzen, dafür aber eine Konservierung der genomischen Struktur aufweisen (Corona-Gomez et al., 2020; Deng et al., 2018; Ma et al., 2019; Mohammadin et al., 2015; Wang et al., 2019a; Wang et al., 2015). Eine vergleichende Studie von lncNATs von *O. sativa* und *Z. mays* identifizierte eine Gruppe von Genen, an deren Loci die Existenz von lncNATs konserviert ist und einige dieser Gene besitzen auch in *A. thaliana* ein lncNAT (Wang et al., 2015).

Einzelne Beispiele funktionell charakterisierter lncNATs zeigen eine Konservierung der Struktur und Funktion in verschiedenen Pflanzenspezies. Die Funktion des lncNAT *COOLAIR*, kälteabhängig die Expression seines *Sense*-Transkriptes zu supprimieren, ist zwischen Dikotyledonen wie *A. thaliana* und Monocotyledonen wie *Brachypodium distachyon* konserviert (Jiao et al., 2019). Die *COOLAIR*-Orthologe von verschiedenen *Arabidopsis*-Spezies und von *B. rapa* besitzen trotz geringer Sequenzhomologie eine hochkonservierte Sekundärstruktur und kovariante Basenpaarungen in doppelsträngigen Bereichen sowie eine höhere Variation in einzelsträngigen Bereichen der Transkripte untermauert die Hypothese, dass die Sekundärstruktur einem hohen Selektionsdruck unterliegt (Hawkes et al., 2016). *HID1*, das *trans*-NAT des Photomorphogeneseinhibitors *PIF3*, ist sowohl auf Ebene der Primärstruktur als auch auf Ebene der Sekundärstruktur in diversen Pflanzenspezies von *P. patens* bis *A. thaliana* hochkonserviert (Wang et al., 2014b). Die phänotypische Komplementation einer *A. thaliana hid1 loss-of-function*-Mutante durch das *O. sativa*-Ortholog *OshID1* verdeutlicht zudem, dass *HID1* in verschiedenen Spezies die gleiche Funktion übernimmt (Wang et al., 2014b).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die pflanzliche Cytokininkonzentration wird streng kontrolliert, unter anderem durch den irreversiblen Abbau durch CKX-Enzyme. Die Expression und Aktivität der CKX-Enzyme wird präzise reguliert und einige der Kontrollmechanismen wurden bereits detailliert untersucht. Ein Mechanismus, der in Bezug auf die *CKX*-Gene bislang nicht untersucht wurde, ist die Regulation ihrer Expression durch lncNATs. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Existenz von lncNATs an den *CKX*-Loci der Modellpflanze *A. thaliana* zu untersuchen und diese gegebenenfalls strukturell und funktionell zu charakterisieren. Dafür sollten folgende Fragestellungen verfolgt werden:

1. Finden sich *in silico* Hinweise auf das Vorkommen von NATs an den *CKX*-Loci? Können diese experimentell bestätigt werden?
2. Wo befinden sich die Transkriptionsstartpositionen und -terminationspositionen? Besitzen die Transkripte eine 5'-Cap und einen Poly-A-Schwanz als Hinweise auf eine aktive Transkription? Werden die Transkripte gespleißt? Handelt es sich um proteinkodierende oder nicht-kodierende NATs?
3. Regulieren die NATs die Expression ihres *Sense*-Partners und über welchen Mechanismus findet eine solche Regulation gegebenenfalls statt? Korrelieren die Transkriptlevel von *CKX-NATs* mit den entsprechenden *CKXs* in Bezug auf die gewebespezifische Expression oder in Reaktion auf externe Stimuli? Ist in Mutanten mit verändertem *CKX-NAT*-Level das Transkript- oder Proteinlevel des entsprechenden *CKX* verändert? Wo sind die *CKX-NATs* subzellulär lokalisiert?
4. In welchen biologischen Prozessen spielen die *CKX-NATs* eine Rolle? In welchen Geweben werden *CKX-NATs* exprimiert? Welche Stimuli beeinflussen das *CKX-NAT*-Level?
5. Sind die *CKX-NATs* evolutionär konserviert? Existieren NATs an *CKX*-Loci verschiedener Spezies unterschiedlicher Taxa? Sind die Nukleotidsequenzen, Spleißgrenzen oder andere strukturelle Merkmale homologer *CKX-NATs* konserviert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande) und Rapidozym (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Chemikalien für Kultivierungsmedien wurden von den Firmen Becton, Dickinson und Company (Sparks, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Enzyme.

Enzym	Firma	Verwendung
<i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierung
<i>Bgl</i> II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	molekulare Analyse von <i>35S:CKX1-NAT</i>
DNAseI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	DNA-Verdau isolierter RNA
FastAP alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierung
Immolase™ DNA-Polymerase	Bioline, London, UK	qPCR
<i>Nhe</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierung
<i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierung
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Plasmidisolierung
RNaseOUT™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Analyse der 5'-Cap-Struktur
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Gesamt-cDNA-Synthese
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (hauseigen)	AG Schuster (Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin)	Genotypisierung, semiquantitative PCR, Kolonie-PCR
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (kommerziell)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Strangspezifische semiquantitative PCR
Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease	Lucigen, Middleton, USA	Analyse der 5'-Cap-Struktur
ThermoScript™ Reverse Transcriptase	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	Strangspezifische cDNA-Synthese
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Ligation
<i>Xba</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierung

2.1.2 Analysesets (Kits)

In Tabelle 2 sind die verwendeten Analysesets aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Kits.

Kit	Firma	Verwendung
CloneJet™ PCR-Klonierungskit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierung von RACE-PCR-Produkten
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Duren, Deutschland	Aufreinigung von DNA aus Agarosegel oder enzymhaltigem Reaktionsansatz
NucleoSpin Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel, Duren, Deutschland	Plasmidisolierung
NucleoSpin RNA Plant	Macherey-Nagel, Duren, Deutschland	RNA-Extraktion
SMARTer® RACE	Takara Bio, Kusatsu, Japan	RACE-Analyse

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang, Tabelle 25 aufgelistet.

2.1.4 Plasmide

Die verwendeten Ausgangsplasmide für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Ausgangsplasmide.

Vektor	Selektionsmarker in Bakterien	Selektionsmarker in Pflanzen	Referenz
<i>pCB308</i>	Kan ^R	Kan ^R	Xiang et al. (1999)
<i>pJET1.2</i>	Amp ^R	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>35S:CKX1-NAT pBIN-Bar</i>	Kan ^R	Basta ^R	Grenz (2016)

2.1.5 Nährmedien und Zusätze

Die für die Kultivierung von Bakterien und Pflanzen verwendeten Nährmedien und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 4 aufgelistet. Alle Nährmedien wurden nach ihrer Herstellung 15 min bei 120 °C autoklaviert. Gegebenenfalls wurden Antibiotika oder das synthetische Cytokinin BA nach dem Abkühlen des Mediums hinzugegeben. Antibiotika wurden zunächst als 1000X-Stammlösung in zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert oder im Fall von Hygromycin B als kommerzielle Stammlösung bei 4 °C gelagert. Die finalen Konzentrationen der zur Selektion genutzten Antibiotika im Nährmedium sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Nährmedien.

	Medium	Zusammensetzung
Bakterien	LB-Medium (Bertani, 1951)	1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, pH 7.0 (eingestellt mit NaOH); für Festmedien: 1,5 % (w/v) Agar
	SOB-Medium (Hanahan, 1983)	2,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7.4 (eingestellt mit NaOH); Zugabe von 10 mM MgCl ₂ und 10 mM MgSO ₄ nach dem Autoklavieren
	SOC-Medium (Hanahan, 1983)	2,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7.4 (eingestellt mit NaOH); Zugabe von 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ und 20 mM Glucose nach dem Autoklavieren
	YEB-Medium (Vervliet et al., 1975)	0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 2 mM MgSO ₄ , pH 7.2 (eingestellt mit NaOH)
Pflanzen	½ MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)	0,215 % (w/v) MS-Salze, 0,05 % (w/v) MES, 0,1 % (w/v) Saccharose, pH 5.7 (eingestellt mit KOH); für Festmedien: 0,7 % (w/v) Agar bzw. 1,0 % (w/v) Phytigel TM

Tabelle 5: Verwendete Zusätze zur *in vitro*-Selektion.

	Zusatz	Finale Konzentration
Bakterien	Carbenicillin	50 µg/ml
	Gentamycin	25 µg/ml
	Kanamycin	50 µg/ml
	Rifampicin	50 µg/ml
Pflanzen	Hygromycin B	15 µg/ml
	Kanamycin	50 µg/ml
	Phosphinothricin (PPT)	10 µg/ml

2.1.6 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme.

Spezies/Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻,m_k⁺</i>) <i>supE44 thi-1 λ-gyrA96</i> (<i>Nal^r</i>) <i>relA1 D(lacZYA-argF)</i> U169.	Hanahan (1983)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMMP90	Rif ^R , Gent ^R	(Koncz und Schell, 1986)

2.1.7 Pflanzenlinien

Alle Experimente wurden mit *A. thaliana* Ökotyp Columbia-0 durchgeführt. Die verwendeten T-DNA-Insertionslinien des Salk-Instituts (Alonso et al., 2003), aus der GABI-Kat-Kollektion (Kleinboelting et al., 2012) bzw. aus der SLAT-Mutantenkollektion des John Innes Centre (Tissier et al., 1999) wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) (Scholl et al., 2000) bezogen. Eine Auflistung der verwendeten T-DNA-Insertionslinien ist im Anhang, Tabelle 24 zu finden.

2.1.8 Verwendete Datenbanken

Die Datenbanken, welche im Rahmen dieser Arbeit als Informationsquellen herangezogen wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Datenbanken.

Datenbank	Referenz	Link
Araport11	Cheng et al. (2017)	https://www.araport.org
eFP-Browser 2.0	Winter et al. (2007)	http://bar.utoronto.ca/efp2
Ensembl Genomes	Kersey et al. (2017)	ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-42/plants/
GenBank	Benson et al. (2013)	
International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)	Cochrane et al. (2011)	http://www.insdc.org
KEGG Orthology	Kanehisa et al. (2016)	https://www.genome.jp/kegg/ko.html
MiRBase	Griffiths-Jones et al. (2006)	http://www.mirbase.org/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	NCBI Resource Coordinators (2016)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Protein Information Ressource (PIR)	Wu et al. (2003)	http://pir.georgetown.edu
Protein Research Foundation (PRF)	Peptide Institute	https://www.prf.or.jp/aboutdb-e.html
PubMed	Fiorini et al. (2017)	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
RCSB Protein Data Bank	Berman et al. (2000)	https://www.rcsb.org
RefSeq	O'Leary et al. (2016)	
Sequence Read Archive (SRA)	Leinonen et al. (2011)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra
snoRNA Orthological Gene Database (snOPY)	Yoshihama et al. (2013)	http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp/
SWISS-PROT	Bairoch und Apweiler (2000)	https://www.ebi.ac.uk/uniprot/
TAIR10	Lamesch et al. (2012)	https://www.arabidopsis.org/

2.1.9 Verwendete Programme

In Tabelle 8 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Programme aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Software.

Programm	Referenz/ Hersteller	Link für webbasierte Anwendung	Verwendung
AxioVision 4.6	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland		Digitalfotografie am Lichtmikroskop
BLASTn	Zhang et al. (2000)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome	Suche homologer Transkriptsequenzen
BLASTp	Altschul et al. (1997), Altschul et al. (2005)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome	Suche homologer Proteinsequenzen
CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA		Lauf und Analyse von qPCR-Reaktionen
Chromas Lite 2.1	Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australien		Prüfung der Sequenzierungsqualität
Cutadapt	Martin (2011)		Adapterentfernung und Trimmen von RNA-Seq reads
EndNote	Thomson Reuters, Toronto, Kanada		Literatur- und Quellenverwaltung
EvoView	Subramanian et al. (2019)	https://www.evolgenius.info/evolview/	grafische Darstellung der Phylogenie von Genen
FastQC	Andrews et al. (2020)		Qualitätsprüfung von RNA-Seq reads
Gbrowse 2	Stein et al. (2002)	https://gbrowse.arabidopsis.org/cgi-bin/gb2/gbrowse/arabidopsis/	Visualisierung von Transkriptstrukturen
GeneCapture 7.12	VWR, Radnor, USA		Geldokumentation
Genevestigator	Nebion AG, Zürich, Schweiz		<i>in silico</i> -Transkriptlevelanalyse
ImageJ	Abràmoff et al. (2004)		Primärwurzellängenmessung, Bestimmung von Agarosegelbandenintensitäten
Inkscape	Das Inkscape-Projekt		Erstellung von Abbildungen und Grafiken
JBrowse	Skinner und Holmes (2010)	https://apps.araport.org/jbrowse/	Visualisierung von Transkriptstrukturen
IncLocator	Cao et al. (2018)	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/IncLocator/	Analyse der subzellulären Lokalisation von Transkripten
Locate-R	Ahmad et al. (2020)	http://locate-r.azurewebsites.net/	Analyse der subzellulären Lokalisation von Transkripten
MAFFT	Katoh et al. (2017)	https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/	paarweises Transkriptsequenzalignment
NCBI Graphical Sequence Viewer 3.37.4	NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/	Visualisierung von Transkriptstrukturen und Spleißgrenzen
NetPrimer	PREMIER Biosoft, Palo Alto, USA	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/	Prüfung der Primerqualität

MATERIAL & METHODEN

Olympus cellSens	Olympus Life Science, Waltham, USA		Digitalfotografie am Stereomikroskop
PhyML mit Smart Model Selection	Guindon et al. (2010), Lefort et al. (2017)	http://www.atgc-montpellier.fr/phyml-sms/	Analyse der Phylogenie von Genen
PrimerBlast	Ye et al. (2012)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Primerdesign
psRNATarget	Dai et al. (2018)	plantgrn.noble.org/psRNATarget/	Identifikation möglicher miRNA-Zielsequenzen
qPCR Efficiency Calculator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html	Etablierung von qPCR-Assays
R 3.5.3	R Core Team		Statistische Analysen, Datenmanagement, Erstellung von Diagrammen
RStudio 1.2.1335	RStudio, Inc., Boston, USA		grafische Benutzeroberfläche für R
SAMtools	Li et al. (2009)		Lesen, Sortieren und Erstellung des Index einer BAM-Datei
SnapGene	Insightful Science, San Diego, USA		Erstellung von Vektorkarten
STAR 2.4.2a	Dobin et al. (2013)		<i>Mapping</i> von RNA-Seq <i>reads</i> auf ein Referenzgenom
Translate	ExPASy Bioinformatics Ressource Portal	https://web.expasy.org/translate/	Identifikation von ORFs
TrimAl	Capella-Gutiérrez et al. (2009)		Säuberung von Proteinsequenzalignments
T-Coffee Accurate	Notredame et al. (2000)	tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:accurate	multiple Alignment von Proteinsequenzen
Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA		Verfassen der Dissertation

2.2 Methoden

Einige der verwendeten Methoden wurden wie in meiner Masterarbeit beschrieben durchgeführt (Engelmann, 2013). Einige Textpassagen zur Beschreibung der Methoden wurden dieser Masterarbeit entnommen, ohne dass jeder Einzelfall gesondert gekennzeichnet wurde.

2.2.1 Arbeiten mit Mikroorganismen

2.2.1.1 Kultivierung und Selektion von Mikroorganismen

Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte auf festem bzw. geschüttelt in flüssigem LB-Medium (Tabelle 4) über Nacht bei 37 °C. Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte auf festem bzw. geschüttelt in flüssigem LB- oder YEB-Medium (Tabelle 4) ein bis drei Tage bei 28 °C. Zur Selektion der Bakterien wurde das Wachstumsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Tabelle 5).

Zur Lagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Dafür wurden 500 µl einer frischen Übernachtskultur mit 500 µl Glycerin (70 % [v/v]) durch Vortexen vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Aus einer Glycerin-Dauerkultur (Kapitel 2.2.1.1) von *E. coli* DH5α wurde eine 5 ml-Übernachtskultur (LB-Medium, Tabelle 4) angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml der Vorkultur inokuliert. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C im Schikanekolben schüttelnd bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) von 0,45 bis 0,55 angezogen und 20 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Punkt wurde ausschließlich mit vorgekühlten Materialien und Reagenzien gearbeitet. Die Zellen wurden 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde zweimal mit jeweils 40 ml eiskaltem ddH₂O gewaschen und 5 min bei 3000 g sowie 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 20 ml eiskaltem Glycerin (70 % [v/v]) gewaschen und 5 min bei 3000 g sowie 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 2 ml eiskaltem Glycerin (10 % [v/v]) resuspendiert, in Volumina von 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die elektrokompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

Die Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde analog zu jener von *E. coli*-Zellen durchgeführt, lediglich die Anzucht der Vorkultur erfolgte bei 28 °C und die Anzucht der Hauptkultur erfolgte in YEB-Medium (Tabelle 4) bei 28 °C.

Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde entsprechend dem Protokoll von Inoue et al. (1990) durchgeführt. Aus einer Glycerin-Dauerkultur (Kapitel 2.2.1.1) von *E. coli* DH5α wurde eine 5 ml-Übernachtskultur (LB-Medium, Tabelle 4) angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 200 ml SOB-Medium (Tabelle 4) wurden mit 2 ml der Vorkultur inokuliert. Diese Hauptkultur wurde im Schikanekolben schüttelnd bei 28 °C bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,5 angezogen und 20 min

auf Eis inkubiert. Ab diesem Punkt wurde (mit Ausnahme von DMSO) ausschließlich mit vorgekühlten Materialien und Reagenzien gearbeitet. Die Zellen wurden 20 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde vorsichtig in jeweils 4 ml sterilfiltriertem TP-Puffer (10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂; pH 6.7 [eingestellt mit KOH]) resuspendiert. Anschließend wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) hinzugefügt und durch Schwenken vermischt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in Volumina von 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die chemokompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Transformation elektrokompenter Bakterienzellen

Elektrokompente Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut. 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig vermischt, 1 min auf Eis inkubiert und in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Die Plasmidaufnahme erfolgte durch Elektroporation der Zellen bei 1,8 kV für 3 bis 5 ms, wonach sofort 1 ml SOC-Medium (Tabelle 4) zugegeben wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C 45 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf antibiotikahaltigem LB-Festmedium (Tabelle 4 und Tabelle 5) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Durchführung der Transformation von *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte analog zu jener von *E. coli*, wobei die Elektroporation bei 2,4 kV für 3 bis 5 ms, die anschließende Inkubation für 2 h bei 28 °C und die Inkubation der ausplattierten Bakterien für 2 bis 3 Tage bei 28 °C erfolgte.

Transformation chemokompenter Bakterienzellen

Chemokompente Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende Plasmid-DNA wurde hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig vermischt und 1 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und eine Inkubation von 2 min auf Eis. Anschließend wurden 800 µl SOC-Medium (Tabelle 4) zugegeben. Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden auf antibiotikahaltigem LB-Festmedium (Tabelle 4 und Tabelle 5) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Arbeiten mit *A. thaliana*

2.2.2.1 Kultivierung und Selektion von *A. thaliana*

Die Anzucht von *A. thaliana* erfolgte unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) je nach Experiment *in vitro* in Kulturkammern oder auf Erde in einem temperatur- sowie lichtregulierten Gewächshaus.

Für die *in vitro*-Kultivierung wurden die Samen sterilisiert. Dafür wurden die Samen in 1 ml Sterilisationslösung (0,01 % [v/v] Triton X-100 in 70 % Ethanol) 10 min geschüttelt und nach Entfernung der Lösung dreimal durch kurzes Schütteln in Ethanol (96 %) gewaschen. Die Samen wurden auf sterilem Filterpapier getrocknet. Sterile Samen wurden auf ½ MS-Medium (Tabelle 4) ausgelegt und mindestens drei Tage bei 4 °C in Dunkelheit stratifiziert. Anschließend wurden die

Pflanzen bei 22 °C inkubiert. Zur Selektion von transgenen Pflanzen wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt (Tabelle 5).

Für die Anzucht von Pflanzen im Gewächshaus wurden zuerst Samen auf Aussaaterde (P-Erde:T-Erde:Sand im Verhältnis 1:1:8) gesät und mindestens drei Tage bei 4 °C in Dunkelheit stratifiziert. Nach sieben bis zehn Tagen anschließender Inkubation im Gewächshaus wurden die Keimlinge für die weitere Kultivierung in Einzeltöpfe mit Pikiererde (P-Erde:T-Erde:Perlite Perligran G im Verhältnis 2:2:1) umgesetzt. P-Erde und T-Erde wurden von Einheitserde Werkverband e.V. (Sinntal-Jossa, Deutschland), Perlite Perligran G von Knauf Perlite GmbH (Dortmund, Deutschland) bezogen.

2.2.2.2 Transformation von *A. thaliana* und Selektion transgener Pflanzen

Die Generierung transgener Pflanzen wurde mittels der von Clough und Bent (1998) beschriebenen *Floral Dip*-Methode durchgeführt. Für die Transformation wurden 15 bis 20 Pflanzen in einem Topf mit 10 cm Durchmesser angezogen. Die Transformation erfolgte ca. 1 Woche nach dem Blühbeginn der Pflanzen. *A. tumefaciens*-Zellen, welche das gewünschte binäre Plasmid trugen, wurden in 20 ml Selektionsmedium 2 Tage schüttelnd kultiviert und anschließend in 200 ml LB-Medium (Tabelle 4) überführt. Diese Hauptkultur wurde 6 h in einem Schikanekolben geschüttelt. Anschließend wurden 60 µl Silwett L-77 (Lehle Seeds, Round Rocks, USA) zugegeben und durch kräftiges Schütteln mit der Kultur vermischt. Die Infloreszenzspresse der Pflanzen wurden zweimal je 10 s in die Bakterienlösung getaucht und über Nacht abgedeckt und liegend inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen bis zum Reifen der Schoten im Gewächshaus kultiviert.

Die Samen transformierter Pflanzen wurden geerntet und zur Selektion der Primärtransformanten (T1-Generation) entweder auf Erde angezogen (Kapitel 2.2.2.1) und die Keimlinge am 5., 8., und 11. Tag nach Keimung (TNK) mit 0,1 % (v/v) Basta (Bayer, Leverkusen, Deutschland) besprüht oder *in vitro* auf antibiotikahaltigem Wachstumsmedium (Tabelle 4 und Tabelle 5) angezogen. Die Segregationsanalysen zur Identifizierung von Linien mit Einzelinsertion in der Folgegeneration (T2) und die Identifizierung von homozygoten Linien in der zweiten Folgegeneration (T3) erfolgten stets *in vitro* mit Zugabe des entsprechenden Selektionszusatzes zum Wachstumsmedium.

2.2.2.3 Analyse der β -Glukuronidase-Aktivität in Geweben von *A. thaliana*

Für die Untersuchung der Promotoraktivität wurden transgene Pflanzen genutzt, welche das Gen für die β -Glukuronidase (GUS) aus *E. coli* unter der Kontrolle des Promotors des zu untersuchenden Gens exprimierten. Durch die Umsetzung des farblosen Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc) zu einem blauen Produkt, konnte die Promotoraktivität exakt lokalisiert werden. Von jeder transgenen Linie wurden Keimlinge sieben und 14 TNK sowie Rosetten und Infloreszenzstängel von fünf Wochen alten Pflanzen analysiert.

Die Gewebe wurden 60 min bei -20 °C in Aceton (90 %) fixiert. Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) gewaschen. Das Gewebe wurde mit Reaktionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer [pH 7.0], 10 mM Kalium-Ferrocyanid, 10 mM Kalium-Ferricyanid, 0,1 % Triton X-100, 1 mM X-Gluc) bedeckt. Es wurde zweimal für 1 min ein

Vakuum angelegt. Im Anschluss wurden die Gewebe bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Reaktionspuffer wurde entfernt und das Gewebe wurde zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen.

Für mikroskopische Analysen wurden Gewebe geklärt (modifiziert nach Malamy und Benfey, 1997). Das Gewebe wurde 15 Minuten in Lösung I (0,24 N HCl, 20% Ethanol) bei 57 °C und anschließend 15 min in Lösung II (7% [w/v] NaOH, 60 % Ethanol) bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels einer Ethanolreihe (40 %, 20 %, 10 %; je 5 min) wurde das Gewebe bei Raumtemperatur rehydriert und in Lösung III aufgenommen (25 % [v/v] Glycerin, 5 % Ethanol). Die Analysen wurden mithilfe des Stereomikroskops SZX12 (Olympus, Tokio, Japan) oder mit dem Mikroskop Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

2.2.2.4 Untersuchung des Wurzelwachstums von *A. thaliana*

Die Pflanzen wurden *in vitro* in quadratischen, hochkant stehenden Kulturplatten angezogen. Das Wachstumsmedium (Tabelle 4) enthielt 1 % (w/v) Phytigel. Zur Analyse der Cytokininsensitivität wurden die Kulturmedien mit 50 nM BA (gelöst in DMSO) versetzt. Am 3. TNK wurden die Wurzelspitzen der Keimlinge markiert, um Unterschiede der Keimungszeitpunkte auszugleichen. Sieben Tage nach der Markierung wurde die Länge der Primärwurzeln fotografisch dokumentiert und die Anzahl der Seitenwurzeln gezählt. Mithilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (Tabelle 8) wurde die Primärwurzellänge gemessen.

2.2.2.5 Induktion von *A. thaliana*-Keimlingen mit Cytokinin

Um Genexpressionsänderungen in Reaktion auf exogenes Cytokinin zu untersuchen, wurden Cytokinin-Induktionsexperimente durchgeführt.

Samen von *A. thaliana* wurden auf die Vertiefungen einer 12-*well*-Kulturplatte verteilt (je fünf Samen pro Vertiefung), in je 2,5 ml flüssigem ½ MS-Medium (Tabelle 4) drei Tage bei 4 °C statifiziert und anschließend für zehn Tage angezogen. Zehn TNK wurden 25 µl einer BA-Stammlösung (100 µM BA, 1 mM KOH) zum Medium gegeben, sodass eine finale BA-Konzentration von 1 µM erreicht wurde. Für die *mock*-Behandlung wurden 25 µl 1 mM NaOH zugegeben. Zum Verteilen der Induktionslösung wurden die Platten kurz geschwenkt. Nach 15 min, 30 min und 120 min wurden die Keimlinge geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Extraktion der Gesamt-RNA (Kapitel 2.2.5.1) wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Zur Amplifikation von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR) (Mullis et al., 1986) genutzt. Je nach Anwendungszweck wurden hauseigene bzw. kommerzielle Polymerasen verwendet (Tabelle 1). Die Zusammensetzung der Ansätze kann der Tabelle 9 entnommen werden. Für die Ansätze mit kommerziellen Polymerasen wurden die mitgelieferten Reagenzien genutzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang, Tabelle 25 aufgelistet. Die Programme der Reaktionen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Polymerase	Zusammensetzung der Ansätze	Finale Konzentration	Verwendung
<i>Taq</i> -Polymerase (houseigen)	10X <i>Taq</i> -Puffer [670 mM Tris/HCl, pH 8.8; 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgCl ₂ ; 0,1 % (v/v) Tween-20]	1X	Genotypisierung, Kolonie-PCR
	dNTP-Mix	je 0,2 mM	
	Primer 1 und Primer 2	je 0,5 µM	
	<i>Taq</i> -Polymerase	ca. 1 U	
	genomische DNA	100 – 200 ng	
	ddH ₂ O	ad. 20 µl	
<i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase (kommerziell)	5x <i>Phusion</i> HF-Puffer	1X	Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die Klonierungen, Amplifikation von cDNA-Sequenzen für Sequenzierung
	dNTP-Mix	je 0,1 mM	
	Primer 1 und Primer 2	je 0,4 µM	
	<i>Phusion</i> -Polymerase (2 U/µl)	ca. 0,02 U	
	genomische DNA	1 µl	
	ddH ₂ O	ad. 20 µl	

Tabelle 10: PCR-Programme

Schritt	<i>Taq</i> -Polymerase		<i>Phusion</i> Polymerase	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	98 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s	98 °C	10 s
3. Anlagerung der Primer	T _m - 5 bis 10 °C	30 s	T _m - 3 bis 5 °C	30 s
4. Elongation	72 °C	1 min/kb	72 °C	30 s/kb
5. Finale Elongation	72 °C	2 min/kb	72 °C	1 min/kb
6. Reaktionsende	16 °C	∞	16 °C	∞
Zyklenanzahl (Schritte 2 bis 4)	25 bis 35		30	

T_m = Schmelztemperatur der Primer

Für die Identifizierung von Bakterienkolonien von *E. coli* sowie *A. tumefaciens* mit rekombinanten Plasmiden wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Als Template wurde 1 µl einer Übernachtskultur genutzt.

2.2.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurefragmente verschiedener Größe wurden mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Abhängig von der Größe der erwarteten Fragmente wurde ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 1 bis 4 % (w/v) hergestellt. Die Agarose wurde in 1X TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8.0) aufgekocht, mit Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) versetzt und in einer Gießanlage gegossen. Je 5 µl Nukleinsäureprobe wurde 1 µl 6x Ladepuffer (40 % [w/v] Saccharose, 10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0], 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 bis 110 V in 1x TAE-Puffer. Die Nukleinsäuren wurden mit Hilfe von UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert. Zur Abschätzung der Größe und Konzentration von Nukleinsäurefragmenten wurde parallel einer der Größenstandards Hyperladder I (Bioline, London, UK), P-805 oder P-815 (Molekularbiologisches & biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld, Deutschland) aufgetrennt.

Die Visualisierung von Agarosegelen erfolgte mithilfe des Geldokumentationssystems GenoPlex (VWR International, Radnor, USA) und der Software GenoCapture (Tabelle 8).

2.2.3.3 Extraktion von DNA aus einem präparativen Agarosegel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus einem PCR-Ansatz oder einem Restriktionsverdau wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Kapitel 2.2.3.2) die entsprechende Bande im UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Tabelle 2) eluiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Quantifizierung der von DNA- bzw. RNA-Konzentration in Lösung wurde die OD_{260} mithilfe des NanoDrop Spektrophotometers (Thermo Scientific, Wilmington, USA) gemessen.

Für die Quantifizierung des Konzentrationsverhältnisses von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten in einem Agarosegel (Kapitel 2.2.3.2) wurde die Bandenintensität mithilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (Tabelle 8) bestimmt.

2.2.3.5 Extraktion genomischer DNA aus *A. thaliana*

Die Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Edwards et al. (1991). 100 mg Blattmaterial wurden 300 ml DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 25 mM EDTA [pH 8.0], 0,5 % [w/v] SDS) zugefügt und unter Verwendung von einer Stahlkugel pro Reaktionsgefäß in der Schwingmühle MM 300 (Retsch, Haan, Deutschland) zerkleinert. Die Probe wurde 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol durch Invertieren gemischt. Die Probe wurde 10 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 300 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in 100 µl 1X TE-Puffer (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.3.6 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte entweder mithilfe des NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits (Tabelle 2) entsprechend der Herstellerangaben oder nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dafür wurde eine 2 ml Übernachtskultur im entsprechenden flüssigen Selektionsmedium (Tabelle 4 und Tabelle 5) angezogen. Die Zellen wurden bei 16.000 g 1 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0]; 100 µg/ml RNase A [Tabelle 1]) vollständig resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl einer frisch hergestellten Lösung II (200 mM NaOH, 1 % [w/v] SDS) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach maximal 5 min wurden 350 µl der Lösung III (3 M NaAc [pH 5.5]) hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde 10 min bei 18 °C und 10.000 g zentrifugiert. 800 µl des Überstands wurden sauber abgenommen und durch Vortexen mit 500 µl eiskaltem Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen, 5 min zentrifugiert, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.3.7 Restriktionsverdau von DNA

Sowohl für die Analyse von Plasmiden und PCR-Produkten als auch für die Generierung passender DNA-Enden für die Klonierung von Vektoren wurden Restriktionsenzyme genutzt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme sind in (Tabelle 1) aufgelistet.

Die Reaktionen umfassten standardmäßig ein Gesamtvolumen von 10 bis 20 µl, wobei die Konzentration des Enzyms 10 % des Gesamtvolumens nicht überschritt. Für die Zusammensetzung der Reaktion, die Wahl des Puffers sowie der Inkubationstemperatur und –dauer wurden die Herstellerangaben befolgt.

2.2.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um durch Restriktionsenzyme geöffnete Plasmide 5'-terminal zu dephosphorylieren, wurde dem Reaktionsansatz direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau 1 µl FastAP alkalische Phosphatase (Tabelle 1) zugegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase 20 min bei mindestens 65 °C inaktiviert.

2.2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA-Ligase (Tabelle 1) genutzt. Die Zusammensetzung des Standardreaktionsansatzes ist der Tabelle 11 zu entnehmen. Der Ligationsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei 70 °C inaktiviert. Zur Selektion und Amplifikation von rekombinanten Plasmiden, wurde der Ligationsansatz in *E. coli*-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.3).

Tabelle 11: Reaktionsansatz einer Ligation.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Vektor (linearisiert und dephosphoryliert)	x (20 bis 100 ng)	
Insert	y (3 mol/1 mol des Vektors)	
T4 DNA-Ligasepuffer (10X)	1 µl	1X
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl	0,1 U/µl
ddH ₂ O	ad. 10 µl	

2.2.3.10 Aufreinigung von DNA nach einer Behandlung mit Enzymen

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem enzymhaltigen Reaktionsansatz wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Tabelle 2) genutzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.3.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Sequenzanalyse-Software Chromas Lite 2.1 (Tabelle 8) analysiert. Für die Homologiesuche mittels BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) wurde BLASTn (Tabelle 8) verwendet.

2.2.4 Klonierungsstrategien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Reportergenkonstrukte für die Visualisierung der Expressionsdomänen von *CKX1-NAT*, *CKX5-NAT* bzw. *CKX6-NAT* generiert. Mittels PCR (Kapitel 2.2.3.1) wurden die entsprechenden Promotorbereiche unter Verwendung von genomischer DNA als Template amplifiziert und mithilfe klassischer Klonierung in die *multiple cloning site 2* (MCS2) des Vektors *pCB308* (Tabelle 3), welcher *downstream* der MCS2 die kodierende Sequenz des *GUS*-Gens trägt, ligiert. Für die Klonierung aller drei Konstrukte wurde *pCB308* mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut (Kapitel 2.2.3.7), anschließend dephosphoryliert (Kapitel 2.2.3.8) und aufgereinigt (Kapitel 2.2.3.10).

Für *pCKX1-NAT:GUS pCB308* wurde unter Verwendung der Primer CKX1-NAT-KP1 und CKX1-NAT-KP2 (Tabelle 25) eine 1547 Basenpaare (bp) lange genomische Sequenz, welche 390 bp *downstream* des *CKX1*-Stoppcodons endet, amplifiziert. Durch die genutzten Primer wurden terminale Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI sowie *Xba*I in das Amplifikat integriert. Das Amplifikat wurde aufgereinigt, mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut, anschließend nochmals aufgereinigt und mit dem Vektor *pCB308* ligiert (Kapitel 2.2.3.9).

Für *pCKX5-NAT:GUS pCB308* wurde unter Verwendung der Primer CKX5-NAT-KP1 und CKX5-NAT-KP2 (Tabelle 25) eine 2658 bp lange genomische Sequenz, welche 282 bp *downstream* des *CKX5*-Stoppcodons endet, amplifiziert. Durch die genutzten Primer wurden terminale Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI sowie *Nhe*I in das Amplifikat integriert. Das Amplifikat wurde aufgereinigt, mit *Bam*HI und *Nhe*I verdaut, anschließend nochmals aufgereinigt und mit dem Vektor *pCB308* ligiert.

Für *pCKX6-NAT:GUS pCB308* wurde unter Verwendung der Primer CKX6-NAT-KP1 und CKX6-NAT-KP2 (Tabelle 25) eine 2167 bp lange genomische Sequenz, welche 32 bp *upstream* des *CKX6*-Stoppcodons endet, amplifiziert. Durch den genutzten Primer CKX6-NAT-KP2 wurde am 3'-Terminus des *CKX6-NAT*-Promotors eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle erzeugt. Eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle befindet sich innerhalb des amplifizierten Bereiches, 59 bp entfernt vom Primer CKX6-NAT-KP1. Das Amplifikat wurde aufgereinigt, mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut, anschließend nochmals aufgereinigt und mit dem Vektor *pCB308* ligiert.

Klonierte Konstrukte wurden in *E. coli*-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.3), Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR getestet (Kapitel 2.2.3.1) und die isolierten Plasmide mittels Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung (Kapitel 2.2.3.11) bestätigt. Vektorkarten befinden sich im Anhang (Abbildung 28, Abbildung 29 und Abbildung 30).

2.2.5 Bestimmung der Transkriptabundanz

2.2.5.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*

Um die Gesamt-RNA aus pflanzlichem Material zu isolieren, wurden zunächst 100 bis 200 mg pflanzliches Gewebe in einem 2 ml-Zentrifugationsgefäß gesammelt und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden unter Verwendung von zwei Stahlkugeln pro Reaktionsgefäß in der Schwingmühle MM 300 (Retsch, Haan, Deutschland) mit 30 Hz 2 min zu einem feinen Pulver gemahlen.

Die RNA-Extraktion erfolgte entweder mithilfe des NucleoSpin RNA Plant Kit (Tabelle 2) entsprechend den Herstellerangaben oder nach der Trizol-Methode. Für letztere wurde dem Pulver 1 ml TRIsure (Bioline, London, UK) zugegeben und durch Vortexen so lange gemischt, bis die Probe vollständig aufgetaut war. Die Proben wurden bei 16.000 g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen 1,5 ml-Zentrifugationsgefäß mit 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 15 s durch Vortexen gemischt. Nach einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur wurde die Probe 15 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. 500 µl der oberen Phase wurden in ein neues 1,5 ml-Zentrifugationsgefäß überführt, mit 500 µl eiskaltem Isopropanol durch Invertieren vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand vollständig entfernt wurde, wurde das Pellet zweimalig mit 900 µl 80 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 4 °C und 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet getrocknet und in 50 µl 65 °C warmem, RNase-freiem ddH₂O gelöst.

2.2.5.2 DNaseI-Verdau

Um die RNA-Proben von genomischer DNA zu befreien, wurden 2,5 µg RNA mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die Probe wurde mit 1 µl DNaseI (Tabelle 1) und 1 µl des zugehörigen 10X DNaseI-Puffers versetzt, vorsichtig vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 1 µl 50 mM EDTA vermischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Um die Qualität der RNA zu prüfen, wurden 250 ng der RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.3.2). Zur weiteren Analyse wurden Proben verwendet, insofern deutlich die zwei Banden zu erkennen waren, welche der 28 S- und der 18 S-rRNAs entsprechen.

2.2.5.3 Gesamt-cDNA-Synthese

Für die Synthese von Gesamt-cDNA wurde 1 µg DNaseI-behandelte Gesamt-RNA genutzt. Es wurden die SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Tabelle 1) und die zugehörigen Chemikalien verwendet. Mix 1 (Tabelle 12) wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort 1 min auf Eis abgekühlt. Mix 1 wurde vorsichtig mit Mix 2 (Tabelle 12) vermischt und anschließend 5 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert. Die daraus resultierende cDNA wurde im Verhältnis von 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für Gesamt-cDNA-Synthese

Mix 1		Mix 2	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Gesamt-RNA	x (1 µg)	First Strand Buffer (5X)	2 µl
dNTP-Mix (je 5 mM)	1 µl	DTT (0,1 M)	0,5 µl
N ₉ -Random-Primer („50 µM“)	0,9 µl	SuperScript™ III (200 U/µl)	0,25 µl
Oligo-dT ₂₅ -Primer (50 µM)	0,5 µl		
ddH ₂ O	ad. 7,25 µl		

2.2.5.4 Strangspezifische cDNA-Synthese

Für die Synthese von strangspezifischer cDNA wurden 2 µg DNaseI-behandelte Gesamt-RNA genutzt. Es wurden die ThermoScript™ Reverse Transcriptase (Tabelle 1) und die zugehörigen Chemikalien verwendet. Mix 1 (Tabelle 13) wurde für 5 min bei 75 °C inkubiert und anschließend

sofort 1 min auf Eis abgekühlt. Mix 1 wurde vorsichtig mit Mix 2 (Tabelle 13) vermischt und anschließend 5 min bei 60 °C, 60 min bei 65 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert. Die daraus resultierende cDNA wurde im Verhältnis von 1:2 mit ddH₂O verdünnt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für strangspezifische cDNA-Synthese

Mix 1		Mix 2	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Gesamt-RNA	x (2 µg)	First Strand Buffer (5X)	4 µl
dNTP-Mix (je 5 mM)	2 µl	DTT (0,1 M)	1 µl
genspezifischer Reverse-Primer (10 µM)	1 µl	ThermoScript™ (15 U/µl)	1 µl
UBC10-qRT2 (10 µM)	1 µl		
ddH ₂ O	ad. 14 µl		

2.2.5.5 Semiquantitative RT-PCR

Um die Transkriptlevel semiquantitativ zu bestimmen, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt, wofür pro Reaktion je 2,5 µl der verdünnten cDNA als Template eingesetzt wurden. Für strangspezifische RT-PCR-Analysen wurden 2,5 µl der verdünnte, strangspezifischen cDNA verwendet. Pro Reaktion wurde ein Ansatz mit 50µl Gesamtvolumen (Tabelle 14) entsprechend des in Tabelle 10 dargestellten Programms inkubiert, wobei jeweils nach 25, 30, 32 und 35 Zyklen 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen und gelelektrophoretisch analysiert wurden. So wurde sichergestellt, dass die Transkriptlevel innerhalb der exponentiellen Phase der PCR verglichen wurden.

Tabelle 14: Reaktionsansätze einer RT-PCR.

Polymerase	Zusammensetzung der Ansätze	Finale Konzentration	Verwendung
<i>Taq</i> -Polymerase (hauseigen)	10X <i>Taq</i> -Puffer [670 mM Tris-HCl, pH 8.8; 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgCl ₂ ; 0,1 % (v/v) Tween-20]	1X	RT-PCR
	dNTP-Mix	je 0,2 mM	
	Primer 1 und Primer 2	je 0,5 µM	
	<i>Taq</i> -Polymerase	ca. 1 U	
	genomische DNA	100 – 200 ng	
	ddH ₂ O	ad. 50 µl	
<i>Taq</i> DNA Polymerase (kommerziell)	10X <i>Taq</i> -Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	1X	Strangspezifische RT-PCR
	MgCl ₂	1,5 mM	
	dNTP-Mix	je 0,2 mM	
	Primer 1 und Primer 2	je 0,5 µM	
	<i>Taq</i> -Polymerase	1 U	
	cDNA	1 µl (entspricht 100 ng umgeschriebener RNA)	
	ddH ₂ O	ad. 50 µl	

2.2.5.6 Quantitative PCR

Um die Transkriptlevel quantitativ zu bestimmen, wurden quantitative PCRs (qPCRs) durchgeführt, wobei je 2 µl der verdünnten Gesamt-cDNA (Kapitel 2.2.5.3) pro Reaktion eingesetzt wurden. Die Zusammensetzung einer Reaktion ist in Tabelle 15 dargestellt. In jede Vertiefung einer weißen 96-well-Mikrotiterplatte wurden 8 µl Mastermix und 2 µl der verdünnten cDNA gegeben und kurz abzentrifugiert. Die Messung erfolgte mit der CFX96 Touch™ *Real-time* PCR-Maschine (Bio-

Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) unter Verwendung der zugehörigen Software CFX Manager (Tabelle 8). Das verwendete Programm ist der Tabelle 16 zu entnehmen. Jedes biologische Replikat wurde in zwei oder drei technischen Replikaten gemessen, um technische Fehler zu detektieren. Die Auswertung und Normalisierung erfolgte mit der vergleichenden C_t -Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) nach (Vandesompele et al. 2002). Zur Normalisierung der eingesetzten cDNA-Menge wurden zwei bis vier der Referenzgene *TBP-ASSOCIATED FACTOR II 15 (TAFII15)*, *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 10 (UBC10)*, *SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A)* oder *AP 4 COMPLEX SUBUNIT MU (AP4M)* genutzt. Die Höhe der Transkriptlevel wurde bei der Analyse von Mutanten relativ zum Wildtyp, bei der Analyse cytokinininduzierter Pflanzen relativ zur *mock*-Kontrolle und bei der Analyse verschiedener Gewebe relativ zum höchsten Messwert des jeweiligen Gens angegeben. Zur Überprüfung, ob die Amplifikation der Zielgene spezifisch war, wurden nach dem Abschluss der PCR-Zyklen Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgenommen.

Tabelle 15: Zusammensetzung einer qPCR-Reaktion.

	Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Mastermix	ddH ₂ O	6,16 µl	
	Immolase-Puffer (10X)	1 µl	1X
	MgCl ₂ (50 mM)	0,4 µl	2 mM
	dNTP-Mix (je 5 mM)	0,2 µl	je 100 µM
	SYBR Green I (10X)	0,1 µl	1X
	Immolase™ DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,02 µl	0,01 U/µl
	Forward-Primer (50 µM)	0,06 µl	300 nM
	Reverse-Primer (50 µM)	0,06 µl	300 nM
Probe	cDNA ¹	2 µl	

¹ Standardmäßig wurde 1:10-verdünnte cDNA verwendet, für die Analyse von *CKX1* wurde 1:50-verdünnte cDNA verwendet.

Tabelle 16: qPCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung / Hitzeaktivierung der Polymerase	95 °C	15 min
2. Denaturierung	95 °C	2 s
3. Anlagerung der Primer	55 °C	15 s
4. Elongation	72 °C	15 s
5. Erstellung einer Schmelzkurve		

Die Schritte 1 und 5 erfolgten einmalig, die Schritte 2 bis 4 wurden vierzigfach zyklisch wiederholt. Die SYBR Green I-Floureszenz wurde jeweils im Schritt 4 gemessen.

2.2.5.7 Etablierung eines qPCR-Assays

Primerpaare für qPCR-Assays wurden mit Hilfe des Programms PrimerBlast (Tabelle 8) designt und anschließend mittels BLASTn (Tabelle 8) und NetPrimer (Tabelle 8) auf ihre Spezifität und Qualität überprüft.

Um die Effizienz und Spezifität der Primerpaare zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA über mindestens fünf 1:10-Verdünnungsstufen erstellt und mittels qPCR gemessen. Für Zielgene mit einer sehr geringen Expression, wurden 1:5-Verdünnungsstufen verwendet. Die Primer-effizienz wurde mithilfe des qPCR Efficiency Calculator (Tabelle 8) berechnet. Es wurden nur jene

Primerpaare genutzt, deren Effizienz zwischen 90 % und 105 % liegen. Die Spezifität des Primerpaars wurde mithilfe der Schmelzkurve untersucht. Es wurden nur jene Primerpaare genutzt, die lediglich einen klaren Schmelzkurven-*Peak* zeigten. Für das Primerpaar von *CKX1* konnten diese Kriterien erst ab einer cDNA-Verdünnungsstufe von 1:50 erreicht werden, weshalb in die Reaktionsansätze für die *CKX1*-Bestimmung stets 1:50-verdünnte cDNA eingesetzt wurde.

2.2.6 Experimentelle Analyse der subzellulären Lokalisation von Transkripten

Die Bestimmung des Anteils von Transkripten in der nuklearen bzw. nukleolaren Fraktion der RNA wurde in Kollaboration mit Prof. Dr. Craig Pikaard und Dr. Nastya Gridasova (Indiana University, Bloomington, USA) durchgeführt. Das Primerdesign sowie die statistische Auswertung wurden von mir durchgeführt. Die fluoreszenzbasierte Isolation von Nuklei und Nukleoli (*fluorescence-activated nuclear sorting*, FANS bzw. *fluorescence-activated nucleolar sorting*, FANoS), die RNA-Isolation und die Transkriptmessung mittels qPCR wurde von Dr. Nastya Gridasova durchgeführt.

Mittels FANS/FANos nach (Pontvianne et al., 2016) wurden je 1.000.000 Nuklei bzw. Nukleoli aus 12 Tage alten Keimlingen isoliert, welche für die Extraktion von RNA mittels Trizol-Methode genutzt wurden. Je 500 ng DNaseI-behandelte RNA wurde revers transkribiert. Die Transkript-abundanz wurde mittels qPCR gemessen.

Für die Analyse der Transkriptlevelanreicherung in der nuklearen Fraktion bzw. der nukleolaren Fraktion wurden die Transkriptlevel der zu untersuchenden Gene und der Referenzgene mittels qPCR in der Gesamt-RNA, der nuklearen RNA und der nukleolaren RNA gemessen. Zunächst wurden jeweils die Mittelwerte der technischen Duplikate ermittelt. Anschließend wurde für jedes Gen der nukleare bzw. nukleolare Anteil als prozentualer Anteil des Transkriptlevels der nuklearen bzw. nukleolaren Fraktion relativ zum Transkriptlevel der Gesamt-RNA ermittelt. Für die Bestimmung der Anreicherung der Transkripte der zu untersuchenden Gene im Nukleus bzw. Nukleolus wurde der nukleare bzw. nukleolare Anteil des Gens auf den mittleren nuklearen bzw. nukleolaren Anteil der cytoplasmatischen Kontrollgene normalisiert.

2.2.7 Charakterisierung von Transkriptenden

2.2.7.1 Identifikation von Transkriptenden mittels RACE-Analyse

Zur Identifikation der Transkriptenden wurde das SMARTer® RACE Kit (Tabelle 2) genutzt. Das Primerdesign, die Kontrolle der RNA-Qualität und die Durchführung der RACE-Analyse erfolgten entsprechend den Herstellerangaben.

Die amplifizierten 3'- und 5'-Transkriptenden wurden mithilfe des CloneJet™ PCR-Klonierungskit (Tabelle 2) in den Vektor pJET1.2 kloniert. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Ligationsansätze wurden in chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.3). Mittels Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.3.1) wurden die Kolonien überprüft. Aus positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 2.2.3.6) und das inserierte Transkriptende sequenziert (Kapitel 2.2.3.11).

2.2.7.2 Analyse der 5'-Cap-Struktur

Die Existenz einer Cap-Struktur an 5'-Transkriptenden wurde mittels Behandlung der Gesamt-RNA mit Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (TEX; Tabelle 1) und anschließender Gesamt-cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.5.3) sowie semiquantitativer RT-PCR (Kapitel 2.2.5.5) analysiert.

5 µg DNaseI-behandelte RNA aus Infloreszenzgewebe wurde in jede Reaktion eingesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sind der Tabelle 17 zu entnehmen. Die Komponenten wurden vorsichtig vermischt und 30 min bei 42 °C inkubiert.

Terminiert wurde die TEX-Behandlung mittels Phenol:Chloroform-Extraktion. Dafür wurden die Reaktionen mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt und mit 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt. Die Ansätze wurden durch kräftiges Schütteln vermischt, 6 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. 150 µl der wässrigen Phase wurden in ein neues 1,5 µl Reaktionsgefäß überführt, mit 15 µl 3 M Natriumacetat und 375 µl Ethanol (100 %) vermischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16.000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl ddH₂O gelöst. Der erfolgreiche Abbau der RNA ohne 5'-Cap-Struktur wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (Kapitel 2.2.3.2) der RNA überprüft.

Tabelle 17: Zusammensetzung einer TEX-Reaktion.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Gesamt-RNA	x (5 µg)	
Puffer A (10X)	2 µl	1X
Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (1 U/µl) ¹	1 µl	0,05 U/µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
DTT (100 mM)	0,2 µl	1 mM
ddH ₂ O	ad. 20 µl	

¹ Für die Kontrollreaktion wurde das Enzym durch ddH₂O ersetzt.

2.2.8 Bioinformatische Analysen

2.2.8.1 *In silico*-Analysen

2.2.8.1.1 Identifikation von vorhergesagten Transkripten innerhalb spezifischer genomischer Bereiche

Für die Identifikation von NATs an den *A. thaliana* CKX-Loci wurde zum ersten Analysezeitpunkt die grafische Darstellung der auf TAIR zugänglichen Transkriptdatenbanken in Gbrowse (Tabelle 8; Stand 09.07.2013) genutzt. In dieser waren die Modelle der proteinkodierenden Gene, der nicht-kodierenden RNAs und der *expressed sequence tags* (ESTs) von GenBank (Tabelle 7) sowie lange nicht-kodierende RNAs einer transkriptomweiten Analyse von Matsui et al. (2008) visualisiert. Zum zweiten Analysezeitpunkt wurde zusätzlich die grafische Darstellung der auf Araport zugänglichen Transkriptdatenbanken in JBrowse (Tabelle 8; Stand 25.06.2019) genutzt. In dieser wurden die Modelle proteinkodierender Gene und nicht-kodierender Transkripte der Transkriptdatenbank Araport11 (Tabelle 7) sowie ESTs aus einer transkriptomweiten Studie von (Campbell et al., 2014)

berücksichtigt. Waren mehrere ESTs mit nahezu identischer Struktur verfügbar, wurde lediglich ein repräsentatives EST dargestellt.

Die Vorhersage von lncNATs oder Introns an *CKX*-Loci verschiedener Spezies erfolgte mithilfe der Visualisierung vorhergesagter Transkriptstrukturen und Spleißgrenzen im NCBI Graphical Sequence Viewer (Tabelle 8; Stand 30.09.2019). Die verfügbaren Annotationen bezüglich der Existenz von Transkripten und Introns werden von den Informationsdatenbanken *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Tabelle 7) und *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC; Tabelle 7) bereitgestellt.

2.2.8.1.2 Identifikation homologer Transkriptsequenzen

Transkriptsequenzen mit hoher Sequenzhomologie wurden mittels BLASTn (Tabelle 8) identifiziert. Dabei wurde als Datenbankoption „RefSeq_rna“ (Tabelle 7) und als Algorithmus Megablast („*highly similar sequences*“) genutzt. Es wurden lediglich Alignments mit einem *Expect value* (deutsch: Erwartungswert, *E-value*) von $\leq 0,05$ berücksichtigt. Dabei stellt der *E-value* einen Parameter dar, welcher der Anzahl der Treffer entspricht, die man beim Durchsuchen einer Datenbank einer bestimmten Größe zufällig erwarten kann.

2.2.8.1.3 Identifikation homologer Proteinsequenzen

Proteinsequenzen mit hoher Sequenzhomologie wurden mittels BLASTp (Tabelle 8; Stand 17.04.2020) identifiziert. Dabei wurde als Algorithmus protein-protein BLAST verwendet und als Datenbankoption „*non-redundant protein sequences*“ genutzt, welche die Informationen der Datenbanken GenBank, SWISS-PROT, RCSB Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) und Protein Research Foundation (PRF) bezieht (Tabelle 7). Es wurden lediglich Alignments mit einem *E-value* von ≤ 1 berücksichtigt.

2.2.8.1.4 *In silico*-Analyse von Transkriptleveländerungen infolge externer Stimuli

Für die *in silico*-Analyse von Genexpressionsänderungen in Reaktion auf externe Stimuli wurden die Datenbanken des eFP-Browsers (Tabelle 7; Stand 10.05.2019) und von Genevestigator (Tabelle 8; 13.05.2019) genutzt. Diese wurden für jedes analysierte Gen bezüglich der relativen Transkriptleveländerung in Reaktion auf die Behandlung mit verschiedenen Hormonen sowie abiotischen und biotischen Stresstimuli untersucht. Bei der Analyse mittels eFP-Browser wurden lediglich Stimuli berücksichtigt, welche das Transkriptlevel des jeweiligen Gens mindestens zweifach erhöhen oder erniedrigen. Wurde die Reaktion auf einen Stimulus im zeitlichen Verlauf gezeigt, wurden lediglich die stärksten Transkriptleveländerungen berücksichtigt. Bei der Analyse mittels Genevestigator wurde für einen Stimulus jeweils sowohl die Anzahl der Einzelexperimente, bei denen die Transkriptlevel mehr als zweifach erhöht oder verringert waren, als auch die jeweils stärkste dieser Transkriptleveländerung aufgelistet.

2.2.8.1.5 Transkriptlevelbestimmung in Datensätzen von RNA-Seq-Eexperimenten

Die zu analysierenden Datensätze von RNA-Seq-Experimenten (Tabelle 18) wurden im fastq-Format vom *Sequence Read Archive* (Leinonen et al., 2011) heruntergeladen. Die *reads* wurden

mithilfe von Cutadapt (Tabelle 8) getrimmt und von Adaptersequenzen befreit, wobei ein *quality-cutoff* (-q) von 20, ein minimaler Überlapp mit der Adaptersequenz (-O) von 10 und eine minimale Länge des finalen *reads* (-m) von 25 gewählt wurden. Die Qualität der Datensätze wurde mithilfe von FastQC (Tabelle 8) analysiert. Das *Mapping* jedes Datensatzes auf das Referenzgenom von *A. thaliana* erfolgte mithilfe von STAR (Tabelle 8) unter Nutzung der Genomannotation (--sjdbGTFfile) von *A. thaliana* und mit Detektion nicht-annotierter Spleißgrenzen (maximale Überhanglänge [--sjdbOverhang] = Länge der *reads* -1). Das Referenzgenom (Arabidopsis_thaliana.TAIR10.dna_sm.toplevel.fa.gz) sowie die Genomannotation (Arabidopsis_thaliana.TAIR10.42.gtf) wurden von der Ensembl Genomes Datenbank (Tabelle 7; Stand 23.04.2019) heruntergeladen. Im Ausgabeordner werden durch STAR mehrere Dateien, u.a. die BAM-Datei mit den *mapped reads* und eine Datei mit der statistischen Zusammenfassung (*.Log.final.out) erzeugt. Aus der statistischen Zusammenfassung wurde die Gesamtanzahl von *mapped reads* ermittelt, wobei folgende Formel genutzt wurde:

$$Total\ mapped\ reads = Uniquely\ mapped\ reads\ number + Number\ of\ reads\ mapped\ to\ multiple\ loci$$

Die *mapped reads* der BAM-Datei wurden mithilfe von Samtools sort (Tabelle 8) sortiert. Von der sortierten BAM-Datei wurde mittels Samtools index (Tabelle 8) ein Index erstellt. Mittels Samtools View, Grep und R (Tabelle 8) wurden die *mapped reads* entsprechend ihrer genomischen Position und Orientierung gefiltert, sodass die Gesamtanzahl von *mapped reads* für jedes der entsprechenden Transkripte bestimmt werden konnte. Die Filter für die jeweiligen Transkripte sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Entsprechend der folgenden Formel wurde die Anzahl detektierter Transkripte auf die Anzahl der *total mapped reads* normalisiert und als *reads per million* (RPM) angegeben:

$$RPM_x = \frac{n_x}{Total\ mapped\ reads} \times 10^6$$

Tabelle 18: Für Transkriptlevelanalyse genutzte RNA-Seq-Datensätze.

Stimulus	Behandlung	RNA-Seq-Lauf	Referenz
Cytokinin	45 min 5 µM BA; Wurzel	SRR6190453	Potter et al. (2018)
		SRR6190454	
		SRR6190471	
		SRR6190472	
		SRR6190475	
		SRR6190476	
Auxin	4 h 5 µM IAA, Wurzel	SRR1042754	Chaiwanon und Wang (2015)
		SRR1042755	
		SRR1042758	
		SRR1042759	
Trockenstress	5 d Trockenheit; Wurzel	SRR7779219	Fàbregas et al. (2018)
		SRR7779220	
		SRR7779221	
		SRR7779225	
		SRR7779226	
		SRR7779227	
Hitzestress	6 h 37 °C, Rosettenblätter	SRR2033948	Rawat et al. (2015)
		SRR2033949	
		SRR2033950	
		SRR2033951	

Kältestress	24 h 4 °C, Keimling	SRR8422200	Esteve-Bruna et al. (2020)
		SRR8422201	
		SRR8422202	
		SRR8422203	
		SRR8422204	
Salzstress	Wachstum bei 150 mM NaCl, Rosettenblätter	SRR8422205	Anderson et al. (2018)
		SRR7442243	
		SRR7442244	
		SRR7442245	
		SRR7442246	

Tabelle 19: Genutzte Filter zur Quantifizierung der reads der verschiedenen Transkripte in den RNA-Seq-Datensätzen.

Transkript	Chromosom ¹	genomischer Bereich ²	Orientierung ³
<i>CKX1</i>	chr2	17314412 - 17317354 ^a	<i>read</i> aligniert zu Minus-Strang
<i>CKX1-NAT</i>	chr2	17311816 - 17317358 ^b	<i>read</i> aligniert zu Plus-Strang
<i>CKX5</i>	chr1	28314458 - 28318362 ^a	<i>read</i> aligniert zu Plus-Strang
<i>CKX5-NAT</i>	chr1	28315122 - 28316315 ^c	<i>read</i> aligniert zu Minus-Strang
<i>UBC16</i>	chr1	28313379 - 28313845 ^d	<i>read</i> aligniert zu Minus-Strang
<i>CKX6</i>	chr3	23424157 - 23426536 ^a	<i>read</i> aligniert zu Minus-Strang
<i>CKX6-NAT</i>	chr3	23422600 - 23426338 ^b	<i>read</i> aligniert zu Plus-Strang

¹ Spalte 3 der BAM-Datei

² Spalte 4 der BAM-Datei

³ Spalte 2 der BAM-Datei; in *single-end*-Sequenzierungen entsprechen „0“ sowie „256“ dem Alignment zum Plus-Strang und „16“ sowie „272“ dem Alignment zum Minus-Strang; in *paired-end*-Sequenzierungen entsprechen „73“, „99“, „147“, „153“, „355“ und „403“ dem Alignment zum Plus-Strang sowie „83“, „89“, „137“, „163“, „339“ und „419“ dem Alignment zum Minus-Strang

^a entspricht den annotierten Transkriptenden

^b entspricht den distalen, mittels RACE-Analyse identifizierten Transkriptenden

^c entspricht dem Bereich zwischen dem distalen, mittels RACE-Analyse identifizierten 5'-Transkriptende von *CKX5-NAT* und dem annotierten 3'-Transkriptende von *UBC16*

^d entspricht dem Bereich der ersten beiden *UBC16*-Exons inklusive des 5'-UTRs

2.2.8.1.6 Analyse der Proteinkodierungskapazität

Mittels Translate (Tabelle 8; Stand 27.02.2016) wurden mögliche *open reading frames* (ORFs) für ein zu untersuchendes Transkript identifiziert. ORFs mit einer Länge von > 300 nt kodieren möglicherweise für ein Protein. ORFs mit einer Länge von ≤ 300 nt kodieren möglicherweise für ein Peptid. Die Protein- bzw. Peptidsequenz des jeweils längsten möglichen ORF jeder Transkript-isoform wurde als *Query*-Sequenz für eine Suche homologer Proteinsequenzen mittels BLASTp (Tabelle 8; Stand 17.04.2020) genutzt (Kapitel 2.2.8.1.3).

2.2.8.1.7 In silico-Analyse der subzellulären Lokalisation von Transkripten

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Transkripten erfolgte mithilfe der Programme IncLocator und Locate-R (Tabelle 8; Stand 04.04.2020).

2.2.8.1.8 Identifikation von miRNA-Zielsequenzen

Die *in silico*-Identifikation von miRNA-Zielsequenzen innerhalb von Transkripten erfolgte mithilfe von psRNATarget (Tabelle 8; Stand 04.05.2020) unter Nutzung der miRNA-Datenbank „Arabidopsis thaliana, 427 published miRNA“ und des *Scoring Schema* „Schema V2 (2017 release)“.

2.2.8.2 Analyse der evolutionären Konservierung

2.2.8.2.1 Erstellung eines Dendrogramms

Um die Verwandtschaftsbeziehungen orthologer Proteine verschiedener Spezies darzustellen, wurde ein Dendrogramm erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Dendrogramm aller CKXs von Pflanzenspezies verschiedener Taxa generiert. Dafür wurden aus der KEGG Orthology Datenbank (Tabelle 7; Stand 03.05.2019) die Proteinsequenzen aller CKX-Orthologe (K00279) der zu untersuchenden Spezies gesammelt. Das multiple Alignment wurde mithilfe von T-Coffee Accurate (Tabelle 8; Stand 13.05.2019) erstellt, wobei die Kombination der Alignment-Methoden „mafft_msa“, „clustalw_msa“, „muscle_msa“ und „kalign_msa“ genutzt wurde. Mittels TrimAl (Tabelle 8; Stand 10.05.2019) wurde das Alignment von zufällig alignierten Bereichen gesäubert. Mithilfe von PhyML mit Smart Model Selection (Tabelle 8; Stand 14.05.2019) unter Verwendung der schnellen, ähnlichkeitsbasierten Methode „aBayes“ (Anisimova et al., 2011) zur Bestimmung der *branch support* wurde die Phylogenie der alignierten Sequenzen analysiert und mittels EvoView (Tabelle 8; Stand 14.05.2019) grafisch dargestellt.

2.2.8.2.2 Vorhersage von NATs an Genloci

Die zu untersuchenden Genloci wurden mit Hilfe des NCBI Graphical Sequence Viewer des Informationsportals NCBI visualisiert (Kapitel 2.2.8.1.1). Innerhalb des transkribierten Bereichs und der Promotorregion (≤ 1000 bp *upstream* des CKX-Startcodons) wurden einerseits Informationen zu annotierten Transkriptstrukturen mit entgegengesetzter Orientierung und andererseits annotierte Intronpositionen von Transkriptsequenzen mit entgegengesetzter Orientierung gesammelt. Für erstere wurden die im NCBI Graphical Sequence Viewer verfügbaren Informationen über die Transkriptlänge und die Länge eventuell existierender proteinkodierender Sequenzen (engl.: *coding sequences*, CDS) von Genen erfasst, deren Annotation von den Informationsdatenbanken NCBI (Tabelle 7) und INSDC (Tabelle 7) bereitgestellt wurde. Für die Identifikation der Intronpositionen wurden die im NCBI Graphical Sequence Viewer dargestellten *RNA-seq intron-spanning reads (aggregate, filtered)* genutzt, deren Annotation von NCBI (Tabelle 7) bereitgestellt wurde. Mithilfe dieser Informationen wurden Hinweise auf die Existenz von lncNATs ermittelt.

Unter Verwendung von R (Tabelle 16) und RStudio (Tabelle 16) wurden die verfügbaren Informationen ausgewertet und die Existenz von NATs an den jeweiligen Loci entsprechend der folgenden Kriterien bewertet:

- Hinweise auf ein lncNAT bestehen, wenn mindestens ein Transkript existiert, welches keine CDS mit einer Länge von mehr als 300 bp enthält oder mindestens ein Intron existiert, das keinem proteinkodierenden NAT zugeordnet werden kann und dessen Grenzen den Konsensussequenzen eukaryontischer Introns entspricht.
- Hinweise auf ein Promotor-lncNAT bestehen, wenn im Bereich von 1000 bp *upstream* des entsprechenden Startcodons mindestens ein Transkript existiert, welches kein ORF mit einer CDS-Länge von mehr als 300 bp enthält oder mindestens ein Intron existiert, das keinem proteinkodierenden NAT zugeordnet werden kann und dessen Grenzen den Konsensussequenzen eukaryontischer Introns entspricht.

- Hinweise auf ein proteinkodierendes NAT bestehen, wenn mindestens ein Transkript existiert, welches eine CDS mit einer Länge von mehr als 300 bp enthält.

Genloci mit existierenden Hinweisen auf lncNATs, Promotor-lncNATs oder proteinkodierenden NATs wurden im Dendrogramm (Kapitel 2.2.8.2.1) markiert.

2.2.8.2.3 Analyse der Sequenzhomologie zweier Transkriptsequenzen

Das paarweise globale Alignment von Transkriptsequenzen und die grafische Darstellung der Alignments erfolgte mittels MAFFT (Tabelle 8; Stand 11.07.2020) unter Nutzung der Standard-einstellungen. Die Sequenzidentität berechnete sich entsprechend der folgenden Gleichung:

$$\frac{\text{Anzahl identischer Basen des Alignments}}{\text{Gesamtanzahl der Basen des Alignments im überlappenden Bereich}}$$

2.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen erfolgten mit R (Tabelle 8) unter Nutzung der grafischen Benutzeroberfläche RStudio (Tabelle 8). Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurde die Normalverteilung der Daten überprüft. Mithilfe des Fisher's F-Test oder des Levene's Tests wurde die Varianzgleichheit der Daten überprüft. Waren beide Annahmen erfüllt, erfolgte die statistische Analyse mittels zweiseitigem Studentischem T-Test oder mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA, Tukey-HSD-Test). Bei Datensätzen mit ungleichen Varianzen erfolgte die statistische Auswertung mittels Welch-T-Test. Beim statistischen Vergleich von mehr als zwei Genen mittels Welch-T-Test wurde eine p-Wert-Korrektur nach Benjamini und Hochberg (1995) vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von NATs an CKX-Loci

Neben anderen molekularen Kontrollmechanismen bieten NATs eine effektive Möglichkeit, die Aktivität ihrer *Sense*-Partner in der Zelle zu regulieren. Um zu untersuchen, ob *CKX*-Gene durch NAT-Mechanismen kontrolliert werden, wurden zunächst existierende Transkriptomdaten nach Hinweisen auf *CKX*-NAT durchsucht und diese anschließend experimentell analysiert.

3.1.1 *In silico*-Analyse von Transkripten an CKX-Loci

Für die Identifikation von *Antisense*-Transkripten an *CKX*-Loci, wurden die Informationsdatenbanken TAIR (Tabelle 7; Stand 09.07.2013 bzw. 25.06.2019) und Araport (Tabelle 7; Stand 25.06.2019) nach Transkriptsequenzen durchsucht, welche mit *CKX*-kodierenden Bereichen überlappen, jedoch eine entgegengesetzte Orientierung besitzen. Diese umfassten sowohl experimentell bestätigte Transkripte als auch vorhergesagte, hypothetische ncRNAs und proteinkodierende RNAs sowie ESTs. Die Übersicht in Abbildung 7 fasst die Ergebnisse der *in silico*-Analyse zusammen.

Zu Beginn der Analyse konnten an nahezu jedem der *CKX*-Loci Hinweise auf NATs gefunden werden. Am *CKX1*-Locus wurden drei NAT-ESTs identifiziert. Eines davon (CB258019) überspannte einen Bereich vom ersten bis zum dritten *CKX1*-Exon und besaß ein Intron, dessen Position sich von denen der *CKX1*-Introns unterschied (Abbildung 7). Die Grenzen dieses Introns stimmten mit den Konsensussequenzen eukaryontischer Introngrenzen (Mount, 1982) überein. Am *CKX6*-Locus wurden drei lncNATs identifiziert, welche in einem Bereich von ca. 1,5 kb *upstream* bis zum 3'-UTR des *CKX6*-Transkripts lagen (Abbildung 7). Diese hatten diverse Exon-Intron-Strukturen, jedes mit konservierten Exon-Intron-Grenzen. Das NAT-EST EG503893 am *CKX3*-Locus sowie die in einem *tiling array* identifizierten Transkriptbereiche Matsui2008_Group1790 am *CKX5*-Locus bzw. Matsui2008_Group6580 am *CKX7*-Locus enthielten kein Intron, überlappten jedoch mit dem Sequenzbereich eines *CKX*-Introns (Abbildung 7). Außerdem überlappten die 3'-UTRs der längeren Isoform des *CKX5*-Transkripts und des proteinkodierenden Gens *AT1G75440* (*UBC16*) und bildeten somit ein *tail-to-tail*-NAT-Paar. Am *CKX2*-Locus wurde ein lncNAT (Matsui2008_Group2387) detektiert, welches mit einem Teil des ersten *CKX2*-Exons überlappte (Abbildung 7). Außerdem überschritten sich die 3'-UTRs des *CKX2*-Transkripts und des proteinkodierenden *AT2G19490* (*REC A HOMOLOG 2*).

Dank der fortschreitenden Entwicklung im Bereich der Transkriptomsequenzierung, erweitert sich die Sammlung von Sequenzen bislang nicht annotierter Transkripte stetig. So konnten zu einem späteren Zeitpunkt die Hinweise auf NATs an den *CKX*-Loci erweitert werden. In zwei Bereichen des *CKX1*-Locus wurden weitere NATs vorhergesagt. Die drei Transkriptisoformen des Gens *AT2G41505* überlappten in einem Bereich *upstream* bis zum ersten Exon des *CKX1*-Transkripts und enthielten ein ORF für ein hypothetisches Protein mit einer Länge von 259 Aminosäuren (engl.: *amino acids*, aa) (Abbildung 7). Das Transkript des Gens *AT2G41515* lag in einem Bereich vom

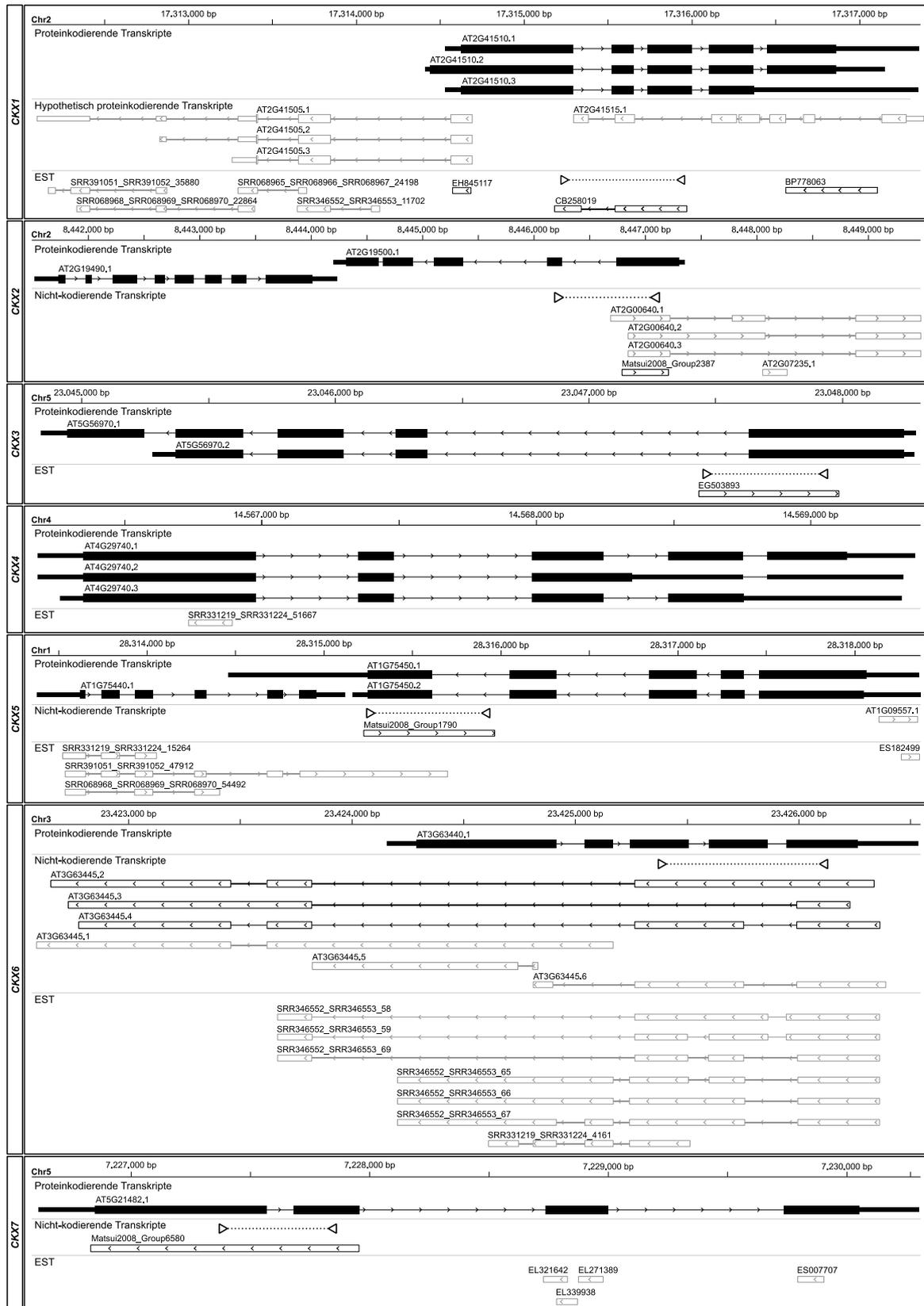


Abbildung 7: *In silico*-Analyse zur Identifikation von CKX-NATs.

Schematische Darstellung von NATs an den sieben CKX-Loci. Boxen repräsentieren Exons, davon zeigen schmalere Boxen untranslatierte Bereiche an. Schwarz gefüllte Boxen stellen proteinkodierende Gene dar, schwarz umrandete Boxen stellen nicht-kodierende und hypothetisch proteinkodierende Transkriptsequenzen dar, welche bereits zum Zeitpunkt der ersten Analyse (Juli 2013) verfügbar waren und grau umrandete Boxen stellen nicht-kodierende und hypothetisch proteinkodierende Transkriptsequenzen dar, welche erst zum Zeitpunkt der späteren Analyse (Juni 2019) verfügbar waren. Linien repräsentieren Introns, Pfeile repräsentieren die Transkriptionsrichtung. Die durch gepunktete Linien verbundenen weißen Pfeilköpfe zeigen die Position der für den experimentellen Nachweis der NATs verwendeten Primer an.

ersten Intron bis *downstream* des *CKX1*-Transkripts und enthielt ein ORF für ein hypothetisches Protein mit einer Länge von 106 aa (Abbildung 7). Diese Transkripte wurden durch einen Annotationsansatz vorhergesagt, bei dem mit Hilfe einer integrativen Annotationspipeline basierend auf RNAseq-Datensätzen Transkripte vorausgesagt wurden (Cheng et al., 2017). Die Expression der hypothetischen Proteine dieser Transkripte wurde bislang nicht nachgewiesen. Es existierten ESTs, welche das Vorkommen von NATs *upstream* des *CKX1*-Gens unterstützten (Abbildung 7). Die Positionen der Introns dieser ESTs stimmten jedoch nur teilweise mit dem hypothetisch proteinkodierenden Transkriptisoformen von *AT2G41505* überein. Es wurden keine ESTs identifiziert, welche die Exon-Intron-Struktur des Transkripts *AT2G41515* bestätigten. Am *CKX2*-Locus wurden lncNATs identifiziert, welche in einem Bereich *upstream* bis zum ersten Exon des *CKX2*-Transkripts lagen und diverse Exon-Intron-Strukturen besaßen. Am *CKX4*-Locus wurde ein NAT-EST detektiert, welches mit einem Teil des ersten *CKX4*-Exons überlappte und keine Introns beinhaltete. Am *CKX5*-Locus wurde ein NAT-EST detektiert, welches nahezu die komplette Sequenz des proteinkodierenden *tail-to-tail*-NAT *UBC16* enthielt und darüber hinaus mit der kompletten Sequenz des fünften *CKX5*-Exons und einem Teil des vierten *CKX5*-Introns überlappte. Am *CKX6*-Locus wurden weitere lncNATs sowie NAT-ESTs identifiziert, welche die Existenz und strukturelle Diversität der *CKX6*-NATs unterstützten. Am *CKX7*-Locus wurden kurze NAT-ESTs detektiert, welche im Bereich des dritten bzw. vierten *CKX7*-Exons mit diesem überlappten.

Die *in silico* Analyse zeigte somit, dass an jedem der sieben *CKX*-Loci Hinweise auf NATs existieren, welche möglicherweise die Aktivität der *CKX*-Gene beeinflussen könnten.

3.1.2 Experimenteller Nachweis von *CKX*-NATs

Um die Hinweise auf *CKX*-NATs aus der *in silico*-Analyse zu verifizieren, sollten jene NATs, deren Exon-Intron-Strukturen von der des jeweiligen *CKX*-Transkripts abwichen, mittels semiquantitativer RT-PCR experimentell nachgewiesen werden (Abbildung 8A). Die Position der Primer zur Amplifikation der Transkriptsequenzen wurde dabei so gewählt, dass vermutete NAT-Amplikons sich in ihrer Größe von den *CKX*-Amplikons unterscheiden (Abbildung 7). Am *CKX1*- und *CKX6*-Locus konnten so zwei Amplikons bzw. ein Amplikon identifiziert werden, welche sich in ihrer Größe von der erwarteten Amplikongröße des jeweiligen *Sense*-Transkripts unterschieden. Am *CKX3*- und *CKX5*-Locus wurde jeweils ein Fragment amplifiziert, obwohl je ein Primer innerhalb des *CKX*-Introns positioniert war. An den Loci von *CKX2* und *CKX7* wurde keine Transkriptstruktur beobachtet, welche von der des *Sense*-Transkripts abwich. Es wurde keine Untersuchung des *CKX4*-Locus durchgeführt, da an diesem zum Zeitpunkt der Analyse keine Hinweise auf NATs beobachtet worden waren.

Jene Loci, an denen Amplikons beobachtet wurden und deren Größe nicht dem jeweiligen *CKX*-Transkript entsprach, wurden mittels strangspezifischer RT-PCR näher analysiert (Abbildung 8B). Der alleinige Einsatz des genspezifischen *reverse*- bzw. *forward*-Primers in der strangspezifischen cDNA-Synthese ermöglichte die reverse Transkription von ausschließlich *Sense*- bzw. *Antisense*-Transkripten des entsprechenden Locus. In der anschließenden RT-PCR wurden demnach entweder nur *CKX*-Transkripte oder nur NATs amplifiziert. Die Analyse bestätigte, dass die Amplikons mit abweichender Größe an den Loci von *CKX1*, *CKX5* und *CKX6* *Antisense*-Transkripten

entsprachen. Dagegen stammte das Amplikon am *CKX3*-Locus von einem *Sense*-Transkript und weist möglicherweise auf eine bisher unbekannte *CKX3*-Isoform hin, welche durch alternatives Spleißen entsteht.

Die Untersuchung hat bestätigt, dass NATs an den Loci von *CKX1*, *CKX5* und *CKX6* existieren, welche sich in ihrer Exon-Intron-Struktur von jener der *Sense*-Transkripte unterscheiden.

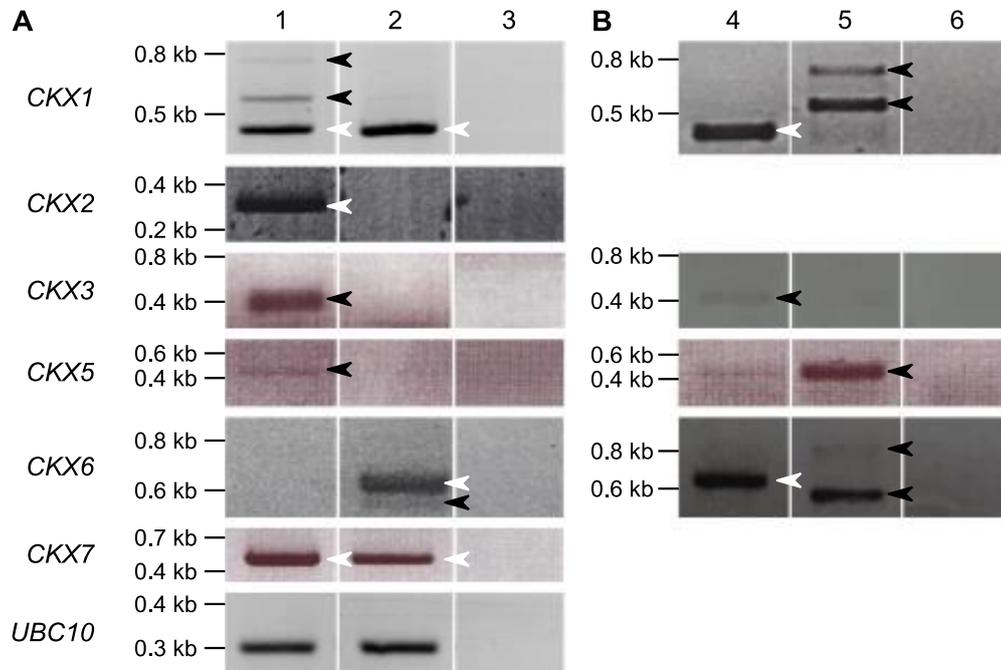


Abbildung 8: Experimenteller Nachweis von *CKX*-NATs.

(A) Amplifikation von Transkripten an den *CKX*-Loci mittels semiquantitativer RT-PCR auf Gesamt-cDNA, welche von RNA aus 1) Infloreszenzen bzw. 2) Rosetten revers transkribiert wurde, oder auf 3) ddH₂O als Negativkontrolle. *UBC10* diente zur Kontrolle der cDNA-Menge. (B) Amplifikation von 4) *Sense*- bzw. 5) *Antisense*-Transkripten an den *CKX*-Loci mittels strangspezifischer RT-PCR auf Gesamt-RNA aus Infloreszenzen (*CKX1*-*CKX5*) bzw. Rosetten (*CKX6*) oder auf 6) ddH₂O als Negativkontrolle. Weiße Pfeile zeigen die erwartete Größe des annotierten *Sense*-Transkripts an, schwarze Pfeile zeigen Amplikate mit einer davon abweichenden Größe an. Die Lage der verwendeten Primer ist im Anhang (Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33) dargestellt. Die Fragmente wurden mit 30 bis 35 Zyklen amplifiziert.

3.2 Strukturelle Charakterisierung von *CKX*-NATs

3.2.1 *CKX*-NATs besitzen diverse alternative Transkriptenden, einen Poly-A-Schwanz und eine 5'-Cap-Struktur

Zunächst sollte die molekulare Struktur der identifizierten NATs am *CKX1*-, *CKX5*- sowie *CKX6*-Locus näher untersucht werden. Dafür wurde eine RACE-Analyse durchgeführt, die es ermöglichte, die 5'- und 3'-Enden der Transkripte zu identifizieren. Als Ausgangsmaterial wurde Gesamt-RNA aus Infloreszenzen genutzt. Die verwendete Methode isoliert Transkriptenden strangspezifisch, wodurch gewährleistet war, dass die vom gleichen DNA-Abschnitt transkribierten *Sense*-Transkripte nicht detektiert wurden. Um die Selektivität der Methode noch zu erhöhen, wurden die genspezifischen RACE-Primer so positioniert, dass sie an Transkriptbereiche der NATs binden, welche nicht mit einem *CKX*-Exon überlappen (Abbildung 10). Das verdünnte PCR-Produkt dieser RACE-PCR wurde

anschließend als Template in eine *nested* RACE-PCR eingesetzt, bei der ein weiterer genspezifischer Primer sowie ein *nested* Universalprimer eingesetzt wurden, um eventuelle unspezifische RACE-Fragmente auszuschließen. Die amplifizierten 5'- und 3'-RACE-Fragmente der CKX-NATs wurden mithilfe eines Agarosegels ihrer Größe nach aufgetrennt (Abbildung 9).

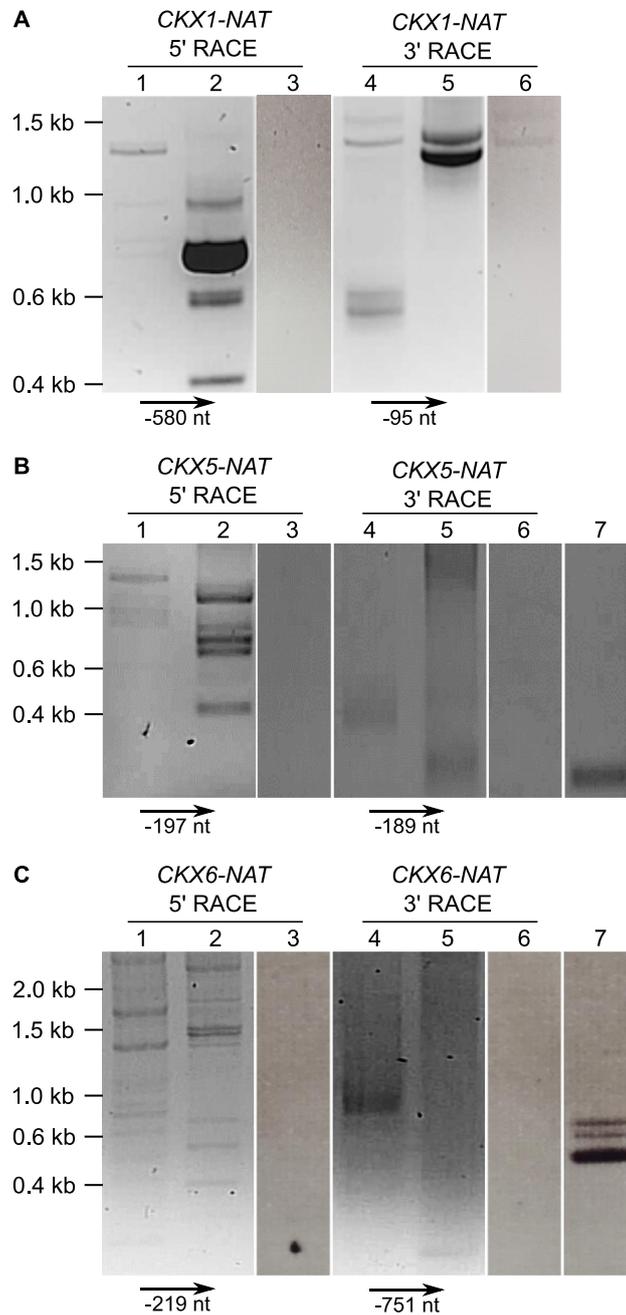


Abbildung 9: Isolierung der CKX-NAT-Transkriptenden.

Auf einem Agarosegel aufgetrennte Amplifikate der 1) & 4) RACE- und 2) & 5) *nested* RACE-PCRs sowie Kontrollen für die NATs von **(A) CKX1**, **(B) CKX5** und **(C) CKX6**. Folgende Kombinationen aus genspezifischen Primern (GSP), *nested* genspezifischen Primern (nGSP), dem Universalprimer (UP) und dem *nested* Universalprimer (nUP) wurden verwendet: 1) & 3) GSP1 + UP, 2) nGSP1 + nUP, 4) & 6) GSP2 + UP, 5) nGSP2 + nUP bzw. 7) GSP1 + GSP2. Die Lage der verwendeten GSP-Primer ist im Anhang (Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33) dargestellt. Als Template diente 1), 4) & 7) Gesamt-cDNA, welche von RNA aus Infloreszenz revers transkribiert wurde, 2) & 5) das Produkt der entsprechenden RACE-PCR oder 3) & 6) ddH₂O als Negativkontrolle. Die Fragmente wurden mit 28 bis 34 Zyklen amplifiziert. Die Größendifferenz zwischen den RACE-PCR-Produkten und den entsprechenden *nested* RACE-PCR-Produkten ist unter den schwarzen Pfeilen abgebildet.

Sowohl die Visualisierung der 5'- und 3'-RACE-Fragmente der *CKX1-NATs* als auch jene der 5'-RACE-Fragmente der *CKX5-* sowie *CKX6-NATs* zeigte mehrere distinkte Banden, was auf das Vorhandensein von verschiedenen Spleißvarianten oder von alternativen Transkriptionsstarts und -stops hinweist. Die Auftrennung der 3'-RACE-Fragmente der *CKX5-* und *CKX6-NATs* zeigte jeweils nur eine diffuse Bande, was auf nur geringe Größenunterschiede der Fragmente hindeutet. Um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten 5'- und 3'-RACE-Fragmenten tatsächlich um Teile eines zusammenhängenden Transkripts handelt, wurden Kontroll-PCRs mit beiden genspezifischen Primern (GSP1 und GSP2) durchgeführt. Für *CKX5-* und *CKX6-NATs* konnten Fragmente amplifiziert werden. Diese entsprachen den Größen von 210 bp für *CKX5-NAT* bzw. 664 bp und 501 bp für *CKX6-NAT*, die aufgrund der *in silico*-Analyse zu erwarten waren. Für *CKX6-NAT* wurde zudem eine weitere Bande (ca. 600 bp) identifiziert, welche auf eine bislang noch unbekannte Spleißvariante des *CKX6-NAT* hinweist. Die Kontrollen bewiesen, dass durch die beiden Primer die Enden eines zusammenhängenden Transkripts amplifiziert werden. Eine solche Kontrolle war für die *CKX1-NATs* nicht möglich, da beide Primer sich komplett überlappten. Aufgrund dieser Überlappung wird jedoch ebenso angenommen, dass durch beide Primer die Enden eines Transkripts isoliert werden.

Für die Sequenzierung der Transkriptenden wurden die Produkte der RACE-PCR bzw. *nested* RACE-PCR zunächst in den PCR-Klonierungsvektor *pJET1.2* kloniert. Die Insertion der PCR-Produkte in den Vektor wurde mittels PCR überprüft, wobei Primer genutzt wurden, welche die Insertion umschließen. Die verschiedenen Klone jedes Klonierungsansatzes wiesen unterschiedliche Amplikongrößen auf, welche den verschiedenen Banden der jeweiligen RACE-PCR bzw. *nested* RACE-PCR entsprachen. Um möglichst viele unterschiedliche Exon-Intron-Strukturen und Transkriptenden zu identifizieren, wurden für die Sequenzierung der RACE- bzw. nRACE-Produkte unterschiedliche Klone ausgewählt, deren Insertgrößen sich unterschieden. Für die *NATs* aller drei untersuchten *CKX*-Gene zeigten die Sequenzierungen der *nested* RACE-Fragmente diverse Positionen der Transkriptionsinitiation und der Transkriptionstermination (Abbildung 10 und Abbildung 11).

Die Transkriptionsstarts des *CKX1-NATs* befanden sich in einem Bereich von 356 bp bis 275 bp *downstream* des *CKX1*-Transkripts (Abbildung 10). Das 5'-Ende 294 bp *downstream* des *CKX1*-Transkripts wurde am häufigsten detektiert (4 von 12 5'-Enden; Tabelle 20 und Abbildung 11). Die Transkriptionsenden waren auf zwei Bereiche verteilt (Abbildung 10). Sechs der 14 sequenzierten 3'-RACE-Fragmente endeten am ersten Nukleotid des 5'-UTRs von *CKX1*. Die verbleibenden 3'-Enden des *CKX1-NATs* lagen in einem Bereich von 2307 bp bis 2370 bp *upstream* des *CKX1*-Transkripts. Die isolierten Transkriptionsstarts der *CKX5-NATs* befanden sich in einem Bereich von 924 bp *downstream* des *CKX5*-Transkripts bis zum 312. bp des fünften *CKX5*-Exons (Abbildung 10). Letzteres stellte das am häufigsten detektierte 5'-Ende dar (6 von 14 5'-Enden; Tabelle 20 und Abbildung 11). Mit Ausnahme von diesen befanden sich alle 5'-Enden der *CKX5-NATs* innerhalb des *UBC16*-Locus. Die Transkriptionsstopps der *CKX5-NATs* lagen in einem Bereich vom 54. bp des vierten Introns bis zum 12. bp des vierten Exons von *CKX5*, wobei letzteres zweimal und die übrigen

jeweils einmal detektiert wurden (Tabelle 20 und Abbildung 11). Die Transkription der isolierten *CKX6-NAT*-Fragmente wurde in einem Bereich vom 73. bp des 3'-UTRs von *CKX6* bis 351 bp *upstream* des *CKX6*-Transkripts initiiert (Abbildung 10), wobei das erstere 5'-Ende am häufigsten detektiert wurde (3 von 13 5'-Enden; Tabelle 20 und Abbildung 11). In einem Bereich von 1424 bp bis 1557 bp *upstream* des *CKX6*-Transkripts wurden die isolierten *CKX6-NAT*-Fragmente terminiert (Abbildung 10), wobei das 3'-Ende 1481 bp *upstream* des *CKX6*-Transkripts am häufigsten detektiert wurde (4 von 10 3'-Enden; Tabelle 20 und Abbildung 11).

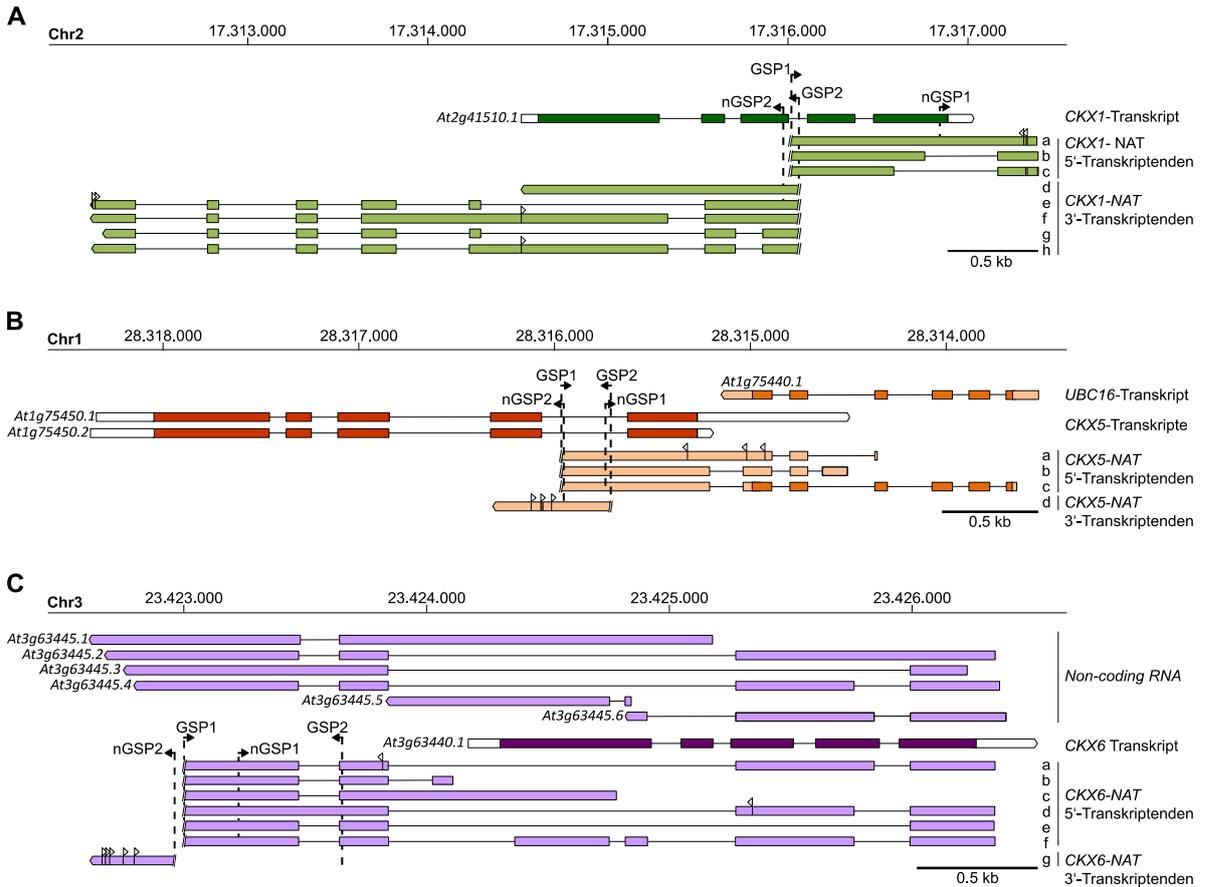


Abbildung 10: *CKX1*, *CKX5*, *CKX6* und ihre *cis*-NATs.

(A-C) Schematische Darstellung der genomischen Bereiche von (A) *CKX1*, (B) *CKX5* und (C) *CKX6*. Unterhalb der *CKX*-Gene sind die in der 5'- und 3'-RACE-Analyse identifizierten Transkriptenden der jeweiligen NATs gezeigt. Bereits annotierte NATs sind oberhalb der *CKX*-Gene dargestellt. Boxen repräsentieren Exons, wobei kodierende Bereiche dunkel dargestellt sind. Weiße Pfeile zeigen alternative Transkriptionsstarts und -stopps an. Schwarze Pfeile markieren die Positionen der genspezifischen RACE-Primer (GSP) bzw. *nested* RACE-Primer (nGSP). Kleinbuchstaben kennzeichnen die verschiedenen Isoformen der NATs, deren Häufigkeit der Abbildung 11 entnommen werden kann.

Tabelle 20: Anzahl sequenzierter RACE-Fragmente.

<i>CKX1-NAT</i> Isoform	a	b	c	d	e	f	g	h
Anzahl sequenzierter Klone	5	2	5	1	4	5	1	3
<i>CKX5-NAT</i> Isoform	a	b	c	d				
Anzahl sequenzierter Klone	12	1	1	7				
<i>CKX6-NAT</i> Isoform	a	b	c	d	e	f	g	
Anzahl sequenzierter Klone	3	1	2	4	2	1	10	

Die Isoformen sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt

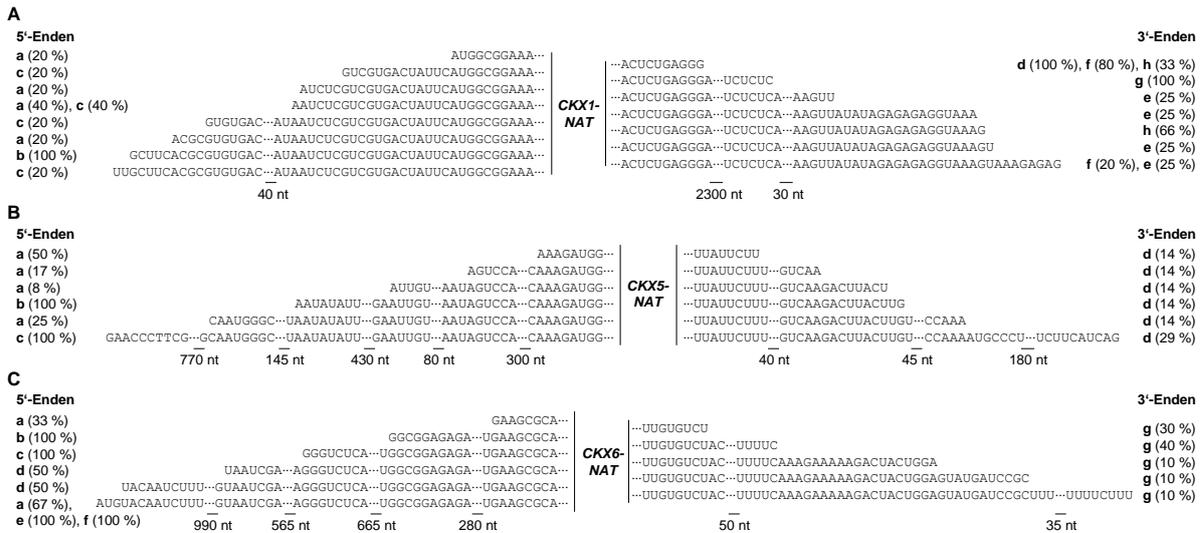


Abbildung 11: Transkriptenden der *CKX-NATs*.

Sequenzen der mittels RACE-Analyse isolierten 5'- sowie 3'-Enden von (A) *CKX1-NATs*, (B) *CKX5-NATs* und (C) *CKX6-NATs*. Kleinbuchstaben geben die Isoformen an, bei denen die jeweiligen Enden gefunden wurden und deren Häufigkeit relativ zur Gesamtanzahl der Isoform. Die Isoformen sind in der Abbildung 10 und Tabelle 20 zu finden.

Die verwendete Methode der RACE-Analyse beinhaltet die Synthese von *full-length* cDNA mithilfe eines Adapterprimers, der spezifisch an den Poly-A-Schwanz von Transkripten bindet. Somit kann angenommen werden, dass alle identifizierten *CKX-NAT*-Isoformen polyadenyliert sind.

Um zu untersuchen, ob die Transkripte zudem eine 5'-Cap-Struktur besitzen, wurde eine TEX-Behandlung von Infloreszenz-RNA mit anschließender RT-PCR durchgeführt (Abbildung 12). Nach der Behandlung der RNA mit TEX waren die distinkten Banden der rRNAs nicht mehr sichtbar, was auf eine erfolgreiche Degradierung aller RNAs ohne 5'-Cap-Struktur hindeutet. Für die folgende RT-PCR wurden Primerkombinationen verwendet, welche spezifisch Fragmente der *CKX-NATs* amplifizierten, ohne jedoch deren *Sense*-Transkripte zu detektieren. Die PCR-Produkte für alle drei *CKX-NATs* konnten in der TEX-behandelten Probe amplifiziert werden, was darauf hinweist, dass die *NATs* an den drei *CKX*-Loci eine 5'-Cap-Struktur besitzen. Dies deutet darauf hin, dass die identifizierten *CKX-NATs* von der RNA-Polymerase II transkribiert und in der Zelle stabilisiert werden, was die Annahme unterstützt, dass es sich um funktionale Transkripte handelt und nicht um „transcriptional noise“.

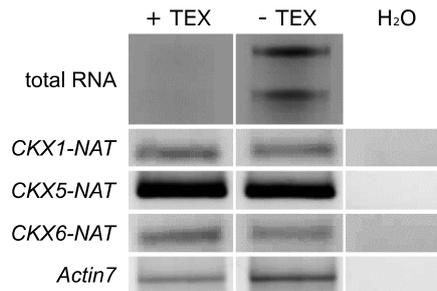


Abbildung 12: Nachweis der 5'-Cap-Struktur an CKX-NATs.

Visualisierung der RT-PCR-Amplifikate für *CKX1*-, *CKX5*- sowie *CKX6*-NATs. Als Template diente GesamtcDNA, welche von der oben dargestellten TEX-behandelten (+ TEX) oder *mock*-behandelten (- TEX) Infloreszenz-RNA revers transkribiert wurde, bzw. ddH₂O als Negativkontrolle. *Actin7* diente zur Kontrolle der cDNA-Menge. Die Fragmente wurden in 35 bis 45 Zyklen amplifiziert.

3.2.2 CKX-NATs bilden diverse Isoformen mit variablen Exon-Intron-Strukturen

Die Sequenzierung der Transkriptenden hat gezeigt, dass alle drei *CKX-NATs* durch mehrere Isoformen repräsentiert wurden, die sich in ihrer Exon-Intron-Struktur unterschieden (Abbildung 10). An allen drei *CKX*-Loci konnte beobachtet werden, dass sich NAT-Introns sowohl in den Bereichen befanden, welche mit dem *Sense*-Transkript überlappen, als auch in jenen, die *upstream* oder *downstream* der *Sense*-Transkripte liegen. Alle identifizierten Introns besaßen die in Eukaryoten konservierten Konsensussequenzen 5'-GU-3' am 5'-Ende und 5'-AG-3' am 3'-Ende. *CKX1-NAT* besaß im Bereich von 687 bp bis 2307 bp *upstream* des *CKX1*-Transkripts eine konservierte Transkriptstruktur. Diese beinhaltete drei Introns und war in allen *CKX1-NAT*-Isoformen enthalten, deren Transkription *upstream* von *CKX1* terminiert wurde. Die Transkriptstruktur von *CKX5-NAT* glich teilweise dem proteinkodierenden *tail-to-tail* NAT *UBC16*, jedoch wurden auch Bereiche identifiziert, in denen sich die Exon-Intron-Strukturen unterschieden. Das erste Exon der *CKX5-NAT*-Isoform b befand sich innerhalb des vierten *UBC16*-Introns und das letzte Intron der *CKX5-NAT*-Isoformen b und c begann im 3'-UTR und endete *downstream* des *UBC16*-Transkripts. Viele der Transkriptstrukturen des *CKX6-NAT* deckten sich mit den *in silico* identifizierten lncNATs von *CKX6*. Es konnte jedoch das erste bzw. vierte Intron der *CKX6-NAT*-Isoformen b bzw. f als bisher noch nicht beschriebene *CKX6-NAT*-Transkriptstrukturen beobachtet werden. Die Häufigkeiten der mittels RACE-Analyse detektierten *CKX-NAT*-Isoformen sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Durch die RACE-Analyse konnten diverse *CKX1-NAT*-Isoformen identifiziert werden, deren Strukturen größtenteils mit den *in silico* analysierten ESTs übereinstimmten (Abbildung 7). Lediglich das zweite Intron des ESTs SRR391051_SRR391052_35880 konnte durch die RACE-Analyse nicht bestätigt werden. Abgesehen von der konservierten Transkriptstruktur am 3'-Ende des *CKX1-NAT*, konnten die Sequenzen der *in silico* gefundenen, hypothetisch proteinkodierenden NATs nicht in der RACE-Analyse detektiert werden. Um weitere Isoformen zu identifizieren, wurden zusätzliche PCRs durchgeführt. Zum einen wurde eine *nested* RACE-PCR durchgeführt, bei der ein genspezifischer *CKX1-NAT*-Primer (nGSP3), welcher 2207 bp *upstream* des *CKX1*-Transkripts an das *CKX1-NAT* bindet, und der Universalprimer verwendet wurden (Primerpositionen dargestellt im Anhang, Abbildung 31). Die *nested* RACE-PCR-Produkte wurden in *pJET1.2* kloniert und vier Klone, deren *nested* RACE-Fragmente sich in ihrer Größe unterschieden, wurden sequenziert. Die Ergebnisse

konnten das EST-Intron nicht bestätigen, es konnten allerdings weitere Transkriptenden bis 2714 bp *upstream* des *CKX1*-Transkripts identifiziert werden (Anhang, Abbildung 31). Zum anderen wurde eine weitere 3'-RACE-PCR durchgeführt, welche *CKX1-NATs* mit nahezu voller Länge amplifizieren sollte. Dafür wurde ein genspezifischer Primer (GSP3) genutzt, der 264 bp *downstream* des *CKX1*-Transkripts an *CKX1-NAT* bindet und somit nahe an dessen identifizierten 5'-Enden liegt. Diese 3'-RACE-PCR wurde verdünnt als Template für verschiedene PCRs mit diversen Primerkombinationen eingesetzt (Primerpositionen dargestellt im Anhang, Abbildung 31). Damit wurden über den gesamten Bereich der identifizierten *CKX1-NATs* verschiedene Transkriptstrukturen durch unterschiedliche Produktgrößen innerhalb einer PCR sichtbar gemacht. Jene PCR-Banden, deren Größe nicht den bereits bekannten Isoformen zugeordnet werden konnten, wurden isoliert, in *pJET1.2* kloniert und sequenziert. Es konnten so 13 weitere *CKX1-NAT*-Isoformen identifiziert werden (Isoformen j – v, dargestellt im Anhang, Abbildung 31). Die Isoformen t und u enthielten das zweite Intron des ESTs SRR391051_SRR391052_35880, dessen Existenz somit bestätigt werden konnte. Die Strukturen der hypothetisch proteinkodierenden lncNATs *At2g41505* und *At2g41515* konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Acht der neu identifizierten Isoformen besaßen ein langes Intron nahe des *CKX1-NAT*-Transkriptionsstarts, welches den gesamten Bereich des *CKX1*-Transkripts überspannte. Bei zwei weiteren Isoformen befand sich innerhalb dieses Introns eine kurze Exonsequenz, welche mit einem Teil des fünften *CKX1*-Exons überlappte. Zudem wurde beobachtet, dass die Positionen dreier Exon-Intron-Grenzen sich in verschiedenen Isoformen um vier, fünf bzw. sechs Nukleotide unterschieden (Anhang, Abbildung 31).

Da die RACE-Fragmente für die Sequenzierung so vorausgewählt wurden, dass möglichst viele unterschiedliche Transkriptstrukturen identifiziert wurden, bildeten die Häufigkeiten der detektierten Transkriptisoformen nicht die jeweiligen Transkriptabundanzen ab. Um zu untersuchen, ob es dominante Transkriptisoformen der *CKX-NATs* gibt, welche in allen Geweben am stärksten abundant sind, wurde eine Reihe von RT-PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt, welche die Unterscheidung der verschiedenen Isoformen ermöglichte. Für nahezu alle getesteten Primerkombinationen konnte beobachtet werden, dass in den verschiedenen Geweben die gleichen Fragmentgrößen am stärksten amplifiziert wurden (Abbildung 13). Daraus kann geschlossen werden, dass es tatsächlich dominante Isoformen der *CKX-NATs* gibt, deren Abundanz in der Regel am höchsten ist. Zwei Ausnahmen davon sind in Abbildung 13 B und D gezeigt. In Abbildung 13 B wurde in Wurzel, Rosette und Infloreszenz das Fragment mit der Größe von 197 bp am stärksten amplifiziert, welches der *CKX1-NAT*-Isoform c entspricht. In den Schoten war jedoch das Fragment mit der Größe von 345 bp am stärksten, welches der Isoform b entspricht. In Abbildung 13 D wurde in Wurzel und Rosette das Fragment mit der Größe 1247 bp am stärksten amplifiziert, welches der *CKX1-NAT*-Isoform f entspricht. In den Infloreszenzen jedoch wurde die Isoform h mit einer Fragmentgröße von 843 bp am stärksten amplifiziert. Das dominante Fragment der Abbildung 13 C wies eine Größe von 437 bp auf, was der *CKX1-NAT*-Isoform f entspricht. Die stärkste Amplifikation in Abbildung 13 E stellt mit 475 bp die konservierte Struktur am 3'-Terminus von *CKX1-NAT* dar, welche in den Isoformen e bis f zu finden ist. Die stärkste Amplifikation über nahezu den gesamten Bereich des *CKX1-NAT* wurde bei ca. 670 bp beobachtet, was den *CKX1-NAT*-Isoformen j, k, o und

p entsprechen könnte (Abbildung 13A). In der Abbildung 13F und G sind die Amplifikate der PCRs auf *CKX5-NAT* dargestellt. In Abbildung 13F kann die stärkste Amplifikation bei jenen Fragmenten beobachtet werden, welche beide in diesem Bereich liegenden Introns beinhalten. Die Abbildung 13G zeigt nur eine Fragmentgröße, was bestätigt, dass in dem amplifizierten Bereich keine weiteren Spleißvarianten existieren. Die Abbildung 13H und I zeigen die Abundanz der *CKX6-NAT*-Isoformen. Die stärkste Amplifikation über nahezu den gesamten Bereich des *CKX6-NAT* hatte eine Länge von 949 bp (Abbildung 13H), was der *CKX6-NAT*-Isoform e entspricht. In Abbildung 13I entspricht die stärkste Amplifikation mit einer Länge von 597 bp jenen Fragmenten, die das letzte *CKX6-NAT*-Intron besitzen. Generell wurde die Tendenz beobachtet, dass die Isoformen mit mehr und/oder größeren Introns stärker abundant waren.

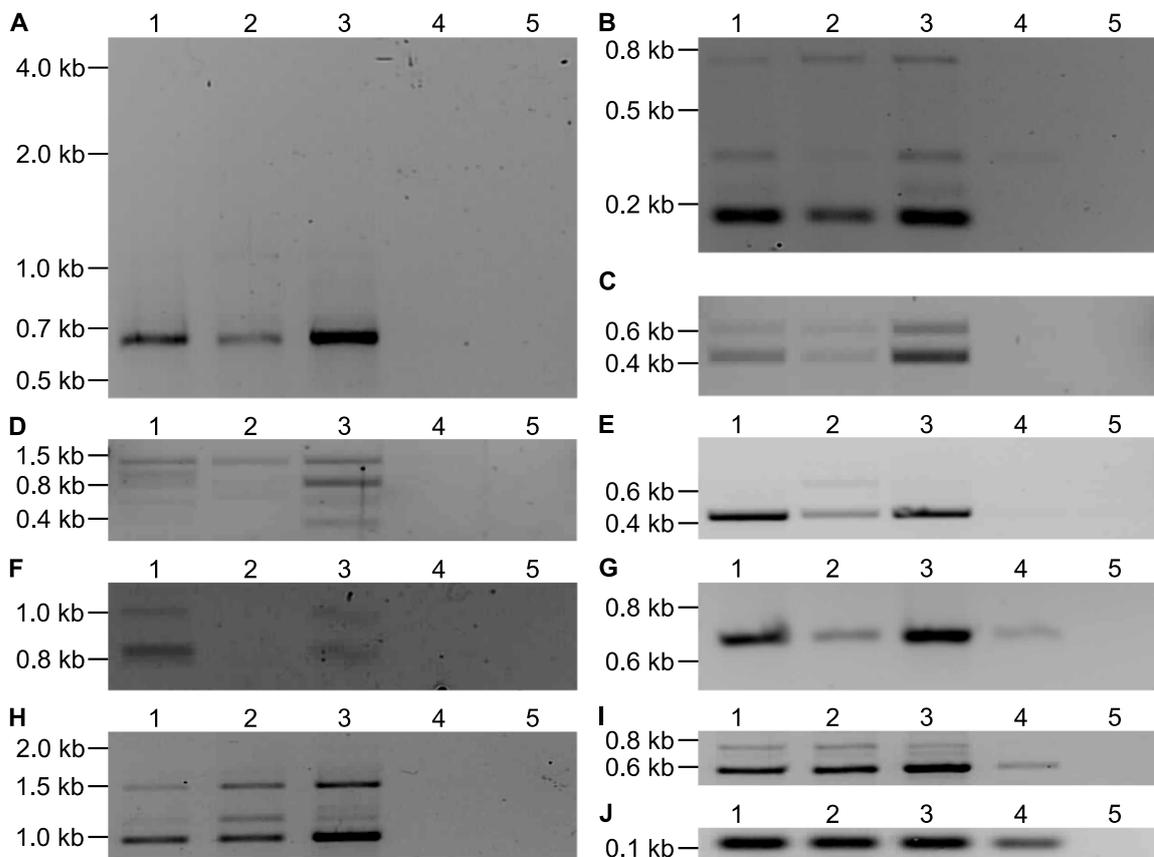


Abbildung 13: Abundanz der *CKX-NAT*-Isoformen in unterschiedlichen Geweben.

Auf einem Agarosegel aufgetrennte RT-PCR-Amplifikate zur Identifikation der abundantesten Isoformen von (A-E) *CKX1-NAT*, (F-G) *CKX5-NAT* und (H-I) *CKX6-NAT*. Als Template diente cDNA, die von Gesamt-RNA aus 1) Wurzeln, 2) Rosetten 12 Tage alter Keimlinge, 3) Infloreszenzen bzw. 4) Schoten oder 5) ddH₂O als Negativkontrolle revers transkribiert wurde. (J) *TAFII15* diente zur Kontrolle der cDNA-Menge. Die Lage der verwendeten Primer sind im Anhang (Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33) dargestellt. Die Fragmente wurden in (A-I) 35 bzw. (J) 25 Zyklen amplifiziert.

3.2.3 *In silico*-Analyse der Proteinkodierungskapazität der *CKX-NATs*

In der *in silico*-Analyse zur Identifikation von *CKX-NATs* wurden sowohl proteinkodierende als auch nicht-kodierende Transkripte als *NATs* der *CKXs* vorhergesagt. Gemeinhin werden Transkripte als proteinkodierend anerkannt, wenn sie ein mögliches ORF mit einer Länge von mehr als 300 bp besitzen (Yazhini, 2018). Um zu untersuchen, ob die mittels RACE-Analyse isolierten *CKX-NATs*

möglicherweise für Proteine kodieren, wurden die möglichen ORFs in ihren Transkriptsequenzen (Anhang, Tabelle 26) identifiziert. Für das längste ORF jeder *CKX-NAT*-Isoform wurde mittels BLASTp nach homologen Proteinsequenzen in der RefSeq-Datenbank gesucht. Es wurden alle Sequenzen mit einem *E-value* von < 1 berücksichtigt. Eine Auflistung der Proteine bzw. Peptide und deren homologe Proteine befindet sich in Tabelle 21.

Tabelle 21: Peptide bzw. Proteine der längsten ORFs der *CKX-NAT*-Isoformen und deren homologe Proteine.

Transkript- isoform ¹	Protein-/ Peptid- länge ²	Homologe Proteine identifiziert mittels BLAST-Analyse ³		Query cover ⁵	E- value ⁶	Identity ⁷
		RefSeq-Annotation	Beschreibung ⁴			
<i>CKX1-NAT</i> <i>a</i>	73 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	39%	1e-05	82.76%
<i>CKX1-NAT</i> <i>b</i>	88 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	82%	4e-43	97.26%
		EFH58039.1	predicted protein [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]	55%	1e-06	59.18%
<i>CKX1-NAT</i> <i>c</i>	73 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	56%	2e-21	100.00%
		RWV85650.1	hypothetical protein GW17_00052543 [<i>Ensete ventricosum</i>]	65%	0.03	37.50%
		BBH07289.1	hypothetical protein Prudu_019175 [<i>Prunus dulcis</i>]	49%	0.57	38.89%
<i>CKX1-NAT</i> <i>d, f, h, t</i>	60 aa	-				
<i>CKX1-NAT</i> <i>e, g, k, l, u</i>	58 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	100%	3e-34	100.00%
		XP_020882875.1	uncharacterized protein LOC110228908 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]	96%	7e-24	85.71%
		XP_019082318.1	uncharacterized protein LOC104793064 [<i>Camelina sativa</i>]	100%	2e-211	60.00%
		XP_023640883.1	uncharacterized protein LOC111831218 [<i>Capsella rubella</i>]	81%	0.05	63.83%
<i>CKX1-NAT</i> <i>i</i>	63 aa	-				
<i>CKX1-NAT</i> <i>j, o</i>	70 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	62%	2e-19	90.91%
<i>CKX1-NAT</i> <i>m</i>	66 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	66%	1e-19	90.91%
<i>CKX1-NAT</i> <i>n</i>	101 aa	NP_001324962.1	hypothetical protein AT2G41505 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	67%	5e-38	95.59%
		XP_020882875.1	uncharacterized protein LOC110228908 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]	55%	1e-23	85.71%
		NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	37%	3e-18	100.00%
		XP_019082318.1	uncharacterized protein LOC104793064 [<i>Camelina sativa</i>]	57%	5e-11	60.00%
		XP_023640883.1	uncharacterized protein LOC111831218 [<i>Capsella rubella</i>]	52%	4e-04	64.15%
<i>CKX1-NAT</i> <i>p, q</i>	91 aa	NP_001324962.1	hypothetical protein AT2G41505 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	62%	5e-33	100.00%
		XP_020882875.1	uncharacterized protein LOC110228908 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]	61%	2e-23	85.71%
		XP_019082318.1	uncharacterized protein LOC104793064 [<i>Camelina sativa</i>]	65%	2e-11	58.06%
		XP_023640883.1	uncharacterized protein LOC111831218 [<i>Capsella rubella</i>]	51%	0.06	63.83%
<i>CKX1-NAT</i> <i>r</i>	94 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	46%	2e-19	90.91%

ERGEBNISSE

<i>CKX1-NAT</i> <i>s</i>	40 aa	NP_001323944.1	hypothetical protein AT2G41515 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	100%	5e-19	100.00%
<i>CKX1-NAT</i> <i>v</i>	54 aa	-				
<i>CKX5-NAT</i> <i>a, b</i>	55 aa	-				
<i>CKX5-NAT</i> <i>c</i>	161 aa	NP_565110.1	ubiquitin-conjugating enzyme 16 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	100%	4e-118	100.00%
<i>CKX5-NAT</i> <i>d</i>	68 aa	-				
<i>CKX6-NAT</i> <i>a, d, f</i>	76 aa	TVU19139.1	hypothetical protein EJB05_35273 [<i>Eragrostis curvula</i>]	55%	9e-09	61.90%
<i>CKX6-NAT</i> <i>b, c</i>	42 aa	-				
<i>CKX6-NAT</i> <i>e</i>	59 aa	-				
<i>CKX6-NAT</i> <i>g</i>	61 aa	AAM97111.1	unknown protein [Arabis thaliana]	100%	2e-36	100.00%

¹ entsprechend Anhang, Abbildung 31 und Tabelle 26.

² Länge des Peptids bzw. Proteins, das aus dem längsten ORF der Isoform entstehen könnte

³ berücksichtigt wurden Alignments mit einem *E-value* ≤ 1

⁴ entsprechend der RefSeq-Proteinbeschreibung (Tabelle 7; 17.04.2020)

⁵ prozentualer Anteil der Länge des Alignments an der Gesamtlänge der CKX-NAT-Peptid- bzw. Proteinsequenz

⁶ *Expect value* (deutsch: Erwartungswert), näher beschrieben in Kapitel 2.2.8.1.2

⁷ prozentualer Anteil identischer Aminosäuren von der Gesamtlänge des Alignments

Zwölf der 13 längsten ORFs der *CKX1-NAT*-Isoformen waren zwischen 123 nt und 285 nt lang. Diese Transkripte wurden somit als lncRNA angesehen. Nur eine Isoform besaß ein ORF mit einer Länge von 306 nt, womit es als proteinkodierendes Transkript galt. Zehn der Proteine bzw. Peptide, welche von den *CKX1-NAT*-Isoformen translatiert werden könnten, besaßen homologe Sequenzen zu den hypothetischen Proteinen der am *CKX1*-Locus vorhergesagten Gene *At2g41505* und *At2g41515* (NP_001324962.1 bzw. NP_001323944.1). Diese Proteine wurden mittels *Conceptual Translation* annotiert (Information, Stand 14.01.2020), d.h. die Transkriptsequenz wurde entsprechend des genetischen Codes in eine Proteinsequenz übersetzt. Experimentell wurde die Existenz dieser Proteine jedoch bislang nicht nachgewiesen. Keines der möglichen Peptide bzw. Proteine der isolierten *CKX1-NAT*-Isoformen stimmte über die gesamte Länge der vorhergesagten Proteine mit deren Aminosäuresequenz überein, wie es bereits aufgrund der abweichenden Transkriptstrukturen zu erwarten war. Sechs der Peptid- bzw. Proteinsequenzen wiesen zudem Homologien zu einem oder mehreren hypothetischen Proteinen anderer Pflanzenspezies auf, welche ebenfalls mittels *Conceptual Translation* vorhergesagt wurden. Darunter befanden sich drei hypothetische Peptide, die weniger als 100 aa lang waren und als Produkte von NATs vorhergesagt wurden, welche komplementär zu den orthologen *CKX1*-Transkripten der Spezies *Arabidopsis lyrata* (*A. lyrata*), *Camelina sativa* (*C. sativa*) sowie *Capsella rubella* (*C. rubella*) transkribiert werden. Die *CKX1-NAT*-Isoform *c* zeigte eine Homologie zu einem hypothetischen Protein der Spezies *Ensete ventricosum* und *Prunus dulcis*, für die jedoch keine Transkriptomdaten verfügbar waren (Stand 14.01.2020). Für drei der möglichen ORFs der *CKX1-NAT*-Isoformen wurden keine homologen Proteinsequenzen mit einem *E-value* von < 1 identifiziert.

Die Isoformen *CKX5-NAT a, b* und *d* enthielten ORFs mit einer Länge von 168 nt bis 207 nt, die entsprechenden Peptide wiesen jedoch keine Homologien zu annotierten Proteinen mit einem *E-value* von < 1 auf. Wie bereits zuvor beschrieben, beinhaltet die Isoform *CKX5-NAT c* ein 486 nt langes ORF mit der CDS für das Protein UBC16.

Die längsten möglichen ORFs der *CKX6-NAT*-Isoformen wiesen eine Länge zwischen 129 nt und 231 nt auf. Das mögliche Peptid der Isoformen *CKX6-NAT a, d* und *f* besaß eine Homologie zu einem hypothetischen Protein des Virus *Eragrostis curvula*. Das Peptid der Isoform *CKX6-NAT g* entsprach einem hypothetischen Peptid, welches mittels *Conceptual Translation* für die *CKX6-NAT*-Transkriptisoformen *At3g63445.1, At3g63445.2* und *At3g63445.3* vorhergesagt wurde.

3.3 *CKX-NATs* werden gewebespezifisch exprimiert

Es sollte zunächst untersucht werden, in welchen Pflanzengeweben die *CKX-NATs* exprimiert werden, um eventuell Entwicklungsprozesse zu identifizieren, an denen diese beteiligt sind.

Dafür wurde zunächst die Abundanz der *CKX1*-, *CKX5*- und *CKX6-NATs* mithilfe von spezifischen qPCR-Assays in verschiedenen Geweben bestimmt (Abbildung 14). *CKX1-NAT* wurde am stärksten in Wurzeln und Infloreszenzen detektiert. Die höchste Abundanz von *CKX5-NAT* und *CKX6-NAT* wurde in Infloreszenzen beobachtet. Für *CKX1-NAT* und *CKX6-NAT* konnte die Tendenz zu einer korrelierenden Transkriptabundanz beobachtet werden: Für *CKX5-NAT* war keine Tendenz zur Korrelation oder Anti-Korrelation sichtbar.

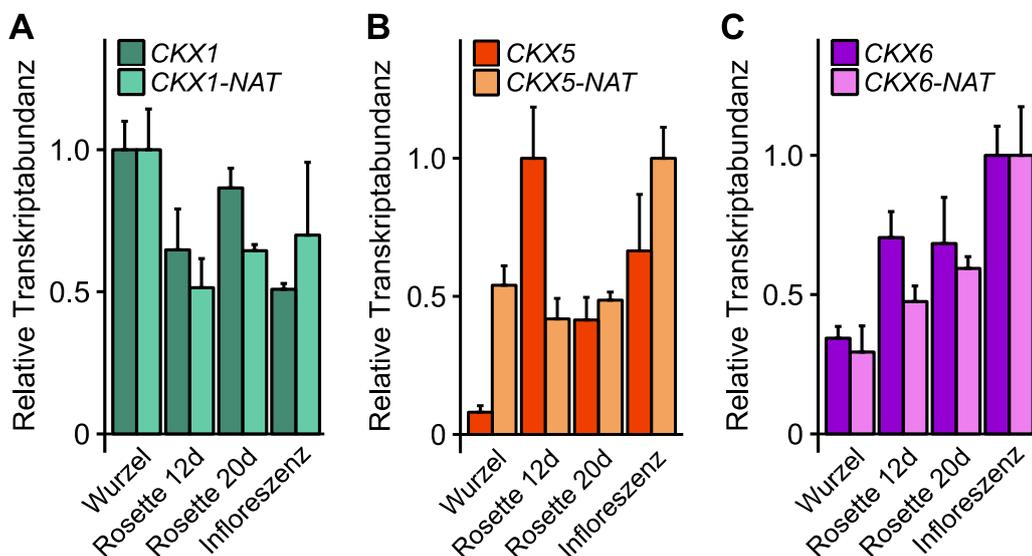


Abbildung 14: *CKX-NAT* Abundanz in verschiedenen Geweben.

Transkriptlevel der *Sense-/Antisense*-Paare am (A) *CKX1*, (B) *CKX5*, und (C) *CKX6*-Locus in verschiedenen pflanzlichen Geweben relativ zum jeweils höchsten Expressionslevel des jeweiligen Gens. Die Bestimmung der Transkriptlevel erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptlevel von *UBC10*, *TAFII15*, *PP2A* und *AP4M* normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$).

Für eine detailliertere Analyse der Expressionsdomänen der *CKX-NATs* wurden Promotor-Reportergenkonstrukte erzeugt, bei denen die vermuteten Promotorbereiche der NATs vor das *GUS*-Gen in den Vektor *pCB308* kloniert wurden (siehe Kapitel 2.2.4). Diese wurden anschließend zur Generierung stabiler Arabidopsislinien genutzt. Als Promotorbereiche der *CKX-NAT*-Gene wurden

DNA-Bereiche von mindestens 1200 bp *upstream* des am weitesten *upstream* liegenden Transkriptionsstarts betrachtet. In der T1-Generation wurden Infloreszenzen von je 24 Pflanzen der Linien *pCKX1-NAT:GUS*, *pCKX5-NAT:GUS* und *pCKX6-NAT:GUS* untersucht, um unabhängige Linien zu identifizieren, welche ein ähnliches Expressionsmuster zeigen. Für die Linien *pCKX1-NAT:GUS* und *pCKX6-NAT:GUS* wurden acht bzw. 16 Linien mit ähnlicher Färbung identifiziert. In den Infloreszenzen der Linie *pCKX5-NAT:GUS* war keine Färbung sichtbar. In der T2-Generation wurden die Nachkommen der zuvor ausgewählten T1-Pflanzen der Linien *pCKX1-NAT:GUS* und *pCKX6-NAT:GUS* bzw. von 24 T1-Pflanzen der Linie *pCKX5-NAT:GUS* auf PPT-haltigem Medium angezogen, um das Vorhandensein der T-DNA sicherzustellen und anschließend wurde die Promotoraktivität in 14 Tage alten Keimlingen untersucht. Bei der Linie *pCKX1-NAT:GUS* wurde keine Färbung in den Keimlingen beobachtet. Zur weiteren Analyse wurden die Linien #34 und #48, welche in der T1-Generation die stärkste Färbung in den Infloreszenzen aufwiesen, ausgewählt. Für die Linie *pCKX5-NAT:GUS* wurden neun unabhängige Linien identifiziert, deren Keimlinge ähnliche Expressionsmuster aufwiesen. Für die weitere Analyse wurden die am stärksten gefärbten Linien #7 und #14 ausgewählt. Von den 16 vorausgewählten *pCKX6-NAT:GUS*-Linien wurde bei 15 Linien eine ähnliche Färbung der Keimlinge beobachtet. Die Linien #15 und #16, welche sowohl in den Keimlingen als auch in den Infloreszenzen eine starke Färbung aufwiesen, wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt.

Um die Gewebe zu identifizieren, in denen die Promotoren der *CKX-NATs* aktiv sind, wurden *in vitro* angezogene Keimlinge sieben bzw. 14 TNK sowie Rosetten, Infloreszenzen und Schoten von auf Erde angezogenen fünf Wochen alten Pflanzen analysiert. Eine Übersicht über die Lokalisation der *CKX-NAT*-Promotoraktivität ist in Abbildung 15 dargestellt. Eine Blaufärbung in den Linien *pCKX1-NAT:GUS* #34 und #48 wurde ausschließlich in reifen Pollen beobachtet (Abbildung 15A und B). Die Keimlinge der Linien *pCKX5-NAT:GUS* #7 und #14 zeigten eine Promotoraktivität in den Wurzelspitzen der Primär- sowie Lateralwurzeln (Abbildung 15C). In 14 Tage alten Keimlingen wurde eine Promotoraktivität im Sprossapex und an der Basis der jüngsten Blätter beobachtet (Abbildung 15D). Außerdem war eine Färbung in einer oder mehreren der radialen Zellschichten des Hypokotyls sichtbar, wobei es sich um die Endodermis, den Perizykel, das Phloem oder das vaskuläre Kambium handeln könnte (Abbildung 15D). In der Abszissionszone am Übergang zwischen Schoten und Stängel war eine schwache Färbung sichtbar (Abbildung 15E). Sowohl in den sieben als auch in den 14 Tage alten Keimlingen der Linien *pCKX6-NAT:GUS* #15 und #16 war eine Promotoraktivität an den Ausbuchtungen des Blattrandes sowie im distalen Bereich der jüngsten Blättern zu erkennen, die zum Blattrand hin zunahm (Abbildung 15F-H). Letztere konnte vor allem auf eine Färbung von Stomata zurückgeführt werden (Abbildung 15I). In den sieben Tage alten Keimlingen wurde zudem eine punktuelle Färbung in den Kotyledonen beobachtet, welche auf eine Promotoraktivität in den Stomata zurückging (Abbildung 15F). Eine Färbung der Stomata wurde ebenso an älteren Blättern der 14 Tage alten Keimlinge sowie an den Schoten adulter Pflanzen sichtbar (nicht gezeigt). Bei der Untersuchung der Infloreszenzen wurde eine Aktivität des *CKX6-NAT*-Promotors in den Kelchblättern junger Blüten sichtbar, welche nach der Anthese abschwächte (Abbildung 15J). Nach der Anthese wurde eine Blaufärbung in den reifen Pollen von Blüten der Stadien 13 bis 16 (Abbildung 15J-K) und in den weiblichen Gametophyten innerhalb der Samenanlagen von Blüten der Stadien 13 bis 14 (Abbildung 15L und M) beobachtet (Blütenstadien nach Smyth et al., 1990).

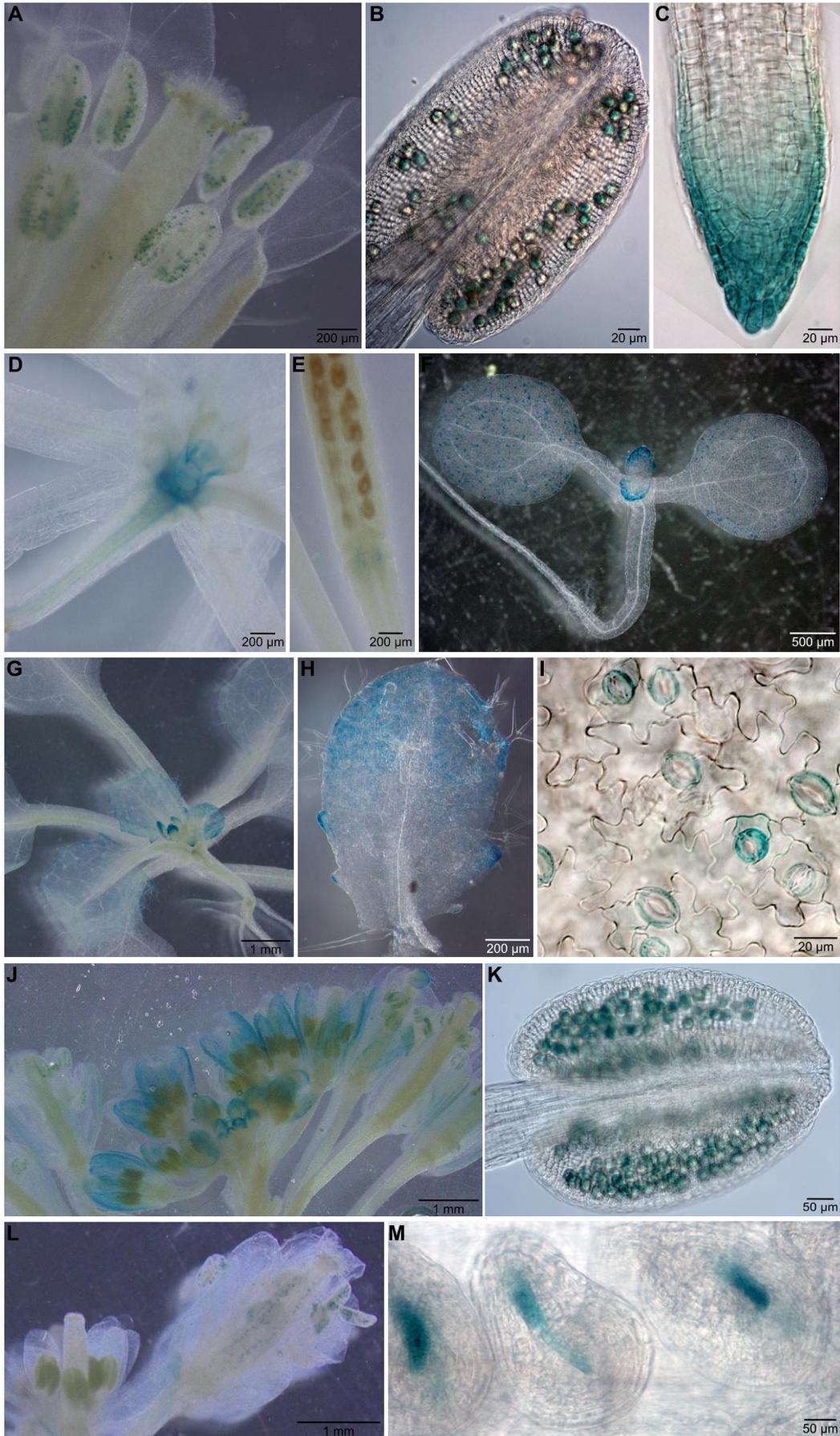


Abbildung 15: Promotoraktivität der *CKX-NATs*.

Zu Abbildung 15: Promotoraktivität der CKX-NATs.

Nachweis der Reporter-Gen-Expression der Linien **(A-B)** *pCKX1-NAT:GUS*, **(C-E)** *pCKX5-NAT:GUS* und **(F-M)** *CKX6-NAT:GUS* während der Entwicklung von *A. thaliana* mittels GUS-Färbung. Es wurden Keimlinge **(F)** 7 TNK sowie **(D und G-I)** 14 TNK, **(A, B und J-M)** Infloreszenzen und **(E)** Schoten stereo- und lichtmikroskopisch untersucht.

3.4 Subzelluläre Lokalisierung der CKX-NATs

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von NATs gibt einen Hinweis darauf, ob diese im Zellkern verbleiben oder ins Cytoplasma transportiert werden, was einen Indiz dafür liefern kann, welche eventuellen Mechanismen der Regulation durch NATs in Frage kommen.

Für eine erste Annäherung an die subzelluläre Lokalisation der CKX-NATs wurden die zwei online verfügbare Programme IncLocator und Locate-R (Tabelle 8; Stand 04.04.2020) genutzt, mit denen die Lokalisation der einzelnen CKX-NAT-Isoformen *in silico* vorhergesagt wurde. Diese Vorhersagen sind im Anhang, Tabelle 27 aufgelistet. Generell fiel auf, dass die beiden Vorhersageprogramme zumeist unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Locate-R sagte für alle Isoformen von CKX1-NAT eine subzelluläre Lokalisation im Cytoplasma voraus, wohingegen IncLocator lediglich für die Isoformen i und v eine cytoplasmatische Lokalisation und für die übrigen Isoformen eine Lokalisation im Nukleus vorhersagte. Auch die CKX5-NAT-Isoformen waren laut Locate-R im Cytoplasma, laut IncLocator jedoch im Nukleus lokalisiert. Von beiden Programmen wurden im Fall von CKX6-NAT verschiedene Lokalisationen für die einzelnen Isoformen vorhergesagt. Beide Programme sagten eine cytoplasmatische Lokalisation der Isoformen b, c, e und g sowie eine nukleare Lokalisation von Isoform f vorher. Die Isoform a war laut Locate-R im Cytoplasma und laut IncLocator im Nukleus lokalisiert, wohingegen die Isoform d laut Locate-R im Nukleus und laut IncLocator im Cytoplasma lokalisiert war. Darüber hinaus war zu sehen, dass die Vorhersage durch jedes der Programme für einige der Isoformen eine deutliche Tendenz, für andere jedoch nur eine schwache Tendenz zu einem bestimmten subzellulären Kompartiment aufwies. So waren z.B. laut Locate-R die CKX5-NAT-Isoformen a bis c mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % im Cytoplasma lokalisiert und damit deutlich diesem Kompartiment zugeordnet. Die CKX1-NAT-Isoformen i bis p hatten hingegen mit 32 %, 28 %, 24 % und 17 % relativ ähnliche Wahrscheinlichkeiten einer Lokalisation im Cytoplasma, Exosom, Nukleus bzw. Ribosom, was auf eine Verteilung dieser Transkripte auf die verschiedenen Kompartimente hindeuten könnte. Generell wurde deutlich, dass die *in silico*-Vorhersage nicht genügt, um die subzelluläre Lokalisation der CKX-NATs eindeutig zu bestimmen.

Um die subzelluläre Lokalisation der CKX-NATs experimentell zu untersuchen, wurde in Kollaboration mit Dr. Nastya Gridasova und Prof. Dr. Craig Pikaard (Indiana University, Bloomington, USA) eine Analyse der Transkriptlevel von CKX1-, CKX5- und CKX6-NATs in nuklearen bzw. nukleolaren RNA-Fractionen durchgeführt (Abbildung 16). Als Referenzene für cytoplasmatisch lokalisierte Transkripte dienten die mRNAs *AT1G04820 (TUA4)* und *AT3G18780 (ACT2)*, welche für Teile des Cytoskeletts kodieren (Fletcher und Mullins, 2010). Als Referenzene für nukleare Transkripte dienten *AT3G14735 (U6)*, eine uridinreiche snRNA, welche einen Bestandteil des Spleißosoms darstellt, sowie *AT1G06253 (SnoR5a)* und *AT5G51174 (SnoR30)*, welche in die

Prozessierung von rRNAs involviert sind, einem Prozess, der im Nukleolus stattfindet (Henras et al., 2015; Will und Luhrmann, 2011; Yoshihama et al., 2013).

In Abbildung 16 ist die Anreicherung der Transkripte in der nuklearen RNA-Fraktion dargestellt, als kernlokalisierter Anteil der Transkriptmenge des jeweiligen Transkripts an der Gesamt-RNA relativ zum durchschnittlichen kernlokalisierten Anteil der Transkriptmenge der cytoplasmatischen Kontrollen an der Gesamt-RNA. Der Anteil der kernlokalisierten Transkripte der nuklearen Kontrollen *U6*, *SnoR5a* und *SnoR30* war erwartungsgemäß hoch. Ihre Transkripte waren in der nuklearen RNA-Fraktion 107-, 305- bzw. 67-mal stärker angereichert als die der cytoplasmatischen Referenzgene (Abbildung 16A). *CKX1*-, *CKX5*- und *CKX6-NAT* zeigten mit einer 11-, 17- bzw. 14-fachen Anreicherung ihrer Transkripte im Kern verglichen mit den cytoplasmatischen Kontrollen ebenfalls eine signifikant höhere Transkriptabundanz in der nuklearen RNA-Fraktion, was darauf hinweist, dass diese Transkripte nicht ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert waren. Die Anreicherung jedes *CKX-NAT* in der nuklearen RNA-Fraktion war jedoch signifikant geringer als jene der nuklearen Kontrollen, was darauf hindeutet, dass die *CKX-NATs* auch nicht ausschließlich im Nukleus lokalisiert waren. Angenommen, die 305-fache Anreicherung der *SnoR5a*-Transkripte in der nuklearen RNA-Fraktion entsprach einer ausschließlichen Lokalisation der Transkripte im Zellkern, so entspräche die 11-, 17- und 14-fache Anreicherung der *CKX-NATs* einem Anteil von 3,6 %, 5,6 % bzw. 4,6 % aller Transkripte, welche im Kern lokalisiert waren. Es wird demnach angenommen, dass ein Teil der *CKX-NATs* im Zellkern lokalisiert war, wohingegen sich der Großteil dieser *NATs* im Cytoplasma befand.

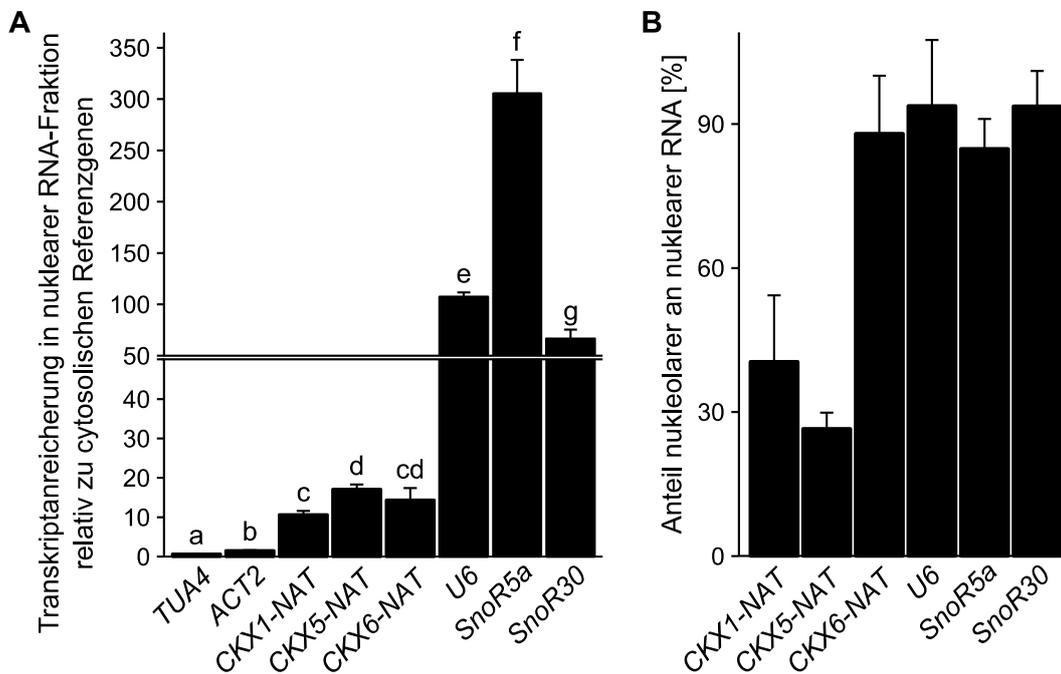


Abbildung 16: CKX-NATs sind im Zellkern und Cytoplasma lokalisiert.

(A) Anreicherung der Transkripte in der nuklearen RNA-Fraktion der RNA aus 12 Tage alten Keimlingen gemessen mithilfe von qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 2$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p \leq 0,05$ (Welch-Test). **(B)** Prozentualer Anteil der nukleolaren RNA in der nuklearen RNA-Fraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 2$).

Um die Lokalisation der im Nukleus befindlichen *CKX-NAT* weiter einzugrenzen, wurden deren nukleolar lokalisierten Anteile bestimmt (Abbildung 16B). Bei den nukleolaren Referenzgenen *SnoR5a* und *SnoR30* waren 85 % bzw. 94 % der nuklearen Transkripte im Nukleolus lokalisiert. Für *CKX6-NAT* konnte mit 88 % ein ähnlich hoher nukleolarer Anteil beobachtet werden, was vermuten lässt, dass die im Kern befindlichen Transkripte des *CKX6-NAT* nahezu ausschließlich im Nukleolus lokalisiert waren. Der nukleolare Anteil der *CKX1-NATs* sowie *CKX5-NATs* war mit 40 % bzw. 27 % deutlich geringer, was darauf hinweist, dass sich lediglich ein Teil der kernlokalisierten Transkripte im Nukleolus befand.

3.5 Untersuchung der transkriptionellen Regulierung von *CKX-NATs*

3.5.1 *CKX-NAT*-Level werden durch verschiedene Stimuli reguliert

Die Untersuchung der Änderung des Transkriptlevels infolge eines exogenen Reizes ermöglicht es, Faktoren zu identifizieren, welche ein Gen regulieren. Dies kann Hinweise darauf liefern, in welchen biologischen Prozessen das Gen eine Rolle spielen könnte.

Für eine erste Annäherung an die Reaktion der *CKX-NAT*-Level auf verschiedene biotische und abiotische Stimuli sowie Hormone, wurden existierende Microarray-Daten untersucht. Die Expressionsdaten in den Datenbanken eFP Browser (Tabelle 7; Stand 10.05.2019) und Genevestigator (Tabelle 8; Stand 13.05.2019), welche sich für eine solche Analyse besonders eignen, basieren hauptsächlich auf den *Arabidopsis Genome ATH1 Array*, auf dem ca. 24.000 Arabidopsigene, jedoch nicht die *CKX-NATs* repräsentiert sind. Die Microarray-Sonden, welche an die *CKX1*-, *CKX5*- bzw. *CKX6*-Transkripte binden, liegen jedoch in Bereichen, welche sich mit dem jeweiligen NAT überschneiden. Die Microarrays detektieren somit nicht spezifisch die Transkriptlevel der *Sense*-, sondern auch die der *Antisense*-Transkripte. Zudem wird *CKX5-NAT* ebenso von den Sonden des *UBC16*-Gens detektiert. Die Datenbanken wurden demnach nach Stimuli durchsucht, welche die *CKX1*-, *CKX5* und *CKX6*- sowie das *UBC16*-Transkriptlevel regulieren. Die Stimuli, welche diese Gene am stärksten regulieren, sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Unter den *in silico*-detektierten Stimuli befanden sich sowohl biotische und abiotische Stimuli als auch Hormone. Um jene Stimuli einzugrenzen, welche detaillierter untersucht werden sollten, wurden die Stimuli identifiziert, welche sowohl in der eFP Browser-Analyse als auch in der Genevestigatoranalyse eine starke Transkriptleveländerung zeigten (in Tabelle 22 hervorgehoben). Für *CKX1* wurde eine Hochregulation der Transkriptlevel durch Auxin sowie eine Herabregulation durch Trockenstress in beiden Datenbanken beobachtet. Für *CKX5* zeigten beide Datenbanken eine positive Regulation der Transkriptlevel durch Cytokinin und Kälte. *UBC16* wurde ebenso durch Cytokinin hochreguliert. Für *CKX6* konnte in beiden Datenbanken ein Anstieg des Transkriptlevels durch Auxin, Salz und Hitze sowie eine Reduktion durch Trocken- sowie Kältestress beobachtet werden.

Tabelle 22: *In silico* identifizierte Stimuli, welche möglicherweise die CKX-NAT-Level regulieren.

Gen	Analyse mittels eFP Browser		Analyse mittels Genevestigator		
	Stimulus	Relative Transkriptlevel ¹	Stimulus	Anzahl der Studien ²	Relative Transkriptlevel ³
CKX1	Auxin	4,12	Auxin	30	6,87
	Salzstress	3,29			
	Hitzestress	2,76			
	Genotoxischer Stress	2,73			
	Verwundung	2,29			
	Trockenstress	2,16			
	Jasmonsäure	0,09	Trockenstress	3	0,33
	Hitzestress	0,10			
	Abscisinsäure	0,13			
	Kältestress	0,14			
	Trockenstress	0,17			
	Salzstress	0,17			
	Osmotischer Stress	0,18			
	Oxidativer Stress	0,18			
Verwundung	0,21				
Genotoxischer Stress	0,35				
CKX5	Verwundung	3,31	biotischer Stress ^a	16	10,57
	Kältestress	2,87	Licht ^b	8	7,56
	Cytokinin	2,51	Kältestress	7	5,07
			Trockenstress	2	2,79
			Cytokinin	2	2,64
	Osmotischer Stress	0,49	Licht ^b	14	0,12
	UV-B	0,46	Hitzestress	2	0,18
UBC16	UV-B	3,28	CO ₂	4	6,10
	Cytokinin	2,30	Cytokinin	3	5,49
	Osmotischer Stress	2,26	biotischer Stress ^a	3	5,26
			Licht ^b	5	3,92
			SA	2	2,33
			ABA	2	2,05
			biotischer Stress ^a	4	0,21
		Kältestress	3	0,39	
		Licht ^b	5	0,39	
CKX6	Auxin	44,92	Auxin	36	15,68
	Cytokinin	9,77	Licht ^b	5	3,77
	Salzstress	7,62	Salzstress	2	3,40
	Hitzestress	5,02	Hitzestress	4	2,77
	Oxidativer Stress	3,62			
	UV-B	2,98			
	Trockenstress	2,56			
	Trockenstress	0,30	ABA	3	0,20
	Kältestress	0,19	Trockenstress	5	0,29
	Salzstress	0,14	Kältestress	7	0,33
Osmotischer Stress	0,04	Hitzestress	2	0,49	

rot = Stimuli, die Transkriptlevel positiv regulieren, blau = Stimuli, die Transkriptlevel negativ regulieren

¹ berücksichtigt wurden relative Transkriptlevel von $\leq 0,5$ oder ≥ 2 verglichen mit der jeweiligen Kontrollbehandlung

² berücksichtigt wurden Studien mit einer relativen Transkriptleveländerung ≥ 2 und $p \leq 0,05$

³ Transkriptleveländerung aus der Studie mit der stärksten beobachteten Änderung

^a alle Studien in Verbindung mit FLG-22 oder Pflanzenpathogenen

^b alle Studien in Verbindung mit veränderten Lichtregimes

Die *in silico* identifizierten Stimuli wurden anschließend detaillierter analysiert. Dafür wurden existierende Daten aus RNA-Seq-Experimenten analysiert, um spezifisch die Transkriptlevel für die *Sense-/Antisense*-Paare *CKX1/CKX1-NAT*, *CKX5/CKX5-NAT/UBC16* und *CKX6/CKX6-NAT* zu bestimmen. Für die Untersuchung wurden Datensätze von Arabidopsispflanzen genutzt, die mit Auxin (Chaiwanon und Wang, 2015) oder Cytokinin (Potter et al., 2018) behandelt worden waren oder Trockenstress (Fàbregas et al., 2018), Hitzestress (Rawat et al., 2015), Kältestress (Esteve-Bruna et al., 2020) bzw. Salzstress (Anderson et al., 2018) ausgesetzt waren. Da diese Datensätze durch die strangspezifische Sequenzierung der Transkriptome generiert wurden, konnten *Sense*- und *Antisense*-Transkripte durch die Leserichtung der sequenzierten Fragmente unterschieden werden. Für *CKX5-NAT* und *UBC16* wurden zudem spezifische Bereiche definiert, um diese zu unterscheiden (siehe Kapitel 2.2.8.1.5). Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 17 dargestellt.

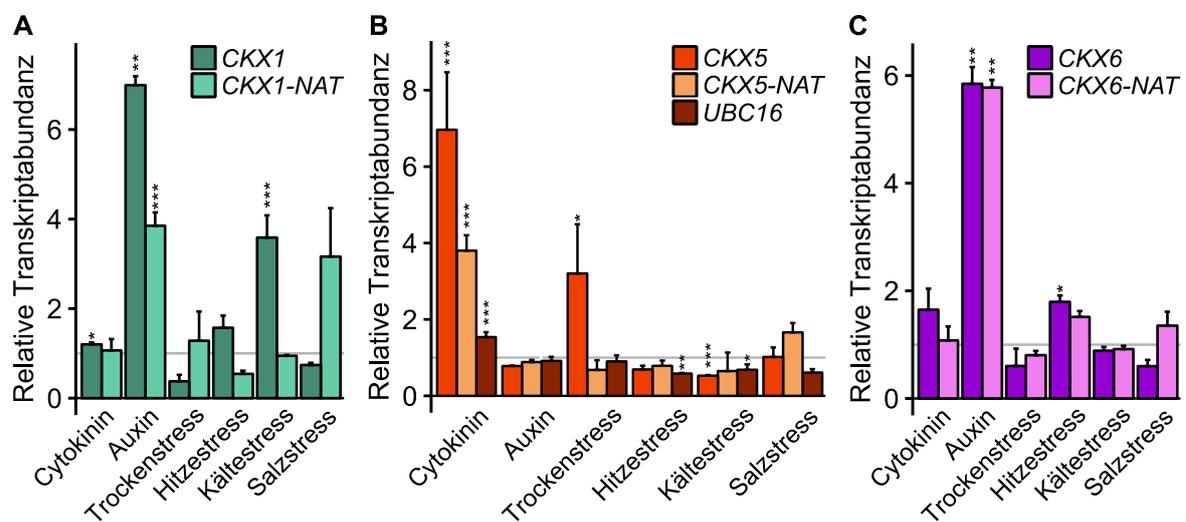


Abbildung 17: Regulation der *Sense*- und *Antisense*-Transkripte am *CKX1*-, *CKX5*- und *CKX6*-Locus. Transkriptlevel von (A) *CKX1* und *CKX1-NAT*, (B) *CKX5* und *CKX5-NAT* sowie (C) *CKX6* und *CKX6-NAT* relativ zur jeweiligen Kontrollbehandlung (markiert durch graue Linie). Die Transkriptlevelbestimmung erfolgte als RPM in den definierten Transkriptbereichen (Tabelle 19) unter Verwendung der in Tabelle 18 aufgeführten RNA-Seq-Datensätzen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 2-3); * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01, *** = p ≤ 0,001 bezogen auf die Kontrollbehandlung (einfaktorielle ANOVA und Tukey-Test).

Die Erhöhung des *CKX1*-Transkriptlevels durch Auxin konnte durch die Analyse der RNA-Seq-Daten bestätigt werden. Es konnte jedoch auch eine signifikante Erhöhung des *CKX1-NAT*-Levels beobachtet werden, was auf ein mögliches Zusammenspiel der Regulation beider Gene hinweisen könnte. Es wurde eine starke, jedoch nicht signifikante Reduktion des *CKX1*-Levels durch Trockenstress beobachtet, was die Ergebnisse der *in silico*-Analyse unterstützte. Hier wurde allerdings keine Veränderung des *CKX1-NAT*-Levels beobachtet. Durch Kältestress wurde das *CKX1*-Level signifikant erhöht, wohingegen das *CKX1-NAT*-Level unverändert blieb. Es gab somit keine Hinweise darauf, dass die Regulation des *CKX1*-Transkriptlevels durch Trocken- und Kältestress von *CKX1-NAT* abhängig ist. Eine starke, jedoch nicht signifikante Erhöhung des *CKX1-NAT*-Levels wurde durch Salzstress verursacht, wohingegen das *CKX1*-Level nicht signifikant verändert wurde.

Für das Transkriptlevel von *CKX5* wurde eine signifikante Erhöhung nach der Behandlung mit Cytokinin beobachtet, was sich mit den vorherigen Ergebnissen deckte. Ebenso wurde eine

signifikante Erhöhung des *CKX5-NAT*-Levels und eine signifikante, aber geringe Erhöhung des *UBC16*-Levels detektiert, was ein auf mögliches Zusammenwirken bei der Kontrolle der Gene hindeuten könnte. Eine signifikante Hochregulation von *CKX5* wurde durch Trockenstress verursacht, jedoch ohne eine Regulation seiner NATs. Entgegen der Ergebnisse aus der vorherigen *in silico*-Analyse wurde eine signifikante Reduktion des *CKX5*-Levels durch Kältestress beobachtet. Geringe, aber signifikante Erhöhungen des *UBC16*-Levels wurden durch Hitze- sowie Kältestress hervorgerufen. *CKX5-NAT* wurde von keinem weiteren der untersuchten Stimuli signifikant verändert.

Sowohl das *CKX6*- als auch das *CKX6-NAT*-Level wurden durch Auxinbehandlung signifikant erhöht, was wiederum auf eine gemeinsame Regulation der Transkripte hindeuten könnte. Das *CKX6*-Level wurde zudem durch Hitzestress signifikant hochreguliert, was die vorherigen Ergebnisse bestätigte. Das *CKX6-NAT*-Level wurde durch Hitzestress nicht signifikant verändert, jedoch konnte die Tendenz einer positiven Korrelation beobachtet werden, was für eine eindeutige Aussage detaillierter untersucht werden müsste. Alle weiteren getesteten Stimuli zeigten keine signifikanten Veränderungen der *CKX6*- und *CKX6-NAT*-Level.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die *CKX-NATs* durch externe Reize reguliert werden und eine Co-Regulation der *Sense-/Antisense*-Paare durch die Phytohormone Auxin bzw. Cytokinin hervorgerufen wurde.

3.5.2 *CKX5-NATs* werden schnell durch Cytokinin induziert

Durch die *in silico*-Analysen hat sich herausgestellt, dass die *CKX-NATs* durch verschiedene Stimuli reguliert werden. Die Regulation von *CKX5*- und *CKX5-NAT* durch Cytokinin ist besonders interessant, da dieses das Substrat der *CKX*-Enzyme ist. Es wäre denkbar, dass *CKX5-NAT* eine Rolle bei der *Feedback*-Regulation des Cytokininmetabolismus spielt, um den Cytokiningehalt in der Zelle zu stabilisieren. Um dieses Ergebnis der *in silico*-Analysen experimentell zu überprüfen, wurde die Reaktion der Gene auf Änderungen der Cytokininkonzentration mittels qPCR-Analyse untersucht.

Zunächst wurden die Transkriptlevel in Arabidopsiskeimlingen mit verändertem endogenen Cytokininstatus analysiert (Abbildung 18A). Dafür wurden zum einen die *loss-of-function*-Mutanten *ipt3,5,7* und *ahk2,3* genutzt, welche Defekte in der Cytokininbiosynthese bzw. -signaltransduktion aufweisen, was einen reduzierten Cytokininstatus hervorruft. Zum anderen wurden die *gain-of-function*-Mutanten *rock4* und *rock2*, welche eine gesteigerte Cytokininbiosynthese bzw. -signaltransduktion besitzen, was einen erhöhten Cytokininstatus hervorruft. Verglichen mit dem Wildtyp wiesen die Keimlinge mit reduziertem Cytokininstatus sowohl signifikant niedrigere *CKX5*-Transkriptlevel (0,13- bzw. 0,29-fach) als auch signifikant niedrigere *CKX5-NAT*-Level (0,42- bzw. 0,54-fach) auf, was einen positiven Effekt von Cytokinin auf beide Gene bestätigte. Bei den Pflanzen mit höherem Cytokininstatus konnte keine signifikante Änderung der Transkriptlevel beider Gene beobachtet werden.

Desweiteren wurde die Reaktion der Gene auf die Behandlung mit exogenem Cytokinin untersucht. Dafür wurden Arabidopsiskeimlinge mit dem Cytokinin BA induziert und die Transkriptlevel nach 30 und 120 min bestimmt (Abbildung 18B). Das *CKX5*-Transkriptlevel war nach 30 min

7,2-fach erhöht, was mit dem Ergebnis der RNA-Seq-Auswertung übereinstimmte. Die 10-fache Erhöhung des *CKX5-NAT*-Levels überstieg sowohl das Ergebnis der RNA-Seq-Auswertung als auch den Anstieg des *Sense*-Partners. Nach 120 min war die Erhöhung der Transkriptlevel beider Gene mit 3,1- bzw. 3,6-fach weniger hoch als nach 30 min. Die Messung bestätigte, dass das *CKX5-NAT*-Level durch die externe Zugabe von Cytokinin positiv reguliert wird. Da sowohl *CKX5* als auch *CKX5-NAT* reguliert wurden, stellt sich die Frage, ob beide Gene unabhängig voneinander durch Cytokinin induziert werden, oder ob die Regulation eines Gens durch das andere vermittelt wird. NATs sind als Regulatoren der Genexpression ihrer *Sense*-Partner bekannt, deshalb liegt die Vermutung nahe, dass *CKX5-NAT* durch Cytokinin induziert wird und durch einen noch unbekanntem NAT-Mechanismus das Transkriptlevel von *CKX5* erhöht. Um diese These zu untersuchen, wurde die Cytokininbehandlung mit einer weiteren Transkriptlevelmessung nach 15 min wiederholt (Abbildung 18B). Bereits nach 15 min war das Transkriptlevel von *CKX5-NAT* mit einer 4,9-fachen Erhöhung stärker induziert, als das von *CKX5* mit 2,9-facher Erhöhung. Dies spricht für eine schnellere oder stärkere Regulation von *CKX5-NAT* als von *CKX5* durch Cytokinin, was die These unterstützt, dass *CKX5-NAT* die Regulation von *CKX5* vermitteln könnte.

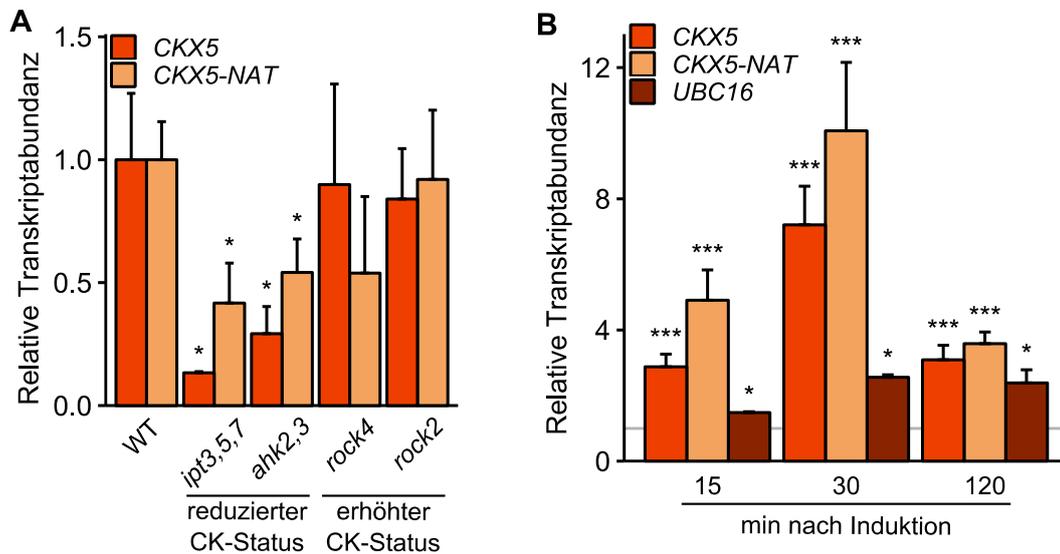


Abbildung 18: *CKX5*- und *CKX5-NAT*-Level werden durch Cytokinin reguliert.

(A) Relative Transkriptlevel von auf Erde angezogenen Keimlingen verschiedener Mutantenlinien mit verändertem Cytokininstatus (CK-Status) 14 TNK. **(B)** Transkriptlevel von zehn Tage alten Keimlingen nach Behandlung mit 1 μ M BA für 15, 30 bzw. 120 min relativ zur jeweiligen Lösemittelkontrolle (markiert durch graue Linie). Die Bestimmung der Transkriptlevel erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptlevel von *UBC10* und *TAF115* normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 4); * = p \leq 0,05, *** = p \leq 0,001 bezogen auf den Wildtyp (WT) bzw. die Lösemittelbehandlung (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

Bei der qPCR-Messung wurde ebenfalls das Transkriptlevel von *UBC16* bestimmt. Die Primer wurden dafür so platziert, dass die in der RACE-Analyse identifizierten *CKX5-NAT*-Isoformen nicht detektiert wurden. Durch den Vergleich der Transkriptlevelveränderungen beider Gene nach Cytokininbehandlung sollte untersucht werden, ob es sich bei beiden Genen um transkriptionell unabhängige genetische Einheiten oder lediglich um verschiedene Isoformen handelt, welche jedoch transkriptionell einheitlich reguliert werden. Die Transkriptlevel von *UBC16* zeigten an allen

gemessenen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung, welche jedoch mit 3,1-, 3,6- und 2,4-fach sehr gering war verglichen mit den Veränderungen von *CKX5-NAT*.

3.6 Analyse der biologischen Relevanz von *CKX-NATs*

Die Charakterisierung und Analyse von Mutanten sind ein zentraler Bestandteil der Pflanzengenetik. Sie ermöglichen es, die Funktion von Genen zu identifizieren und zu untersuchen. Die Analyse von Mutanten, deren Genaktivität ausgeschaltet oder inhibiert ist, ermöglicht es, die Funktion des Gens im physiologischen Kontext und die biologische Relevanz eines Gens zu identifizieren. Die Überexpression eines Gens kann zur Identifikation der molekularen Funktion eines Gens genutzt werden. Um die Funktion und Relevanz von *CKX1-NAT* und *CKX5-NAT* zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze reverser Genetik verfolgt, um Mutanten zu generieren und zu untersuchen. Aus Zeitgründen wurde auf die Identifikation und Analyse von *CKX6-NAT*-Mutanten vorerst verzichtet.

3.6.1 Identifikation und Analyse von *knock-out*-Mutanten der *CKX1-NATs*

Zunächst wurden zwei Ansätze verfolgt, um Mutanten zu identifizieren, deren *CKX1-NAT*-Level reduziert ist, mit dem Ziel, die Funktion und biologische Relevanz von *CKX1-NAT* zu untersuchen. Dafür wurden zum einen T-DNA-Insertionsmutanten und zum anderen amiRNA-Mutanten untersucht.

3.6.1.1 Isolierung von *CKX1-NAT*-T-DNA-Insertionsmutanten

Um Pflanzen zu identifizieren, welche einen Verlust oder eine starke Reduktion der *CKX1-NAT*-Level aufweisen, wurden die T-DNA-Insertionspopulationen des Salk-Instituts (S) (Alonso et al., 2003) und der GABI-Kat-Kollektion (G) (Kleinboelting et al., 2012) nach geeigneten T-DNA-Insertionen durchsucht. Diese sollten sich innerhalb der *CKX1-NAT* transkribierenden Bereiche oder im *upstream* liegenden Promotorbereich befinden, möglichst viele der verschiedenen Isoformen treffen und dabei nicht innerhalb des *Sense*- oder eines benachbarten Transkripts liegen. Es wurden vier Linien identifiziert, welche sich im definierten Bereich befanden (Anhang, Tabelle 24). Die Grenzen von Genloci und T-DNAs wurden amplifiziert und sequenziert, wodurch die exakten Positionen der T-DNA-Insertionen bestimmt wurden (Anhang, Tabelle 24). Alle folgenden Positionsangaben der Insertionen beziehen sich auf das erste Nukleotid des längsten 5'-Endes von *CKX1-NAT* (siehe Abbildung 11A), welches nachfolgend als distaler *CKX1-NAT*-Start bezeichnet wird. Die T-DNA-Insertionen der Linien *ckx1-nat-S1* und *ckx1-nat-S2* liegen 1182 bp bzw. 1130 bp *downstream* des distalen *CKX1-NAT*-Starts und befinden sich somit innerhalb des ORF von *CKX1*. Sie waren für die weitere Analyse demnach ungeeignet. Die Insertion der Linie *ckx1-nat-S3* liegt innerhalb des ersten *CKX1-NAT*-Exons, 74 bp *downstream* des distalen *CKX1-NAT*-Start. Sie befindet sich in allen Isoformen, lediglich die Transkripte, welche das kürzeste 5'-Ende von *CKX1-NAT* besitzen, werden nicht getroffen. Die Linie *ckx1-nat-G1* besitzt eine Insertion im intergenischen Bereich, 124 bp *upstream* des distalen *CKX1-NAT*-Starts. Diese unterbricht nicht das Transkript von *CKX1-NAT*, hat aber möglicherweise einen Einfluss auf dessen Promotoraktivität und somit die Expressionsstärke des Transkripts.

Für die am besten geeigneten Linien *ckx1-nat-S3* und *ckx1-nat-G1* sollten mittels PCR homozygote Pflanzen identifiziert werden. Dafür wurden zwei verschiedene Primerkombinationen genutzt. Zum einen wurden Primer verwendet, die an Positionen in der genomische DNA-Sequenz binden, welche um den T-DNA-Insertionsort herum angeordnet sind. Bei einer homozygoten Mutante sollte hiermit kein Produkt gebildet werden, da dieses aufgrund der integrierten T-DNA unter den genutzten PCR-Bedingungen zu lang für eine effektive Amplifikation wäre. Zum anderen wurde eine Kombination aus einem Primer, welcher an die genomische Sequenz bindet und einem Primer, welcher an die T-DNA-Sequenz bindet, gewählt. Trägt die Pflanze die T-DNA, kann durch diese Primerkombination ein PCR-Produkt erzeugt werden. Mithilfe dieser PCRs konnten für beide Linien homozygote Linien identifiziert werden, deren Nachkommen für die weiteren Analysen genutzt wurden (Abbildung 19A und Anhang, Abbildung 31). Da die Pflanzen dieser Linien keine auffälligen phänotypischen Veränderungen in Bezug auf Sprosswachstum (Abbildung 19B) oder Wurzelentwicklung (nicht gezeigt) zeigten, wurden beide Linien weiter analysiert.

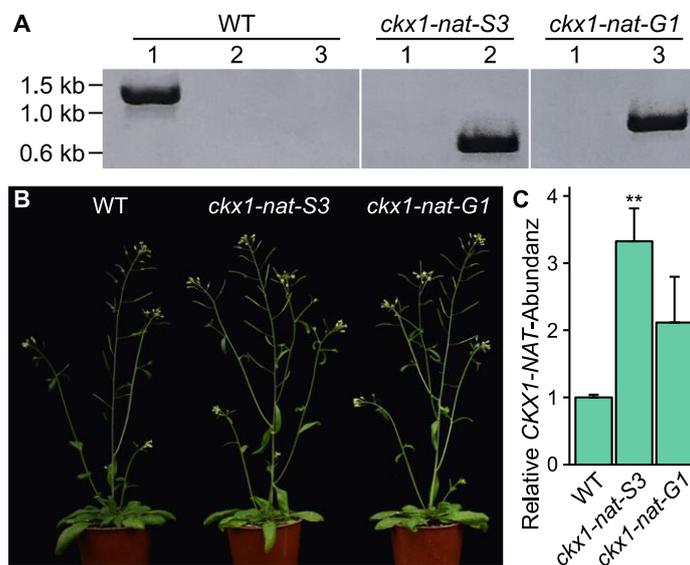


Abbildung 19: Identifikation und Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten des *CKX1-NAT*-Gens.

(A) Bestätigung homozygoter Mutanten der *ckx1-nat*-Linien mittels PCR auf genomische DNA adulter Pflanzen. Zum einen wurde ein genspezifisches Primerpaar (1), zum anderen ein genspezifischer Primer in Kombination mit einem T-DNA-spezifischen Primer (2 und 3) verwendet. Als Kontrolle diente genomische DNA des Wildtyps (WT). Die Lage der T-DNA-Insertionsorte und der verwendeten Primer ist in Anhang, Abbildung 31 dargestellt. Die Fragmente wurden in 32 Zyklen amplifiziert. **(B)** Auf Erde angezogene Pflanzen der *ckx1-nat*-Linien und des Wildtyps (WT) fünf Wochen nach der Keimung. **(C)** Transkriptlevelmessung von *CKX1-NAT* in 14 Tage alten Keimlingen der *ckx1-nat*-Mutanten. Die Bestimmung der Transkriptlevel erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptlevel von *UBC10* und *TAFII15* normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 3)

3.6.1.2 T-DNA-Insertionsmutanten zeigen keine Reduktion des *CKX1-NAT*-Levels

Zunächst sollte mittels RT-PCR untersucht werden, ob das *full-length CKX1-NAT* in der Linie *ckx1-nat-S3* unterbrochen ist. Dafür sollten Primer genutzt werden, welche um den Insertionsort der T-DNA herum angeordnet sind. Aufgrund der begrenzten Positionsmöglichkeiten der Primer wegen der Nähe der T-DNA-Insertion zum 5'-Ende des *CKX1-NATs* konnte keine Primerkombination identifiziert werden, welche im gewünschten Bereich *CKX1-NAT* spezifisch amplifiziert. Da sich

allerdings die T-DNA im transkribierten Bereich nahe des 5'-Terminus befindet, kann davon ausgegangen werden, dass ein *full-length* Transkript nicht exprimiert werden kann.

Bei *CKX1-NAT* handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein proteinkodierendes Transkript, was vermuten lässt, dass *CKX1-NAT* als RNA aktiv ist. Es wäre denkbar, dass nur einzelne Teile des Transkripts für seine Funktion benötigt werden. Ein zuverlässiger Verlust der Genfunktion wäre demnach nur bei einem Verlust oder einer starken Reduktion des gesamten Transkripts von *CKX1-NAT* gegeben. Da die Insertionen der T-DNA-Insertionslinien am 5'-Ende bzw. *upstream* von *CKX1-NAT* liegen, wurde getestet, ob der Teil des Transkripts, welcher sich *downstream* der T-DNA befindet und den größeren Teil des *CKX1-NATs* ausmacht, reduziert war. Dafür wurde das *CKX1-NAT*-Level mittels qPCR bestimmt (Abbildung 19C). Das im konservierten Bereich am 3'-Terminus gemessene *CKX1-NAT*-Level in den Linien *ckx1-nat-S3* und *ckx1-nat-G1* war im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert, sondern 3,3- bzw. 2,1-fach erhöht. Die Messung zeigte somit, dass es sich bei den isolierten T-DNA-Insertionslinien nicht um *loss-of-function*-Mutanten handelte und diese für die Analyse der Funktion und biologischen Relevanz von *CKX1-NAT* somit ungeeignet waren.

3.6.1.3 Isolierung von amiRNA-Mutanten

Da es nicht möglich war, geeignete T-DNA-Insertionsmutanten für *CKX1-NAT* zu identifizieren, sollte eine Methode zum zielgerichteten Ausschalten des Gens verwendet werden. Am häufigsten werden dafür in Pflanzen Methoden genutzt, welche auf deren endogenen RNAi-Mechanismus oder auf das *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9* (CRISPR/Cas9)-System aus Prokaryoten beruhen. Da letztere vor allem zu kurzen Veränderungen der DNA-Sequenz führen, welche meist einen *frame shift* in der Proteinsequenz zur Folge haben, sind sie für die Erzeugung von *loss-of-function*-Mutanten eines nicht-kodierenden Transkripts nicht geeignet. Im Rahmen meiner Masterarbeit wurden transgene Arabidopsislinien generiert, welche unter dem starken und konstitutiven *CaMV 35S*-Promotor amiRNAs exprimieren, die spezifisch an die *CKX1-NATs* binden und so deren Inaktivierung verursachen sollen (Engelmann, 2013). Um eventuelle phänotypische Veränderungen der Inaktivierung von *CKX1-NAT* zuordnen zu können und diese von Effekten durch *off-targets* zu trennen, waren zwei verschiedene Konstrukte kloniert und in Pflanzen transformiert worden, sodass diese unterschiedliche *CKX1-NAT*-spezifische amiRNAs exprimieren (*35S:ckx1-nat-miR1* und *35S:ckx1-nat-miR2*). Die in der Masterarbeit isolierten Primärtransformanden stellten sich als falsch positive Transformanden heraus. Mit den in der Masterarbeit erzeugten Konstrukten wurden erneut Arabidopsispflanzen transformiert und es konnten 28 und 19 Primärtransformanden für das *35S:ckx1-nat-miR1*- bzw. *35S:ckx1-nat-miR2*-Konstrukt selektiert werden. Nach der *in vitro*-Selektion wurden die Pflanzen auf Erde umgesetzt und die Sprossentwicklung beobachtet (Abbildung 20A). Alle Pflanzen entwickelten im Vergleich zum Wildtyp kleinere Rosetten und dünnere Stängel. Durch eine Segregationsanalyse in der T2-Generation wurden die Linien identifiziert, welche nur eine T-DNA-Insertion trugen. Fünf Linien, die eine starke Veränderung des Sprossphänotyps zeigten und nur eine T-DNA-Insertion beinhalteten, wurden für die weiteren Analysen ausgewählt. In der T3-Generation wurden durch eine erneute Segregationsanalyse homozygote Pflanzen jeder unabhängigen Linie isoliert. Die auf Erde angezogenen

homozygoten Pflanzen zeigten nicht mehr die zuvor beobachteten Veränderungen des Sprosswachstums (nicht gezeigt).

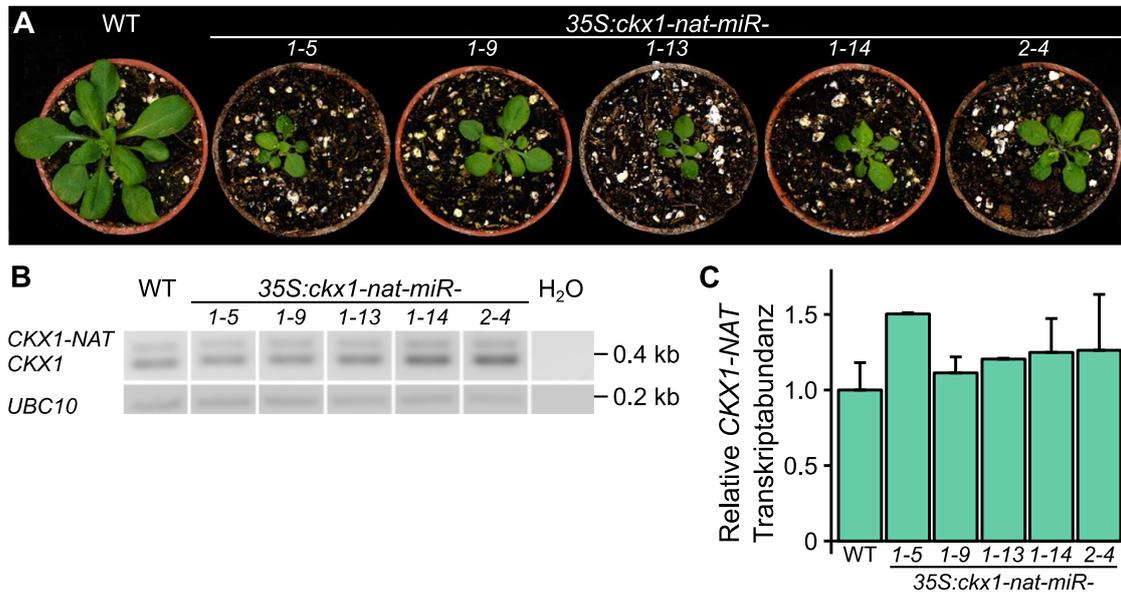


Abbildung 20: Analyse der 35S:ckx1-nat-miR-Linien.

(A) Vier Wochen alte Primärtransformanten, *in vitro* angezogen auf Selektionsmedium und 14 TNK auf Erde umgesetzt. (B) Analyse der Transkriptlevel von *CKX1-NAT* mittels RT-PCR unter Verwendung von Primern, welche die Zielsequenz der *ckx1-nat*-amiRNA umschließen. Als Template diente Gesamt-cDNA, welche von RNA 14 Tage alter Keimlinge revers transkribiert wurde, bzw. ddH₂O als Negativkontrolle. *UBC10* diente zur Kontrolle der cDNA-Menge. Die Lage der amiRNA-Zielsequenzen und der verwendeten Primer ist im Anhang, Abbildung 31 dargestellt. Die Fragmente wurden in 30 Zyklen amplifiziert. (C) Transkriptlevelmessung von *CKX1-NAT* in 14 Tage alten Keimlingen der *35S:ckx1-nat-miR*-Mutanten. Die Bestimmung der Transkriptlevel erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptlevel von *UBC10* und *TAFII15* normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 2).

3.6.1.4 amiRNA-Mutanten zeigen keine Reduktion des *CKX1-NAT*-Levels

Um festzustellen, ob es sich bei den isolierten Linien um Mutanten mit reduziertem *CKX1-NAT*-Level handelte, wurden diese mittels semiquantitativer PCR analysiert (Abbildung 20B). Die Primer wurden so gewählt, dass sie einen Bereich umschließen, welcher die amiRNA-Zielsequenz beinhaltet, und *CKX1-NAT* mit einer Bandengröße von 447 bp sowie *CKX1* mit einer Bandengröße von 359 bp amplifizieren. Die Analyse zeigte keine Reduktion der *CKX1-NAT*-Level in den *35S:ckx1-nat-miR1*- und *35S:ckx1-nat-miR2*-Linien. Um die *CKX1-NAT*-Level exakt zu quantifizieren und so auch eventuell kleine Transkriptlevelunterschiede zu detektieren, wurde eine qPCR-Analyse durchgeführt (Abbildung 20C). Keine der untersuchten Linien wies ein verringertes Transkriptlevel von *CKX1-NAT* auf. Es wurde somit kein Hinweis auf eine reduzierte *CKX1-NAT*-Aktivität in den isolierten amiRNA-Linien nachgewiesen. Für die Analyse der Funktion und biologischen Relevanz von *CKX1-NAT* waren die Linien demnach nicht geeignet.

3.6.2 Isolierung und Analyse von *CKX1-NAT*-Überexpressionsmutanten

3.6.2.1 Selektion geeigneter *35S:CKX1-NAT*-Linien

Um der Funktion von *CKX1-NAT* auch ohne die Analyse von *loss-of-function*-Mutanten näherzukommen, sollten Arabidopsislinien untersucht werden, welche einen erhöhten *CKX1-NAT*-

Status besitzen. In einem klassischen Klonierungsansatz wurde die gesamte genomische Sequenz, welche alle identifizierten *CKX1-NAT*-Isoformen beinhaltet, amplifiziert und *downstream* des konstitutiven *CaMV 35S*-Promotors in den Vektor *pBIN-BAR* kloniert. Die genomische Sequenz enthält neben dem *CKX1-NAT*-Locus ebenso den kompletten *CKX1*-Genlocus. Um zu verhindern, dass eine zusätzliche Kopie von *CKX1* die spätere Untersuchung eventueller phänotypischer Veränderungen verfälscht, wurde 310 bp *downstream* des *CKX1*-Startcodons eine Punktmutation eingefügt, welche einen vorzeitigen Abbruch der Translation verursacht. Die Klonierung wurde im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Philipp Grenz durchgeführt (Grenz, 2016). Das klonierte Plasmid wurde sequenziert und anschließend für die Transformation von *A. tumefaciens* und *A. thaliana* genutzt. Es wurden 53 Primärtransformatanten selektiert. Keine dieser Pflanzen zeigte starke phänotypische Veränderungen in Bezug auf das Sprosswachstum. In der T2-Generation wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt, wodurch elf Linien mit nur einer T-DNA-Insertion identifiziert wurden. Um die Anzahl unabhängiger Linien für die folgenden Analysen auf die stärksten Überexpressionslinien zu reduzieren, wurden die *CKX1-NAT*-Level von gepoolten segregierenden Keimlingen jeder Linie bestimmt. Es wurden fünf Linien identifiziert, deren *CKX1-NAT*-Level verglichen mit dem Wildtyp mehr als 10-fach erhöht waren (Daten nicht gezeigt). In der T3-Generation wurden homozygote Pflanzen dieser Linien isoliert. Auch die homozygoten Pflanzen der starken Überexpressionslinien zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich der Sprossentwicklung (Abbildung 21A).

3.6.2.2 Molekulare Analyse der 35S:CKX1-NAT-Linien

Während der Selektion der stärksten Überexpressionslinien in der segregierenden T2-Population wurde mithilfe einer RT-PCR überprüft, ob das Spleißen von *CKX1-NAT* durch die Überexpression beeinträchtigt wird (Abbildung 21B). Es wurden Primer genutzt, die den konservierten Bereich am 3'-Terminus umschließen. In beiden getesteten Linien 35S:CKX1-NAT-15 und 35S:CKX1-NAT-22 konnte eine starke Amplifikation des Fragmentes mit der Größe von 474 bp beobachtet werden, welches der bekannten Exon-Intron-Struktur entsprach und auch im Wildtyp als einzige, jedoch deutlich schwächere Bande beobachtet wurde (Abbildung 21B). Bei beiden Überexpressionslinien wurden zudem weitere schwache Banden detektiert, welche entweder bisher unbekannte, schwach abundante Isoformen von *CKX1-NAT* darstellten oder auf eine geringe Menge Transkripte mit inkorrektem Spleißen hindeuteten. Somit konnte gezeigt werden, dass die Exon-Intron-Struktur des Großteils der überexprimierten Transkripte der konservierten *CKX1-NAT*-Struktur entsprach, was vermuten lässt, dass die überexprimierten *CKX1-NATs* effizient gespleißt und somit die relevanten *CKX1-NAT*-Isoformen stark überexprimiert wurden. Die Messung der *CKX1-NAT*-Level in den homozygoten Linien mittels qPCR zeigte einen mehr als 40-fachen Anstieg in allen untersuchten Linien (Abbildung 21C). Die Linien 35S:CKX1-NAT-8 und 35S:CKX1-NAT-26 stellten mit einem 320- bzw. 148-fachen Anstieg des *CKX1-NAT*-Levels im Vergleich zum Wildtyp die stärksten Überexpressionslinien dar.

Es ist bekannt, dass NATs unter anderem einen *cis*-regulatorischen Einfluss auf die Transkriptmenge ihres *Sense*-Partners haben können. Um zu untersuchen, ob *CKX1-NAT* die Transkriptmenge von *CKX1* reguliert, wurde das *CKX1*-Transkriptlevel in den Linien mit erhöhtem

CKX1-NAT-Status mittels qPCR gemessen (Abbildung 21C). Bei allen Linien wurde eine mindestens 15-fache Erhöhung des *CKX1*-Levels beobachtet. In den stärksten Überexpressionslinien *35S:CKX1-NAT-8* und *35S:CKX1-NAT-26* wurde ein 118- bzw. 51-facher Anstieg des *CKX1*-Levels gemessen. Die Stärke der Erhöhung korrelierte mit der Höhe der *CKX1-NAT*-Expression. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass *CKX1* durch sein *cis-NAT* positiv reguliert wird.

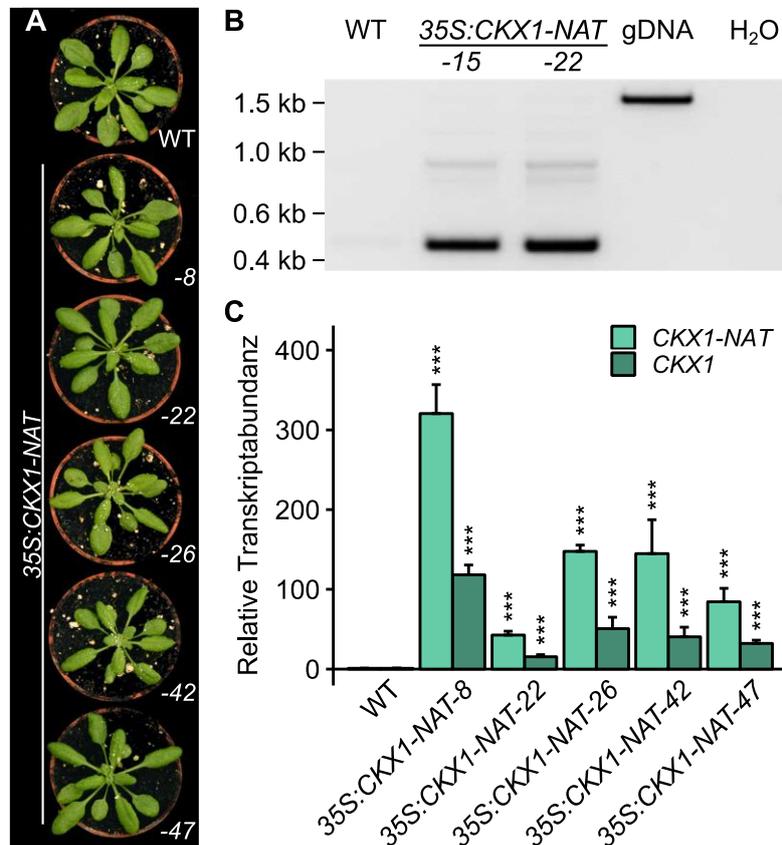


Abbildung 21: Überexpression von *CKX1-NAT* in transgenen Arabidopsislinien.

(A) Auf Erde angezogene homozygote Pflanzen der stärksten *35S:CKX1-NAT*-Überexpressionslinien und des Wildtyps (WT) drei Wochen nach der Keimung. **(B)** Amplifikation der konservierten Exon-Intron-Struktur von *CKX1-NAT* mittels RT-PCR auf Gesamt-cDNA, welche von RNA aus auf Erde angezogenen 10 Tage alten Keimlingen von Wildtyp (WT) bzw. *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien (T2-Generation) revers transkribiert wurde, auf genomische DNA (gDNA) oder auf ddH₂O (H₂O) als Negativkontrolle. Die stärkste Bande aller Linien entspricht der konservierten Transkriptstruktur. Die Fragmente wurden in 30 Zyklen amplifiziert. Die Lage der Primer ist in Anhang, Abbildung 31 dargestellt. **(C)** Relative *CKX1*- und *CKX1-NAT*-Level verschiedener *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien. Die Bestimmung der Transkriptlevel erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptlevel von *UBC10* und *TAF115* normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 2-3); *** = p ≤ 0,001 bezogen auf den Wildtyp (WT) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

Die Effizienzbestimmung des qPCR-Assays für *CKX1* zeigte, dass die quantitative Messung des *CKX1*-Transkriptlevels lediglich bei geringer Konzentration der cDNA zuverlässig war (siehe Kapitel 2.2.5.7). Bei steigender Transkriptmenge ließ sich die Amplifikation einer Bande, welche möglicherweise *CKX1-NAT* entspricht, aufgrund der Lage der Primer nicht verhindern. Da in den Überexpressionslinien eine sehr hohe Transkriptmenge von *CKX1-NAT* vorhanden ist, sollte überprüft werden, ob die gemessene Erhöhung des *CKX1*-Levels auf dessen tatsächliche Erhöhung oder auf einen Messfehler der qPCR zurückzuführen war. Dafür wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt, durch die *CKX* und *CKX1-NAT* anhand der Fragmentgröße unterschieden werden konnten. Analysiert wurden die beiden stärksten Überexpressionslinien *35S:CKX1-NAT-8* und

35S:CKX1-NAT-26. In mehreren RT-PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen (Anhang, Abbildung 31) wurde in den Überexpressionslinien eine stärkere Amplifikation von *CKX1* beobachtet. Beispielhaft wurden in Abbildung 22B das Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination CKX1-NAT-P17 und CKX1-NAT-P18 dargestellt, wobei die 479 bp große Bande dem *CKX1*-Transkript entspricht. Die Ergebnisse der RT-PCRs wiesen darauf hin, dass das *CKX1*-Transkriptlevel in den transgenen Linien tatsächlich erhöht war. Der Anstieg von *CKX1* entsprach allerdings nicht dem mittels qPCR gemessenen 118- bzw. 51-fachen Anstieg. Mithilfe der Grafiksoftware ImageJ wurden die Bandenintensitäten der in Abbildung 22B gezeigten RT-PCRs gemessen und daraus lediglich eine 3,9- bzw. 6,1-fache Erhöhung der Transkriptlevel für die Linien 35S:CKX1-NAT-8 und 35S:CKX1-NAT-26 im Vergleich zum Wildtyp bestimmt.

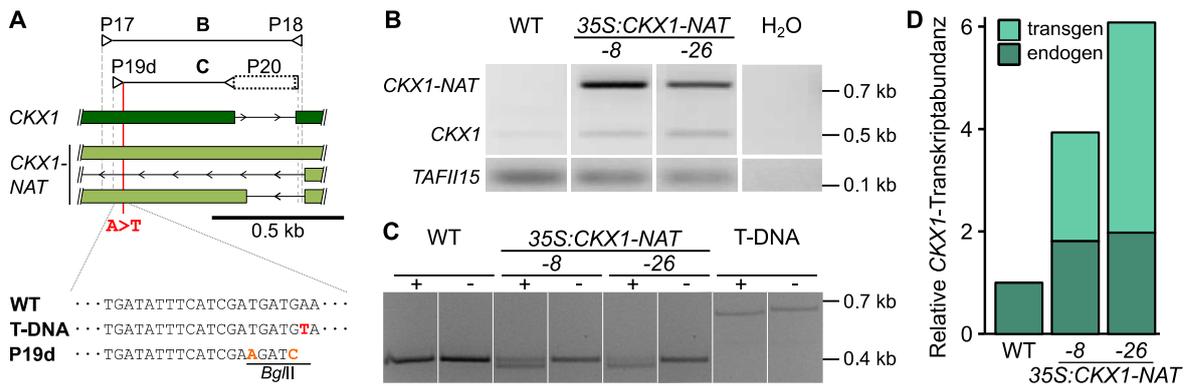


Abbildung 22: Anstieg des *CKX1*-Transkriptlevels in den *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien.

(A) Oben: Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen, welche zur semiquantitativen Analyse der endogenen und transgenen *CKX1*-Transkriptlevel genutzt wurden. Dunkelgrüne Boxen repräsentieren *CKX1*-Exons, hellgrüne Boxen repräsentieren *CKX1-NAT*-Exons, Linien mit Pfeilen repräsentieren Intronbereiche und die Transkriptorientierung. Die rote Linie markiert die Punktmutation im ersten *CKX1*-Exon innerhalb der T-DNA. Durch Linien verbundene Pfeilköpfe zeigen die Position der Primer für die in (B) und (C) durchgeführten PCR-Reaktionen an, wobei Intron überspannende Primer durch gepunktete Linien unterbrochen sind. Unten: Sequenzausschnitt des endogenen (WT) und transgenen (T-DNA) *CKX1*-Allels bzw. der Primersequenz von P19d. Von der wildtypischen *CKX1*-Sequenz abweichende Basen innerhalb der T-DNA und des Primers sind farbig markiert. Die Position der *BglII*-Schnittstelle, die sich für das Amplikon des transgenen *CKX1*-Allels bei der *nested* PCR ergibt, wurde unterstrichen. (B) Amplifikation von *CKX1* und *CKX1-NAT* mittels semiquantitativer RT-PCR auf Gesamt-cDNA, welche von RNA aus auf Erde angezogenen, 10 Tage alten Keimlingen des Wildtyps (WT) bzw. der *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien (35S:CKX1-NAT-8 und -26) revers transkribiert wurde, oder ddH₂O (H₂O) als Negativkontrolle (33 Zyklen). Als Primer wurden CKX1-NAT-P17 und CKX1-NAT-P18 verwendet. *TAFII15* diente zur Kontrolle der cDNA-Menge (28 Zyklen). Beide Überexpressionslinien zeigen eine Zunahme von *CKX1-NAT*- und *CKX1*-Transkripten. (C) Visualisierung der mit *BglII* verdauten (+) und unverdauten (-) *CKX1*-Amplikons der *nested* PCR, für die als Template die aus (B) isolierte *CKX1*-Bande genutzt wurde bzw. des Amplikons des transgenen *CKX1*-Gens von der T-DNA. Für die Überexpressionslinien ist eine Aufspaltung der Amplikons in unverdaute endogene und verdaute transgene *CKX1*-Sequenzen zu beobachten. (D) Relative Abundanz endogener und transgener *CKX1*-Transkripte in den *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien verglichen mit dem Wildtyp (WT), berechnet anhand der Verhältnisse geschnittener und ungeschnittener *CKX1*-Amplikons aus (C) und relativer *CKX1*-Zunahme aus (B), welche anhand der mittels ImageJ gemessenen Bandenintensitäten bestimmt wurden. Die Lage der Primer ist in Anhang, Abbildung 31 dargestellt.

Der Anstieg des *CKX1*-Transkriptlevels ließe sich durch verschiedene Hypothesen erklären. Eine Möglichkeit wäre, dass *CKX1-NAT* das Transkriptlevel von *CKX1* positiv reguliert. Dabei würden vermutlich sowohl die endogenen *CKX1*-Transkripte reguliert, als auch transgene *CKX1*-Transkripte, welche vom zusätzlichen, auf der T-DNA befindlichen *CKX1*-Gen abgelesen werden. Andererseits wäre es auch möglich, dass die Erhöhung des *CKX1*-Levels lediglich daraus resultiert, dass eine zusätzliche Kopie des *CKX1*-Gens durch die T-DNA ins Genom integriert wurde, möglicherweise in

einen transkriptionell sehr aktiven chromosomalen Bereich. In diesem Fall wären lediglich die transgenen *CKX1*-Transkripte stark exprimiert und das endogene *CKX1*-Transkriptlevel bliebe unverändert. Um diese Hypothesen zu prüfen, sollte der Anteil von endogenen und transgenen *CKX1*-Transkripten an der Zunahme des *CKX1*-Levels in den Überexpressionslinien bestimmt werden. Dafür wurden die mittels RT-PCR amplifizierten *CKX1*-Fragmente der Linien 35S:*CKX1*-NAT-8 und 35S:*CKX1*-NAT-26 (Abbildung 22B) aus einem präparativen Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Diese wurden als Template für eine *nested* PCR genutzt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die isolierte Bande durch Spuren des *CKX1*-NAT-Amplikons verunreinigt war, sollte durch die Wahl der Primer die Spezifität der PCR für *CKX1* zusätzlich erhöht und eine Amplifikation von *CKX1*-NAT verhindert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Primer der *nested* PCR über der Spleißgrenze vom ersten zum zweiten *CKX1*-Exon positioniert (P20, siehe Abbildung 22A), sodass er nur an *CKX1*-Fragmente mit ausgespleißtem Intron effizient binden kann. Um die endogenen und transgenen Fragmente zu unterscheiden, wurde die Punktmutation genutzt, die sich in der transgenen *CKX1*-Sequenz befindet. Es wurde ein dCAPS-Primer (P19d, siehe Abbildung 22A) verwendet, der zwei Punktmutation im 3'-terminalen Bereich besitzt. Zusammen mit der Mutation im transgenen *CKX1*-Gen erzeugen diese Mutationen eine Schnittstelle für *Bgl*II, wohingegen das Amplifikat der endogenen *CKX1*-Sequenz keine *Bgl*II-Schnittstelle enthält (Abbildung 22A). Nach dem Verdau des Produktes der *nested* PCR mit *Bgl*II sind die Amplifikate des transgenen *CKX1* also 30 bp kürzer als die Amplifikate des endogenen *CKX1* (Abbildung 22C). In jeden Ansatz wurde etwa die gleiche DNA-Menge der entsprechenden *nested* PCR-Produkte eingesetzt. Wie erwartet, wurden die Amplifikate des Wildtyps von *Bgl*II nicht geschnitten, da diese die T-DNA mit dem transgenen *CKX1* nicht enthielten. Als Kontrolle für die Effizienz des Enzyms wurde ein Fragment der T-DNA unter Verwendung des dCAPS-Primers amplifiziert und ebenfalls mit *Bgl*II verdaut. Da die T-DNA ausschließlich das mutierte transgene *CKX1*-Allel beinhaltet, sollte die Bande vollständig verdaut worden sein. Wie auf Abbildung 22C zu sehen ist, zeigte die gesamte Bande die erwartete Größenänderung, was beweist, dass mit der eingesetzten Menge Enzym ein vollständiger Verdau des PCR-Produktes möglich ist. Für die beiden Überexpressionslinien wurde beobachtet, dass ein Teil der Amplifikate nicht von *Bgl*II geschnitten wurde, der größere Teil jedoch die Größenänderung aufwies. Das bedeutet, dass in den transgenen Linien mehr transgene als endogene *CKX1*-RNAs transkribiert wurden. Mithilfe von ImageJ wurden die Bandenintensitäten der *Bgl*II-verdauten Proben (Abbildung 22C) gemessen, um deren prozentuales Verhältnis zueinander und somit deren Anteil an der zuvor beobachteten Erhöhung des *CKX1*-Levels (Abbildung 22B) zu berechnen. Das Amplikon der Linie 35S:*CKX1*-NAT-8 bestand zu 46 % aus endogenen und zu 54 % aus transgenen *CKX1*-Sequenzen (Abbildung 22D). Da als Template in die *nested* PCR das PCR-Produkt eingesetzt wurde, das eine 3,9-fache Erhöhung des *CKX1*-Transkriptlevels anzeigte, entsprechen 46 % einem 1,8-fachen Anstieg des endogenen *CKX1*-Transkripts verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 22D). Das PCR-Produkt der Linie 35S:*CKX1*-NAT-26 bestand zu 33 % aus endogenen und zu 67 % aus transgenen Sequenzen (Abbildung 22D). Da für das Template dieser *nested* PCR ein 6,1-facher Anstieg des *CKX1*-Levels gemessen wurde, entsprechen 33 % einem 2-fachen Anstieg der endogenen *CKX1*-Transkriptmenge verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung

22D). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Erhöhung des *CKX1-NAT*-Levels einen Anstieg von transgenem und endogenem *CKX1*-Transkriptlevel hervorrief. Die Hypothese, dass *CKX1-NAT* das Transkriptlevel von *CKX1* positiv reguliert, wurde damit unterstützt.

3.6.3 Isolierung und Analyse von *knock-out*-Mutanten der *CKX5-NATs*

Es liegt die Hypothese nahe, dass *CKX5-NAT* die Funktion besitzt, seinen *Sense*-Partner *CKX5* zu regulieren, so wie es für andere *cis*-*NAT*-Paare bereits beschrieben wurde. In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass *CKX5-NAT* schneller oder stärker als *CKX5* durch Cytokinin hochreguliert wurde, was diese Hypothese unterstützt. Um die Hypothese weiter zu analysieren, ist es notwendig, den Verlust des Gens im physiologischen Kontext zu untersuchen. Dafür sollten Mutanten identifiziert und analysiert werden, deren *CKX5-NAT*-Level reduziert ist. So sollten außerdem eventuelle weitere Funktionen und die biologische Relevanz von *CKX5-NAT* untersucht werden.

3.6.3.1 Isolierung von *CKX5-NAT* T-DNA-Insertionsmutanten

Um Pflanzen zu identifizieren, die einen Verlust oder eine starke Verringerung der *CKX5-NAT*-Level aufweisen, wurden die T-DNA-Insertionspopulationen des Salk-Instituts (Alonso et al., 2003), die GABI-Kat-Mutantenkollektion (Kleinboelting et al., 2012) und die SLAT-Mutantenkollektion des John Innes Centre (SM) (Tissier et al., 1999) nach geeigneten T-DNA-Insertionen durchsucht. Diese sollten sich innerhalb der *CKX5-NAT* transkribierten Bereiche oder im *upstream* liegenden Promotorbereich befinden, in möglichst vielen der Isoformen, jedoch nicht im *CKX5*-Transkript lokalisiert sein. Da ein großer Teil der Sequenzen von *CKX5-NAT* und *UBC16* identisch sind, wurden auch Linien miteinbezogen, deren T-DNA im *UBC16*-Transkript lokalisiert ist. Es wurden 15 Linien identifiziert, deren T-DNA-Insertionsort im definierten Bereich vorhergesagt wurde und die über NASC verfügbar waren (Anhang, Tabelle 24). Für die weiteren Analysen wurden jene Linien ausgewählt, die über NASC bereits als homozygote Linien bezogen werden konnten. Zudem wurde die Linie *ckx5-nat-SM1* der SLAT-Mutantenkollektion ausgewählt, da die T-DNA entsprechend des vorhergesagten Insertionsortes alle identifizierten *CKX5-NAT*-Isoformen trifft. Mithilfe von PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen (wie bereits in Kapitel 3.6.1.1 beschrieben) wurden von allen ausgewählten Linien homozygote Pflanzen isoliert bzw. bestätigt (Abbildung 23).

Die Grenzen von Genloci und T-DNAs wurden amplifiziert und sequenziert, wodurch die exakte Position der T-DNA-Insertion bestimmt wurde (Anhang, Tabelle 24). Alle folgenden Positionsangaben der T-DNAs beziehen sich auf das erste Nukleotid des längsten 5'-Endes von *CKX5-NAT* (siehe Abbildung 11B), welches nachfolgend als distaler *CKX5-NAT*-Start bezeichnet wird. Die T-DNA-Insertion der Linie *ckx5-nat-SM1* befindet sich innerhalb des vierten *CKX5*-Introns, 2332 bp *downstream* des distalen *CKX5-NAT*-Starts. Die T-DNA unterbricht somit alle identifizierten *CKX5-NAT*-Isoformen. Die Insertion der Linie *ckx5-nat-S1* liegt innerhalb des 3'-UTRs von *CKX5*, 1705 bp *downstream* des distalen *CKX5-NAT*-Starts und liegt damit innerhalb aller isolierten Isoformen von *CKX5-NAT*. Lediglich *CKX5-NAT*-Transkripte mit dem kürzesten 5'-Ende werden nicht getroffen. Die T-DNA der Linie *ckx5-nat-S2* befindet sich ebenfalls innerhalb des 3'-UTRs von

CKX5, 1637 bp *downstream* des distalen *CKX5-NAT*-Starts und liegt damit innerhalb des Introns der *CKX5-NAT*-Isoformen b und c. Die Insertion der Linie *ckx5-nat-S3* befindet sich 890 bp *downstream* des distalen *CKX5-NAT*-Starts und liegt damit innerhalb des Introns der *CKX5-NAT*-Isoformen a und c und *upstream* der Isoform b. Die T-DNA der Linie *ckx5-nat-S4* liegt 188 bp *downstream* des distalen *CKX5-NAT*-Starts innerhalb des ersten Introns der *CKX5-NAT*-Isoform c.

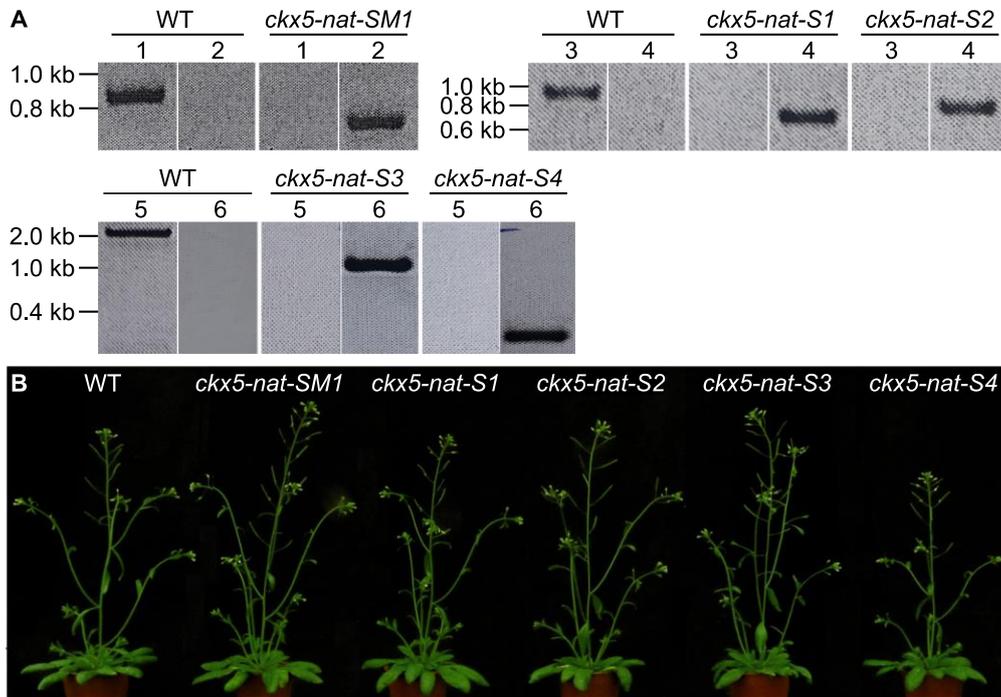


Abbildung 23: Identifikation von T-DNA-Insertionsmutanten des *CKX5-NAT*-Gens.

(A) Bestätigung homozygoter Mutanten der *ckx5-nat*-Linien mittels PCR auf genomische DNA adulter Pflanzen. Zum einen wurde ein genspezifisches Primerpaar (1, 3 und 5), zum anderen ein genspezifischer Primer in Kombination mit einem T-DNA-spezifischen Primer (2, 4 und 6) verwendet. Als Kontrolle diente genomische DNA des Wildtyps (WT). Die Lage der T-DNA-Insertionen und der verwendeten Primer ist im Anhang, Abbildung 32 dargestellt. Die Fragmente wurden in 30 bis 35 Zyklen amplifiziert. **(B)** Auf Erde angezogene Pflanzen der *ckx5-nat*-Linien und des Wildtyps (WT) vier Wochen nach der Keimung.

Um die Anzahl der zu untersuchenden Linien einzugrenzen, wurden homozygote Pflanzen aller Linien auf Erde angezogen und auf Veränderungen bezüglich ihrer Sprossentwicklung untersucht (Abbildung 23B). Die Linien *ckx5-nat-S1* sowie *ckx5-nat-S2* zeigten während des gesamten Entwicklungszyklus keine auffälligen Abweichungen des Sprossphänotyps verglichen mit dem Wildtyp. Bei den Pflanzen der Linien *ckx5-nat-SM1* und *ckx5-nat-S3* wurden leicht verlängerte Hauptsprosse beobachtet. Der Hauptspross von Pflanzen der Linie *ckx5-nat-S4* war leicht verkürzt. Es wurden die Linien *ckx5-nat-SM1*, *ckx5-nat-S3* und *ckx5-nat-S4* für weitere Analysen ausgewählt. Zudem wurde die Linien *ckx5-nat-S1* ausgewählt, da die T-DNA-Insertionen dieser Linie ebenso wie bei der Linie *ckx5-nat-SM1* alle der *CKX5-NAT*-Isoformen trifft.

3.6.3.2 Molekulare Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten von *CKX5-NAT*

Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob das *full-length* Transkript von *CKX5-NAT* nicht mehr exprimiert wird. Dafür wurden Primer genutzt, welche um die Insertionsorte der T-DNAs herum angeordnet sind (Anhang, Abbildung 32). Für die Linien *ckx5-nat-SM1* und *ckx5-nat-S1* wurde ein Bereich vom vierten *CKX5*-Exon bis zum fünften *UBC16*-Exon amplifiziert. Im Wildtyp konnten drei

Fragmente amplifiziert werden (Abbildung 24A1). Die Fragmente mit den Größen 1382 bp und 1208 bp entsprachen den bekannten *CKX5-NAT*-Isoformen. Das kleinste Fragment entsprach mit einer Größe von 1034 bp der annotierten *CKX5*-Isoform mit dem langen 3'-UTR (*At1g75450.1*). In den Linien *ckx5-nat-SM1* und *ckx5-nat-S1* wurde kein PCR-Produkt detektiert, welches den *CKX5-NAT*-Isoformen entsprach, wodurch ein Verlust des *full-length* Transkripts von *CKX5-NAT* in diesen Linien bestätigt wurde. Ebenso wurde in beiden Linien keine Bande mit der erwarteten Größe für *CKX5* detektiert (Abbildung 24A1), was auf ein Fehlen des *full-length* Transkripts für *CKX5* in beiden Linien hinweist. Für die Linie *ckx5-nat-S1* war dies wahrscheinlich, da sich die T-DNA-Insertion im 3'-UTR von *CKX5*, *upstream* der gewählten Primerposition befindet. Durch die Amplifikation des *CKX5*-Transkripts mit Primern, die einen Bereich vom vierten *CKX5*-Exon bis 2 bp *downstream* des Stoppcodons amplifizieren, wurde gezeigt, dass in dieser Linie ein *CKX5*-Transkript mit vollständiger CDS exprimiert wurde (Abbildung 24A4). Für die Linie *ckx5-nat-SM1* war der Verlust des *CKX5*-Transkripts nicht zu erwarten, da sich die T-DNA-Insertion innerhalb des vierten *CKX5*-Introns befindet. Da in dieser Linie ebenfalls kein *full-length* Transkript des *CKX5-NAT* detektiert wurde, wäre es möglich, dass der Ausfall des *full-length* *CKX5-NAT* den Verlust des *CKX5*-Transkripts bewirkt. Es ist jedoch auch denkbar, dass die T-DNA trotz ihrer Lokalisation im *CKX5*-Intron das korrekte Spleißen dieses Introns stört und somit zum Verlust des *full-length* Transkripts von *CKX5* führt. Für die Linien *ckx5-nat-S3* und *ckx5-nat-S4* konnte aufgrund der begrenzten Positionsmöglichkeiten der Primer wegen der Nähe der T-DNA-Insertion zum 5'-Ende des *CKX5-NATs* keine Primerkombination identifiziert werden, welche den Insertionsort umschließt und gleichzeitig *CKX5-NAT* spezifisch amplifiziert.

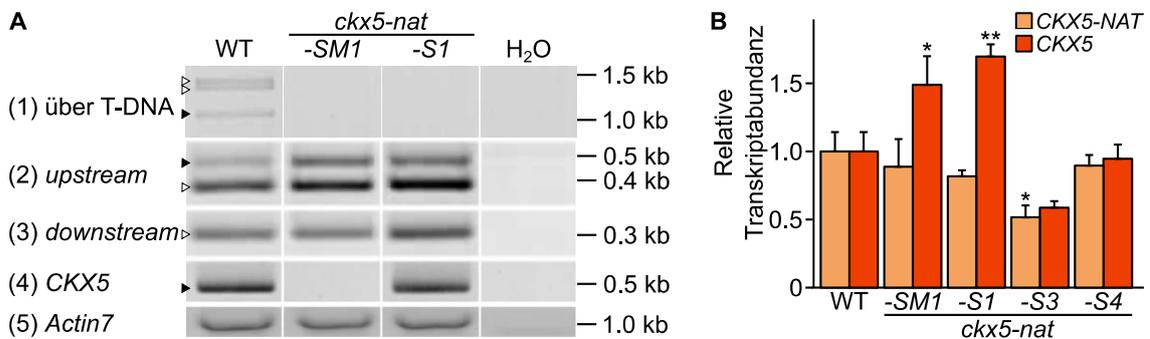


Abbildung 24: Molekulare Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten des *CKX5-NAT*-Gens.

(A) Analyse der Transkriptlevel von *full-length* *CKX5-NAT* und *CKX5* in den Linien *ckx5-nat-SM1* und *-S1* mittels RT-PCR. Es wurden Primer zur Detektion von *CKX5-NAT* (weiße Pfeile) sowie *CKX5* (schwarze Pfeile) verwendet, welche die T-DNA umschließen oder *upstream* bzw. *downstream* der T-DNA liegen. Als Template diente Gesamt-cDNA, welche von RNA 14 Tage alter Keimlinge revers transkribiert wurde, bzw. ddH₂O als Negativkontrolle. *Actin7* diente zur Kontrolle der cDNA-Menge. Die Lage der verwendeten Primer ist im Anhang, Abbildung 32 dargestellt. Die Fragmente wurden in 30 bis 35 Zyklen amplifiziert. **(B)** Transkriptlevelmessung von *CKX5-NAT* in 14 Tage alten Keimlingen der *ckx5-nat*-Mutanten. Die Bestimmung der Transkriptlevel erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptlevel von *UBC10* und *TAF115* normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n ≥ 2); * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01 bezogen auf den Wildtyp (WT) (Studentischer T-Test).

Ohnehin ist es essentiell, eine Linie zu identifizieren, deren *CKX5-NAT*-Level über die gesamte Transkriptlänge reduziert ist, da *CKX5-NAT* wahrscheinlich nicht aufgrund eines kodierten Proteins, sondern aufgrund seiner Transkriptstruktur aktiv ist und möglicherweise bereits der funktionale Teil des Transkripts für seine Aktivität genügen würde. Um zu überprüfen, ob alle Bereiche des

CKX5-NAT reduziert sind, wurden weitere RT-PCRs durchgeführt, welche Bereiche *upstream* sowie *downstream* der Insertionsorte der Linien *ckx5-nat-SM1* und *ckx5-nat-S1* amplifizierten (Abbildung 24A2 bzw. A3). Es wurden sowohl vor als auch hinter den T-DNA-Insertionen Fragmente detektiert, deren Größe den *CKX5-NAT*-Isoformen entsprachen. Die Intensität der Banden lässt darauf schließen, dass die Abundanz der Transkripte nicht geringer als im Wildtyp war, sondern etwas erhöht. Da sich die T-DNA-Insertionen der Linien *ckx5-nat-S3* und *ckx5-nat-S4* im 5'-terminalen Bereich bzw. *upstream* der meisten *CKX5-NAT*-Isoformen befinden, wurde auf die Amplifikation von Fragmenten *upstream* der T-DNAs verzichtet. Die Bereiche *downstream* der T-DNAs dieser Linien wurden mit der nachfolgenden qPCR-Analyse kombiniert.

Mittels qPCR wurden die *CKX5-NAT*-Level quantifiziert, wobei aufgrund der Primerpositionen ein Bereich *upstream* der Insertion der Linie *ckx5-nat-SM1* bzw. *downstream* der Insertion der Linien *ckx5-nat-S1*, *ckx5-nat-S3* und *ckx5-nat-S4* detektiert wurde (Abbildung 24 B). Verglichen mit dem Wildtyp wurde bei der Linie *ckx5-nat-S3* eine signifikante Verringerung des *CKX5-NAT*-Levels um 48 % gemessen. Alle anderen Linien zeigten keine signifikante Veränderung der Abundanz der *CKX5-NAT*-Fragmente. Eine Erhöhung der Transkriptlevel, wie es bei der RT-PCR beobachtet wurde, konnte nicht bestätigt werden.

Da vermutet wird, dass *CKX5-NAT* einen regulatorischen Einfluss auf seinen *Sense*-Partner besitzt, wurde das *CKX5*-Transkriptlevel in den *ckx5-nat*-Insertionslinien untersucht. Mithilfe einer qPCR wurde ein Fragment innerhalb des ersten Exons des *CKX5*-Transkripts quantifiziert (Abbildung 24B). Für die Linien *ckx5-nat-SM1* und *ckx5-nat-S1* wurde ein signifikanter Anstieg des *CKX5*-Levels auf das 1,5-fache bzw. 1,7-fache Level im Vergleich zum Wildtyp gemessen. In beiden Linien war das *CKX5-NAT*-Level nicht signifikant verändert, jedoch befinden sich beide T-DNA-Insertionen innerhalb des Bereiches, von dem das *CKX5*-Transkript transkribiert wird. Es handelte sich bei der Erhöhung des *CKX5*-Levels also möglicherweise um einen direkten Einfluss der jeweiligen T-DNA-Insertion auf das *CKX5*-Transkript, unabhängig von *CKX5-NAT*. Die *CKX5*-Level in der Linie *ckx5-nat-S4* zeigte keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp. In der Linie *ckx5-nat-S3* wurde eine Verringerung des *CKX5*-Levels um 41 % verglichen mit dem Wildtyp gemessen. Da in dieser Linie ebenfalls das *CKX5-NAT*-Level reduziert war und die T-DNA-Insertion sich *downstream* des *CKX5*-Transkripts befindet und somit wahrscheinlich nicht direkt das *CKX5*-Transkriptlevel beeinflusst, weist das Ergebnis auf eine positive regulatorische Funktion von *CKX5-NAT* auf seinen *Sense*-Partner *CKX5* hin.

3.6.3.3 Phänotypische Analyse von *ckx5-nat-S3*

Um zu untersuchen, ob die molekularen Veränderungen der Linie mit reduziertem *CKX5-NAT*-Level *ckx5-nat-S3* sich auf die Entwicklung der Pflanzen auswirkt, wurden die Pflanzen dieser Linien phänotypisch analysiert. Aus Zeitgründen beschränkte sich diese Analyse bislang auf eine vorläufige Untersuchung der Infloreszenzen, des Wurzelwachstums und der Sensitivität gegenüber Cytokinin.

Wie bereits erwähnt, zeigten die Pflanzen der Linie *ckx5-nat-S3* keine auffälligen Veränderungen der Sprossentwicklung. Bartrina et al. (2011) haben gezeigt, dass die Infloreszenzmeristemaktivität und -größe durch *CKX5* reguliert werden. Um einen Eindruck davon zu erhalten, welchen Einfluss das durch die *CKX5-NAT*-Reduktion verringerte *CKX5*-Transkriptlevel auf die Meristementwicklung

hat, wurden die Infloreszenzmeristeme der Hauptsprosse von Pflanzen der Linie *ckx5-nat-S3* untersucht. Es konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Infloreszenzen der Linie *ckx5-nat-S3* und des Wildtyps festgestellt werden (Abbildung 25A).

Sowohl das Wachstum der Primärwurzel als auch die Entwicklung von Lateralwurzeln werden durch Cytokinin beeinflusst (Kieber und Schaller, 2014; Werner und Schmülling, 2009). Schon seit der Entdeckung des Phytohormons ist die inhibitorische Wirkung von exogenem Cytokinin auf die Wurzelentwicklung bekannt (Skoog und Miller, 1957) und Pflanzen mit erhöhter Cytokininbiosyntheseaktivität oder gesteigerter Cytokininsensitivität entwickeln kürzere Wurzeln und weniger Seitenwurzeln (Jensen, 2014; To et al., 2004). Die Analyse der Promotoraktivität zeigte, dass *CKX5-NAT* in den Wurzelspitzen exprimiert wurde, was vermuten lässt, dass *CKX5-NAT* eine Rolle für die Entwicklung des Wurzelsystems spielen könnte. Um zu analysieren, ob die Reduktion des *CKX5-NAT* einen Einfluss auf die Wurzelentwicklung oder die Cytokininsensitivität hat, wurde die Wurzelentwicklung von Pflanzen der Linie *ckx5-nat-S3* auf cytokininfreiem und cytokininhaltigem Wachstumsmedium mit der des Wildtyps verglichen (Abbildung 25B und C). Weder die Primärwurzellänge noch die Lateralwurzelndichte der Mutanten zeigten auf cytokininfreiem Medium signifikante Unterschiede zu der des Wildtyps. Die Reduktion der Primärwurzellänge durch die Zugabe von 50 nM BA ins Wachstumsmedium war bei den *ckx5-nat-S3*-Pflanzen nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Wildtyp. Die Entwicklung von Lateralwurzeln wurde durch die Zugabe von BA sowohl in der Linie *ckx5-nat-S3* als auch im Wildtyp gänzlich verhindert. Es konnte demnach weder ein Einfluss von *CKX5-NAT* auf die Wurzelentwicklung der Pflanzen noch auf die Sensitivität gegenüber Cytokinin beobachtet werden.

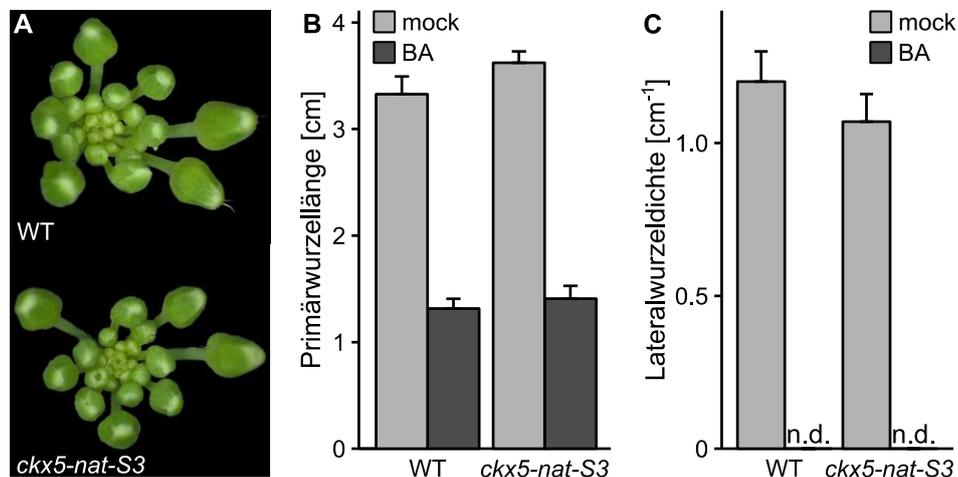


Abbildung 25: Phänotypische Analyse der *knock-down*-Mutante *ckx5-nat-S3*.

(A) Infloreszenzen von auf Erde angezogenen Pflanzen des Wildtyps (WT) und der Linie *ckx5-nat-S3* fünf Wochen nach der Keimung. (B) Primärwurzellänge sowie (C) Lateralwurzelndichte von 10 Tage alten Keimlingen des Wildtyps (WT) und der Linie *ckx5-nat-S3*. Die Pflanzen wurden auf Wachstumsmedium mit 50 nM BA bzw. der Lösemittelkontrolle (mock) kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n \geq 14$). Keimlinge auf BA-haltigem Medium bildeten keine Lateralwurzeln aus (n.d.).

3.7 Untersuchung der evolutionären Konservierung von *CKX-NATs*

Funktionell relevante DNA-Elemente werden in Genomen konserviert und bleiben im Laufe der Evolution erhalten. Es wurde gezeigt, dass funktionelle, nicht-kodierende Transkripte evolutionär

konserviert werden, wobei die Nukleotidsequenzen weniger stark konserviert werden als die Sekundärstruktur (Johnsson et al., 2014; Torarinsson et al., 2006; Washietl et al., 2005). Auch die Nukleotidsequenz von lncRNA-Promotoren zeigen häufig eine Konservierung (Derrien et al., 2012; Pang et al., 2006).

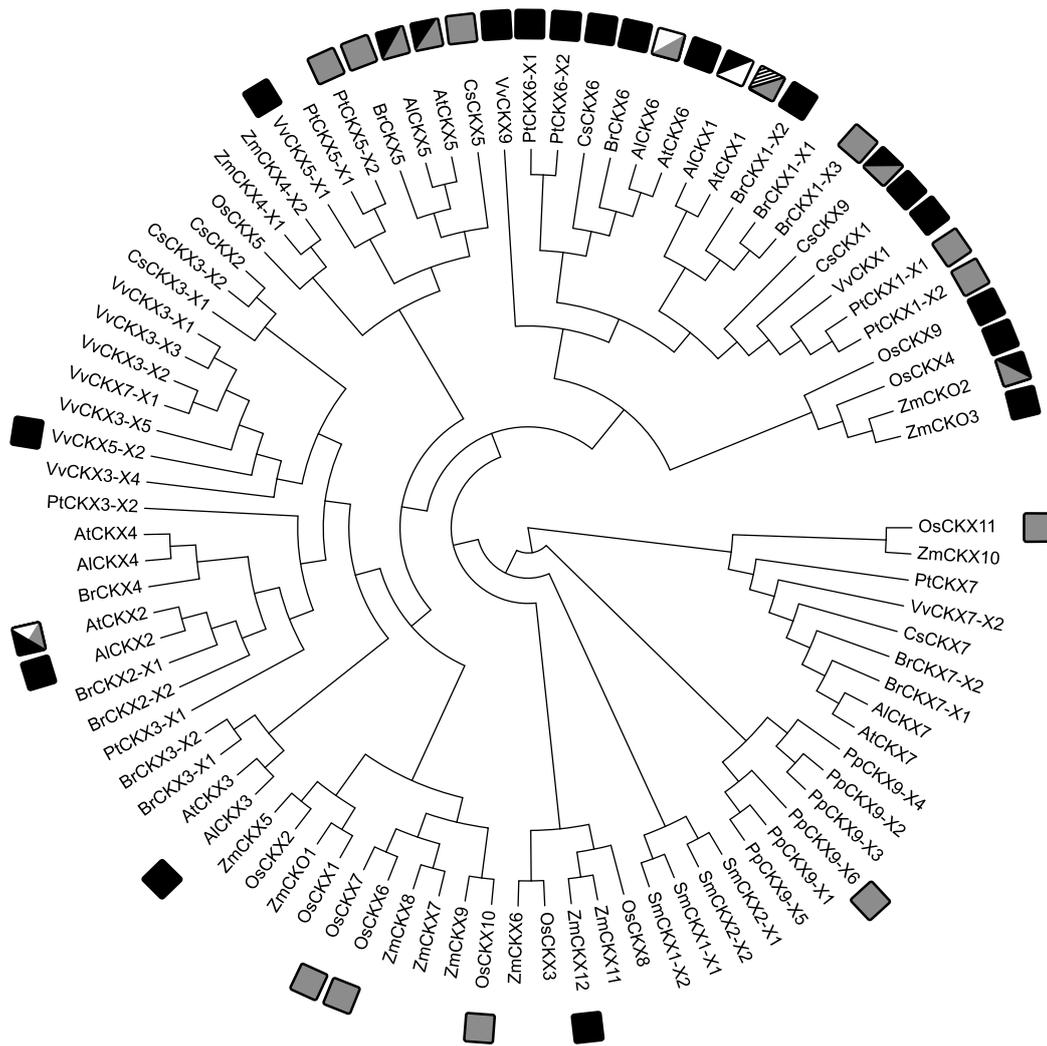
Um näher zu untersuchen, ob die NATs der CKX-Gene biologisch relevant sind, sollte analysiert werden, ob sie evolutionär konserviert sind. Dafür wurde zunächst untersucht, ob Hinweise auf CKX-NATs in anderen Pflanzenspezies existieren. Zudem wurden die Transkriptstrukturen eventuell identifizierter CKX-NAT-Homologe verglichen und auf Konservierung überprüft.

3.7.1 CKX-NATs existieren an homologen Loci verschiedener Pflanzenspezies

Alle bisherigen Analysen der CKX-NATs bezogen sich auf den Modellorganismus *A. thaliana*. Um die evolutionäre Konservierung der CKX-NATs zu untersuchen, wurden Transkriptomdaten verschiedener Pflanzenspezies *in silico* nach Hinweisen auf CKX-NAT-Orthologe durchsucht. Dafür wurden Spezies der *Embryophyta* mit verschiedenen Verwandtschaftsgraden zu *A. thaliana* ausgewählt, für die Transkriptominformationen sowie auf RNA-Seq-Daten basierende Intronpositionen verfügbar waren. *A. lyrata* der Gattung *Arabidopsis* und *B. rapa* als Vertreter der Familie der *Brassicaceae* wurden als nahe Verwandte betrachtet. Diese standen als Vertreter der Malviden den Fabiden *P. trichocarpa* und *Cucumis sativus* (*C. sativus*) gegenüber und gehören zusammen mit *Vitis vinifera* (*V. vinifera*), als Vertreter der basaleren *Vitales*, in die Ordnung der Rosiden. Als Vertreter der Monokotyledonen wurden *O. sativa* und *Z. mays* ausgewählt. Diese Samenpflanzen wurden den basaleren Landpflanzen, dem Bärlappgewächs *S. moellendorffii* und dem Laubmoos *P. patens*, gegenübergestellt. Mithilfe der Datenbank KEGG Orthology (Tabelle 7; Stand 03.05.2019) wurden die Proteinsequenzen aller CKX-Homologe der ausgewählten Spezies isoliert. Diese wurden genutzt um ein Dendrogramm zu erzeugen, mit dessen Hilfe die Verwandtschaftsbeziehungen der CKX-Homologe dargestellt wurden (Abbildung 26).

Mit Hilfe des NCBI Graphical Sequence Viewer (Tabelle 8; Stand 30.09.2019) wurden die Genloci der jeweiligen CKX-Homologe visualisiert. Innerhalb der Sequenzbereiche, in denen sich die jeweiligen Genloci der CKX-Homologe befinden, wurden einerseits Informationen zu annotierten Transkriptstrukturen mit entgegengesetzter Orientierung zu jener der CKX-Transkripte und andererseits annotierte Intronpositionen von Transkriptsequenzen mit entgegengesetzter Orientierung zu jener der CKX-Transkripte gesammelt (Anhang, Tabelle 29). Für erstere wurden die im NCBI Graphical Sequence Viewer verfügbaren Informationen über die Transkriptlänge und die Länge eventuell existierender CDS von Genen erfasst, deren Annotation von den Informationsdatenbanken NCBI (Tabelle 7) und INSDC (Tabelle 7) bereitgestellt wurde. Für die Identifikation der Intronpositionen wurden die im NCBI Graphical Sequence Viewer dargestellten *RNA-seq intron-spanning reads (aggregate, filtered)* genutzt, deren Annotation von NCBI bereitgestellt wurde. Mithilfe diesen Informationen wurden Hinweise auf die Existenz von lncNATs ermittelt, welche mit Transkriptsequenzen von CKX-Homologen überlappen. Als Hinweis galt zum einen die Annotation von Transkripten, welche ein ORF mit einer CDS-Länge von ≤ 300 bp enthielten. Zum anderen wurden annotierte Introns, die keinem proteinkodierenden NAT zugeordnet werden konnten und deren Grenzen den Konsensussequenzen eukaryontischer Introns entsprachen, als Hinweis auf die

Existenz von lncNATs betrachtet. Diese Introns werden im Folgenden als NAT-Introns bezeichnet. Weiterhin wurden Hinweise auf die Existenz von Promotor-lncNATs gesammelt. Als Hinweis galt die Annotation von Transkripten *upstream* des entsprechenden CKX-Transkriptionsstarts mit einer maximalen Entfernung von 1000 bp vom CKX-Startcodon und einem ORF mit einer CDS-Länge von ≤ 300 bp. Die Ergebnisse dieser Analyse sind im Anhang, Tabelle 29 aufgelistet. Genloci mit existierenden Hinweisen auf lncNATs oder Promotor-lncNATs wurden im Dendrogramm markiert (Abbildung 26). Darüber hinaus wurden Hinweise auf die Existenz von proteinkodierenden NATs gesammelt. Als Hinweise galt die Annotation von Transkripten, welche ein ORF mit einer CDS-Länge von mehr als 300 bp enthielten. Dies umfasste sowohl bereits charakterisierte als auch hypothetische proteinkodierende Transkripte.



Das Dendrogramm zeigt, dass *AtCKX7* eine von allen anderen *AtCKX*-Genen isolierte Stellung einnahm und mit seinen Homologen aus *A. lyrata*, *B. rapa*, *C. sativa*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera* sowie den Monokotyledonen *O. sativa* und *Z. mays* ein eigenständiges Cluster bildete, in welchem keine Anzeichen für IncNATs beobachtet wurden. Auch bei den *CKX*-Homologen von *P. patens* und *S. moellendorffii*, welche jeweils ein eigenständiges Cluster bildeten, wurden keine Hinweise auf IncNATs gefunden. Ein weiteres eigenständiges Cluster wurde von den *CKX*-Homologen der Monokotyledonen *OsCKX3*, *OsCKX8*, *ZmCKX6*, *ZmCKX11* und *ZmCKX12* gebildet, wobei die Existenz eines NAT-Introns am 5'-Terminus des *ZmCKX12* Transkripts detektiert wurde. Die übrigen *CKX*-Homologe spalteten sich in zwei größere Cluster auf.

Das eine Cluster beinhaltete *AtCKX1*, *AtCKX6* und deren Orthologe, wozu auch *VvCKX9*, *OsCKX4*, *OsCKX9*, *ZmCKO2* und *ZmCKO3* gehören. Bei 16 der 21 Homologen wurden Hinweise auf IncNATs identifiziert. Für zwölf der Orthologe gab es zudem Indizien für die Existenz mehrerer Splicingvarianten dieser IncNATs, ähnlich wie es für *AtCKX1-NAT* und *AtCKX6-NAT* gezeigt wurde. Für das Ortholog *AICKX6* wurden Hinweise auf die Existenz eines Promotor-IncNAT gefunden. Bei den vier Homologen ohne Hinweise auf eine IncNAT-Existenz handelte es sich um *BrCKX1-X1*, *BrCKX1-X3*, *PtCKX1-X1* und *PtCKX1-X2*, welche vermutlich jeweils infolge einer Genduplikation entstanden sind. Die Paare waren an zwei verschiedenen Positionen der Unter-Cluster zu finden. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass IncNATs bei dem letzten gemeinsamen Vorfahren dieses Clusters existierten, während der Evolution der einzelnen Homologe erhalten wurden und lediglich für einzelne Homologe nicht konserviert wurden.

Das andere größere Cluster bestand aus einem Unter-Cluster mit Homologen von *AtCKX5* und einem Unter-Cluster mit den Homologen von *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX4*, wobei *AtCKX2* und *AtCKX4* näher miteinander verwandt sind. Bei dem Großteil dieser Homologe wurden keine Hinweise auf IncNATs gefunden, lediglich vereinzelt gab es Indizien auf IncNATs. An den Loci von *AtCKX2* und *AICKX2* wurden ein nicht-kodierendes *head-to-head-NAT* bzw. ein NAT-Intron am 5'-Terminus gefunden. Möglicherweise existierte ein nicht-kodierendes *head-to-head-NAT* bereits bei ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren. Im ersten Intron von *VvCKX5-X2* wurde ein Transkript mit einem kurzen hypothetischen ORF von 188 bp vorhergesagt und im ersten Intron von *AICKX3* wurde ein NAT-Intron identifiziert. Da nur Hinweise auf IncNATs in einzelnen Mitgliedern dieses Genclusters gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, dass diese unabhängig voneinander entstanden sind.

Für den *AtCKX5*-Locus wurde zusätzlich zu dem bereits aus der RACE-Analyse bekannten *CKX5-NAT* ein weiteres IncNAT identifiziert, welches mit dem 5'-UTR von *CKX5* überlappt. Analog zu *AtCKX5* wurde auch für *AICKX5* ein *tail-to-tail-NAT* identifiziert, das für *AIUBC16* kodiert. Ähnlich dem *AtCKX5*-Locus wurde auch am *AICKX5*-Locus ein NAT-Intron gefunden, welches komplementär zum 3'-UTR von *AICKX5* ist und von den *AIUBC16*-Introns abweicht. Es ist denkbar, dass *UBC16* bereits als *tail-to-tail-NAT* des gemeinsamen Vorfahren von *AtCKX5* und *AICKX5* existierte und verschiedene Transkriptisoformen besaß, von denen ein Teil für ein Protein kodierte und ein Teil als *CKX5-NAT* agierte. Am 5'-Terminus des *VvCKX5*-Locus wurde ein Transkript mit einem kurzen hypothetischen ORF von 177 bp vorhergesagt, welches jedoch keine strukturellen Ähnlichkeiten zu den NATs des *AtCKX5*- und *AICKX5*-Locus aufwies und vermutlich unabhängig von diesen entstand.

Die Suche nach lncNATs an homologen Loci der *CKX*-Gene in anderen Spezies zeigte, dass nahezu alle Genloci der *CKX1*- und *CKX6*-Homologe Hinweise auf die Existenz von lncNATs aufwiesen. Lediglich an den Genloci von *BrCKX1-X1*, *BrCKX1-X3*, *PtCKX1-X1* und *PtCKX1-X2* konnten mit den genutzten Auswahlkriterien keine lncNATs detektiert werden. Um den genomischen Kontext an diesen Genloci zu untersuchen, wurden mit Hilfe des NCBI Graphical Sequence Viewer (Tabelle 8; 08.05.2020) die entsprechenden Genloci visualisiert (Anhang, Abbildung 34). An drei der vier Loci wurde ein *tail-to-tail*-NAT identifiziert (Abbildung 26). Diese gelten jedoch nicht als lncNAT, da sie jeweils ein ORF beinhalten, dessen Länge die festgelegte Grenze von 300 bp übersteigt. Die ORFs von *PtCKX1-X1* und *PtCKX1-X2* kodieren für hypothetische Proteine, welche bislang nicht experimentell nachgewiesen wurden. Ähnlich den *AtCKX1-NATs* und *AtCKX6-NATs* konnten auch für die NATs am *PtCKX1-X1*-Locus sowie am *PtCKX1-X2*-Locus mehrere Isoformen mit verschiedenen Exon-Intron-Strukturen identifiziert werden. Das *tail-to-tail*-NAT am *BrCKX1-X1*-Locus kodiert für eine S-Formylglutathionhydrolase. Die Expression und Funktion dieser wurde bislang nicht experimentell nachgewiesen, das Protein weist jedoch eine hohe Homologie zur entsprechenden S-Formylglutathionhydrolase in *A. thaliana* auf, deren Funktionalität nachgewiesen wurde (Cummins et al., 2006; Kordic et al., 2002). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bis auf den Locus *BrCKX1-X2* an allen homologen Genloci im Cluster mit *AtCKX1* und *AtCKX6* NATs existierten, wobei an 17 dieser Loci nicht-kodierende Transkripte vorkamen und die Transkripte an drei Loci möglicherweise für Proteine kodieren.

3.7.2 Konservierung der NAT-Sequenz

Obwohl die Basenabfolge von lncRNAs im Vergleich mit proteinkodierenden Transkripten eher schwach evolutionär konserviert ist, zeigen einige genomweite Analysen für lncRNAs einen höheren Grad evolutionärer Konservierung auf Sequenzebene im Vergleich zu nicht-transkribierten DNA-Sequenzen. Um zu untersuchen, ob homologe *CKX-NATs* verschiedener Spezies eine Konservierung auf Sequenzebene aufweisen, wurde eine Analyse der Sequenzhomologie durchgeführt. Um homologe *CKX-NAT*-Sequenzen mit ausreichend hoher Homologie für einen zuverlässigen Vergleich zu identifizieren, wurde BLASTn (Tabelle 8; Stand 21.05.2020) genutzt. Als *Query*-Sequenz wurden die Sequenzen der Transkriptisoformen *CKX1-NAT f* und *CKX6-NAT e*, die entsprechend den Ergebnissen der semiquantitativen Transkriptlevelanalyse die abundantesten Isoformen darstellten, welche zumindest teilweise mit der Transkriptsequenz des *Sense*-Partners überlappten. Um Homologien zu *CKX*-kodierenden Sequenzen zu vermindern, wurden als *Query*-Sequenzen für die BLASTn-Analyse lediglich die Sequenzbereiche genutzt, welche *upstream* des *CKX1*- bzw. des *CKX6*-Transkripts liegen. Die identifizierten homologen Sequenzen sind im Anhang, Tabelle 30 aufgelistet.

Für *CKX1-NAT f* wurden Homologien mit Transkripten 20 verschiedener Genloci gefunden. Zehn dieser Loci stellen homologe *CKX1*-Loci dar und erwartungsgemäß besaßen die homologen Sequenzen dieser Transkripte eine der *Query*-Sequenz entgegengesetzte Orientierung. Die Transkripte von sieben der Loci befanden sich *upstream* oder überlappen mit einem homologen *CKX1*-Locus und besaßen die entgegengesetzte Orientierung zum *CKX1*-Transkript der entsprechenden Spezies. Für einige Loci wurden mehrere Transkriptisoformen mit Homologien zu

CKX1-NAT f identifiziert. Für *CKX6-NAT e* wurden Homologien mit sechs Genloci gefunden. Alle der homologen Transkripte befanden sich *upstream* oder überlappten mit homologen *CKX6*-Transkripten der jeweiligen Spezies und besaßen im Vergleich mit diesen die gegenläufige Orientierung. Für jeden identifizierten Locus ist die Transkriptisoform mit der größten Sequenzhomologie zur *Query*-Sequenz in Abbildung 27 dargestellt.

Um eine eventuelle Konservierung der Nukleotidsequenz zu analysieren, wurde für die identifizierten Loci von *A. lyrata*, *C. sativa*, *C. rubella* und *Eutrema salsugineum* (*E. salsugineum*) die Sequenz der Isoform mit der höchsten Homologie (niedrigster *E-value*) mit der entsprechenden *CKX-NAT*-Transkriptsequenz aligniert. Es wurden lediglich die Bereiche *upstream* des *CKX-Sense*-Transkripts genutzt, um Homologien aufgrund der Konservierung komplementärer *CKX*-Sequenzen auszuschließen. Diese umfassten für *AtCKX1-NAT* 1181 bp und für *AtCKX6-NAT* 1222 bp. Um zu bestimmen, wie hoch die Sequenzübereinstimmung von vermutlich nicht-funktionalen und nicht-transkribierten homologen DNA-Abschnitten zwischen *A. thaliana* und den anderen untersuchten Spezies ist, wurden zudem vier homologe intergenische Bereiche aligniert. Dafür wurden intergenische Bereiche zwischen den homologen Genen von *At2g44940* und *At2g44950* bzw. zwischen den homologen Genen von *At3g63230* und *At3g63240* ausgewählt, da diese in allen der untersuchten Spezies benachbart liegen und somit davon ausgegangen werden kann, dass während der unabhängigen Evolution der einzelnen Spezies keine größeren chromosomalen Veränderungen stattgefunden haben. Die intergenischen Bereiche liegen *downstream* der angrenzenden transkribierten Bereiche, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass homologe Promotorbereiche mit möglicherweise konservierten regulatorischen Sequenzelementen miteinander verglichen wurden. Um eine vergleichbare Alignmentlänge zu erhalten, wurden Sequenzabschnitte mit einer Länge von 1300 bp mit einem Abstand von 200 bp zum 3'-Ende des angrenzenden Transkripts ausgewählt (Anhang, Abbildung 35). Darüber hinaus wurden die homologen *CKX-Sense*-Transkripte für jeden der orthologen *CKX-NAT*-Loci aligniert. Für diese ist eine höhere Homologie als für die intergenischen Bereiche zu erwarten, da die Sequenzen dieser proteinkodierenden Transkripte mit hoher Wahrscheinlichkeit funktional sind und somit unter einem höheren Selektionsdruck stehen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Die detaillierte Auflistung der Sequenzidentitäten der einzelnen intergenischen Bereiche ist im Anhang, Tabelle 31 dargestellt.

Erwartungsgemäß zeigten die *CKX-Sense*-Transkriptsequenzen eine höhere Sequenzidentität als die intergenischen Bereiche. Mit ≥ 79 % identischer Basen war die Sequenzidentität jedes der homologen *CKX*-Transkripte mehr als 10 % höher als die der einzelnen intergenischen Bereiche in der entsprechenden Spezies (Tabelle 23). Die Sequenzidentität der homologen *CKX1-NATs* lag 3,3 % bis 41,9 % unter der des jeweiligen *Sense*-Transkripts. Eine Ausnahme bildeten die homologen *CKX1-NATs* des Locus LOC110228908 und LOC110228910, deren Sequenzidentitäten 0,5 % bzw. 0,1 % über der des entsprechenden homologen *CKX1*-Transkripts lag. Interessanterweise lag auch die Sequenzidentität der *CKX-NAT*-Sequenzen über der durchschnittlichen Sequenzidentität der intergenischen Bereiche der entsprechenden Spezies, was auf eine evolutionäre Konservierung der *CKX-NATs* auf Ebene der Nukleotidsequenz hindeutet. Lediglich die Sequenzidentität eines *CKX1-NAT*-Homologs aus *C. sativa* am Locus LOC104782643 lag mit 48,9 % unter der durchschnittlichen Sequenzidentität der intergenischen Bereiche in *C. sativa* von 51,0 %. Es sollte erwähnt werden, dass es sich bei der Untersuchung lediglich um eine vorläufige Analyse handelte,

da die geringe Stichprobenanzahl der intergenischen Sequenzen von $n = 4$ zunächst keine repräsentative Aussage zulässt. Beim direkten Vergleich der Sequenzidentität einzelner intergenischer Sequenzen mit der Sequenzidentität der *CKX-NATs* der entsprechenden Spezies waren zum Teil ähnlich hohe Werte zu beobachten. Es kann somit nicht definitiv beurteilt werden, ob die Konservierung der *CKX-NAT*-Sequenzen evolutionär stärker konserviert ist, als nicht-funktionale intergenische Bereiche.

Tabelle 23: Analyse der Sequenzidentität zwischen *CKX-NATs* bzw. *CKX*-Transkripten aus *A. thaliana* und den entsprechenden orthologen Transkripten verschiedener Spezies.

<i>CKX1</i> -Locus ¹	Identität mit <i>AtCKX1</i> ²	<i>CKX1-NAT</i> -Locus ¹	Identität mit <i>AtCKX1-NAT</i> ²	<i>CKX6</i> -Locus ¹	Identität mit <i>AtCKX6</i> ²	<i>CKX6-NAT</i> -Locus ¹	Identität mit <i>AtCKX6-NAT</i> ²	Intergenische Bereiche ³
<i>A. lyrata</i>								
LOC9317846	92,0%	LOC110228909	92,5%	LOC9312791	84,1%	LOC110228168	75,1%	62,9% ± 13,97
		LOC110228908	88,7%					
		LOC110228910	92,1%					
<i>C. sativa</i>								
LOC104785229	88,5%	LOC104785228	78,7%	LOC104704111	85,1%	LOC104699532	64,6%	51,0% ± 13,37
LOC104793063	90,7%	LOC104793064	62,4%					
LOC104782642	90,8%	LOC104782643	48,9%					
<i>C. rubella</i>								
LOC17887842	89,5%	LOC111831218	67,9%	LOC17885237	82,7%	LOC111830395	58,5%	49,4% ± 10,64
<i>E. salsugineum</i>								
				LOC18020194	79,1%	LOC112087125	64,7%	49,0% ± 9,19

¹ entsprechend der NCBI-Annotation der mittels BLAST identifizierten homologen *CKX-NATs* und des entsprechenden *CKX*-Homologs der jeweiligen Spezies; bei mehreren existierenden *CKX1-NAT*-Transkriptisoformen an einem Locus erfolgte die Analyse für die Isoform mit der größten Sequenzhomologie (kleinster *E-value* in BLASTn-Analyse; Tabelle 30)

² Sequenzidentität als prozentualer Anteil der identischen Nukleotide der orthologen Transkripte bezogen auf die Länge des Alignments

³ Mittelwert ± Standardabweichung ($n = 4$) der Sequenzidentitäten der vier intergenischen Bereiche mit dem jeweiligen homologen Bereich in *A. thaliana* (für Einzelauflistung siehe Anhang, Tabelle 31)

Trotz der meist schwachen Konservierung der Nukleotidsequenz, wurde in genomweiten Analysen gezeigt, dass einige strukturelle Merkmale nicht-kodierender Transkripte, wie beispielsweise die Position von Introns, einem evolutionären Druck unterliegen (Ponjavic et al., 2007). Um Hinweise für eine Konservierung der Spleißgrenzen der *CKX-NATs* zu identifizieren, wurde untersucht, ob sich Exon-Intron-Übergänge an homologen Positionen innerhalb der *CKX-NATs* befanden. Dafür wurden die Spleißgrenzen untersucht, welche sich *upstream* des entsprechenden *CKX*-Transkripts befinden.

Wie in Abbildung 27A zu sehen ist, besaßen die analysierten homologen *CKX1-NATs* jeweils mehrere Introns *upstream* des *CKX1*-Transkripts. Ein Großteil der Spleißgrenzen befand sich an konservierten Positionen der Transkripte (Abbildung 27C). Zwei der Spleißgrenzen befanden sich in drei bzw. fünf Spezies an der homologen Position. Eine der Spleißgrenzen befand sich nicht an der exakt homologen Position, jedoch lagen die Positionen lediglich ein bis zwei Basen voneinander entfernt und die Sequenz *downstream* der Spleißgrenzen war in diesen Spezies konserviert. Die analysierten homologen *CKX6-NATs* besaß jeweils ein Exon *upstream* des *CKX6*-Transkripts. Die Spleißgrenze befand sich in allen Transkripten an einer konservierten Position (Abbildung 27D). Die Sequenz der letzten 19 bp des Exons war in allen *CKX6-NATs* identisch und scheint hochkonserviert zu sein. Diese Ergebnisse weisen auf eine Konservierung der Exon-Intron-Grenzen der *CKX-NATs* hin, was eine funktionelle Relevanz der Transkriptstruktur vermuten lässt.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der Analysen auf eine evolutionäre Konservierung der Existenz von lncNATs an *CKX1*- und *CKX6*-Genloci verschiedener Spezies sowie der Nukleotidsequenz und der Transkriptstruktur homologer *CKX-NATs* hin.

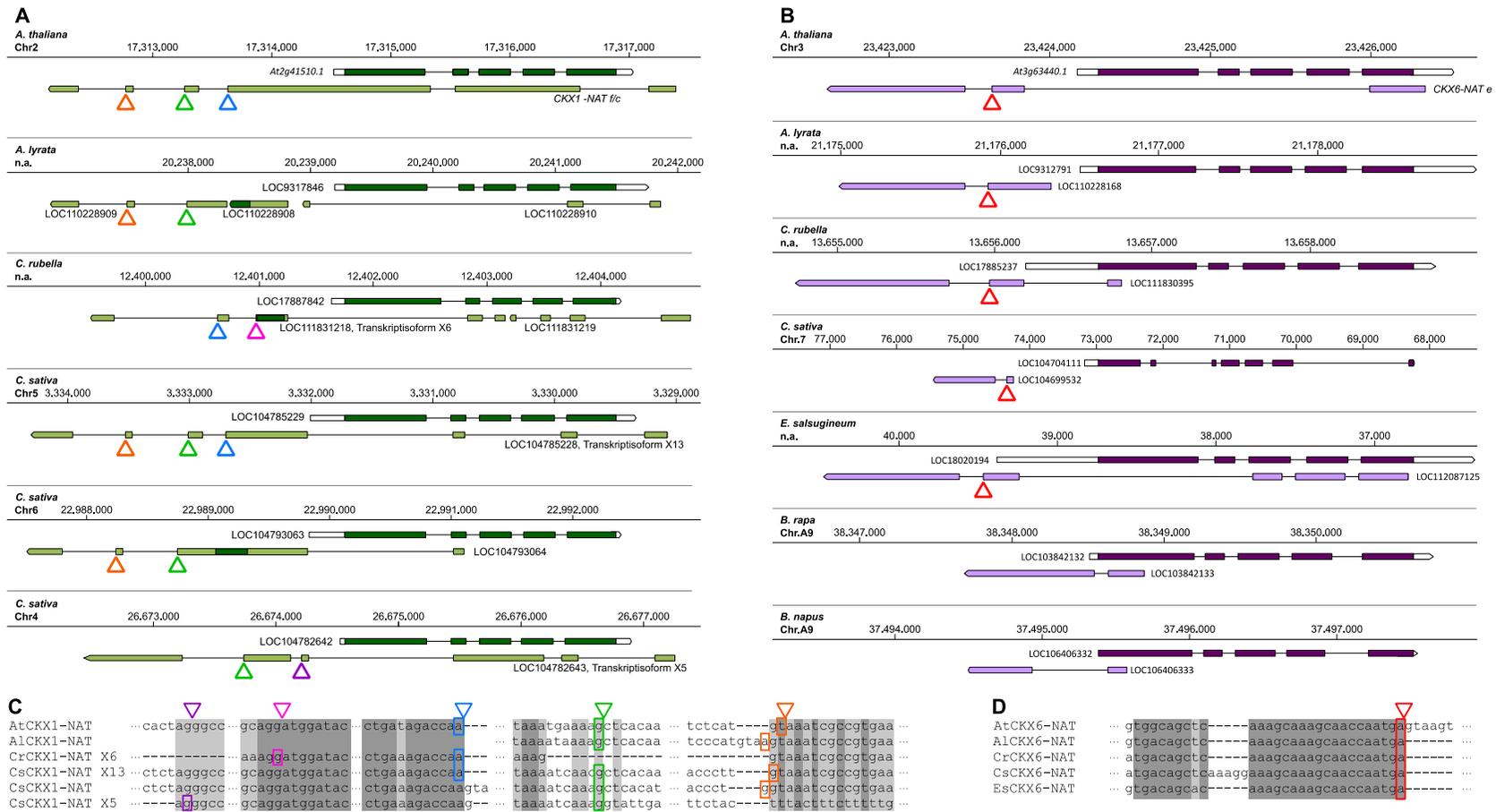


Abbildung 27: Mittels BLAST identifizierte Transkriptisofomn mit größter Sequenzhomologie zu CKX1-NAT bzw. CKX6-NAT.

(A) und (B) Schematische Darstellung homologer (A) CKX1-NATs bzw. (B) CKX6-NATs und der zugehörigen Sense-CKXs an den entsprechenden Genloci. Für jeden mittels BLASTn identifizierten Locus (Tabelle 30) wurde die Transkriptisofomn mit der größten Sequenzhomologie zur jeweiligen Query-Sequenz (entspricht dem niedrigsten E-value) dargestellt. Boxen repräsentieren Exons, wobei proteinkodierende und hypothetisch proteinkodierende Bereiche dunkel dargestellt sind. Farbige Pfeile markieren die jeweiligen in (C) und (D) dargestellten Spleißgrenzen. (C) und (D) Alignments der homologen Sequenzen im Bereich der Spleißgrenzen. Stark konservierte Nukleotide sind grau hinterlegt. Pfeile markieren die Spleißgrenze und farbige Umrangungen markieren die letzte Base des entsprechenden Exons. Gleiche Farben markieren Spleißgrenzen an homologen Positionen in der Transkriptsequenz.

4 Diskussion

Die Konzentration von Cytokinin, einem bedeutenden Regulator verschiedenster pflanzlicher Entwicklungsprozesse, muss in den pflanzlichen Zellen präzise kontrolliert werden, was im Zusammenspiel von Biosynthese, Aktivierung, Inaktivierung und Abbau des Hormons erfolgt. Der irreversible Abbau wird von Enzymen katalysiert, welche durch *CKX*-Gene kodiert werden. Die Aktivität von Genen kann durch verschiedene Regulationsmechanismen moduliert werden, wozu unter anderem die Kontrolle durch lncNATs zählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Existenz von lncNATs an den *CKX*-Loci untersucht. Die identifizierten NATs wurden strukturell charakterisiert und funktionell analysiert. Darüber hinaus wurde die evolutionäre Konservierung von *CKX*-NATs untersucht.

4.1 An einigen *CKX*-Loci werden aktiv NATs transkribiert

Obwohl die *in silico*-Analyse auf Antisense-Transkripte an allen *CKX*-Loci hinwies (Abbildung 7), konnten NATs experimentell nur für die drei Loci von *CKX1*, *CKX5* und *CKX6* bestätigt werden (Abbildung 8). Der fehlende experimentelle Nachweis von NATs an anderen Loci hat vermutlich verschiedene Ursachen. Zum einen standen zum Zeitpunkt der ersten *in silico*-Analyse noch vergleichsweise wenige Transkriptomdaten in den genutzten Datenbanken zur Verfügung. Für den *CKX4*-Locus wurde zu diesem Zeitpunkt beispielsweise kein NAT identifiziert, weshalb dieser Locus bereits zu Beginn von der experimentellen Untersuchung ausgeschlossen wurde und eventuelle NATs nicht identifiziert werden konnten. Diese Limitierung wird in zukünftigen Untersuchungen durch die wachsende Zahl von Transkriptomdaten aus verschiedensten Geweben aus zuverlässigeren Quellen, wie strangspezifische RNA-Seq-Analysen, vermutlich stetig sinken. Am *CKX7*-Locus wurde *in silico* zwar eine abweichende Transkriptstruktur beobachtet, diese konnte aber experimentell nicht nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits bedeuten, dass in diesem Bereich kein NAT existiert. Andererseits könnte dieses eventuelle NAT auch lediglich ein zu geringes Expressionlevel aufweisen, um mit der genutzten Untersuchungsmethode identifiziert zu werden. Denkbar wäre auch, dass dieses NAT ausschließlich in anderen, nicht untersuchten Geweben exprimiert wird. Auch für den *CKX3*-Locus wurde ein NAT mit abweichender Transkriptstruktur vorhergesagt. Obwohl die Existenz eines Transkripts mit abweichender Struktur bestätigt werden konnte, stellte sich heraus, dass es sich bei diesem nicht um ein *Antisense*- sondern um ein *Sense*-Transkript handelt. Möglicherweise stellt dieses eine bislang unbekannte Splicevariante von *CKX3* dar.

Die Charakterisierung der identifizierten *CKX1*-, *CKX5*- und *CKX6*-NATs zeigte, dass diese eine 5'-Cap besaßen (Abbildung 12) und polyadenyliert waren, was auf eine aktive Transkription durch die RNA-Polymerase II hindeutet. Die meisten lncRNAs in Pflanzen und anderen Eukaryonten werden von der RNA-Polymerase II transkribiert, prozessiert und damit in der Zelle stabilisiert, was für eine tatsächliche Funktion dieser und gegen die Theorie des „*transcriptional noise*“ spricht (Conley und Jordan, 2012; Wang und Chekanova, 2017). Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die *CKX*-NATs nicht von der pflanzenspezifischen RNA-Polymerase Pol IV/Pol V transkribiert werden, welche dafür bekannt sind, transkriptionelles *Silencing* auszulösen (Matzke und Mosher, 2014; Wierzbicki et al., 2008).

4.2 NATs an CKX-Loci zeigen ein ähnliches Muster struktureller Variabilität

Die Visualisierung der RACE-PCR-Amplikons aller *CKX-NATs* wies auf eine starke Heterogenität bezüglich der Strukturen der *Antisense*-Transkripte hin (Abbildung 9), was durch die Sequenzierung der Transkriptenden bestätigt wurde (Abbildung 10 und Abbildung 11). Alle *CKX-NATs* besaßen verschiedene Initiations- sowie Terminationspositionen und diverse Isoformen mit unterschiedlichen Exon-Intron-Strukturen.

Es stellt sich die Frage, ob es sich bei den verschiedenen mittels RACE-Analyse identifizierten Transkriptenden um tatsächliche Initiations- und Terminationsstellen handelt oder diese lediglich Abbauprodukte der Transkripte kennzeichnen. Durch die Behandlung der RNA mit TEX und der anschließenden Transkriptuntersuchung mittels RACE-Analyse gefolgt von semiquantitativer PCR wurde festgestellt, dass *CKX1-NATs*, *CKX5-NATs* und *CKX6-NATs* existierten, welche eine 5'-Cap besaßen und somit keine Abbauprodukte darstellten (Abbildung 12). Da lediglich ein konservierter Bereich innerhalb der Transkripte amplifiziert und nicht jedes einzelne identifizierte Transkriptende untersucht wurde, konnte durch diese Analyse keine Aussage über die 5'-Cap an den einzelnen 5'-Enden getroffen werden. Für eine detailliertere Aussage wären Sequenzierungen von Amplifikaten der 5'-RACE-PCRs auf cDNA, die von TEX-behandelter RNA revers transkribiert wurde, notwendig. Da die RACE-Analyse auf die Existenz einer Poly-A-Sequenz im Transkript basiert, kann davon ausgegangen werden, dass die detektierten 3'-Transkriptenden der *CKX-NATs* tatsächlich mit einem Poly-A-Schwanz modifiziert sind und einen wahren Transkriptterminus darstellen. Jedoch sind auch hier technische Fehlerquellen nicht auszuschließen. Beispielsweise wäre es denkbar, dass die Sequenz des Poly-T-Primers, welcher für die Generierung der RACE-cDNA genutzt wird, an einen längeren Bereich innerhalb eines Transkripts mit repetitiven Adeninnukleotiden bindet. Beispielsweise befand sich *downstream* des 3'-Endes der *CKX1-NAT*-Isoform d eine Sequenz von elf aufeinanderfolgenden Adeninnukleotiden. Diese Position wurde ebenso als Transkriptende für die kurzen Varianten der Isoformen f und h identifiziert und sie trat unter den sequenzierten Transkriptenden vergleichsweise häufig auf (Abbildung 11). Um auszuschließen, dass es sich bei diesem 3'-Ende um kein falsch positives Ergebnis handelt, wären weitere Untersuchungen notwendig.

Für die *CKX-NATs* aller drei untersuchten *CKX-Loci* wurden diverse Spleißvarianten identifiziert. Alternatives Spleißen ist ein Prozess, der sowohl bei proteinkodierenden als auch nicht-kodierenden Transkripten in Mensch, Tier und Pflanze beobachtet wurde und als wichtiger Mechanismus dient, eine größere Vielfalt von Proteinen oder Transkripten mit unterschiedlichen Funktionen bei gleicher Genomgröße zu erzeugen (Blencowe, 2006; Deveson et al., 2018; Marquez et al., 2012; Park et al., 2018). Im Menschen wurde eine größere Vielfalt an Spleißvarianten von lncRNAs im Vergleich zu proteinkodierenden Transkripten beobachtet (Deveson et al., 2018). Mit mindestens 18 verschiedenen Isoformen des *CKX1-NAT*, mindestens drei Isoformen des *CKX5-NAT* und mindestens sechs Isoformen des *CKX6-NAT* (Anhang, Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33) lag die Variabilität dieser Transkripte über der von proteinkodierenden Transkripten in *A. thaliana*, welche durchschnittlich ca. 2,5 verschiedene Transkriptisoformen besitzen (Marquez et al., 2012; Zhang et al., 2017). Verschiedene Spleißvarianten könnten dabei unterschiedliche Funktionen besitzen. Das menschliche lncNAT *PXN ANTISENSE TRANSCRIPT 1* (*PXN-AS1*) beispielsweise besitzt zwei

Transkriptisofomen, welche die Expression des *Sense*-Partners *PAXILLIN* (*PXN*) gegensätzlich regulieren (Yuan et al., 2017). Die lange Isoform bindet hauptsächlich an die kodierende Sequenz des Transkripts und interferiert mit Translationselongationsfaktoren, wodurch das *PXN*-Proteinlevel verringert wird. Die kurze Isoform hingegen bindet hauptsächlich an das 3'-UTR von *PXN* und maskiert dort eine miRNA-Zielsequenz, wodurch das Transkript stabilisiert wird. Eine funktionelle Spezialisierung der verschiedenen Isoformen der *CKX-NATs* könnte ein Aspekt sein, welcher in zukünftige Analysen miteinbezogen wird. Darüber hinaus weist die evolutionäre Konservierung von Exon-Intron-Grenzen nicht-kodierender Transkripte auf die funktionelle Relevanz bestimmter Spleißmuster hin (Corona-Gomez et al., 2020). In den *CKX-NATs* aus *A. thaliana* wiesen einige Transkriptbereiche eine starke strukturelle Konservierung in den verschiedenen Isoformen auf, wie z.B. die Exon-Intron-Abfolge im 3'-terminalen Bereich der *CKX1-NATs* (Abbildung 31). Eine Konservierung der Spleißgrenzen im 3'-terminalen Bereich war zudem beim Vergleich der *CKX-NATs* verschiedener Spezies zu beobachten (Abbildung 27). Dies könnte auf Strukturen innerhalb dieser Sequenzbereiche hindeuten, welche eine biologische Relevanz besitzen.

Das Profil der verschiedenen Spleißvarianten pflanzlicher Transkripte kann zelltyp- oder gewebespezifisch variieren und durch das Entwicklungsstadium oder biotische und abiotische Stimuli reguliert werden (Calixto et al., 2018; Kriechbaumer et al., 2012; Li et al., 2016a; Li et al., 2020; Rigo et al., 2019; Shang et al., 2017; Szakonyi und Duque, 2018). Schon die Visualisierung der Transkriptenden der RACE-PCR zeigte, dass einige der Transkriptisofomen stärker abundant waren, als andere (Abbildung 9) und mittels semiquantitativer RT-PCRs konnte gezeigt werden, dass in mehreren getesteten Geweben jeweils die gleichen Isoformen die stärkste Abundanz aufwiesen, die relativen Verhältnisse zwischen den verschiedenen Isoformen sich jedoch gewebespezifisch unterscheiden konnten (z.B. Abbildung 13H). Die große Anzahl verschiedener Exon-Intron-Strukturen und der teilweise große Abstand zwischen den Transkriptionsstarts bzw. -stopps erschwerte eine endgültige Analyse der abundantesten Isoformen an jedem Locus. Innerhalb dieser Arbeit wurde deshalb lediglich eine vorläufige Analyse der abundantesten Strukturen innerhalb einzelner Bereiche vorgenommen. Dabei konnte, bis auf wenige Ausnahmen, eine Tendenz zur höheren Abundanz von Isoformen mit mehr und/oder längeren Intronbereichen festgestellt werden. Für den Bereich, welcher *CKX1-NAT*-Isoformen detektierte, die das gesamte *CKX1*-Transkript überspannen (Abbildung 13A), wurden z.B. jene Isoformen als abundanteste identifiziert, die ein Intron besaßen, welches *downstream* des *CKX1*-Transkriptionsstopps beginnt und *upstream* des *CKX1*-Transkriptionsstarts endet. Diese wiesen somit keine Sequenzüberlappung mit dem *CKX1*-Transkript auf. Dabei sollte erwähnt werden, dass kurze Isoformen mit einem Transkriptende in direkter Nähe des 5'-Endes von *CKX1* durch diese PCR nicht detektiert wurden. Interessanterweise ähneln die Transkriptisofomen mit dem *CKX1*-überspannenden Intron strukturell dem *cis*-NAT *LAIR*, welches die Transkription seines *Sense*-Partners *LRK1* durch Rekrutierung von aktivierenden chromatinmodifizierenden Enzymen erhöht (Wang et al., 2018). Das erste Intron von *LAIR* überspannt den gesamten *LRK1*-kodierenden Bereich und *LAIR* besitzt mindestens zehn Spleißvarianten, wobei die Transkriptstrukturen in einem Teil des Locus sehr variabel, in einem anderen jedoch stark konserviert sind.

Die Analyse der Abundanz verschiedener *CKX-NAT*-Isoformen wurde mithilfe semiquantitativer PCRs durchgeführt. Es ist nicht auszuschließen, dass das Ergebnis durch systemische Fehler aufgrund der genutzten Methodik und Enzyme verfälscht wurde. Dabney und Meyer (2012) testeten die Amplifikationspräferenzen verschiedener kommerzieller DNA-Polymerasen und stellten fest, dass alle der getesteten Enzyme dazu neigen, kürzere Fragmente stärker zu amplifizieren, als lange Fragmente. Es ist demnach denkbar, dass die längeren Isoformen in den jeweiligen PCR-Reaktionen unterrepräsentiert waren. Für eine erste Annäherung an eine unverzerrte Quantifizierung der verschiedenen Isoformen, könnten die Häufigkeiten der verschiedenen Spleißgrenzen in RNA-Seq-Datensätzen analysiert werden, wodurch zumindest die Abundanz der jeweiligen Introns bestimmt werden könnte. Die Zusammensetzung der sich daraus ergebenden Exons sowie deren Abundanzen kann jedoch auch so nicht endgültig erfasst werden. Um die verschiedenen Transkriptisoformen exakt zu quantifizieren, müsste eine Methode gewählt werden, bei der nach Möglichkeit kein PCR-Amplifikationsschritt benötigt wird, aber dennoch die Detektion von *full-length* Transkripten möglich ist, wie z.B. bei der Sequenzierung mittels *single molecule sequencing* (Rhoads und Au, 2015; Wang et al., 2019b).

Eine solche Analyse würde vermutlich auch weitere, bislang nicht identifizierte Isoformen aufzeigen. Für die Identifikation der Transkriptenden mittels RACE-Analyse mussten bestimmte genspezifische Primerpositionen ausgewählt werden. Diese Positionen limitierten jedoch die identifizierbaren Transkriptenden, da Isoformen, welche an den ausgewählten Positionen ein Intron enthalten sowie Transkripte, deren Transkriptionsstart *downstream* bzw. deren Transkriptionsstopp *upstream* der Primerposition liegen, nicht detektiert werden konnten. Außerdem war die vergleichsweise geringe Anzahl sequenzierter RACE-PCR- bzw. nRACE-PCR-Fragmente innerhalb dieser Arbeit vermutlich nicht ausreichend für eine erschöpfende Analyse aller existierender Transkriptisoformen der *CKX-NATs*. In der Kontroll-PCR der *CKX6-NAT*-RACE-Analyse mit beiden genspezifischen Primern (Abbildung 9) wurde beispielsweise ein Fragment amplifiziert, welches keiner der sequenzierten Transkriptisoformen zugeordnet werden konnte. Generell kann allerdings gesagt werden, dass ein Großteil der *in silico* identifizierten Exons und Introns mit *Antisense*-Orientierung an den Loci von *CKX1*, *CKX5* und *CKX6* experimentell bestätigt werden konnten und somit auch die Existenz von NATs an diesen Loci erwiesen ist.

4.3 Die Expression von *CKX-NATs* wird aktiv reguliert

Hinweise auf die biologische Relevanz und die Funktion der *CKX-NATs* kann eine Untersuchung der Expressionsregulation sowie der Expressionsmuster liefern. Eine spezifische Kontrolle der Expressionsstärke in Abhängigkeit von Gewebe, Entwicklungsstadium sowie externen Stimuli unterstreicht zum einen die tatsächliche Relevanz der NATs entgegen der Hypothese, es handle sich um „*transcriptional noise*“ und gibt zum anderen Hinweise auf biologische Kontexte, in denen die jeweiligen Transkripte eine Rolle spielen.

Die Transkriptlevelanalyse von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten mittels semiquantitativer PCR zeigte an allen *CKX*-Loci, dass die NATs geringer exprimiert wurden, als ihre *Sense*-Partner. Die Darstellung der Amplifikation von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten am *CKX1*- und *CKX6*-Locus in Abbildung 8A zeigt, dass die NATs innerhalb derselben Reaktion deutlich schwächer amplifiziert

wurden. Obwohl viele DNA-Polymerasen die Amplifikation kürzerer Fragmente bevorzugt, wurde dieses Ergebnis in PCR-Reaktionen unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen und Erzeugung unterschiedlicher relativer Größenverhältnisse von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten beobachtet (Daten nicht gezeigt), weshalb davon ausgegangen wird, dass die *CKX1-NATs* und *CKX6-NATs* unter Standardbedingungen niedriger exprimiert werden, als ihre *Sense*-Partner. Die Darstellung der Amplifikation von *CKX5* und *CKX5-NAT* in Abbildung 24A2 zeigt interessanterweise eine geringere Abundanz der *CKX5*-Isoform *AT1G75450.1*, welche das längere 3'-UTR besitzt und durch diese Primerkombination als einzige amplifiziert wurde, im Vergleich mit jener der *CKX5-NATs*. Beim semiquantitativen Vergleich beider *CKX5*-Isoformen (*AT1G75450.1* und *AT1G75450.2*) mit den *CKX5-NATs* konnte allerdings ein deutlich höheres Transkriptlevel der *Sense*-Transkripte beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung einer geringeren Abundanz der NATs deckte sich mit den Ergebnissen genomweiter Analysen. In Pflanzen und anderen Eukaryonten sind die Transkriptlevel von lncRNAs im Allgemeinen geringer als die proteinkodierender Transkripte (Li et al., 2016a; Liu et al., 2012; Mercer et al., 2011). Dies lässt sich in der Regel nicht durch eine hohe Expression in wenigen spezialisierten Zelltypen erklären, da auch zelltypspezifische Messungen eine deutlich geringere Expression von lncRNAs verglichen mit den meisten mRNAs aufweisen (Cabili et al., 2015; Li et al., 2016a). Für NAT-Paare in *H. sapiens* wurde gezeigt, dass die meisten *Sense*-Partner eine mehr als fünffach höhere Abundanz aufweisen als ihre lncNATs (He et al., 2008).

Die Expression pflanzlicher, nicht-kodierender Transkripte weist meist eine hohe Spezifität für bestimmte Gewebe oder Entwicklungszeitpunkte auf (Karakulah und Unver, 2017; Liu et al., 2012; Ma et al., 2019; Zhang et al., 2014b). Analysen menschlicher lncRNAs weisen darauf hin, dass diese verglichen mit kodierenden mRNAs in der Regel sogar eine höhere Gewebespezifität besitzen (Derrien et al., 2012). Untersuchungen von lncRNAs in verschiedenen Zelltypen der Wurzel von *A. thaliana* weisen ebenso auf eine hohe Spezifität auf Zelltyp-Ebene hin, da lediglich 25 % dieser lncRNAs in mehr als der Hälfte aller untersuchten Zelltypen gefunden wurden (Li et al., 2016a). Auch die Promotoren von *cis*-NATs weisen eine stark gewebespezifische Aktivität auf und die Gewebespezifität vieler NATs ist evolutionär konserviert (Conley und Jordan, 2012; Ling et al., 2013). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser genomweiten Analysen, konnten auch für die NATs an den *CKX*-Loci unterschiedliche Expressionslevel in verschiedenen Geweben (Abbildung 14) und spezifische Muster der Promotoraktivität (Abbildung 15) festgestellt werden.

Beim Vergleich der quantitativen Transkriptlevelmessung in den verschiedenen Geweben und der Analyse der Promotoraktivität mittels GUS-Färbung fiel auf, dass die Ergebnisse nicht direkt miteinander korrelierten. Dieser Beobachtung können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Erstens besitzen beide Methoden trotz ihrer Vorteile in Bezug auf spezifische Fragestellungen technische Limitierungen. Die GUS-Analyse liefert eine starke Abgrenzung der Expression auf Ebene der Gewebe und gegebenenfalls auch auf Zelltyp-Ebene, sodass lokale Expressionsmaxima gut detektiert werden können. Da es sich aber nicht um eine quantitative Methode handelt, können das Verhältnis der Expression in verschiedenen Geweben zueinander lediglich abgeschätzt werden. Eine sehr schwache Expression in einer Vielzahl von Zellen innerhalb eines Gewebes könnte beispielsweise übersehen werden, obwohl sie aufsummiert eine große Anzahl von Transkripten

darstellt. Demgegenüber steht die qPCR-Methode, welche die Transkriptmenge exakt quantifizieren kann, jedoch nur als mittlere Abundanz aller im getesteten Gewebe vorhandenen Zellen. Außerdem ist die Zuverlässigkeit der Methode auf eine ausreichende Menge an Startmolekülen des zu messenden Transkripts angewiesen, da Zufallseffekte mit sinkender Ausgangsmenge zunehmen. Sowohl die *Sense*- als auch *Antisense*-Transkripte der *CKXs* sind generell schwach exprimiert, was deren exakte Quantifizierung erschwert. Zweitens bilden die Gewebeproben, welche für die quantitative Transkriptlevelmessung genutzt wurden, teilweise nicht die vergleichbaren Zellen ab, welche eine Färbung in der GUS-Analyse zeigten. Zum Beispiel war die Promotoraktivität von *CKX1-NAT* in reifen Pollen zu beobachten, welche jedoch kein Teil der mittels qPCR getesteten Infloreszenzgewebe waren, da diese lediglich die Blütenstadien bis zur Anthese beinhalteten. Drittens muss das Transkriptlevel nicht direkt mit der Promotoraktivität korrelieren, da die tatsächliche Transkriptmenge nicht ausschließlich durch die Promotoraktivität, sondern auch durch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen wie z.B. miRNAs beeinflusst werden kann.

Die Expression eines Großteils pflanzlicher lncRNAs und NATs wird nicht nur gewebespezifisch, sondern ebenso durch biotische oder abiotische Stressfaktoren reguliert (Liu et al., 2012; Ma et al., 2019; Wang et al., 2019a; Wang et al., 2014a; Xu et al., 2017). Die Analyse mehrerer verfügbarer Transkriptomdatensätze von Experimenten mit verschiedenen Hormon- und Stressbehandlungen wies darauf hin, dass auch die *CKX-NAT*-Level durch verschiedene Stimuli kontrolliert werden (Abbildung 17). Die stärksten Transkriptleveländerungen der *CKX-NATs* wurden durch Hormone verursacht, bei *CKX1-NAT* und *CKX6-NAT* durch Auxin, bei *CKX5-NAT* durch Cytokinin. Es konnten zudem weitere Tendenzen zur Transkriptleveländerung durch spezifische Stimuli beobachtet werden, wie z.B. jene von *CKX1-NAT* durch Salzstress, jedoch waren diese Änderungen nicht statistisch signifikant. Die Stimulation von *CKX5-NAT* durch Cytokinin wurde mittels qPCR-Analyse bestätigt (Abbildung 18), die Bestätigung anderer Stimuli mittels qPCR könnte in zukünftigen Analysen folgen.

Entsprechend ihrer Funktionsweise kann die Expression von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten positiv oder negativ korrelieren (Lapidot und Pilpel, 2006). *In planta* wurden Beispiele für beide gefunden, genomweite Analysen zeigen jedoch, dass eine positive Korrelation von NAT-Paaren in verschiedenen Spezies überwiegt (Batagov et al., 2013; Ling et al., 2013; Oeder et al., 2007; Rai et al., 2019; Xu et al., 2017). In den gewebespezifischen Transkriptlevelmessungen tendieren die Level von *CKX1* und *CKX1-NAT* zur positiven Korrelation (Abbildung 13), was auf eine positive Regulation von *CKX1* durch *CKX1-NAT* hinweisen könnte. Die GUS-Analyse zeigte für *CKX1-NAT* eine spezifische Promotoraktivität, die ausschließlich in reifen Pollen detektiert wurde (Abbildung 15). Auch der Promotor von *CKX1* war in den Infloreszenzen aktiv (Werner et al., 2003). Es ist nicht eindeutig geklärt, ob eine *CKX1*-Aktivität in den Pollen detektiert werden kann, sie ist jedoch eindeutig nicht auf die reifen Pollen begrenzt (Werner et al., 2003). *CKX1* ist zudem in weiteren Geweben exprimiert, in denen eine sichtbare Promotoraktivität von *CKX1-NAT* fehlte (Werner et al., 2003). Die Promotoraktivität von *CKX1* und *CKX1-NAT* zeigte demnach keine eindeutige Korrelation. In Reaktion auf die Behandlung mit Auxin zeigte sowohl *CKX1*- als auch *CKX1-NAT* eine Zunahme des Transkriptlevels (Abbildung 17), was auf eine Co-Regulation durch das Hormon hinweist.

Darüber hinaus wurde kein weiterer Stimulus identifiziert, welcher beide Transkripte stark reguliert. Für das *CKX1*-Level war eine signifikante Erhöhung durch Kältestress und eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Verringerung durch Trockenstress zu beobachten. Das *CKX1-NAT*-Level blieb bei diesen Stimuli nahezu unverändert. Das Level von *CKX1-NAT* wurde durch Salzstress erhöht und durch Hitzestress erniedrigt, jedoch waren auch diese Veränderungen nicht statistisch signifikant. Diese Stimuli bewirkten nur geringe Veränderungen des *CKX1-Sense*-Levels. Die fehlende Co-Regulation infolge der Stressstimuli lassen sich durch verschiedene Hypothesen erklären. Einerseits wäre es möglich, dass *CKX1* und *CKX1-NAT* unabhängig voneinander reguliert werden und Übereinstimmungen der Transkriptlevel zufallsbedingt auftraten. Andererseits könnte vermutet werden, dass die Expression von *CKX1*- und *CKX1-NAT* unter spezifischen Bedingungen co-reguliert, unter anderen Bedingungen jedoch unabhängig voneinander reguliert sind. Möglich wäre auch, dass eine Co-Regulation ebenso unter anderen Bedingungen vorliegt, diese jedoch durch die fehlende zeitliche Auflösung nicht sichtbar war, da die Transkriptlevel je nur für einen Zeitpunkt bestimmt wurden. Die Messung der Transkriptlevel nach Kältebehandlung fand beispielsweise nach 24 h statt. Es wäre denkbar, dass das *CKX1-NAT*-Level schon zu einem früheren Zeitpunkt eine erhöhte war, nach 24 h jedoch wieder sein Ausgangsniveau erreicht hatte. Um dies zu überprüfen, müssten Induktionsexperimente mit den entsprechenden Stimuli durchgeführt werden, um eine Kinetik der Transkriptleveländerungen zu erstellen. Es wäre auch möglich, dass lediglich spezifische Spleißvarianten von *CKX1-NAT* mit *CKX1* co-reguliert sind, was durch die in dieser Arbeit verwendete Analysemethoden nicht differenziert wurde. Um dies näher zu untersuchen, könnte gezielt die Anzahl aller sequenzierter Spleißgrenzen bestimmt werden. Dafür wäre eine hohe Sequenziertiefe notwendig, um eine repräsentative Menge an Spleißgrenzen zu erhalten.

Auch *CKX6*- und *CKX6-NAT* tendierten in der gewebespezifischen Transkriptlevelmessung zu einer positiven Korrelation (Abbildung 13). Interessanterweise war der *CKX6-NAT*-Promotor ebenso wie der *CKX6*-Promotor in den Stomata aktiv (Werner et al., 2003). Auch in sich entwickelnden Samenanlagen wurde sowohl *CKX6-NAT* als auch *CKX6* exprimiert, jedoch befindet sich die GUS-Färbung der *pCKX6:GUS*-Linien im Funiculus, wohingegen die Färbung in den *pCKX6-NAT:GUS*-Linien dem Expressionsmuster eines Markers für die funktionale Megaspore (*pFM2:GUS*) ähnelte (Olmedo-Monfil et al., 2010; Werner et al., 2003). Der *CKX6-NAT*-Promotor war zudem in jungen Blättern, Petalen junger Blüten und Pollen aktiv. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde für *CKX6* nicht gezeigt (Werner et al., 2003). Außerdem wird *CKX6* in einigen weiteren Geweben wie der Vaskulatur in Spross und Wurzel oder dem Gynöceum exprimiert, in denen keine *CKX6-NAT*-Promotoraktivität zu beobachten war (Werner et al., 2003). Die Expressionsdomänen von *CKX6* und *CKX6-NAT* überlappten demnach teilweise, jedoch nicht vollständig. Auch in Reaktion auf verschiedene Stimuli konnte für *CKX6-NAT* und *CKX6* eine Tendenz zur positiven Korrelation beobachtet werden (Abbildung 17). Durch Auxin stiegen die Transkriptlevel beider Gene stark an. In Reaktion auf Hitzestress wurde lediglich für *CKX6* ein signifikanter Anstieg beobachtet, jedoch war auch das *CKX6-NAT*-Level um 50 % erhöht. In Reaktion auf Trockenstress zeigten *CKX6* und *CKX6-NAT* eine Tendenz zur Transkriptlevelreduktion, wenngleich diese nicht signifikant war. Diese Ergebnisse weisen auf eine positive Interaktion von *CKX6* und *CKX6-NAT* hin, der ein positiv

regulatorischer Einfluss von *CKX6-NAT* auf *CKX6* zugrunde liegen könnte. Diese Interaktion scheint zelltypspezifisch und in Reaktion auf bestimmte Stimuli aufzutreten.

Für *CKX5* und *CKX5-NAT* war in der gewebespezifischen Transkriptlevelmessung keine Tendenz zur positiven oder negativen Korrelation der Transkriptlevel zu beobachten (Abbildung 14). Beim Vergleich der Promotoraktivitäten von *CKX5-NAT* und *CKX5* fiel auf, dass beide im Sprossapex, vor allem an der Basis junger Blätter exprimiert wurden (Werner et al., 2003). Auch im Primärwurzelmeristem waren beide Promotoren aktiv, wobei sich die Färbung in den *CKX5-NAT:GUS*-Linien auf die Zellen der Wurzelspitze, unterhalb der Wurzelstammzellen konzentrierte, die Färbung in den *CKX5:GUS*-Linien hingegen in den Zellen des Zentralzylinders auftritt (Werner et al., 2003). Weiterhin war eine *CKX6-NAT*-Promotoraktivität im Hypokotyl um den Zentralzylinder sowie eine schwache Färbung in der Abszissionszone am Übergang zwischen Schote und Fruchstiel zu sehen. Eine Expression von *CKX5* wurde in diesen Geweben nicht gezeigt. Zudem wird *CKX5* in Domänen exprimiert, welche keine Färbung in den *CKX5-NAT:GUS*-Linien aufwiesen, wie z.B. die sich entwickelnden Stamina (Werner et al., 2003). Somit kann auch für die gewebespezifische *CKX5-NAT*-Expression gesagt werden, dass sie teilweise, jedoch nicht komplett mit jener von *CKX5* übereinstimmte. Die Analyse der Transkriptlevel von *CKX5* und *CKX5-NAT* nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli zeigte keine eindeutig positive oder negative Co-Regulation, es konnte jedoch eine Tendenz zur positiven Korrelation beobachtet werden (Abbildung 17). Durch Cytokinin wurde ein starker Anstieg beider Transkriptlevel sowie des *UBC16*-Levels stimuliert. Durch Kältestress wurde das *CKX5*-Level signifikant reduziert. Auch das *UBC16*-Level zeigte eine signifikante Erniedrigung, wohingegen das *CKX5-NAT*-Level ähnlich stark, jedoch nicht statistisch signifikant reduziert war. Die Behandlung mit Hitzestress bewirkte tendenziell eine Verringerung der drei Transkriptlevel, wobei lediglich *UBC16* signifikant reduziert war. Im Gegensatz dazu verursachte beispielsweise Trockenstress lediglich eine Erhöhung von *CKX5*, jedoch nicht von *CKX5-NAT* oder *UBC16*. Ebenso wie zuvor bereits für den *CKX1*-Locus erörtert, wären auch für *CKX5* verschiedene Hypothesen zur Interpretation der fehlenden Korrelation denkbar. Entweder besteht keine Wechselwirkung zwischen *Sense*- und *Antisense*-Transkriptlevel, es besteht lediglich in einem Teil der Gewebe und Bedingungen eine regulatorische Verbindung oder es besteht eine generelle Co-Regulation, welche aus Gründen zu geringer experimenteller Auflösung teilweise nicht detektierbar war.

4.4 Mögliche Regulationsmechanismen der *CKX-NATs*

Die Untersuchungen der Transkriptlevel und Promotoraktivität in den verschiedenen Geweben sowie der Induzierbarkeit mit verschiedenen Stimuli zeigte für alle untersuchten *CKX*-Loci mindestens teilweise eine positive Korrelation. Angenommen, die Funktion der *CKX-NATs* besteht in der Regulation ihres jeweiligen *Sense*-Partners, weisen diese Korrelationen auf eine positiv regulatorische Wirkung der *CKX-NATs* hin. Diese Vermutung wurde für *CKX5-NAT* einerseits durch die schnellere oder stärkere Zunahme des *CKX5-NAT*-Levels nach Cytokininbehandlung verglichen mit der von *CKX5* unterstützt (Abbildung 18). Andererseits zeigten *ckx5-nat-S3*-Pflanzen ein signifikant reduziertes *CKX5*-Transkriptlevel (Abbildung 24), was die Hypothese einer positiven Regulation von *CKX5* durch *CKX5-NAT* bestätigte. Aus Zeitgründen konnte diese Analyse nur

einmalig durchgeführt werden und muss für eine definitive Aussage nochmals wiederholt werden. Für *CKX1-NAT* und *CKX6-NAT* wurden im Rahmen dieser Arbeit keine *loss-of-function*-Mutanten identifiziert, weshalb eine positive Regulation für diese lediglich vermutet werden kann. Die Analyse der *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien lieferte ebenfalls Hinweise auf eine positive Korrelation der *CKX1-NAT*- und *CKX1*-Level. In diesen Linien wurde sowohl eine starke Erhöhung der *CKX1-NAT*-Level (Abbildung 21) als auch eine Erhöhung der *CKX1*-Level (Abbildung 22) beobachtet. Bei dieser Analyse handelte es sich jedoch lediglich um einen ersten vorläufigen Ansatz zur Annäherung an die *CKX1*-Transkriptlevel, da zum einen die Stichprobenmenge von zwei Proben je Genotyp für ein repräsentatives Ergebnis zu gering ist und der Ansatz aufgrund der vergleichsweise vielen Zwischenschritte fehleranfällig ist. Um diese Linien genauer zu analysieren, ist es notwendig, zunächst einen methodischen Ansatz zu entwickeln, um die endogenen *CKX1*-Transkriptlevel in diesen Linien exakt zu bestimmen. Ein *targeted* RNA-Seq-Experiment könnte z.B. die Möglichkeit einer exakten Messung endogener und transgener Transkriptlevel bieten.

Es wurden diverse molekulare Mechanismen beschrieben, die zur positiven Regulierung des *Sense*-Partners durch ein NAT führen. Darunter fallen beispielsweise verschiedene Möglichkeiten, die Zugänglichkeit der DNA zu erhöhen, die Veränderung des relativen Verhältnisses alternativer Spleißvarianten und die Erhöhung der mRNA-Stabilität (Khorkova et al., 2014; Wanowska et al., 2018). Die Funktionsweise eines NAT kann anhand seiner subzellulären Lokalisation eingegrenzt werden, da einige Mechanismen wie z.B. die Regulation des Spleißens eine nukleäre Lokalisation des NAT voraussetzen, wohingegen andere Mechanismen wie die Regulation der Translation eine cytoplasmatische Lokalisation des NAT erfordern. Genauere Unterteilungen dieser Kompartimente können weitere Hinweise auf die mögliche Funktionsweise geben. So kann die Zuordnung eines NAT zur ribosomalen Fraktion des Cytoplasmas auf eine regulatorische Wirkung auf die Translation oder die Kodierung für ein Peptid hindeuten. Analysen von lncRNAs in *D. melanogaster* und *H. sapiens* zeigen, dass eine Vielzahl von subzellulären Lokalisationsmustern, von der exklusiven Lokalisation in definierten, subnuklearen Bereichen bis hin zu nahezu ausschließlich cytoplasmatischer Lokalisation, existieren und eine distinkte, subzelluläre Lokalisation von lncRNAs eher die Regel als die Ausnahme ist (Cabili et al., 2015; Wilk et al., 2016). Die subzelluläre Lokalisation von lncRNAs wird hauptsächlich durch die Nukleotidsequenz der Transkripte bestimmt, aber auch andere Faktoren wie z.B. die Transkriptlänge oder ineffizientes Spleißen spielen eine Rolle (Gudenas und Wang, 2018; Zuckerman und Ulitsky, 2019). Die subzelluläre Lokalisation der *CKX-NATs* wurde im Rahmen dieser Arbeit *in silico* (Anhang, Tabelle 27) und experimentell (Abbildung 16) untersucht. Die *in silico*-Vorhersagen durch die zwei verschiedenen Programme Locate-R und lncLocator lieferten unterschiedliche Ergebnisse für die meisten der *CKX-NAT*-Isoformen. Da ein Vergleich beider Methoden eine höhere Genauigkeit der Vorhersagen von Locate-R aufzeigte (Ahmad et al., 2020), kann angenommen werden, dass Locate-R eine bessere Vorhersage der *CKX-NAT*-Lokalisation liefert.

Für alle Isoformen von *CKX1-NAT* wurde durch Locate-R eine cytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt. Jedoch lag die Wahrscheinlichkeit einer nuklearen Lokalisation bei elf der 22 Isoformen bei über 20 %, was darauf hindeuten könnte, dass ein Teil der Transkripte nicht

spezifisch in einem einzigen Kompartiment lokalisiert sind. Diese Vermutung wurde durch das Ergebnis der experimentellen Analyse unterstützt. Hier zeigte sich, dass verglichen mit den cytoplasmatischen Kontrolltranskripten ein signifikant größerer Anteil von *CKX1-NATs* im Nukleus lokalisiert war, was gegen eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation spricht. Allerdings lag die Anreicherung der *CKX1-NATs* im Kern deutlich unter jener der nuklearen Kontrolltranskripte und mit einem geschätzten Anteil von 3,6 % stellten die nuklear lokalisierten Transkripte lediglich einen kleinen Teil der *CKX1-NAT*-Transkripte dar.

Die Wahrscheinlichkeit einer nuklearen Lokalisation aller *CKX5-NAT*-Isoformen lag laut der *in silico*-Vorhersage durch Locate-R bei maximal 2 %, was für eine nahezu ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation spricht. Experimentell wurde jedoch auch für *CKX5-NAT* eine Anreicherung der Transkripte im Zellkern beobachtet, die über jener der cytoplasmatischen Kontrollen und unter jener der nuklearen Kontrollen lag, was ebenso auf eine Verteilung der Transkripte auf Zellkern und Cytoplasma hindeutet. Die nuklearen Transkripte stellten mit geschätzten 5,6 % den deutlich geringeren Anteil der *CKX5-NATs* dar.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Großteil der *CKX1-NATs* und *CKX5-NATs* im Cytoplasma und ein kleiner Teil dieser Transkripte im Kern lokalisiert war. Für diese Beobachtung könnte es verschiedene Erklärungen geben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Transkripte sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus eine spezifische Funktion ausüben und dafür gezielt auf diese Kompartimente verteilt werden. Genomweite Analysen zeigen, dass die Transkripte von 50 % der lncRNAs sich relativ gleichmäßig auf Kern und Cytoplasma verteilen und lediglich 25 % der lncRNAs eine signifikante Anreicherung im Nukleus und 25 % der lncRNAs eine signifikante Anreicherung im Cytoplasma aufweisen (Gudenas und Wang, 2018; Wen et al., 2018). Das relative Verhältnis der nuklearen und cytoplasmatischen Transkripte einer Isoform hängt von den Raten mehrerer kontrollierter Prozesse ab, wie z.B. Synthese, nuklearem Export sowie Abbau in Nukleus bzw. Cytoplasma (Palazzo und Lee, 2018). Der nukleare Export bzw. die nukleare Retention einer RNA sind von der Sequestrierung durch nuklear lokalisierte Proteine und Chromatin abhängig, werden aber auch mit dem Spleißprozess, dem 5'-*Capping*, der Polyadenylierung und RNA-Nukleotidmodifikationen assoziiert (Palazzo und Lee, 2018). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass mRNAs und lncRNAs nach ihrer Synthese im Nukleus standardmäßig ins Cytoplasma exportiert werden, für eine Retention im Nukleus sind jedoch spezifische Sequenzelemente notwendig (Palazzo und Lee, 2018; Williams et al., 2018). Möglicherweise besitzt nur ein Teil der *CKX-NAT*-Isoformen Exonbereiche mit Sequenzelementen zur nuklearen Retention und werden im Kern zurückgehalten, was zu der signifikanten, wenngleich geringen Anreicherung in der nuklearen Fraktion führt und auf eine Funktion der Transkripte im Zellkern hindeuten könnte. Ebenso wäre es vorstellbar, dass die subzelluläre Lokalisation der Transkripte sich zelltypspezifisch unterscheidet. In *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass die Lokalisation von mRNA abhängig vom Entwicklungsstadium oder Zelltyp variieren kann (Jambor et al., 2015). Für die Bestimmung der *CKX-NAT*-Level in Nukleus und Cytoplasma wurden Proben von Keimlingen untersucht. Wie die Untersuchung der *CKX5-NAT*-Promotoraktivität zeigte, wurde *CKX5-NAT* im Keimling im Sprossapex, im Hypokotyl und in der Wurzelspitze exprimiert. Die in dieser Arbeit durchgeführte, experimentelle Analyse der

subzellulären Lokalisation ließ keinen Rückschluss auf eine zelltypspezifische Verteilung der Transkripte auf die Kompartimente zu. Neben der Hypothese, dass die *CKX-NATs* sowohl eine spezifische Funktion im Zellkern als auch im Cytoplasma ausüben, wäre es auch denkbar, dass die *CKX-NATs* lediglich eine spezifische Funktion im Cytoplasma besitzen, in welchem der größte Teil der Transkripte lokalisiert war. Unter dieser Annahme könnte die Anreicherung der *CKX-NATs* im Kern auf einen Regulationsmechanismus zurückzuführen sein, durch den die Transkriptkonzentration im Cytoplasma, als Ort der Wirkung, kontrolliert wird. Für proteinkodierende Transkripte sind solche Mechanismen zur Regulation der nuklearen Retention bekannt. Die Translation und somit Aktivität von *COFILIN 1* (*CFL1*) im Cytoplasma wird beispielsweise durch das RNA-bindende, nuklear lokalisierte Protein *EWING SARCOMA BREAK POINT REGION 1* (*EWS*) reguliert, indem es die *CFL1*-mRNA im Nukleus sequestriert (Huang et al., 2014). Die Translation von *MOUSE CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 2* (*mCAT2*) wird ebenfalls über nukleare Retention kontrolliert (Prasanth et al., 2005). *CAT2 TRANSCRIBED NUCLEAR RNA* (*CTN-RNA*), beinhaltet ebenfalls das ORF für *mCAT2*, ihre Initiations- und Terminationsposition unterscheiden sich jedoch von denen der *mCAT2*-mRNA. Durch spezifische Sequenzelemente im 3'-UTR wird *CTN-RNA* im Kern zurückgehalten, in Reaktion auf Stress hingegen wird die *CTN-RNA* posttranskriptional prozessiert, sodass die Sequenzelemente für die nukleare Retention entfernt werden, die RNA ins Cytoplasma exportiert wird und *mCAT2* translatiert werden kann. *CTN-RNA* stellt somit eine Transkriptreserve dar, von der unter Stress schnell aktives *mCAT2* bereitgestellt werden kann.

Die *in silico*-Vorhersage für *CKX6-NAT* mit *Locate-R* sagte mit hoher Wahrscheinlichkeit eine cytoplasmatische Lokalisation für die Isoformen b, c und g voraus. Für die Isoform a und die vermutlich abundanteste Isoform e wurde zwar eine cytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt, jedoch lag deren Wahrscheinlichkeit lediglich bei 50 % bzw. 55 % und auch die Wahrscheinlichkeit für eine nukleare Lokalisation war mit 48 % bzw. 42 % vergleichsweise hoch. Im Gegensatz dazu wurde für die Isoformen d und f eine nukleare Lokalisation vorhergesagt, jedoch lagen auch deren Wahrscheinlichkeiten bei lediglich 55 % bzw. 60 %. Die experimentelle Bestimmung der *CKX6-NAT*-Lokalisation zeigte, dass auch für *CKX6-NATs* der Transkriptanteil in der nuklearen RNA-Fraktion signifikant höher war als jener der cytoplasmatischen Kontrollen, jedoch geringer als jener der nuklearen Kontrollen. Wiederum stellten die nuklearen Transkripte mit 4,6 % lediglich einen geringen Anteil der *CKX6-NATs* dar. Interessanterweise zeigte die Messung des nukleolaren Transkriptanteils, dass die im Kern befindlichen *CKX6-NATs* nahezu ausschließlich im Nukleolus lokalisiert waren (Abbildung 16B). Die Hauptaufgabe des Nukleolus ist die Biogenese der ribosomalen Untereinheiten in eukaryontischen Zellen, doch werden ihm noch weitere Funktionen zugeschrieben (Boisvert et al., 2007). Zu diesen zählt beispielsweise die Modifizierung von Nukleotiden verschiedener RNAs, wie z.B. RNAs aus dem Spleißosom (Ganot et al., 1999; Kiss, 2002). Es wurde lange angenommen, dass solche RNA-Modifizierungen wie z.B. Pseudouridinylierung, Methylierung oder Hydroxylierung von Ribonukleotiden hauptsächlich in strukturellen RNAs wie tRNAs oder rRNAs vorkommen, doch transkriptomweite Analysen zeigen, dass auch andere RNA-Spezies wie mRNAs oder ncRNAs modifiziert werden (Carlile et al., 2014; Dominissini et al., 2012; Dominissini et al., 2016; Li et al., 2016b; Li et al., 2015; Meyer et al., 2012; Squires et al., 2012). Die nukleolare

Lokalisation von *CKX6-NAT* könnte demnach auf eine post-transkriptionelle Modifikation der *CKX6-NATs* im Nukleolus hinweisen. Denkbar wäre auch, dass *CKX6-NAT* selbst eine Funktion im Nukleolus besitzt und beispielsweise Modifikationen der *CKX6-mRNA* im Nukleolus beeinflusst. Die Modifizierung von mRNAs wurde auch in Pflanzen nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass diese die mRNA-Stabilität sowie die Translationseffizienz beeinflussen können (Arribas-Hernández und Brodersen, 2020; Burgess et al., 2016; Chmielowska-Bak et al., 2019; Shen et al., 2019). Die Existenz von Modifikationen in der *CKX6-mRNA* wurde bislang nicht untersucht. Der Nukleolus gilt außerdem als subnukleares Kompartiment, welches Proteine in Reaktion auf externe Stresstimuli sequestrieren und somit deren Konzentration am Wirkort schnell regulieren kann (Boulon et al., 2010). Audas et al. (2012) zeigten, dass die Sequestrierung von Proteinen im Nukleolus durch intergenische lncRNAs reguliert wird, deren Transkription durch den Stresstimulus stimuliert wird. Es wäre denkbar, dass die im Nukleolus lokalisierten *CKX6-NATs* die Funktion besitzen, die subzelluläre Lokalisation und somit Translation des *CKX6-Sense*-Transkripts durch Sequestrierung im Nukleolus zu regulieren. Unabhängig von der Regulation von *CKX6* wäre es ebenso möglich, dass *CKX6-NAT* die Sequestrierung anderer Proteine im Nukleolus vermittelt.

Unerwarteterweise zeigte die Bestimmung des nukleolaren Anteils der im Kern befindlichen Transkripte, dass nicht nur die snoRNAs, sondern auch das nukleare Kontrolltranskript *U6* nahezu ausschließlich im Nukleolus lokalisiert war. In *H. sapiens* wurde *U6* zunächst ausschließlich im Nukleoplasma detektiert, es zeigte sich jedoch, dass während der Reifung von *U6* post-transkriptionelle Modifikationen im Nukleolus stattfinden und *U6* anschließend zurück ins Nukleoplasma gelangt (Ganot et al., 1999; Lange und Gerbi, 2000; Reddy und Busch, 1983; Tycowski et al., 1998). Um diese Modifikationen zu erhalten, befindet sich *U6* jedoch nur kurzzeitig im Nukleolus und generell ist ein größerer Anteil der Transkripte im Nukleoplasma zu beobachten (Ganot et al., 1999; Lange und Gerbi, 2000). Die beobachtete nukleolare Lokalisation von *U6* könnte demnach auf eine Ungenauigkeit der Messung hinweisen, weshalb diese wiederholt werden sollte.

Weiterhin fällt auf, dass sowohl *U6* als auch *snoR30* zwar ca. 100- bzw. 60-fach stärker im Kern angereichert waren als die cytoplasmatischen Kontrollen, jedoch ca. 3- bis 4-fach geringer als *snoR5a*, was darauf hindeutet, dass sich ein beträchtlicher Teil dieser Transkripte in der cytoplasmatischen Fraktion befand. In *H. sapiens* wurde gezeigt, dass einige snRNAs und snoRNAs nicht ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind (van Heesch et al., 2014). Box C/D snoRNAs akkumulieren beispielsweise in Reaktion auf oxidativen Stress im Cytoplasma und es wird spekuliert, dass diese Klasse von snoRNAs die zelluläre Antwort auf Stress auch durch molekulare Interaktionen außerhalb des Zellkerns steuern (Holley et al., 2015). Auch *snoR30* gehört der Klasse der Box C/D snoRNAs an, wohingegen *snoR5a* eine Box H/ACA snoRNA darstellt (snoRNA Orthological Gene Database, Tabelle 7; Stand 03.05.2020). Darüber hinaus wurden „shutteling“ RNAs beschrieben, welche sich kontrolliert zwischen Kern und Cytoplasma hin- und herbewegen, wozu auch einige der uridinreichen sRNAs des Spleißosoms zählen (Goldstein und Ko, 1974). *U6* wurde diesbezüglich jedoch nicht untersucht. In mehreren Studien wird *U6* sowohl in der nuklearen als auch in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert, wobei jedoch vermutet wird, dass es sich bei den *U6*-Transkripten in der cytoplasmatischen Fraktion um Verunreinigungen während der

Extraktion handelt, da bei der *in situ*-Hybridisierung von *U6* ausschließlich im Zellkern ein Signal detektiert wird (Back et al., 2006; Csorba et al., 2014; Fury und Zieve, 1996; Pessa et al., 2008; Tycowski et al., 1998). Der Austritt der mit 101 nt vergleichsweise kleinen monomeren Version von *U6* aus dem Nukleus während der Extraktion wäre eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringe nukleare Anreicherung dieser Transkripte in der experimentellen Analyse im Rahmen dieser Arbeit. Um Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der nuklearen bzw. cytoplasmatischen Anteile zu verringern und die exakten Lokalisationen der *CKX-NATs* zu ermitteln, sollte diese zukünftig *in situ* analysiert werden. Durch eine *in situ*-Hybridisierung könnte semiquantitativ die relative Verteilung der Transkripte in Cytoplasma und Zellkern untersucht werden. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Sonden wäre auch eine quantitative Analyse denkbar. Diese Methode böte auch die Möglichkeit, zelltypspezifische Unterschiede der relativen Verteilung zu detektieren oder durch spezifische Sonden die Lokalisation verschiedener Spleißvarianten zu untersuchen.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen und der Untersuchung der subzellulären Lokalisation darauf hin, dass die Expression aller *CKX-NATs* generell positiv mit den jeweiligen *Sense*-Transkripten korrelieren und dass der Großteil der Transkripte im Cytoplasma lokalisiert ist. Angenommen, dass die *CKX-NATs* die Funktion besitzen, das entsprechende *CKX-Sense*-Transkript zu regulieren, lassen diese zwei Beobachtungen mehrere Rückschlüsse zu. Erstens deutet die hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation der *CKX-NATs* auf eine Funktion im Cytoplasma hin, was gegen die Regulation der Transkription sowie einen Einfluss auf post-transkriptionelle Prozesse im Nukleus wie z.B. das Spleißen spricht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch der geringe Anteil nuklearer Transkripte die Expression der *CKXs* durch einen Regulationsmechanismus im Zellkern beeinflusst. Gerade Mechanismen, durch welche die Transkription auf Ebene der DNA-Zugänglichkeit reguliert wird, benötigen oft nur eine geringe NAT-Konzentration, da lediglich zwei Kopien des zu regulierenden DNA-Locus pro Zelle vorliegen (Faghihi und Wahlestedt, 2009). Zweitens weist die positive Korrelation der Expression darauf hin, dass die *Sense*-Partner durch die *CKX-NATs* positiv reguliert werden, was inhibierende Mechanismen wie z.B. RNA-Interferenz ausschließt. Drittens waren die positiven Korrelationen auf Ebene der Transkriptlevel zu beobachten. Auch die Reduktion bzw. der Anstieg der Transkriptlevel von *CKX5-NAT* und *CKX1-NAT* hatten eine Auswirkung auf die jeweiligen Transkriptlevel des *Sense*-Partners. Dies spricht gegen eine Kontrolle der Translation durch die *CKX-NATs*.

Ein möglicher cytoplasmatischer NAT-Mechanismus, das *Sense*-Transkriptlevel positiv zu beeinflussen, ist die Erhöhung der RNA-Stabilität. Dies kann beispielsweise durch die Maskierung von Bindesequenzen für destabilisierende Moleküle innerhalb der *Sense-CKXs* erfolgen. NATs können beispielsweise die Zielsequenz von miRNAs überdecken und so deren inhibierenden Effekt auf das *Sense*-Transkript verhindern, so wie es beispielsweise für das lncNAT von *BACE1* in *H. sapiens* gezeigt wurde (Faghihi et al., 2008). Eine Regulation von *CKX1*, *CKX5* oder *CKX6* durch miRNAs wurde bisher nicht beschrieben. Mithilfe einer *in silico*-Vorhersage möglicher Targetsequenzen bekannter miRNAs aus *A. thaliana* mittels psRNA Target (Tabelle 8; Stand 04.05.2020) können jedoch potentielle miRNA-Zielsequenzen in den *CKX*-Transkripten vorausgesagt werden (Anhang, Tabelle 28). In jedem der untersuchten *CKX*-Transkripte werden mehrere Zielsequenzen

vorhergesagt, an welche möglicherweise miRNAs aus *A. thaliana* binden können. Für einen Teil der vorhergesagten mRNA-miRNA-Interaktionen wird ein Einfluss auf die Stabilität des jeweiligen Zieltranskripts vorausgesagt. Für *CKX1* und *CKX5* fanden sich je vier solcher Zielsequenzen, für *CKX6* zwölf solcher Zielsequenzen, welche mit einer oder mehreren NAT-Isoformen am jeweiligen Locus überlappen. Um eine regulatorische Funktion dieser miRNAs auf die entsprechenden *CKX*-Transkriptlevel zu überprüfen, könnten die jeweiligen *CKX*-Level in T-DNA-Insertionslinien der jeweiligen miRNA-Gene untersucht werden. Alternativ dazu könnten sogenannte Zielgen-Mimikry (MIM)-Linien erzeugt werden, welche ein künstliches Zielgen der entsprechenden miRNA exprimieren und somit die Aktivität der miRNA kompetitiv hemmen. Wäre in diesen Linien das entsprechende *CKX*-Transkriptlevel erhöht, könnte von einer negativen Regulation des *CKX* durch die miRNA ausgegangen werden und weitere Analysen der *CKX*-NAT-Wirkung auf die miRNA-Aktivität könnten sich anschließen. Darüber hinaus wird die Stabilität von mRNAs in Pflanzen über den Abbau durch Deadenylierung gefolgt von *Decapping* oder dem Abbau durch das Exosom reguliert (Chiba und Green, 2009). All diese Prozesse werden katalysiert von Enzymen oder Enzymkomplexen, welche an die RNA binden. Auch diese Bindestellen können von NATs maskiert werden, woraus eine höhere Stabilität des *Sense*-Transkripts resultieren würde.

4.5 Mögliche biologische Funktionen der *CKX*-NATs

Es ist bekannt, dass Cytokinin im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen vielfältige pflanzliche Entwicklungsprozesse steuert. Für viele dieser Prozesse ist es nötig, dass die Cytokininkonzentration lokal und zeitlich präzise reguliert wird. Eine Möglichkeit der Feinregulation der Cytokininmenge besteht im kontrollierten Abbau des Hormons durch die *CKX*-Enzyme. Die Menge aktiver *CKX1*-, *CKX5*- und *CKX6*-Enzyme könnte unter anderem durch die *cis*-NATs an den jeweiligen Loci moduliert werden. Die Analyse der RNA-Seq-Datensätze sowie die Analyse der *CKX1*-NAT-Überexpressionsmutanten und der *ckx5-nat*-Mutanten wiesen dabei auf eine positive Regulation durch die *CKX*-NATs hin (siehe Kapitel 4.4).

Um Hinweise auf biologische Prozesse, bei denen die *CKX*-NATs eine Rolle spielen könnten, zu erhalten, können verschiedene Aspekte in Betracht gezogen werden. Zum einen sind das die Gewebe, in denen ein *CKX*-NAT exprimiert wird. Entsprechend der *GUS*-Analyse wurde beispielsweise *CKX1*-NAT spezifisch in reifen Pollen transkribiert (Abbildung 15A und B). Dies könnte auf eine Rolle von *CKX1*-NAT für die späte Entwicklung oder Funktionalität der Pollen hindeuten. Es ist bekannt, dass Cytokinin an der Entwicklung der männlichen Blütenorgane und der Fertilität beteiligt ist (Huang, 2003; Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). So bewirkt eine stark verringerte Cytokininkonzentration eine reduzierte Keimungsfähigkeit der Pollen in *A. thaliana* und eine Sterilität der männlichen Blütenorgane in *Z. mays* (Huang, 2003; Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). Möglicherweise ist die Regulation von *CKX1* durch *CKX1*-NAT an der Feinregulation der Cytokininkonzentration in den Pollen beteiligt. Zum anderen kann die Analyse der RNA-Seq-Datensätze interne und externe Stimuli aufzeigen, welche die Transkriptlevel der *CKX*-NATs induzieren und somit deren regulatorische Aktivität stimulieren. Die *CKX1*-NAT-Level wurden z.B. durch Auxin stark erhöht (Abbildung 17). Auch Auxin spielt eine Rolle für die Pollenentwicklung und -funktion (Robert et al., 2015). Eine Verringerung der Auxinkonzentration oder des gerichteten Auxintransports

resultiert in nicht lebensfähigen Pollen und der abnormalen Entwicklung der Pollenschläuche (Feng et al., 2006b; Salinas-Grenet et al., 2018; Yao et al., 2018). Interessanterweise ist das Auxinsignal in den Pollen und Antheren am stärksten in Blüten der Stadien 11 und 12, also kurz bevor eine *GUS*-Färbung von *CKX1-NAT* sichtbar war (Feng et al., 2006a; Yao et al., 2018). Möglicherweise wird also während der späten Pollenentwicklung die *CKX1-NAT*-Expression durch Auxin induziert, um das Level von *CKX1* und darüber die aktive Cytokininkonzentration in den Pollen präzise zu regulieren. Dies könnte einen bisher unbekanntem Mechanismus der antagonistischen Auxin-Cytokinin-Interaktion darstellen. Dieser Hypothese folgend, wäre anzunehmen, dass die Cytokininkonzentration in den Pollen in Blüten der Stadien 13 und 14 abnimmt. Es wäre interessant, diese Hypothese mithilfe von Pflanzen zu überprüfen, welche das synthetische Reporterkonstrukt der Cytokininantwort *pTCSn:GFP* exprimieren.

Um eine biologische Relevanz von *CKX1-NAT* eindeutig nachzuweisen, wäre es unerlässlich, *loss-of-function*-Mutanten zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits vier T-DNA-Insertionslinien identifiziert und analysiert, welche eine Insertion im *CKX1-NAT*-transkribierenden Bereich oder in der Promotorregion tragen. Andererseits wurden *ckx1-nat-miR*-Linien isoliert und untersucht, welche eine *CKX1-NAT*-spezifische amiRNA exprimieren. Leider konnten mit beiden Ansätzen keine Linien identifiziert werden, deren *CKX1-NAT*-Transkriptlevel verringert waren. Für die T-DNA-Insertionslinien ist dies vermutlich durch eine Transkriptionsinitiation innerhalb der T-DNA zu erklären. Aufgrund der Position der Insertionen werden dadurch die *CKX1-NAT*-Isoformen nahezu in ihrer gesamten Länge exprimiert. Für die amiRNA-Linien ist die fehlende *CKX1-NAT*-Reduktion vermutlich durch eine zu geringe Effizienz der amiRNAs zu erklären. Es ist bekannt, dass nicht jede amiRNA mit gleicher Effizienz sein Zieltranskript degradiert (Li et al., 2013a; Yu und Pilot, 2014). Einige amiRNAs wirken zudem nicht durch den Abbau des Zieltranskripts, sondern durch die Inhibition der Translation (Li et al., 2013a; Yu und Pilot, 2014). Für nicht-kodierende Transkripte ist dieser Regulationsmechanismus nicht geeignet. Um zukünftig Pflanzenlinien zu generieren, deren *CKX1-NAT*-Level reduziert ist, könnten weitere transgene Linien generiert und untersucht werden, welche andere spezifische amiRNA- oder sogenannte *hairpin* RNAi-Konstrukte (Wesley et al., 2001) exprimieren. Um entsprechende Konstrukte zu identifizieren, welche *CKX1-NAT* effizient degradieren, könnten Vortests in transient exprimierenden *A. thaliana*-Protoplasten oder infiltrierten *Nicotiana tabaccum*-Zellen durchgeführt werden (Li et al., 2013a; Yu und Pilot, 2014). Alternativ dazu könnten transgene Linien erzeugt werden, in denen der *CKX1-NAT*-Promotor inklusive der Transkriptionsstartpositionen mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems deletiert ist. Die erfolgreiche Deletion von DNA-Fragmenten mit einer Größe von mehr als 1000 bp in *A. thaliana* wurde mehrfach gezeigt (Gao et al., 2016; Hui et al., 2019; Liu et al., 2019; Wu et al., 2018).

Die *CKX*-Gene weisen eine hohe funktionale Redundanz auf und der Funktionsverlust eines Gens hat im Allgemeinen keine oder nur schwache phänotypischen Konsequenzen (Bartrina, 2006). Auch *ckx1 loss-of-function*-Mutanten zeigen keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen (Engelmann, 2013). Bei der Untersuchung der Funktion von *CKX1-NAT* und *CKX1* für die Pollenentwicklung und -funktionalität mittels *loss-of-function*-Mutanten müssen somit auch eventuell redundant wirkende *CKX*-Gene beachtet werden. *CKX6-NAT* z.B. wurde ebenfalls in reifen Pollen

exprimiert (Abbildung 15K) und durch Auxin induziert (Abbildung 17) und möglicherweise wirken beide *CKX-NATs* in diesem Entwicklungsprozess redundant, indem sie ihr jeweiliges *Sense*-Transkript regulieren. Für eine funktionelle Analyse sollten demnach auch Mutanten untersucht werden, in denen sowohl das *CKX1-NAT* als auch das *CKX6-NAT*-Level reduziert ist. Diese könnten z.B. auf die Keimungsfähigkeit ihrer Pollen *in vitro* und auf wildtypischen Stigmata untersucht werden.

Neben der Expression von *CKX6-NAT* in den Pollen, welche analog zu *CKX1-NAT* auf eine Bedeutung von *CKX6-NAT* für die Entwicklung oder Funktion der Pollen hinweisen könnte, wurde *CKX6-NAT* auch im Embryosack exprimiert (Abbildung 15M). Das Expressionsmuster ähnelte dem des Markers für die funktionale Megaspore *pFM2:GUS*, was eine Transkription des *NAT* im weiblichen Gametophyten vermuten lässt (Olmedo-Monfil et al., 2010). Um die Übereinstimmung der Lokalisation zu bestätigen, wären Co-Lokalisationsstudien mit Reporterlinien für *pCKX6-NAT* und *pFM2* sinnvoll, wofür die Promotorfragmente mit verschiedenen Genen fluoreszierender Proteine fusioniert werden müssten. Es ist bekannt, dass Cytokinin für die Entwicklung des weiblichen Gametophyten eine essentielle Rolle spielt (Cheng et al., 2013). Möglicherweise ist eine lokale Erhöhung der *CKX6*-Transkriptlevel durch *CKX6-NAT* an der Feinregulation der Cytokininkonzentration im Gametophyten beteiligt und beeinflusst dessen Entwicklung oder Funktionalität. Auch Auxin, ein Stimulus, welcher die *CKX6-NAT* und *CKX6*-Level stark induzierte, beeinflusst die Gametophytenentwicklung (Zhao, 2010). Im Verlauf der Embryosackentwicklung ist die Expression von Genen der Auxinhomöostase sowie des synthetischen Reporterkonstruktes der Auxinantwort *pDR5:GUS* zeitlich und räumlich präzise kontrolliert, wobei die maximale Auxinantwort innerhalb des weiblichen Gametophyten detektiert wird (Pagnussat et al., 2009; Panoli et al., 2015). Pflanzen mit Störungen von Auxinsynthese oder -transport zeigen Defekte in der Gametophytenentwicklung (Ceccato et al., 2013; Panoli et al., 2015). Es wäre also auch für die Entwicklung des weiblichen Gametophyten denkbar, dass Auxin über die Induktion von *CKX6-NAT* und folglich von *CKX6* die lokale Cytokininkonzentration reguliert und so die Entwicklung und Musterbildung oder die Funktionsfähigkeit des weiblichen Gametophyten steuert. Um die biologische Relevanz von *CKX6-NAT* zu überprüfen, wäre es essentiell, *loss-of-function*-Mutanten zu analysieren. Dafür könnten zukünftig T-DNA-Insertionslinien, amiRNA-exprimierende oder *hairpin* RNAi-exprimierende Linien identifiziert und in Bezug auf die Entwicklung der weiblichen Gametophyten untersucht werden.

Darüber hinaus wurde *CKX6-NAT* in den Stomata transkribiert (Abbildung 15I) und interessanterweise überlappte diese Expression mit der des *Sense*-Partners *CKX6*. Es ist bekannt, dass Cytokinin die Anzahl und Verteilung sowie die Öffnung der Stomata beeinflusst (Hönig et al., 2018; Vatén et al., 2018). Untersuchungen von Pflanzen verschiedener Spezies, die mit exogenem Cytokinin behandelt wurden oder deren endogener Cytokininstatus verändert wurde, weisen auf einen positiven Einfluss von Cytokinin auf die Öffnung der Stomata hin (Ahanger et al., 2018; Kulaeva et al., 2002; Nguyen et al., 2016; Tao et al., 2010). Die Öffnung der Stomata ist ein wichtiger Anpassungsmechanismus der Pflanze auf Trockenheit, mit dessen Hilfe der Wasserverlust reguliert werden kann. In *Malus domestica* wurde gezeigt, dass durch Trockenheit das *MsCKX4a*-Level

erhöht und infolge dessen das endogene Cytokininlevel reduziert wird, was wahrscheinlich der Grund für die zu beobachtende Schließung der Stomata ist (Liao et al., 2017). Für *CKX6-NAT* und *CKX6* wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Hinweise auf eine Transkriptlevelerhöhung infolge von Trockenstress beobachtet. Neben Trockenheit existieren noch weitere Stimuli, welche die Schließung der Stomata beeinflussen. Zum Beispiel ist die Öffnung der Stomata von der Lichtintensität abhängig, wobei die Öffnung durch Rotlicht und Blaulicht synergistisch stimuliert wird (Matthews et al., 2019). So kann die Öffnung der Stomata an die photosynthetische Aktivität gekoppelt werden, um einen ausreichenden Nachschub an Kohlendioxid in der Pflanze gewährleisten zu können. Durch Beschattung und das damit verbundene niedrige Rot-/Dunkelrotlicht-Verhältnis wird die Öffnung der Stomata verringert (Echer und Rosolem, 2015; Gross et al., 1996; Maliakal et al., 1999). Für *CKX6* wurde eine regulatorische Rolle bei der molekularen Antwort auf Beschattung beschrieben (Carabelli et al., 2007). In Reaktion auf ein geringes Rot-/Dunkelrotlicht-Verhältnis wird das Wachstum von Blattprimordien eingestellt, um die Energieressourcen für das Wachstum des Primärsprosses bereitzustellen (Smith, 1982). In *A. thaliana* wurde gezeigt, dass diese Reaktion durch die lokale Erhöhung des Auxinsignals und die daraus resultierende Erhöhung des *CKX6*-Levels vermittelt wird (Carabelli et al., 2007). Es wäre denkbar, dass auch das Schließen der Stomata infolge von Beschattung über *CKX6* reguliert wird, welches seinerseits möglicherweise durch *CKX6-NAT* reguliert wird. Auxin als *CKX6-NAT* stimulierendes Hormon könnte in einen solchen regulatorischen Weg involviert sein. Obwohl bekannt ist, dass Auxin in physiologischen Konzentrationen die Öffnung von Stomata fördert, ist das Auxinsignal ebenso essentiell für das Schließen der Stomata bei Trockenheit (Daszkowska-Golec und Szarejko, 2013; Salehin et al., 2019). Vorstellbar wäre also, dass ein niedriges Rot-/Dunkelrotlichtverhältnis den Auxinstatus in den Stomata erhöht, wodurch die Expression von *CKX6-NAT* und nachfolgend *CKX6* stimuliert wird, was zu einer Verringerung der lokalen Cytokininkonzentration und letztlich zur Schließung der Stomata führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten *loss-of-function*-Mutanten von *CKX6-NAT* und *CKX6* sowie von Komponenten der Auxinsignaltransduktion in Bezug auf die Schließung der Stomata infolge eines reduzierten Rot-/Dunkelrotlichtverhältnisses untersucht werden. Außerdem könnten die Transkriptlevel von *CKX6-NAT* und *CKX6* im Zeitverlauf nach Reduktion des Rot-/Dunkelrotlichtverhältnisses im Wildtyp und in *ckx6-nat loss-of-function*-Mutanten gemessen werden, um eine Abhängigkeit der *CKX6*-Expression von *CKX6-NAT* in dieser Reaktion zu überprüfen.

Für *CKX5-NAT* kann eine Funktion bei der Kontrolle der Cytokininkonzentration durch eine negative *Feedback*-Regulation vermutet werden. Die Analyse der Transkriptlevel von *CKX5-NAT* und *CKX5* nach Behandlung mit exogenem Cytokinin zeigte eine schnelle und starke Erhöhung des *CKX5-NAT*-Levels (Abbildung 18) und in Pflanzen mit reduziertem *CKX5-NAT*-Status waren auch die *CKX5*-Level reduziert (Abbildung 24). Es ist bekannt, dass *A. thaliana*-Pflanzen eine erhöhte endogene Cytokininkonzentration, z.B. infolge des Funktionsverlustes von Cytokininhomöostasegenen, kompensieren können, unter anderem durch den Anstieg der Expression von *CKX*-Genen (Brock, 2020; Šmehilová et al., 2016; Wang et al., 2011a). Vermutlich stimuliert ein Anstieg der endogenen Cytokininkonzentration die Expression von *CKX5-NAT*, welches das Level von *CKX5*

erhöht und folglich eine Reduktion der endogenen Cytokininkonzentration bewirkt. Diese Hypothese könnte durch die Messung der *CKX5*-Level in den *ckx5-nat-S3*-Pflanzen nach Behandlung mit exogenem BA getestet werden. Geht die Erhöhung von *CKX5* infolge von BA tatsächlich auf die positive Regulation durch *CKX5-NAT* zurück, wäre zu vermuten, dass diese Erhöhung in *ckx5-nat-S3* weniger stark ausfällt.

Die *GUS*-Analyse zeigte, dass *CKX5-NAT* ebenso wie *CKX5* im Sprossapex exprimiert wurde (Abbildung 15D), was möglicherweise auf eine regulatorische Funktion des NAT auf *CKX5* im SAM hindeutet. Es wurde gezeigt, dass *CKX5* zusammen mit *CKX3* die Größe und Aktivität des Infloreszenzmeristems steuert und so die Anzahl von Blüten und Schoten beeinflusst (Bartrina et al., 2011). Es wäre denkbar, dass die *CKX5*-Expression in diesen Prozessen durch *CKX5-NAT* reguliert wird. Um diese Hypothese zu testen, könnten sowohl die Meristemgröße als auch die Anzahl von Blüten und Schoten der *ckx5-nat-S3*-Pflanzen analysiert werden. Da *CKX5* in diesen Prozessen redundant mit *CKX3* wirkt und die phänotypischen Effekte in Einzelmutanten kaum ausgeprägt sind, wäre es sinnvoll, auch Kreuzungen von *ckx5-nat-S3* mit *ckx3* durchzuführen und diese in die Analysen zu integrieren.

Darüber hinaus wurde eine *CKX5-NAT*-Expression in einer oder mehreren der radialen Zellschichten des Hypokotyls beobachtet (Abbildung 15D). Dabei könnte es sich um die Endodermis, den Perizykel, das Phloem oder das vaskuläre Kambium handeln. Es ist bekannt, dass Cytokinin die Entwicklung des vaskulären Kambiums beeinflusst und so die Entwicklung der Leitgewebe und das sekundäre Dickenwachstum in Spross und Wurzel reguliert (Nieminen et al., 2015; Ragni und Greb, 2018). Das sekundäre Dickenwachstum wird von *CKX5* und *CKX3* negativ reguliert und ihr Verlust bewirkt die Ausbildung dickerer Infloreszenzstängel (Bartrina et al., 2011). Eventuell ist *CKX5-NAT* im sekundären Kambium aktiv, um *CKX5* und somit die Cytokininkonzentration in diesen Zellen exakt zu regulieren. Diese Hypothese könnte getestet werden, indem zunächst in Pflanzen der *pCKX5-NAT:GUS*-Linien überprüft wird, ob *CKX5-NAT* auch in radialen Zellschichten der Infloreszenzstängel exprimiert wird. Um die Zelltypen, in denen *CKX5-NAT* exprimiert wird, exakt zu bestimmen, könnten Querschnitte von Hypokotyl und Infloreszenzstängel der *pCKX5-NAT:GUS*-Pflanzen analysiert werden. Die biologische Relevanz von *CKX5-NAT* für das sekundäre Dickenwachstum könnte mittels Analyse des Stängeldurchmessers sowie mittels mikroskopischer Analyse des Zellteilungsmusters in Sprossquerschnitten von *ckx5-nat-S3* bzw. *ckx5-nat-S3,ckx3*-Doppelmutanten untersucht werden.

4.6 Der Großteil der *CKX-NATs* kodiert wahrscheinlich nicht für Proteine

Obwohl die meisten *Antisense*-Transkripte proteinkodierender Transkripte selbst nicht für ein Protein kodieren, wurden auch *Sense-Antisense*-Paare zweier kodierender RNAs beobachtet (Katayama et al., 2005; Wang et al., 2006). Um herauszufinden, auf welche Weise die *CKX-NATs* wirken, wurde analysiert, ob diese potentiell für Proteine kodieren können. Die Untersuchung zeigte, dass die meisten der NAT-Isoformen an den untersuchten *CKX*-Loci wenig Potential besaßen, für eventuelle Proteine zu kodieren. Die Transkriptisoformen des *CKX6-NAT* wiesen keine ORFs auf, die für Polypeptide mit mindestens 100 aa kodieren können, sondern lediglich kurze ORFs (engl.: *short ORFs*; sORFs), welche für hypothetische Peptide mit einer Länge von maximal 76 aa kodieren

könnten. Bis auf die Isoform *CKX1-NAT n*, deren längstes ORF 306 nt umfasste, enthielten auch die *CKX1-NAT*-Isoformen keine langen ORFs.

Für einige der potentiellen Peptide bzw. das potentielle Protein wurden Homologien zu verschiedenen annotierten Proteinen der RefSeq-Kollektion gefunden (Tabelle 21). Bei diesen handelte es sich gänzlich um hypothetische und bislang nicht charakterisierte Proteine. Viele dieser hypothetischen Proteine waren kürzer als 100 aa, weshalb die zugehörigen Transkripte ebenfalls zu den nicht-kodierenden Transkripten gezählt werden. Das Transkript, welches für das hypothetische Protein AAM97111.1 kodiert, entspricht beispielsweise einem der für den *AtCKX6*-Locus vorhergesagten lncNAT, das strukturell mit der isolierten *CKX6-NAT*-Isoform g übereinstimmt. Auch die hypothetischen Proteine EFH58039.1 und XP_020882875.1 aus *A. lyrata*, XP_019082318.1 aus *Camelina sativa* und XP_023640883.1 aus *Capsella rubella*, welche als Homologe einiger potentieller Peptide der *CKX1-NAT*-Isoformen identifiziert wurden, sind weniger als 100 aa lang. Ihre RefSeq-Annotation basiert auf einem bioinformatischen Annotationsprozess (ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/process/; Stand 17.04.2020), experimentell wurden diese hypothetischen Proteine bislang nicht bestätigt. Die Existenz eines entsprechenden Transkripts an den jeweiligen Loci wird durch RNA-Seq-Daten unterstützt. Die Transkripte überlappten mit dem *CKX1*-Gen der jeweiligen Spezies und stellten so auch in diesen Spezies *Antisense*-Transkripte dar.

Darüber hinaus wurden Homologe mit einer Länge von mehr als 100 aa gefunden. Zu diesen zählten RWV85650.1 aus *Ensete ventricosum* und BBH07289.1 aus *Prunus dulcis*, welche als Homologe der potentiellen Peptide mehrerer *CKX1-NAT*-Isoformen gefunden wurden, und TVU19139.1 aus *Eragrostis curvula*, welches als Homolog des potentiellen Peptids mehrerer *CKX6-NAT*-Isoformen identifiziert wurde. Alle dieser hypothetischen Proteine wurden bioinformatisch auf Grundlage der Genomannotation der jeweiligen Spezies vorhergesagt und wurden ebenfalls nicht experimentell nachgewiesen. Aufgrund mangelnder Transkriptannotationen in diesen Spezies konnten die Positionen der jeweiligen Transkripte relativ zu den *CKX1*-Homologen der entsprechenden Spezies nicht festgestellt werden. Eine Homologiesuche mittels BLASTn (Tabelle 8; Stand 17.04.2020) zeigte jedoch, dass jedes dieser Transkripte hohe Sequenzhomologien zu den komplementären Sequenzen von *CKX*-mRNAs anderer Spezies aufwies, was vermuten lässt, dass es sich bei den jeweiligen Transkripten um NATs an den Loci der *CKX*-Homologe von *Ensete ventricosum*, *Prunus dulcis* und *Eragrostis curvula* handelt.

Für die potentiellen Peptide mehrerer *CKX1-NAT*-Isoformen wurden Homologien zu den hypothetischen Proteinen NP_001323944.1 und NP_001324962.1 aus *A. thaliana* identifiziert, für die eine Länge von 259 aa bzw. 106 aa vorhergesagt wurde. Bei den entsprechenden Transkripten handelt es sich um die NATs *At2g41515* und *At2g41505*, die am *CKX1*-Locus vorhergesagt werden (Abbildung 7). Die Existenz dieser Transkriptstrukturen konnte durch die RACE-Analyse in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da ein Teil der jeweiligen Sequenzen, welcher auch einen Großteil der ORFs beinhaltet, nicht mit den isolierten RACE-Produkten übereinstimmte. Es wäre denkbar, dass diese Transkriptvarianten nur in speziellen Geweben oder Zellen exprimiert werden und in Infloreszenzgewebe, welches für die RACE-Analyse genutzt wurde, nicht nachweisbar war. *In silico*

wurden allerdings ebenso keine ESTs oder RNA-Seq-Sequenzen gefunden, welche die vorhergesagten Transkriptvarianten unterstützen. In einer semiquantitativen PCR-Reaktion, welche die *CKX1-NATs* im 5'-terminalen Bereich amplifizierte (Abbildung 13B), wurde eine schwache Bande detektiert, welche keiner der in dieser Arbeit identifizierten *CKX1-NAT*-Isoformen entsprach, mit einer Größe von ca. 240 bp jedoch dem *At2g41415*-Transkript entsprechen könnte. Diese Bande war lediglich in der Probe des Infloreszenzgewebes deutlich zu erkennen und wies im Vergleich mit den anderen Isoformen nur eine sehr geringe Expression auf. Dies könnte entweder auf eine spezifische Expression dieser Transkriptvariante in wenigen Zellen oder auf dessen untergeordnete Relevanz hindeuten. Die Sequenzumgebung der hypothetischen Startcodons von *At2g41515* (AUUCAAUGG) und *At2g41505* (GAUCAAUGA) weisen nicht auf eine effektive Translation dieser ORFs hin, da sich die Sequenz um das Initiatorcodon dieser Transkripte und die Konsensussequenz in Dikotyledonen (aaA(A/C)aAUGG) an wichtigen Positionen unterscheiden (Joshi et al., 1997). Die *CKX1-NAT*-Transkriptisoform n stellte mit seinem 306 nt großen ORF ein potentiell proteinkodierendes Transkript dar. Wie die Abbildung 13A zeigt, scheint diese Isoform in den untersuchten Geweben keine hohe Abundanz zu besitzen. Außerdem weist auch der Sequenzkontext dieser Isoform um das Startcodon (CUUGAAUGA) Abweichungen zur Konsensussequenz an relevanten Nukleotidpositionen auf.

Drei der vier *CKX5-NAT*-Isoformen besaßen keine ORFs mit mehr als 300 nt und für die jeweils längsten hypothetischen Peptide der Isoformen konnten keine homologen Proteine gefunden werden. Die *CKX5-NAT*-Isoform c enthielt die CDS für das 161 aa lange Protein UBC16. Die Amplifikate der 5'-RACE-PCR sowie der semiquantitativen PCRs (Abbildung 9 und Abbildung 13F) deuteten darauf hin, dass es sich bei dieser um die am stärksten abundante Isoform handelte. Bislang wurde die Proteinexpression und Aktivität von UBC16 nicht experimentell nachgewiesen, jedoch weist die Proteinsequenz mit 85 % identischen Aminosäuren eine hohe Sequenzhomologie zu seinem nächsten Paralog UBC15 auf, welches eine nachgewiesene enzymatische Funktion als Ubiquitin-konjugierendes Enzym besitzt (Kraft et al., 2005). UBC16 ist ein Ortholog des funktionell charakterisierten UBC16 des Menschen und besitzt die enzymatisch aktive Domäne (Yin et al., 2006). Es ist demnach wahrscheinlich, dass die *CKX5-NAT*-Isoform c ein funktionales UBC16-Protein kodiert. Es wäre denkbar, dass nur einige der Transkriptisoformen von *CKX5-NAT* eine regulatorische Rolle als NAT des *CKX5* spielen und die Isoform c lediglich eine kodierende Funktion besitzt. Diese Hypothese wird durch die Analyse der Transkriptlevel von *CKX5-NAT* und *UBC16* in Reaktion auf exogenes Cytokinin unterstützt (Abbildung 18). Diese zeigte, dass die UBC16-kodierenden Transkriptlevel durch BA weniger stark erhöht wurden als die Transkriptlevel der *CKX5-NATs*, welche im Bereich gemessen wurden, der mit dem *CKX5*-Intron überlappt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Isoform c eine duale Funktion besitzt und sowohl für UBC16 kodiert als auch eine regulatorische Funktion als RNA besitzt. Für RNAs mit dualer Funktion gibt es einige bekannte Beispiele vom Prokaryonten bis zu Tieren, Menschen und Pflanzen (Nam et al., 2016). Das Gen *SIMILAR TO RCD ONE 5* (*SRO5*) aus *A. thaliana* beispielsweise besitzt zwei Transkriptisoformen, welche für ein 309 aa bzw. ein 241 aa großes Protein kodieren. *SRO5* gehört zu einer Genfamilie, deren Genprodukte zumindest partiell Homologien zu *RADICAL-INDUCED*

CELL DEATH 1 (RCD1) aufweisen und vermutlich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und die Bildung von Proteinkomplexen regulieren (Ahlfors et al., 2004; Jaspers et al., 2010). *SRO5* bildet zudem ein *tail-to-tail*-NAT-Paar mit $\Delta 1$ -PYRROLINE-5-CARBOXYLATE DEHYDROGENASE (*P5CDH*), welches in die pflanzliche Antwort auf Stress involviert ist (Borsani et al., 2005; Deuschle et al., 2001). In Reaktion auf NaCl wird die Expression von *SRO* induziert, was die Bildung von siRNAs bewirkt, welche wiederum den Abbau der konstitutiv exprimierten *P5CDH*-mRNA verursacht (Borsani et al., 2005). *SRO5* besitzt somit neben der proteinkodierenden Funktion zusätzlich eine Wirkung als funktionelle RNA bei der Reduktion der *P5CDH*-Expression durch Salzstress.

Nicht nur proteinkodierende Transkripte können eine unerwartete Funktion als *Antisense*-Transkript besitzen, auch Transkripte, welche aufgrund des Fehlens eines langen ORFs als ncRNAs eingruppiert werden, können für funktionale Peptide kodieren. Beispielsweise kodiert *POLARIS* aus *A. thaliana* für ein 36 aa großes Peptid, welches eine Rolle für das Wurzelwachstum und die Entwicklung der Vaskulatur spielt (Casson et al., 2002). Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch von einem der sORFs der *CKX-NAT*-Isoformen ein funktionales Peptid translatiert wird. Um in zukünftigen Analysen näher zu untersuchen, ob Peptide oder Proteine von den *CKX-NATs* translatiert werden, könnte untersucht werden, ob die Transkripte an Ribosomen gebunden sind. Dafür können bereits existierende Sequenzierungsdaten von *ribosome profiling*-Experimenten nach den *CKX-NAT*-Sequenzen durchsucht werden oder die Existenz der Transkripte in Polysomen mittels PCR-Analyse überprüft werden, um erste Hinweise zu erhalten. Da gezeigt wurde, dass auch ein Großteil nicht-translatierter Transkripte an Polysomen gebunden ist, gibt diese Art der Analyse kein endgültiges Ergebnis, sondern kann lediglich Hinweise darauf liefern, ob in bestimmten Abschnitten des Transkripts gehäuft Ribosomen vorkommen (Guttman et al., 2013). Ein weiteres Indiz für die tatsächliche Translation eines Peptids kann die Bestimmung des *ribosome release score* liefern (Guttman et al., 2013). Sinkt die Zahl der Ribosomen am Transkript nach dem Stoppcodon des ORFs, wurde dieses wahrscheinlich translatiert. Auch die Trinukleotid-Periodik der ribosomalen Fraktionen relativ zum Startcodon kann auf die tatsächliche Translation eines ORFs hinweisen (Calviello et al., 2016). Um den Nachweis eventueller Peptide zu komplementieren, können diese mittels Massenspektrometrie direkt nachgewiesen werden, wobei die Detektionslimitierungen aufgrund der Länge und/oder Konzentration der zu detektierenden Peptide durch spezielle Peptidomics-Ansätze oder Anreicherungsprotokolle minimiert werden sollten (Mustafa et al., 2015; Schulz-Knappe et al., 2005). Werden in weiteren Analysen für eines der *CKX-NATs* eindeutige phänotypische Veränderungen in *loss*- oder *gain-of-function*-Mutanten identifiziert, sollte untersucht werden, ob die Peptide oder Proteine, die von den Isoformen des entsprechenden *CKX-NAT* kodiert werden, für die Ausprägung der phänotypischen Veränderungen eine Rolle spielen. Dafür können Mutanten zur Komplementation oder für Überexpressionstudien genutzt werden, die eine Punktmutation am Beginn der ORFs besitzen.

Auch wenn nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die ORFs der *CKX-NATs* für Peptide oder Proteine kodieren, weisen die Daten darauf hin, dass die meisten der Isoformen nicht für lange Proteine kodieren. Lediglich bei einer Isoform des *CKX5-NAT* ist die Kodierung für das funktionale Protein UBC16 wahrscheinlich. Die Analyse liefert jedoch auch Hinweise dafür, dass an den

homologen *CKX*-Loci in einigen Spezies, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail untersucht wurden, IncNATs existieren, was auf eine Konservierung der Struktur des Locus mit *CKX* als *Sense*- und einer IncRNA als *Antisense*-Transkript hindeutet.

4.7 Die Existenz von IncNATs ist ein gemeinsames Merkmal homologer *CKX1*- und *CKX6*-Loci in Angiospermen

Die evolutionäre Konservierung von DNA-Bereichen ist ein Hinweis auf ihre funktionelle Relevanz. Eine Analyse der genomischen Struktur von NAT-Paaren verschiedener Vertebratenspezies zeigt, dass die Anordnung von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten zueinander evolutionär konserviert ist (Dahary et al., 2005; Wood et al., 2013; Zhang et al., 2006). Die Analyse der Existenz von IncNATs und Promotor-IncNATs an den *CKX*-Loci verschiedener Pflanzenspezies deutete darauf hin, dass bereits der letzte gemeinsame Vorfahre von *CKX1* und *CKX6* ein IncNAT besaß, welches in nahezu allen Orthologen der untersuchten Spezies erhalten wurde (Abbildung 26 und Anhang, Tabelle 29). Entstanden ist das IncNAT vermutlich spätestens innerhalb der Angiospermen beim letzten gemeinsamen Vorfahren der *CKX1*- und *CKX6*-Homologe der Dikotyledonen und den *OsCKX9*-Homologen der Monokotyledonen. Die Konservierung der Existenz eines IncNAT weist darauf hin, dass dieses an diesen *CKX*-Loci von funktioneller Bedeutung ist, vermutlich um deren Expression gewebespezifisch oder in Reaktion auf einen bestimmten Stimulus zu regulieren.

Vier der Loci innerhalb des *CKX1/CKX6*-Clusters wiesen keine Hinweise auf IncNATs auf, jedoch wurden für drei dieser Loci proteinkodierende NATs vorhergesagt (Abbildung 26 und Anhang, Tabelle 29). Für die NATs am *PtCKX1-X1*- und *PtCKX1-X2*-Locus existierten mehrere Spleißvarianten (Abbildung 34), ähnlich wie es am *CKX1*-Locus zu beobachten war. Möglicherweise besitzen die kodierenden NATs an den drei Loci eine duale Funktion, einerseits für ein Protein zu kodieren und andererseits die Expression von *CKX1* zu regulieren.

Innerhalb der Rosiden scheint die Existenz eines proteinkodierenden *tail-to-tail*-NAT am *CKX5*-Locus konserviert zu sein (Abbildung 26 und Anhang, Tabelle 29). In den Vertretern der *Brassicaceae*, *A. lyrata* und *B. rapa*, handelte es sich jeweils um das *AtUBC16*-Ortholog der entsprechenden Spezies. In den Vertretern der Fabiden, *P. trichocarpa* und *C. sativus*, handelte es sich hingegen um die zueinander orthologen Gene *RIBOSOMAL RNA SMALL SUBUNIT METHYLTRANSFERASE I* (*RSMI*) der entsprechenden Spezies. Obwohl während der unabhängigen Evolution der *CKX5*-Orthologe der Rosiden offensichtlich größere Veränderungen des *downstream* liegenden chromosomalen Abschnitts stattfanden, blieb die Existenz von *tail-to-tail*-NATs erhalten und interessanterweise existierten für diese jeweils mehrere unterschiedliche Spleißvarianten. Es wäre denkbar, dass für die orthologen *CKX5*-Loci innerhalb der Rosiden die Existenz von NATs mit dualer Funktion biologisch relevant ist und deshalb evolutionär konserviert wurde.

4.8 *CKX1*- und *CKX6*-IncNATs verschiedener Spezies sind strukturell konserviert

Nicht nur die Existenz von IncNATs an orthologen Genloci selbst kann evolutionär konserviert sein, auch strukturelle Eigenschaften wie die Nukleotidsequenz, der Grad der Überlappung mit dem

Sense-Partner oder die Position von Spleißgrenzen der homologen lncNATs können konserviert sein.

Der Sequenzvergleich der homologen *CKX1-NATs* bzw. *CKX6-NATs* aus *A. lyrata*, *C. sativa*, *C. rubella* und *E. salsugineum* zeigte eine höhere Sequenzidentität im Vergleich mit jenem homologer intergenischer Bereiche (Tabelle 23), was auf eine biologische Relevanz der Transkripte hindeutet. Die Nukleotidsequenz der funktionell konservierten Orthologe des lncNAT *COOLAIR* in *A. thaliana* und *Brachypodium distachyon*, welche in beiden Spezies durch Vernalisation induziert werden und ihre *Sense*-Transkripte supprimieren, ist ebenfalls weniger stark konserviert als die ihrer *Sense*-Transkripte, jedoch stärker konserviert als die der Introns und der angrenzenden, nicht-transkribierten Sequenzen (Jiao et al., 2019). Die vier im Rahmen dieser Arbeit untersuchten intergenischen Bereiche wiesen jedoch eine hohe Variabilität bezüglich ihrer Sequenzkonservierung auf (Anhang, Tabelle 31). So besaß beispielsweise der intergenische Bereich *downstream* des *At2g44940*-Homologs in allen Spezies eine ähnliche oder höhere Sequenzidentität verglichen mit dem jeweiligen *CKX6-NAT*-Homolog. Obwohl intergenische Bereiche ausgewählt wurden, die *downstream* von kodierenden Genloci liegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in den homologen Bereichen funktionell relevante DNA-Sequenzen befinden, welche unter einem höheren Evolutionsdruck stehen als nicht-funktionale Sequenzen. Um eine repräsentative Sequenzidentität für intergenische Bereiche zu ermitteln, muss eine höhere Anzahl von nicht-funktionalen, intergenischen Bereichen in den untersuchten Spezies analysiert werden. Erst dann können die ermittelten Sequenzidentitäten der *CKX-NATs* aussagekräftig interpretiert werden.

Die Visualisierung der homologen *CKX1-NATs* in Abbildung 27 zeigt, dass die NATs an zwei der Loci von *C. sativa* den gesamten *CKX1*-Locus überspannten, ähnlich wie es in *A. thaliana* beobachtet wurde. Für die *CKX1*-Loci von *A. lyrata* und *C. rubella* wurden mehrere hintereinanderliegende NATs vorhergesagt. Die an den Loci annotierten Intronpositionen legen jedoch nahe, dass diese einzelnen NATs einem größeren Transkript angehören, welches analog zum *AtCKX1-NAT* den gesamten *CKX1*-Locus überspannt. Das vollständige Überlappen des NATs an den *CKX1*-Locus scheint also ebenfalls ein gemeinsames Merkmal in verschiedenen Spezies zu sein.

Für die homologen lncNATs an nahezu allen Loci des *CKX1/CKX6*-Clusters waren Hinweise auf die Existenz mehrerer Isoformen mit variablen Exon-Intron-Strukturen zu finden, entweder in Form von verschiedenen annotierten Transkriptisoformen oder in Form von verschiedenen annotierten Spleißgrenzen im gleichen Sequenzbereich (Anhang, Tabelle 29). Dies weist auf eine ähnliche Struktur der Transkripte an den homologen *CKX-NAT*-Loci hin. Die Analyse der Spleißgrenzen zeigte, dass die Position der Exon-Intron-Grenzen und zum Teil die *up*- oder *downstream* angrenzenden Transkriptsequenzen für einige Introns der *CKX1-NAT*-Homologe und alle Introns der untersuchten *CKX6-NATs* hoch konserviert war. Dies weist auf eine funktionelle Bedeutung dieser Exon-Intron-Strukturen hin. Möglicherweise werden in diesen konservierten Bereichen funktionell relevante Sekundärstrukturen ausgebildet. Einige funktionell charakterisierte lncRNAs wie *COOLAIR*, *HID1* und *AtR8* in Pflanzen oder *HOTAIR* und *STEROID RECEPTOR ACTIVATOR (SRA)* in Vertebraten weisen eine hohe Konservierung ihrer Sekundärstruktur auf und z.B. für *HID1* wurden mehrere *stem-loop*-Strukturen identifiziert, welche für die biologische Funktion dieser

lncRNA essentiell sind (Hawkes et al., 2016; Somarowthu et al., 2015; Wang et al., 2014b; Wu et al., 2012). Um die Existenz funktionell relevanter Sekundärstrukturen in *CKX-NATs* näher zu untersuchen, könnte eine Analyse der Sekundärstrukturen und deren Konservierung durchgeführt werden. Konservierte Strukturen könnten anschließend *in silico* mit bekannten funktionalen Sekundärstrukturen nicht-kodierender Transkripte verglichen werden, um erste Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Es ist bekannt, dass RNA-Sekundärstrukturen verschiedene Funktionen ausüben können. Unter anderem können lncRNAs eine Bindung mit spezifischen DNA-Bereichen eingehen oder die Interaktion mit Proteinen vermitteln, z.B. um als Gerüst für Multiproteinkomplexe zu fungieren (Vandivier et al., 2016). Beispielsweise bildet die menschliche lncRNA *GROWTH ARREST-SPECIFIC 5* (*GAS5*) eine *hairpin*-Struktur aus, welche mit der DNA-Bindedomäne des Glucocorticoidrezeptors interagiert, wodurch kompetitiv die Glucocorticoidsignaltransduktion gehemmt wird und diese *hairpin*-Struktur ist zwischen *H. sapiens* und *M. musculus* hoch konserviert (Kino et al., 2010). Proteine, welche mit einem der *CKX-NAT* interagieren, könnten mithilfe eines spezifischen RNA-Protein-Interaktions-Screens identifiziert werden (Butter et al., 2009; Perez-Perri et al., 2018).

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der Analysen der evolutionären Konservierung der Existenz und Struktur von *CKX-NATs* an homologen Loci von *CKX1* und *CKX6* darauf hin, dass regulatorische NATs an diesen Loci funktionell relevant sind und deshalb in verschiedenen Spezies innerhalb der Angiospermen erhalten wurden.

5 Zusammenfassung

Das Phytohormon Cytokinin spielt bei nahezu allen pflanzlichen Entwicklungsprozessen und der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress eine bedeutende Rolle. Die Konzentration des Hormons wird zeitlich und lokal präzise kontrolliert, unter anderem durch deren Degradation durch CKX-Enzyme. Einige Mechanismen, durch welche die Expression und die Aktivität der CKX-Enzyme reguliert werden, wurden bereits detailliert untersucht. Eine mögliche Regulation durch NATs wurde jedoch bislang nicht analysiert. NATs bieten durch ihre einzigartigen Eigenschaften eine exzellente Möglichkeit, die Expression ihrer *Sense*-Partner zu modulieren. Einerseits können sie mittels komplementärer Basenpaarung oder spezifischen Sekundärstrukturen gezielt mit DNA, RNA und Proteinen interagieren, andererseits kann ihre Aktivität durch die Regulation ihrer Transkription oder subzellulären Lokalisation schnell und flexibel kontrolliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Existenz von NATs an den Loci von *CKX*-Genen analysiert und identifizierte *CKX-NATs* wurden strukturell sowie funktionell charakterisiert.

Durch eine *in silico*-Analyse wurden Hinweise auf die Existenz von NATs an nahezu allen *CKX*-Loci der Modellpflanze *A. thaliana* gefunden. An den Loci der Gene *CKX1*, *CKX5* und *CKX6* konnte das Vorkommen von NATs experimentell bestätigt werden. Eine RACE-Analyse zeigte, dass die NATs dieser Loci diverse verschiedene Isoformen mit variablen Exon-Intron-Strukturen sowie heterogenen Transkriptstarts und -enden aufweisen. Die identifizierten *CKX-NATs* besitzen eine 5'-Cap sowie einen Poly-A-Schwanz, was auf eine aktive Transkription durch die RNA-Polymerase II hinweist. Die *CKX1-NATs* und *CKX6-NATs* kodieren wahrscheinlich nicht für Proteine. Für *CKX5-NAT* existieren mehrere nicht-kodierende Isoformen und eine Isoform, welche die CDS des *UBC16*-Gens enthält.

Expressionsanalysen wiesen auf eine Co-Regulation von *CKX-NATs* mit ihren jeweiligen *Sense*-Transkripten hin, was eine positive Regulation der *CKXs* durch die *CKX-NATs* vermuten lässt. Mithilfe von T-DNA-Insertionsmutanten, in denen das *CKX5-NAT*-Level reduziert ist, konnte für *CKX5-NAT* ein positiv regulatorischer Einfluss auf das *CKX5*-Transkriptlevel bestätigt werden. Die Erhöhung der *CKX1*-Transkriptlevel in *CKX1-NAT*-Überexpressionslinien weist ebenso auf eine positive Regulation von *CKX1* durch *CKX1-NAT* hin. Die experimentelle Analyse der subzellulären Lokalisation der *CKX-NATs* lässt vermuten, dass der größte Teil der Transkripte im Cytoplasma lokalisiert ist. Zusammen mit der positiven Regulation der *Sense*-Partner, lassen sich die möglichen Wirkungsweisen der *CKX-NATs* eingrenzen. Eine naheliegende Hypothese wäre, dass die *CKX-NATs* die Stabilität der entsprechenden *CKX*-Transkripte im Cytoplasma positiv beeinflussen, möglicherweise durch die Maskierung der Bindestellen von miRNAs oder RNA-degradierenden Enzymen.

Um mögliche Prozesse aufzudecken, die von den *CKX-NATs* beeinflusst werden, wurden einerseits die Expressionsdomänen der *CKX-NATs* und andererseits deren Transkriptleveländerung durch externe Stimuli untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass zum einen die Promotoren von *CKX1-NAT* und *CKX6-NAT* in reifen Pollen aktiv sind und dass zum anderen die Transkriptlevel durch das Phytohormon Auxin induziert werden. Diese Beobachtungen deuten auf eine Bedeutung

von *CKX1-NAT* und *CKX6-NAT* für die Entwicklung oder Funktion der Pollen hin, möglicherweise durch die pollenspezifische Modulation der *CKX1*- bzw. *CKX6*-Level in Reaktion auf Auxin. Der *CKX6-NAT*-Promotor ist zudem im Embryosack und in den Stomata aktiv, was auf einen Einfluss von *CKX6-NAT* auf die Funktion in diesen Strukturen hinweisen könnte. Ähnlich dem *CKX5*-Transkriptlevel stieg das *CKX5-NAT*-Level durch Behandlung mit exogenem Cytokinin schnell an, wohingegen es in Pflanzen mit reduziertem Cytokininstatus verringert war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass *CKX5-NAT* in einen negativen Rückkopplungsmechanismus involviert ist, um das *CKX5*-Level bei hohen Cytokininkonzentrationen zu steigern. Die *CKX5-NAT*-Promotoraktivität in der Wurzelspitze und im Sprossapex könnte auf eine Rolle von *CKX5-NAT* bei der Entwicklung von RAM und SAM hinweisen.

Schließlich wurde die evolutionäre Konservierung der *CKX-NATs* untersucht. Die Analysen zeigten, dass an nahezu allen orthologen Genloci von *CKX1* und *CKX6* verschiedener Spezies der Angiospermen NATs existieren, von denen die meisten vermutlich nicht für Proteine kodieren. An allen der untersuchten, orthologen Genloci von *CKX5* in Dikotyledonen wurden proteinkodierende *tail-to-tail*-NATs identifiziert, an einigen der Loci existieren jedoch auch nicht-kodierende Isoformen. Die Nukleotidsequenzen und Spleißgrenzen von *CKX1-NAT*- und *CKX6-NAT*-Orthologen sind evolutionär konserviert, was eine funktionelle Bedeutung dieser lncNATs innerhalb der Angiospermen vermuten lässt. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine biologische Relevanz der *CKX-NATs* hin, die Transkriptlevel der entsprechenden *CKXs* zu kontrollieren.

6 Summary

The plant hormone cytokinin is involved in the regulation of nearly all developmental processes and responses to biotic and abiotic stresses. Cytokinin concentrations are precisely controlled by different mechanisms, such as the degradation through CKX enzymes. Some of the mechanisms by which the expression and activity of CKX enzymes are regulated have already been reported. However, a possible control of CKX through NATs has not been analyzed yet. The unique properties of NATs make them excellent regulators of the expression of their sense partners. On the one hand, NATs can interact specifically with DNA, RNA and proteins via complementary base pairing and specific secondary structures. On the other hand, the activity of NATs can be quickly and flexibly regulated by altering their transcription and subcellular localization. In this work, the existence of NATs at CKX gene loci was analyzed and the identified CKX-NATs were structurally and functionally characterized.

An *in silico* analysis indicated NATs at almost all CKX loci of the model plant *A. thaliana* and the existence of NATs could be experimentally proven at the gene loci of CKX1, CKX5 and CKX6. Via RACE analysis different isoforms with various exon-intron-structures as well as heterogenous transcription start and termination sites could be identified. CKX-NATs are 5'-capped and polyadenylated suggesting that they are transcribed by RNA polymerase II. Presumably, CKX1-NATs and CKX6-NATs and most CKX5-NAT isoforms do not encode for functional proteins while one of the identified CKX5-NAT isoforms comprises UBC16-coding gene.

Transcript level analyses in different tissues and in response to various external stimuli indicated a co-regulation of CKX-NATs and their cognate CKXs, suggesting a positive regulation of CKXs through CKX-NATs. The analysis of CKX5-NAT T-DNA insertion lines confirmed the positive effect of CKX5-NAT on CKX5. Similarly, in CKX1-NAT overexpressing plants, CKX1 levels were increased, implying a positive regulatory mode of interaction. Analyses of the subcellular localization of CKX-NATs indicated that most of their transcripts localize to the cytoplasm. Taking together these results, it can be hypothesized that CKX-NATs stabilize their cognate CKX transcripts within the cytoplasm, possibly through masking target sites for miRNAs or RNA-degrading enzymes.

To uncover possible processes which are regulated through CKX-NATs, their expression patterns and transcriptional responses to exogenous stimuli were studied. Promoters of CKX1-NAT and CKX6-NAT were active in mature pollen and their transcript levels were induced by the phytohormone auxin. These observations point to a role of CKX1-NAT and CKX6-NAT in pollen function, possibly via pollen-specific modulation of CKX1 and CKX6 levels in response to auxin. In addition, the CKX6-NAT promoter was active within the embryo sac and stomatal guard cells, hinting to a function of CKX6-NAT in these structures. Similar to CKX5, CKX5-NAT transcript levels were rapidly induced by exogenous cytokinin and decreased in mutant plants with reduced endogenous cytokinin status. Thus, CKX5-NAT might be involved in a negative feedback-loop, increasing the CKX5 transcript levels in response to high cytokinin levels. Moreover, the CKX5-NAT promoter is active in the root and shoot apices, suggesting a possible function for the development of the RAM and SAM.

Finally, the evolutionary conservation of *CKX-NATs* was analyzed. At almost all orthologous *CKX1* and *CKX6* loci in different angiosperm species, NATs were identified as probably non-coding transcripts. At nearly all orthologous *CKX5* loci of dicots, protein-coding tail-to-tail NATs were identified and, at some of the loci, also non-coding isoforms exist. Nucleotide sequences and splice junctions of *CKX1-NAT* and *CKX6-NAT* orthologues are evolutionary conserved, hinting to a functional role of *CKX1-NATs* and *CKX6-NATs* in angiosperms. Taken together, the results provide evidences that *CKX-NATs* are biologically relevant to control the respective *CKX* transcript levels in plants.

Literaturverzeichnis

- Abràmoff, M., Magalhães, P., and Ram, S.** (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Adrian, J., Chang, J., Ballenger, C.E., Bargmann, B.O., Alassimone, J., Davies, K.A., Lau, O.S., Matos, J.L., Hachez, C., Lanctot, A., et al.** (2015) Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Developmental Cell* **33**, 107-118.
- Ahanger, M.A., Alyemini, M.N., Wijaya, L., Alamri, S.A., Alam, P., Ashraf, M., and Ahmad, P.** (2018) Potential of exogenously sourced kinetin in protecting *Solanum lycopersicum* from NaCl-induced oxidative stress through up-regulation of the antioxidant system, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *PLoS One* **13**, e0202175.
- Ahlfors, R., Lång, S., Overmyer, K., Jaspers, P., Brosché, M., Tauriainen, A., Kollist, H., Tuominen, H., Belles-Boix, E., Piippo, M., et al.** (2004) *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell* **16**, 1925-1937.
- Ahmad, A., Lin, H., and Shatabda, S.** (2020) Locate-R: subcellular localization of long non-coding RNAs using nucleotide compositions. *Genomics* **112**, 2583-2589.
- Albrecht, T., and Argueso, C.T.** (2017) Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth-defence trade-off. *Annals of Botany* **119**, 725-735.
- Alessio, E., Bonadio, R.S., Buson, L., Chemello, F., and Cagnin, S.** (2020) A single cell but many different transcripts: a journey into the world of long non-coding RNAs. *Int J Mol Sci* **21**, 302.
- Allen, M., Qin, W., Moreau, F., and Moffatt, B.** (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum* **115**, 56-68.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., and Yu, Y.K.** (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal* **272**, 5101-5109.
- Alvarez, S., Marsh, E.L., Schroeder, S.G., and Schachtman, D.P.** (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell & Environment* **31**, 325-340.
- Anantharaman, V., and Aravind, L.** (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* **26**, 579-582.
- Anderson, S.J., Kramer, M.C., Gosai, S.J., Yu, X., Vandivier, L.E., Nelson, A.D.L., Anderson, Z.D., Beilstein, M.A., Fray, R.G., Lyons, E., et al.** (2018) N⁶-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in *Arabidopsis*. *Cell Rep* **25**, 1146-1157.
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., and Wingett, S.** (2020). FastQC (Babraham Institute).
- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J.-F., Dessimoz, C., and Gascuel, O.** (2011) Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology* **60**, 685-699.
- Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J., and Schaller, G.E.** (2008) Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* **20**, 2102-2116.
- Ariel, F., Romero-Barrios, N., Jégu, T., Benhamed, M., and Crespi, M.** (2015) Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. *trends in plant science* **20**, 362-371.
- Arribas-Hernández, L., and Brodersen, P.** (2020) Occurrence and functions of m⁶A and other covalent modifications in plant mRNA. *Plant Physiol* **182**, 79-96.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H., and Matsuoka, M.** (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**, 741-745.
- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.H., and Sandberg, G.** (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14778-14783.
- Audas, T.E., Jacob, M.D., and Lee, S.** (2012) Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Mol Cell* **45**, 147-157.
- Back, S.H., Lee, K., Vink, E., and Kaufman, R.J.** (2006) Cytoplasmic IRE1 α -mediated *XBP1* mRNA splicing in the absence of nuclear processing and endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 18691-18706.
- Bairoch, A., and Apweiler, R.** (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* **28**, 45-48.
- Bajguz, A., and Piotrowska, A.** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.

- Bartrina, I.** (2006) Molekulare Charakterisierung von *ckx* Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokinindefizienzsyndroms in *Arabidopsis thaliana*. Institut für Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**
- Bartrina, I., Jensen, H., Novák, O., Strnad, M., Werner, T., and Schmülling, T.** (2017) Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiol* **173**, 1783-1797.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., and Schmülling, T.** (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 69-80.
- Bass, B.L.** (2002) RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 817-846.
- Batagov, A.O., Yarmishyn, A.A., Jenjaroenpun, P., Tan, J.Z., Nishida, Y., and Kurochkin, I.V.** (2013) Role of genomic architecture in the expression dynamics of long noncoding RNAs during differentiation of human neuroblastoma cells. *BMC systems biology* **7 Suppl 3**, S11.
- Beinsberger, S.E.I., Valcke, R.L.M., Deblaere, R.Y., Clijsters, H.M.M., De Greef, J.A., and Van Onckelen, H.A.** (1991) Effects of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA *ipt* gene in *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 plant cells. *Plant and Cell Physiology* **32**, 489-496.
- Beltran, M., Puig, I., Pena, C., Garcia, J.M., Alvarez, A.B., Pena, R., Bonilla, F., and de Herreros, A.G.** (2008) A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes & Development* **22**, 756-769.
- Ben Amor, B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., d'Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., Maizel, A., Mallory, A., Lucas, A., Deragon, J.M., et al.** (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. *Genome Res* **19**, 57-69.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y.** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* **57**, 289-300.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W.** (2013) GenBank. *Nucleic Acids Res* **41**, D36-D42.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E.** (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-242.
- Bertani, G.** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**, 293-300.
- Bhan, A., and Mandal, S.S.** (2014) Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. *ChemMedChem* **9**, 1932-1956.
- Bhargava, A., Clabaugh, I., To, J.P., Maxwell, B.B., Chiang, Y.H., Schaller, G.E., Loraine, A., and Kieber, J.J.** (2013) Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **162**, 272-294.
- Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey, J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D., and Morris, R.O.** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* **125**, 378-386.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W., and Benfey, P.N.** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**, 1956-1960.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benková, E., Mähönen, A.P., and Helariutta, Y.** (2011a) A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology* **21**, 917-926.
- Bishopp, A., Lehesranta, S., Vatén, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, A.P., Sakakibara, H., and Helariutta, Y.** (2011b) Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current Biology* **21**, 927-932.
- Blencowe, B.J.** (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37-47.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I.** (2007) The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 574-585.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.K.** (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* **123**, 1279-1291.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.-M., and Lamond, A.I.** (2010) The nucleolus under stress. *Mol Cell* **40**, 216-227.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.K., and Poppenberger, B.** (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 254-263.
- Brandstatter, I., and Kieber, J.J.** (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1009-1019.
- Brenner, W.G., Ramireddy, E., Heyl, A., and Schmülling, T.** (2012) Gene regulation by cytokinin in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **3**, 8.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L., and Schmülling, T.** (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* **44**, 314-333.
- Britto-Kido Sde, A., Ferreira Neto, J.R., Pandolfi, V., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L., Vilela Abdelnoor, R., Benko-Iseppon, A.M., and Kido, E.A.** (2013) Natural antisense transcripts in plants: a

- review and identification in soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi* SuperSAGE library. *Scientific World Journal* **2013**, 219798-219812.
- Brock, L.** (2020) Charakterisierung der Cytokinin-N-Glucosyltransferase-Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* in *Arabidopsis thaliana*. Institut für Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**
- Bromley, J.R., Warnes, B.J., Newell, C.A., Thomson, J.C., James, C.M., Turnbull, C.G., and Hanke, D.E.** (2014) A purine nucleoside phosphorylase in *Solanum tuberosum* L. (potato) with specificity for cytokinins contributes to the duration of tuber endodormancy. *Biochemical Journal* **458**, 225-237.
- Brownlee, B.G., Hall, R.H., and Whitty, C.D.** (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **53**, 37-41.
- Brugière, N., Jiao, S., Hantke, S., Zinselmeier, C., Roessler, J.A., Niu, X., Jones, R.J., and Habben, J.E.** (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol* **132**, 1228-1240.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., and Palme, K.** (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Burgess, A., David, R., and Searle, I.R.** (2016) Deciphering the epitranscriptome: a green perspective. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**, 822-835.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., and Frommer, W.B.** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**, 13-26.
- Butter, F., Scheibe, M., Mörl, M., and Mann, M.** (2009) Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 10626.
- Cabili, M.N., Dunagin, M.C., McClanahan, P.D., Biaesch, A., Padovan-Merhar, O., Regev, A., Rinn, J.L., and Raj, A.** (2015) Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome biology* **16**, 20.
- Caesar, K., Thamm, A.M., Withoft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., and Harter, K.** (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* **62**, 5571-5580.
- Calixto, C.P.G., Guo, W., James, A.B., Tzioutziou, N.A., Entizne, J.C., Panter, P.E., Knight, H., Nimmo, H.G., Zhang, R., and Brown, J.W.S.** (2018) Rapid and dynamic alternative splicing impacts the *Arabidopsis* cold response transcriptome. *Plant Cell* **30**, 1424-1444.
- Calviello, L., Mukherjee, N., Wyler, E., Zauber, H., Hirsekorn, A., Selbach, M., Landthaler, M., Obermayer, B., and Ohler, U.** (2016) Detecting actively translated open reading frames in ribosome profiling data. *Nature Methods* **13**, 165-170.
- Campbell, M.S., Law, M., Holt, C., Stein, J.C., Moghe, G.D., Hufnagel, D.E., Lei, J., Achawanantakun, R., Jiao, D., Lawrence, C.J., et al.** (2014) MAKER-P: a tool kit for the rapid creation, management, and quality control of plant genome annotations. *Plant Physiol* **164**, 513-524.
- Cao, Z., Pan, X., Yang, Y., Huang, Y., and Shen, H.B.** (2018) The lncLocator: a subcellular localization predictor for long non-coding RNAs based on a stacked ensemble classifier. *Bioinformatics* **34**, 2185-2194.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., and Gabaldón, T.** (2009) TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**, 1972-1973.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G., and Ruberti, I.** (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes & Development* **21**, 1863-1868.
- Carlile, T.M., Rojas-Duran, M.F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K.M., and Gilbert, W.V.** (2014) Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature* **515**, 143-146.
- Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., Pesce, E., Ferrer, I., Collavin, L., Santoro, C., et al.** (2012) Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* **491**, 454-457.
- Cary, A.J., Liu, W., and Howell, S.H.** (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol* **107**, 1075-1082.
- Casson, S.A., Chille, P.M., Topping, J.F., Evans, I.M., Souter, M.A., and Lindsey, K.** (2002) The *POLARIS* gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. *Plant Cell* **14**, 1705-1721.
- Ceccato, L., Masiero, S., Sinha Roy, D., Bencivenga, S., Roig-Villanova, I., Ditengou, F.A., Palme, K., Simon, R., and Colombo, L.** (2013) Maternal control of PIN1 is required for female gametophyte development in *Arabidopsis*. *PLoS One* **8**, e66148.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., and Frommer, W.B.** (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol* **148**, 1857-1867.
- Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)**, auf <http://arabidopsis.info/>.
- Chaiwanon, J., and Wang, Z.Y.** (2015) Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in *Arabidopsis* roots. *Current Biology* **25**, 1031-1042.
- Chandler, J.W., and Werr, W.** (2015) Cytokinin-auxin crosstalk in cell type specification. *trends in plant science* **20**, 291-300.

- Chang, H., Jones, M.L., Banowetz, G.M., and Clark, D.G.** (2003) Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with P_{SAG12}-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiol* **132**, 2174-2183.
- Chen, C.M., and Kristopeit, S.M.** (1981) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiol* **68**, 1020-1023.
- Cheng, C.Y., Krishnakumar, V., Chan, A.P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., and Town, C.D.** (2017) Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *The Plant Journal* **89**, 789-804.
- Cheng, C.Y., Mathews, D.E., Schaller, G.E., and Kieber, J.J.** (2013) Cytokinin-dependent specification of the functional megaspore in the *Arabidopsis* female gametophyte. *The Plant Journal* **73**, 929-940.
- Chernikova, D., Managadze, D., Glazko, G.V., Makalowski, W., and Rogozin, I.B.** (2016) Conservation of the exon-intron structure of long intergenic non-coding RNA genes in eutherian mammals. *Life (Basel, Switzerland)* **6**, 27.
- Chiba, Y., and Green, P.J.** (2009) mRNA degradation machinery in plants. *Journal of Plant Biology* **52**, 114-124.
- Chickarmane, V.S., Gordon, S.P., Tarr, P.T., Heisler, M.G., and Meyerowitz, E.M.** (2012) Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 4002-4007.
- Chmielowska-Bak, J., Arasimowicz-Jelonek, M., and Deckert, J.** (2019) In search of the mRNA modification landscape in plants. *BMC Plant Biology* **19**, 421.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743.
- Cochrane, G., Karsch-Mizrachi, I., and Nakamura, Y.** (2011) The International Nucleotide Sequence Database Collaboration. *Nucleic Acids Res* **39**, D15-18.
- Conley, A.B., and Jordan, I.K.** (2012) Epigenetic regulation of human cis-natural antisense transcripts. *Nucleic Acids Res* **40**, 1438-1445.
- Consortium, E.P.** (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74.
- Conti, L.** (2017) Hormonal control of the floral transition: can one catch them all? *Dev Biol* **430**, 288-301.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacqumard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Périlleux, C., and Bernier, G.** (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J Exp Bot* **54**, 2511-2517.
- Corona-Gomez, J.A., Garcia-Lopez, I.J., Stadler, P.F., and Fernandez-Valverde, S.L.** (2020) Splicing conservation signals in plant long non-coding RNAs. *bioRxiv*, 588954.
- Corot, A., Roman, H., Douillet, O., Autret, H., Perez-Garcia, M.D., Citerne, S., Bertheloot, J., Sakr, S., Leduc, N., and Demotes-Mainard, S.** (2017) Cytokinins and abscisic acid act antagonistically in the regulation of the bud outgrowth pattern by light intensity. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1724.
- Cortleven, A., Leuendorf, J.E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S., and Schmölling, T.** (2019) Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Plant, Cell & Environment* **42**, 998-1018.
- Crevillen, P., Yang, H., Cui, X., Greeff, C., Trick, M., Qiu, Q., Cao, X., and Dean, C.** (2014) Epigenetic reprogramming that prevents transgenerational inheritance of the vernalized state. *Nature* **515**, 587-590.
- Crick, F.** (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561-563.
- Csorba, T., Questa, J.I., Sun, Q., and Dean, C.** (2014) Antisense *COOLAIR* mediates the coordinated switching of chromatin states at *FLC* during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16160-16165.
- Cucinotta, M., Manrique, S., Cuesta, C., Benková, E., Novák, O., and Colombo, L.** (2018) CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **69**, 5169-5176.
- Cummins, I., McAuley, K., Fordham-Skelton, A., Schwoerer, R., Steel, P.G., Davis, B.G., and Edwards, R.** (2006) Unique regulation of the active site of the serine esterase S-formylglutathione hydrolase. *Journal of Molecular Biology* **359**, 422-432.
- Cutcliffe, J.W., Hellmann, E., Heyl, A., and Rashotte, A.M.** (2011) CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. *J Exp Bot* **62**, 4995-5002.
- D'Agostino, I.B., Deruere, J., and Kieber, J.J.** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* **124**, 1706-1717.
- Dabney, J., and Meyer, M.** (2012) Length and GC-biases during sequencing library amplification: a comparison of various polymerase-buffer systems with ancient and modern DNA sequencing libraries. *BioTechniques* **52**, 87-94.
- Dahary, D., Elroy-Stein, O., and Sorek, R.** (2005) Naturally occurring antisense: transcriptional leakage or real overlap? *Genome Res* **15**, 364-368.
- Dai, X., Zhuang, Z., and Zhao, P.X.** (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res* **46**, W49-W54.
- Daszowska-Golec, A., and Szarejko, I.** (2013) Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 138.

- De Rybel, B., Adibi, M., Breda, A.S., Wendrich, J.R., Smit, M.E., Novák, O., Yamaguchi, N., Yoshida, S., Van Isterdael, G., Palovaara, J., *et al.* (2014) Plant development. Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in *Arabidopsis*. *Science* **345**, 1255-1265.
- Deforges, J., Reis, R.S., Jacquet, P., Sheppard, S., Gadekar, V.P., Hart-Smith, G., Tanzer, A., Hofacker, I.L., Iseli, C., Xenarios, I., *et al.* (2019) Control of cognate sense mRNA translation by *cis*-natural antisense RNAs. *Plant Physiol* **180**, 305-322.
- Dello Iorio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2007) Cytokinin determines *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* **17**, 678-682.
- Dello Iorio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S. (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380-1384.
- Deng, P., Liu, S., Nie, X., Weining, S., and Wu, L. (2018) Conservation analysis of long non-coding RNAs in plants. *Science China Life Sciences* **61**, 190-198.
- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.C., Liang, Y., and Zuo, J. (2010) Arabidopsis histidine kinase CK1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell* **22**, 1232-1248.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., *et al.* (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* **22**, 1775-1789.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Daschner, K., Binder, S., and Frommer, W.B. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal* **27**, 345-356.
- Deveson, I.W., Brunck, M.E., Blackburn, J., Tseng, E., Hon, T., Clark, T.A., Clark, M.B., Crawford, J., Dinger, M.E., Nielsen, L.K., *et al.* (2018) Universal alternative splicing of noncoding exons. *Cell Systems* **6**, 245-255.
- Dinger, M.E., Amaral, P.P., Mercer, T.R., and Mattick, J.S. (2009) Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **8**, 407-423.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., *et al.* (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* **485**, 201-206.
- Dominissini, D., Nachtergaele, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Peer, E., Kol, N., Ben-Haim, M.S., Dai, Q., Di Segni, A., Salmon-Divon, M., Clark, W.C., *et al.* (2016) The dynamic N¹-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **530**, 441-446.
- Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schülling, T., and Heyl, A. (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **273**, 4631-4644.
- Du, Q., and Wang, H. (2015) The role of HD-ZIP III transcription factors and miR165/166 in vascular development and secondary cell wall formation. *Plant Signaling & Behavior* **10**, e1078955.
- Ebralidze, A.K., Guibal, F.C., Steidl, U., Zhang, P., Lee, S., Bartholdy, B., Jorda, M.A., Petkova, V., Rosenbauer, F., Huang, G., *et al.* (2008) *PU.1* expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared *cis*-regulatory element. *Genes & Development* **22**, 2085-2092.
- Echer, F.R., and Rosolem, C.A. (2015) Cotton leaf gas exchange responses to irradiance and leaf aging. *Biologia Plantarum* **59**, 366-372.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.
- Efroni, I., Han, S.K., Kim, H.J., Wu, M.F., Steiner, E., Birnbaum, K.D., Hong, J.C., Eshed, Y., and Wagner, D. (2013) Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental Cell* **24**, 438-445.
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M.H., and Bacher, A. (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology* **5**, 221-233.
- Eklof, S., Astot, C., Blackwell, J., Moritz, T., Olsson, O., and Sandberg, G. (1997) Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology* **38**, 225-235.
- El-Showk, S., Ruonala, R., and Helariutta, Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**, 1373-1383.
- Engelmann, J. (2013) Genetische und molekulare Charakterisierung des *CKX1*-Gens in *Arabidopsis thaliana*. Institut für Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin. **Masterarbeit**.
- Engström, P.G., Suzuki, H., Ninomiya, N., Akalin, A., Sessa, L., Lavorgna, G., Brozzi, A., Luzi, L., Tan, S.L., Yang, L., *et al.* (2006) Complex loci in human and mouse genomes. *PLoS Genetics* **2**, e47.
- Esteve-Bruna, D., Carrasco-López, C., Blanco-Touriñán, N., Iserte, J., Calleja-Cabrera, J., Perea-Resca, C., Úrbez, C., Carrasco, P., Yanovsky, M.J., Blázquez, M.A., *et al.* (2020) Prefoldins contribute to maintaining the levels of the spliceosome LSM2-8 complex through Hsp90 in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **48**, 6280-6293.
- Fàbregas, N., Lozano-Elena, F., Blasco-Escámez, D., Tohge, T., Martínez-Andujar, C., Albacete, A., Osorio, S., Bustamante, M., Riechmann, J.L., Nomura, T., *et al.* (2018) Overexpression of the vascular

- brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth. *Nat Commun* **9**, 4680.
- Faghihi, M.A., Modarresi, F., Khalil, A.M., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Morgan, T.E., Finch, C.E., St Laurent, G., 3rd, Kenny, P.J., and Wahlestedt, C.** (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nature Medicine* **14**, 723-730.
- Faghihi, M.A., and Wahlestedt, C.** (2009) Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 637-643.
- Faiss, M., Zalubilova, J., Strnad, M., and Schmölling, T.** (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *The Plant Journal* **12**, 401-415.
- Falk, A., and Rask, L.** (1995) Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading beta-glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol* **108**, 1369-1377.
- Feng, J., Bi, C., Clark, B.S., Mady, R., Shah, P., and Kohtz, J.D.** (2006a) The *Evf-2* noncoding RNA is transcribed from the *Dlx-5/6* ultraconserved region and functions as a *Dlx-2* transcriptional coactivator. *Genes & Development* **20**, 1470-1484.
- Feng, J., Wang, C., Chen, Q., Chen, H., Ren, B., Li, X., and Zuo, J.** (2013) S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat Commun* **4**, 1529.
- Feng, X.L., Ni, W.M., Elge, S., Mueller-Roeber, B., Xu, Z.H., and Xue, H.W.** (2006b) Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Molecular Biology* **61**, 215-226.
- Fiorini, N., Lipman, D.J., and Lu, Z.** (2017) Towards PubMed 2.0. *Elife* **6**, e28801.
- Fischer, U., Kucukoglu, M., Helariutta, Y., and Bhalerao, R.P.** (2019) The dynamics of cambial stem cell activity. *Annual review of plant biology* **70**, 293-319.
- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D.** (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492.
- Franc, V., Šebela, M., Řehulka, P., Končítíková, R., Lenobel, R., Madzak, C., and Kopečný, D.** (2012) Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics* **75**, 4027-4037.
- Frebort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frebortova, J., and Galuszka, P.** (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**, 2431-2452.
- Frébortová, J., Fraaije, M.W., Galuszka, P., Sebel, M., Pec, P., Hrbáč, J., Novák, O., Bilyeu, K.D., English, J.T., and Frébort, I.** (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- Frébortová, J., Greplová, M., Seidl, M.F., Heyl, A., and Frébort, I.** (2015) Biochemical characterization of putative adenylate dimethylallyltransferase and cytokinin dehydrogenase from *Nostoc sp.* PCC 7120. *PLoS One* **10**, e0138468.
- Frébortová, J., Novák, O., Frébort, I., and Jorda, R.** (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant Journal* **61**, 467-481.
- Fukuda, H., and Ohashi-Ito, K.** (2019) Vascular tissue development in plants. *Curr Top Dev Biol* **131**, 141-160.
- Fury, M.G., and Zieve, G.W.** (1996) *U6* snRNA maturation and stability. *Experimental Cell Research* **228**, 160-163.
- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P.I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žížková, E., et al.** (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* **62**, 2827-2840.
- Galuszka, P., Frébort, I., Sebel, M., Sauer, P., Jacobsen, S., and Pec, P.** (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Galuszka, P., Frébortova, J., Luhová, L., Bilyeu, K.D., English, J.T., and Frébort, I.** (2005) Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant and Cell Physiology* **46**, 716-728.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmölling, T., and Frébort, I.** (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255-267.
- Galuszka, P., Spíchal, L., Kopečný, D., Tarkowski, P., Frébortová, J., Šebela, M., and Frébort, I.** (2008). Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In *Bioactive Natural Products (Part N)*, Atta-ur-Rahman, ed. (New York: Elsevier), pp. 203-264.
- Gan, S., and Amasino, R.M.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Gandia-Herrero, F., Lorenz, A., Larson, T., Graham, I.A., Bowles, D.J., Rylott, E.L., and Bruce, N.C.** (2008) Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in *Arabidopsis*: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases. *The Plant Journal* **56**, 963-974.
- Ganot, P., Jady, B.E., Bortolin, M.L., Darzacq, X., and Kiss, T.** (1999) Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of *U6* spliceosomal RNA. *Molecular and cellular biology* **19**, 6906-6917.
- Gao, X., Chen, J., Dai, X., Zhang, D., and Zhao, Y.** (2016) An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-free *Arabidopsis* mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Physiol* **171**, 1794.

- Gattolin, S., Alandete-Saez, M., Elliott, K., Gonzalez-Carranza, Z., Naomab, E., Powell, C., and Roberts, J.A.** (2006) Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **57**, 4225-4233.
- Gillissen, B., Burkler, L., Andre, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B., and Frommer, W.B.** (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291-300.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., and Yoshida, S.** (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**, 1555-1573.
- Goldstein, L., and Ko, C.** (1974) Electrophoretic characterization of shuttling and nonshuttling small nuclear RNAs. *Cell* **2**, 259-269.
- Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C., and Meyerowitz, E.M.** (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16529-16534.
- Grenz, K.P.** (2016) Klonierung von Genkonstrukten zur Analyse der Funktion nicht-kodierender *CKX1* Antisense-Transkripte. Institut für Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin. **Bachelorarbeit**.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J.** (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **34**, D140-D144.
- Gross, K., Homlicher, A., Weinreich, A., and Wagner, E.** (1996) Effect of shade on stomatal conductance, net photosynthesis, photochemical efficiency and growth of oak saplings. *Annals of Forest Science* **53**, 279-290.
- Gu, R., Fu, J., Guo, S., Duan, F., Wang, Z., Mi, G., and Yuan, L.** (2010) Comparative expression and phylogenetic analysis of maize cytokinin dehydrogenase/oxidase (CKX) gene family. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**, 428-440.
- Gudenas, B.L., and Wang, L.** (2018) Prediction of LncRNA subcellular localization with deep learning from sequence features. *Scientific reports* **8**, 16385.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O.** (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**, 307-321.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., et al.** (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223-227.
- Guttman, M., Russell, P., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Lander, E.S.** (2013) Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins. *Cell* **154**, 240-251.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Hangauer, M.J., Vaughn, I.W., and McManus, M.T.** (2013) Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genetics* **9**, e1003569.
- Hansen, H., and Dörffling, K.** (2003) Root-derived trans-zeatin riboside and abscisic acid in drought-stressed and rewatered sunflower plants: interaction in the control of leaf diffusive resistance? *Functional Plant Biology* **30**, 365-375.
- Hansen, M., Chae, H.S., and Kieber, J.J.** (2009) Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid. *The Plant Journal* **57**, 606-614.
- Hartig, K., and Beck, E.** (2005) Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biol (Stuttg)* **7**, 33-40.
- Hass, C., Lohrmann, J., Albrecht, V., Sweere, U., Hummel, F., Yoo, S.D., Hwang, I., Zhu, T., Schäfer, E., Kudla, J., et al.** (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **23**, 3290-3302.
- Hawkes, E.J., Hennelly, S.P., Novikova, I.V., Irwin, J.A., Dean, C., and Sanbonmatsu, K.Y.** (2016) COOLAIR antisense RNAs form evolutionarily conserved elaborate secondary structures. *Cell Rep* **16**, 3087-3096.
- He, M., He, C.Q., and Ding, N.Z.** (2018) Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1771.
- He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Papadopoulos, N., and Kinzler, K.W.** (2008) The antisense transcriptomes of human cells. *Science* **322**, 1855-1857.
- Hejatk, J., Ryu, H., Kim, G.T., Dobesova, R., Choi, S., Choi, S.M., Soucek, P., Horak, J., Pekarova, B., Palme, K., et al.** (2009) The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. *Plant Cell* **21**, 2008-2021.
- Held, M.A., Penning, B., Brandt, A.S., Kessans, S.A., Yong, W., Scofield, S.R., and Carpita, N.C.** (2008) Small-interfering RNAs from natural antisense transcripts derived from a cellulose synthase gene modulate cell wall biosynthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20534-20539.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.E.** (2015) An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA* **6**, 225-242.
- Henriques, R., Wang, H., Liu, J., Boix, M., Huang, L.F., and Chua, N.H.** (2017) The antiphasic regulatory module comprising CDF5 and its antisense RNA FLORE links the circadian clock to photoperiodic flowering. *New Phytologist* **216**, 854-867.

- Heo, J.B., and Sung, S.** (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**, 76-79.
- Heyl, A., Riefler, M., Romanov, G.A., and Schmölling, T.** (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology* **91**, 246-256.
- Heyl, A., Werner, T., and Schmölling, T.** (2018). Cytokinin metabolism and signal transduction. In Annual Plant Reviews online, P. Hedden, and S.G. Thomas, eds. (Oxford: Blackwell Publishing Ltd), pp. 93-123.
- Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A., and Schmölling, T.** (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 62.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mahonen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., et al.** (2004) *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8821-8826.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T., and Sakakibara, H.** (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol* **138**, 196-206.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., and Sakakibara, H.** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**, 75-83.
- Holley, C.L., Li, M.W., Scruggs, B.S., Matkovich, S.J., Ory, D.S., and Schaffer, J.E.** (2015) Cytosolic accumulation of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is dynamically regulated by NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 11741-11748.
- Holst, K., Schmölling, T., and Werner, T.** (2011) Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic *Arabidopsis* plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1328-1334.
- Hönig, M., Plíhalová, L., Husičková, A., Nisler, J., and Doležal, K.** (2018) Role of cytokinins in senescence, antioxidant defence and photosynthesis. *Int J Mol Sci* **19**, 4045.
- Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., and Yamazaki, T.** (2002) Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* **14**, 2015-2029.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafey, M.K., Tingey, S.V., and Chua, N.H.** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* **115**, 4891-4900.
- Hothorn, M., Dabi, T., and Chory, J.** (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature Chemical Biology* **7**, 766-768.
- Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S., and Bowles, D.J.** (2004) N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822-47832.
- Houba-Herlin, N., Pethe, C., d'Alayer, J., and Laloue, M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal* **17**, 615-626.
- Huang, L., Kuwahara, I., and Matsumoto, K.** (2014) EWS represses cofilin 1 expression by inducing nuclear retention of cofilin 1 mRNA. *Oncogene* **33**, 2995-3003.
- Huang, S.** (2003) Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiol* **131**, 1270-1282.
- Hui, L., Zhao, M., He, J., Hu, Y., Huo, Y., Hao, H., Hao, Y., Zhu, W., Wang, Y., Xu, M., et al.** (2019) A simple and reliable method for creating PCR-detectable mutants in *Arabidopsis* with the polycistronic tRNA-gRNA CRISPR/Cas9 system. *Acta Physiologiae Plantarum* **41**, 170.
- Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., et al.** (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**, 3073-3087.
- Hwang, I., and Sheen, J.** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Hwang, I., Sheen, J., and Müller, B.** (2012) Cytokinin signaling networks. *Annual review of plant biology* **63**, 353-380.
- Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2003) *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 122-131.
- Immanen, J., Nieminen, K., Smolander, O.P., Kojima, M., Alonso Serra, J., Koskinen, P., Zhang, J., Elo, A., Mahonen, A.P., Street, N., et al.** (2016) Cytokinin and auxin display distinct but interconnected distribution and signaling profiles to stimulate cambial activity. *Current Biology* **26**, 1990-1997.
- National Center of Biotechnology Information (NCBI)**, auf www.ncbi.nlm.nih.gov/protein, Stand 14.01.2020.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., and Mizuno, T.** (2008) Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **49**, 47-57.
- Itai, C., Ben-Zioni, A., and Ordán, L.** (1973) Correlative changes in endogenous hormone levels and shoot growth induced by short heat treatments to the root. *Physiologia Plantarum* **29**, 355-360.

- Jabnونة, M., Secco, D., Lecampion, C., Robaglia, C., Shu, Q., and Poirier, Y.** (2013) A rice *cis*-natural antisense RNA acts as a translational enhancer for its cognate mRNA and contributes to phosphate homeostasis and plant fitness. *Plant Cell* **25**, 4166-4182.
- Jambor, H., Surendranath, V., Kalinka, A.T., Mejstrik, P., Saalfeld, S., and Tomancak, P.** (2015) Systematic imaging reveals features and changing localization of mRNAs in *Drosophila* development. *Elife* **4**, e05003.
- Jaspers, P., Overmyer, K., Wrzaczek, M., Vainonen, J.P., Blomster, T., Salojarvi, J., Reddy, R.A., and Kangasjarvi, J.** (2010) The RST and PARP-like domain containing SRO protein family: analysis of protein structure, function and conservation in land plants. *BMC Genomics* **11**, 170.
- Jensen, H.** (2014) Molecular characterisation of dominant repressors of the cytokinin deficiency syndrome. Institut für Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**
- Jeon, J., Kim, N.Y., Kim, S., Kang, N.Y., Novák, O., Ku, S.J., Cho, C., Lee, D.J., Lee, E.J., Strnad, M., et al.** (2010) A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 23371-23386.
- Jiang, D., Kong, N.C., Gu, X., Li, Z., and He, Y.** (2011) *Arabidopsis* COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genetics* **7**, e1001330.
- Jiao, F., Pahwa, K., Manning, M., Dochy, N., and Geuten, K.** (2019) Cold induced antisense transcription of *FLOWERING LOCUS C* in distant grasses. *Frontiers in Plant Science* **10**, 72.
- Jin, S.H., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H., Wang, Y.W., and Hou, B.K.** (2013) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through O-glucosylation. *Planta* **237**, 991-999.
- Jing, H., and Strader, L.C.** (2019) Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *Int J Mol Sci* **20**, 486.
- Johnsson, P., Lipovich, L., Grander, D., and Morris, K.V.** (2014) Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 1063-1071.
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., and Chiang, V.L.** (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology* **35**, 993-1001.
- Kakimoto, T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kamada-Nobusada, T., and Sakakibara, H.** (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444-449.
- Kamínek, M.** (2015) Tracking the story of cytokinin research. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**, 723-739.
- Kaminek, M., and Armstrong, D.J.** (1990) Genotypic variation in cytokinin oxidase from *phaseolus* callus cultures. *Plant Physiol* **93**, 1530-1538.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M.** (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* **44**, D457-D462.
- Kang, N.Y., Cho, C., Kim, N.Y., and Kim, J.** (2012) Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1382-1391.
- Kapusta, A., and Feschotte, C.** (2014) Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends Biochem Sci* **30**, 439-452.
- Karakulah, G., and Unver, T.** (2017) Barley long non-coding RNAs and their tissue-specific co-expression pattern with coding-transcripts. *bioRxiv*, 229559.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., et al.** (2005) Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* **309**, 1564-1566.
- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K.D.** (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* **20**, 1160-1166.
- Kersey, P.J., Allen, J.E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B.J., Carvalho-Silva, D., Christensen, M., Davis, P., Grabmueller, C., et al.** (2017) Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res* **46**, D802-D808.
- Khaitovich, P., Kelso, J., Franz, H., Visagie, J., Giger, T., Joerchel, S., Petzold, E., Green, R.E., Lachmann, M., and Pääbo, S.** (2006) Functionality of intergenic transcription: an evolutionary comparison. *PLoS Genetics* **2**, e171.
- Khorkova, O., Myers, A.J., Hsiao, J., and Wahlestedt, C.** (2014) Natural antisense transcripts. *Human Molecular Genetics* **23**, R54-R63.
- Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H., and Mizuno, T.** (2004) *Arabidopsis* response regulator, *ARR22*, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1063-1077.
- Kiba, T., Takei, K., Kojima, M., and Sakakibara, H.** (2013) Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **27**, 452-461.
- Kiba, T., Yamada, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2003) The type-A response regulator, *ARR15*, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 868-874.
- Kieber, J.J., and Schaller, G.E.** (2014) Cytokinins. *Arabidopsis Book* **12**, e0168.
- Kim, H.J., Chiang, Y.H., Kieber, J.J., and Schaller, G.E.** (2013) SCF(KMD) controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 10028-10033.

- Kim, K., Ryu, H., Cho, Y.H., Scacchi, E., Sabatini, S., and Hwang, I. (2012) Cytokinin-facilitated proteolysis of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 attenuates signaling output in two-component circuitry. *The Plant Journal* **69**, 934-945.
- Kindgren, P., Ard, R., Ivanov, M., and Marquardt, S. (2018) Transcriptional read-through of the long non-coding RNA SVALKKA governs plant cold acclimation. *Nat Commun* **9**, 4561.
- Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G.P. (2010) Noncoding RNA *gas5* is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling* **3**, ra8.
- Kinoshita-Tsujimura, K., and Kakimoto, T. (2011) Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 66-71.
- Kiss, T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**, 145-148.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B. (2012) GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res* **40**, D1211-D1215.
- Klemm, S.L., Shipony, Z., and Greenleaf, W.J. (2019) Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics* **20**, 207-220.
- Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K.Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W.Y., et al. (2014) *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 7150-7155.
- Köllmer, I., Novak, O., Strnad, M., Schmülling, T., and Werner, T. (2014) Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *The Plant Journal* **78**, 359-371.
- Koncz, C., and Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* **204**, 383-396.
- Kopečný, D., Končítiková, R., Popelka, H., Briozzo, P., Vigouroux, A., Kopečná, M., Zalabák, D., Šebela, M., Skopalová, J., Frébort, I., et al. (2016) Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *FEBS Journal* **283**, 361-377.
- Kordic, S., Cummins, I., and Edwards, R. (2002) Cloning and characterization of an S-formylglutathione hydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **399**, 232-238.
- Kowalska, M., Galuszka, P., Frébortová, J., Šebela, M., Béres, T., Hluska, T., Šmehilová, M., Bilyeu, K.D., and Frébort, I. (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* **71**, 1970-1978.
- Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W., and Callis, J. (2005) Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**, 1597-1611.
- Kriechbaumer, V., Wang, P., Hawes, C., and Abell, B.M. (2012) Alternative splicing of the auxin biosynthesis gene YUCCA4 determines its subcellular compartmentation. *The Plant Journal* **70**, 292-302.
- Kudo, T., Kiba, T., and Sakakibara, H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53-60.
- Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H., and Sakakibara, H. (2012) Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-Zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol* **160**, 319-331.
- Kulaeva, O.N., Burkhanova, E.A., Karavaiko, N.N., Selivankina, S.Y., Porfirova, S.A., Maslova, G.G., Zemlyachenko, Y.V., and Börner, T. (2002) Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *Journal of Plant Physiology* **159**, 1309-1316.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., and Kyoizuka, J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., and Sakakibara, H. (2009) Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D.L., Garcia-Hernandez, M., et al. (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res* **40**, D1202-D1210.
- Lange, T.S., and Gerbi, S.A. (2000) Transient nucleolar localization of *U6* small nuclear RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2419-2428.
- Lapidot, M., and Pilpel, Y. (2006) Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO reports* **7**, 1216-1222.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M.B., et al. (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**, 3889-9900.
- Larkin, J.C., Marks, M.D., Nadeau, J., and Sack, F. (1997) Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell* **9**, 1109-1120.
- Laskey, J.G., Patterson, P., Bilyeu, K., and Morris, R.O. (2003) Rate enhancement of cytokinin oxidase/dehydrogenase using 2,6-dichloroindophenol as an electron acceptor. *Plant Growth Regulation* **40**, 189-196.

- Lau, O.S., Davies, K.A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M.H., Ballenger, C.E., and Bergmann, D.C. (2014) Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science* **345**, 1605-1609.
- Lavorgna, G., Dahary, D., Lehner, B., Sorek, R., Sanderson, C.M., and Casari, G. (2004) In search of antisense. *Trends Biochem Sci* **29**, 88-94.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Vankova, R., Tanaka, M., Seki, M., Ham le, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.S. (2012) Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to cytokinin levels. *PLoS One* **7**, e42411.
- Lee, B.H., Johnston, R., Yang, Y., Gallavotti, A., Kojima, M., Travencolo, B.A., Costa Lda, F., Sakakibara, H., and Jackson, D. (2009) Studies of *aberrant phyllotaxy1* mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem. *Plant Physiol* **150**, 205-216.
- Lee, D.J., Park, J.Y., Ku, S.J., Ha, Y.M., Kim, S., Kim, M.D., Oh, M.H., and Kim, J. (2007) Genome-wide expression profiling of *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7)* overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* **277**, 115-137.
- Lefort, V., Longueville, J.E., and Gascuel, O. (2017) SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution* **34**, 2422-2424.
- Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., and International Nucleotide Sequence Database, C. (2011) The sequence read archive. *Nucleic Acids Res* **39**, D19-D21.
- Letham, D.S., and Palni, L.M.S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 163-197.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079.
- Li, J.F., Chung, H.S., Niu, Y., Bush, J., McCormack, M., and Sheen, J. (2013a) Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants. *Plant Cell* **25**, 1507-1522.
- Li, S., Yamada, M., Han, X., Ohler, U., and Benfey, P.N. (2016a) High-resolution expression map of the *Arabidopsis* root reveals alternative splicing and lincRNA regulation. *Developmental Cell* **39**, 508-522.
- Li, X., Xiong, X., Wang, K., Wang, L., Shu, X., Ma, S., and Yi, C. (2016b) Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic *N*¹-methyladenosine methylome. *Nature Chemical Biology* **12**, 311-316.
- Li, X., Zhu, P., Ma, S., Song, J., Bai, J., Sun, F., and Yi, C. (2015) Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nature Chemical Biology* **11**, 592-597.
- Li, Y., Kurepa, J., and Smalle, J. (2013b) AXR1 promotes the *Arabidopsis* cytokinin response by facilitating ARR5 proteolysis. *The Plant Journal* **74**, 13-24.
- Li, Y., Mi, X., Zhao, S., Zhu, J., Guo, R., Xia, X., Liu, L., Liu, S., and Wei, C. (2020) Comprehensive profiling of alternative splicing landscape during cold acclimation in tea plant. *BMC Genomics* **21**, 65.
- Liao, X., Guo, X., Wang, Q., Wang, Y., Zhao, D., Yao, L., Wang, S., Liu, G., and Li, T. (2017) Overexpression of MsDREB6.2 results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *The Plant Journal* **89**, 510-526.
- Lichtenthaler, H.K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47-65.
- Lindsay, D.L., Sawhney, V.K., and Bonham-Smith, P.C. (2006) Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science* **170**, 1111-1117.
- Ling, M.H., Ban, Y., Wen, H., Wang, S.M., and Ge, S.X. (2013) Conserved expression of natural antisense transcripts in mammals. *BMC Genomics* **14**, 243.
- Liu, F., Marquardt, S., Lister, C., Swiezewski, S., and Dean, C. (2010) Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis FLC* chromatin silencing. *Science* **327**, 94-97.
- Liu, J., Jung, C., Xu, J., Wang, H., Deng, S., Bernad, L., Arenas-Huertero, C., and Chua, N.H. (2012) Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4333-4345.
- Liu, J., Moore, S., Chen, C., and Lindsey, K. (2017) Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in *Arabidopsis* root development: from experiments to systems modeling, and back again. *Molecular Plant* **10**, 1480-1496.
- Liu, P., Zhang, C., Ma, J.Q., Zhang, L.Y., Yang, B., Tang, X.Y., Huang, L., Zhou, X.T., Lu, K., and Li, J.N. (2018a) Genome-wide identification and expression profiling of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) genes reveal likely roles in pod development and stress responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Genes (Basel)* **9**, 168.
- Liu, X., Li, D., Zhang, D., Yin, D., Zhao, Y., Ji, C., Zhao, X., Li, X., He, Q., Chen, R., et al. (2018b) A novel antisense long noncoding RNA, *TWISTED LEAF*, maintains leaf blade flattening by regulating its associated sense R2R3-MYB gene in rice. *New Phytologist* **218**, 774-788.
- Liu, Y., Gao, Y., Gao, Y., and Zhang, Q. (2019) Targeted deletion of floral development genes in *Arabidopsis* with CRISPR/Cas9 using the RNA endoribonuclease Csy4 processing system. *Horticulture Research* **6**, 99.
- Liu, Z., Lv, Y., Zhang, M., Liu, Y., Kong, L., Zou, M., Lu, G., Cao, J., and Yu, X. (2013) Identification, expression, and comparative genomic analysis of the *IPT* and *CKX* gene families in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* **14**, 594.
- Lohrmann, J., Buchholz, G., Keitel, C., Sweere, U., Kircher, S., Bäurle, I., Kudla, J., Schäfer, E., and Harter, K. (2007) Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **1**, 495-505.

- Lomin, S.N., Krivosheev, D.M., Steklov, M.Y., Arkhipov, D.V., Osolodkin, D.I., Schmölling, T., and Romanov, G.A. (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J Exp Bot* **66**, 1851-1863.
- Louro, R., Smirnova, A.S., and Verjovski-Almeida, S. (2009) Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* **93**, 291-298.
- Ma, J., Bai, X., Luo, W., Feng, Y., Shao, X., Bai, Q., Sun, S., Long, Q., and Wan, D. (2019) Genome-wide identification of long noncoding RNAs and their responses to salt stress in two closely related poplars. *Frontiers in Genetics* **10**, 777.
- Magistri, M., Faghihi, M.A., St Laurent, G., 3rd, and Wahlestedt, C. (2012) Regulation of chromatin structure by long noncoding RNAs: focus on natural antisense transcripts. *Trends Biochem Sci* **28**, 389-396.
- Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., and Helariutta, Y. (2006a) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y. (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* **14**, 2938-2943.
- Mähönen, A.P., Higuchi, M., Tormakangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y., and Kakimoto, T. (2006b) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current Biology* **16**, 1116-1122.
- Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- Maliakal, S.K., McDonnell, K., Dudley, S.A., and Schmitt, J. (1999) Effects of red to far-red ratio and plant density on biomass allocation and gas exchange in *Impatiens capensis*. *International Journal of Plant Sciences* **160**, 723-733.
- Malito, E., Coda, A., Bilyeu, K.D., Fraaije, M.W., and Mattevi, A. (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237-1249.
- Mameaux, S., Cockram, J., Thiel, T., Steuernagel, B., Stein, N., Taudien, S., Jack, P., Werner, P., Gray, J.C., Greenland, A.J., et al. (2012) Molecular, phylogenetic and comparative genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the *Poaceae*. *Plant Biotechnology Journal* **10**, 67-82.
- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Pařezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., et al. (2011) Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell* **21**, 796-804.
- Marhavý, P., Duclercq, J., Weller, B., Feraru, E., Bielach, A., Offringa, R., Friml, J., Schwechheimer, C., Murphy, A., and Benková, E. (2014) Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Current Biology* **24**, 1031-1037.
- Marques, A.C., and Ponting, C.P. (2009) Catalogues of mammalian long noncoding RNAs: modest conservation and incompleteness. *Genome biology* **10**, R124.
- Marquez, Y., Brown, J.W., Simpson, C., Barta, A., and Kalyna, M. (2012) Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res* **22**, 1184-1195.
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal* **17**, 3.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Schaller, G.E. (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3007-3018.
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., et al. (2008) *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1135-1149.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., and Kakimoto, T. (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20027-20031.
- Matthews, J.S.A., Vialet-Chabrand, S., and Lawson, T. (2019) Role of blue and red light in stomatal dynamic behaviour. *J Exp Bot* **71**, 2253-2269.
- Mattick, J.S. (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports* **2**, 986-991.
- Mattick, J.S., and Gagen, M.J. (2001) The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 1611-1630.
- Matzke, M.A., and Mosher, R.A. (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**, 394-408.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T. (1998) Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- McGaw, B.A., and Horgan, R. (1983) Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. *Phytochemistry* **22**, 1103-1105.
- Mercer, T.R., Gerhardt, D.J., Dinger, M.E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddloh, J.A., Mattick, J.S., and Rinn, J.L. (2011) Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nature Biotechnology* **30**, 99-104.

- Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., and Jaffrey, S.R. (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* **149**, 1635-1646.
- Miller, C.O., Skoog, F., Von Saltza, M.H., and Strong, F.M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392.
- Miyashima, S., Roszak, P., Sevillem, I., Toyokura, K., Blob, B., Heo, J.O., Mellor, N., Help-Rinta-Rahko, H., Otero, S., Smet, W., et al. (2019) Mobile PEAR transcription factors integrate positional cues to prime cambial growth. *Nature* **565**, 490-494.
- Miyata, S., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998) Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **437**, 11-14.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., and Kakimoto, T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**, 128-138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., and Kakimoto, T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16598-16603.
- Moffatt, B., Pethe, C., and Laloue, M. (1991) Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiol* **95**, 900-908.
- Moffatt, B.A., Wang, L., Allen, M.S., Stevens, Y.Y., Qin, W., Snider, J., and von Schwartzenberg, K. (2000) Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol* **124**, 1775-1785.
- Mohammadin, S., Edger, P.P., Pires, J.C., and Schranz, M.E. (2015) Positionally-conserved but sequence-diverged: identification of long non-coding RNAs in the *Brassicaceae* and *Cleomaceae*. *BMC Plant Biology* **15**, 217.
- Mok, D.W., and Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2011) The roles of RNA in the synthesis of protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a003780-a003780.
- Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G., and Cheikh, N.N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 328-333.
- Motyka, V., Faiss, M., Strand, M., Kamínek, M., and Schmölling, T. (1996) Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol* **112**, 1035-1043.
- Motyka, V., and Kamínek, M. (1994) Cytokinin oxidase from auxin- and cytokinin-dependent callus cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* **13**, 1-9.
- Motyka, V., Vaňková, R., Čapková, V., Petrášek, J., Kamínek, M., and Schmölling, T. (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum* **117**, 11-21.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Iorio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology* **20**, 1138-1143.
- Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**, 459-472.
- Müller, B., and Sheen, J. (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094-1097.
- Müller, C.J., Larsson, E., Spichal, L., and Sundberg, E. (2017) Cytokinin-auxin crosstalk in the gynoecial primordium ensures correct domain patterning. *Plant Physiol* **175**, 1144-1157.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51 Pt 1**, 263-273.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Mustafa, G.M., Larry, D., Petersen, J.R., and Elferink, C.J. (2015) Targeted proteomics for biomarker discovery and validation of hepatocellular carcinoma in hepatitis C infected patients. *World journal of hepatology* **7**, 1312-1324.
- Nam, J.W., Choi, S.W., and You, B.H. (2016) Incredible RNA: dual functions of coding and noncoding. *Molecules and cells* **39**, 367-374.
- NCBI Resource Coordinators (2016) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **44**, D7-D19.
- Nguyen, K.H., Ha, C.V., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-González, M.A., Fujita, Y., Tran, U.T., Li, W., Tanaka, M., Seki, M., et al. (2016) *Arabidopsis* type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 3090-3095.
- Niemann, M.C., Bartrina, I., Ashikov, A., Weber, H., Novák, O., Spíchal, L., Strnad, M., Strasser, R., Bakker, H., Schmölling, T., et al. (2015) *Arabidopsis* ROCK1 transports UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc and regulates ER protein quality control and cytokinin activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 291-296.

- Niemann, M.C.E., Weber, H., Hluska, T., Leonte, G., Anderson, S.M., Novák, O., Senes, A., and Werner, T. (2018) The cytokinin oxidase/dehydrogenase CKX1 is a membrane-bound protein requiring homooligomerization in the endoplasmic reticulum for its cellular activity. *Plant Physiol* **176**, 2024-2039.
- Nieminen, K., Blomster, T., Helariutta, Y., and Mähönen, A.P. (2015) Vascular Cambium Development. *Arabidopsis Book* **13**, e0177.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Ueguchi, C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Nishiyama, R., Le, D.T., Watanabe, Y., Matsui, A., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.S. (2012) Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS One* **7**, e32124.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., et al. (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell* **23**, 2169-2183.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M.A., Ha, C.V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., et al. (2013) Arabidopsis AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 4840-4845.
- Nomoto, Y., Kubozono, S., Yamashino, T., Nakamichi, N., and Mizuno, T. (2012) Circadian clock- and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1950-1964.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* **302**, 205-217.
- O'Brien, J.A., and Benková, E. (2013) Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 451.
- O'Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., et al. (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* **44**, D733-D745.
- Oeder, S., Mages, J., Flicek, P., and Lang, R. (2007) Uncovering information on expression of natural antisense transcripts in Affymetrix MOE430 datasets. *BMC Genomics* **8**, 200.
- Oh, E., Zhu, J.Y., and Wang, Z.Y. (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature Cell Biology* **14**, 802-809.
- Ohashi-Ito, K., Saegusa, M., Iwamoto, K., Oda, Y., Katayama, H., Kojima, M., Sakakibara, H., and Fukuda, H. (2014) A bHLH complex activates vascular cell division via cytokinin action in root apical meristem. *Current Biology* **24**, 2053-2058.
- Olmedo-Monfil, V., Duran-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., and Vielle-Calzada, J.P. (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* **464**, 628-632.
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., and Sakakibara, H. (2017) Systemic transport of *trans*-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. *Nature Plants* **3**, 17112.
- Osugi, A., and Sakakibara, H. (2015) Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology* **13**, 102.
- Pagnussat, G.C., Alandete-Saez, M., Bowman, J.L., and Sundaresan, V. (2009) Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science* **324**, 1684-1689.
- Palazzo, A.F., and Lee, E.S. (2018) Sequence determinants for nuclear retention and cytoplasmic export of mRNAs and lncRNAs. *Frontiers in Genetics* **9**, 440.
- Palni, L.M., Burch, L., and Horgan, R. (1988) The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta* **174**, 231-234.
- Pang, K.C., Frith, M.C., and Mattick, J.S. (2006) Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Biochem Sci* **22**, 1-5.
- Panoli, A., Martin, M.V., Alandete-Saez, M., Simon, M., Neff, C., Swarup, R., Bellido, A., Yuan, L., Pagnussat, G.C., and Sundaresan, V. (2015) Auxin import and local auxin biosynthesis are required for mitotic divisions, cell expansion and cell specification during female gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **10**, e0126164.
- Park, E., Pan, Z., Zhang, Z., Lin, L., and Xing, Y. (2018) The expanding landscape of alternative splicing variation in human populations. *American Journal of Human Genetics* **102**, 11-26.
- Pavlu, J., Novaá, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., and Černý, M. (2018) Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *Int J Mol Sci* **19**, 2450.
- Perez-Perri, J.I., Rogell, B., Schwarzl, T., Stein, F., Zhou, Y., Rettel, M., Brosig, A., and Hentze, M.W. (2018) Discovery of RNA-binding proteins and characterization of their dynamic responses by enhanced RNA interactome capture. *Nat Commun* **9**, 4408.
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., Reichman, P., Hoyerová, K., Dubová, J., Friml, J., et al. (2009) Cytokinin modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3609-3614.

- Pertry, I., Václavíková, K., Gemrotová, M., Spíchal, L., Galuszka, P., Depuydt, S., Temmerman, W., Stes, E., De Keyser, A., Riefler, M., *et al.* (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1164-1174.
- Pessa, H.K., Will, C.L., Meng, X., Schneider, C., Watkins, N.J., Perälä, N., Nymark, M., Turunen, J.J., Luhmann, R., and Frilander, M.J. (2008) Minor spliceosome components are predominantly localized in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8655-8660.
- Peters, N.T., Rohrbach, J.A., Zalewski, B.A., Byrket, C.M., and Vaughn, J.C. (2003) RNA editing and regulation of *Drosophila* 4f-rnp expression by *sas-10* antisense readthrough mRNA transcripts. *RNA* **9**, 698-710.
- Pfeiffer, A., Wenzl, C., and Lohmann, J.U. (2017) Beyond flexibility: controlling stem cells in an ever changing environment. *Current Opinion in Plant Biology* **35**, 117-123.
- Pierre-Jerome, E., Drapek, C., and Benfey, P.N. (2018) Regulation of division and differentiation of plant stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **34**, 289-310.
- Pillitteri, L.J., Peterson, K.M., Horst, R.J., and Torii, K.U. (2011) Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and commonalities among stem cell populations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 3260-3275.
- Pineda Rodo, A., Brugière, N., Vankova, R., Malbeck, J., Olson, J.M., Haines, S.C., Martin, R.C., Habben, J.E., Mok, D.W., and Mok, M.C. (2008) Over-expression of a zeatin O-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation. *J Exp Bot* **59**, 2673-2686.
- Ponjavic, J., Ponting, C.P., and Lunter, G. (2007) Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Res* **17**, 556-565.
- Pontvianne, F., Carpentier, M.-C., Durut, N., Pavlišťová, V., Jaške, K., Schořová, Š., Parrinello, H., Rohmer, M., Pikaard, C.S., Fojtová, M., *et al.* (2016) Identification of nucleolus-associated chromatin domains reveals a role for the nucleolus in 3D organization of the *A. thaliana* genome. *Cell Rep* **16**, 1574-1587.
- Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G.L., Vaistij, F.E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S., *et al.* (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15253-15258.
- Potter, K.C., Wang, J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2018) Cytokinin modulates context-dependent chromatin accessibility through the type-B response regulators. *Nature Plants* **4**, 1102-1111.
- Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S.M., Bennett, C.F., Zhang, M.Q., and Spector, D.L. (2005) Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**, 249-263.
- Prerostova, S., Dobrev, P.I., Gaudinova, A., Knirsch, V., Körber, N., Pieruschka, R., Fiorani, F., Brzobohatý, B., Černý, M., Spíchal, L., *et al.* (2018) Cytokinins: their impact on molecular and growth responses to drought stress and recovery in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **9**, 655.
- Ragni, L., and Greb, T. (2018) Secondary growth as a determinant of plant shape and form. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **79**, 58-67.
- Rahayu, Y.S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Romheld, V., von Wiren, N., and Bangerth, F. (2005) Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃-induced stimulation of leaf growth. *J Exp Bot* **56**, 1143-1152.
- Rai, M.I., Alam, M., Lightfoot, D.A., Gurha, P., and Afzal, A.J. (2019) Classification and experimental identification of plant long non-coding RNAs. *Genomics* **111**, 997-1005.
- Raines, T., Shanks, C., Cheng, C.Y., McPherson, D., Argueso, C.T., Kim, H.J., Franco-Zorrilla, J.M., Lopez-Vidriero, I., Solano, R., Vanková, R., *et al.* (2016) The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **85**, 134-147.
- Ramireddy, E., Brenner, W.G., Pfeifer, A., Heyl, A., and Schmölling, T. (2013) In planta analysis of a cis-regulatory cytokinin response motif in *Arabidopsis* and identification of a novel enhancer sequence. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1079-1092.
- Ramireddy, E., Chang, L., and Schmölling, T. (2014) Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e27771.
- Ramireddy, E., Hosseini, S.A., Eggert, K., Gillandt, S., Gnad, H., von Wirén, N., and Schmölling, T. (2018) Root engineering in barley: increasing cytokinin degradation produces a larger root system, mineral enrichment in the shoot and improved drought tolerance. *Plant Physiol* **177**, 1078-1095.
- Rangwala, S.H., and Richards, E.J. (2010) The structure, organization and radiation of *Sadhu* non-long terminal repeat retroelements in *Arabidopsis* species. *Mobile DNA* **1**, 10.
- Ransohoff, J.D., Wei, Y., and Khavari, P.A. (2018) The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 143-157.
- Rashotte, A.M., Carson, S.D., To, J.P., and Kieber, J.J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1998-2011.
- Rashotte, A.M., Chae, H.S., Maxwell, B.B., and Kieber, J.J. (2005) The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia Plantarum* **123**, 184-194.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11081-11085.
- Ratcliffe, O.J., Kumimoto, R.W., Wong, B.J., and Riechmann, J.L. (2003) Analysis of the *Arabidopsis* MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell* **15**, 1159-1169.

- Rawat, V., Abdelsamad, A., Pietzenuk, B., Seymour, D.K., Koenig, D., Weigel, D., Pecinka, A., and Schneeberger, K.** (2015) Improving the annotation of *Arabidopsis lyrata* using RNA-Seq Data. *PLoS One* **10**, e0137391.
- Reddy, R., and Busch, H.** (1983). Small nuclear RNAs and RNA processing. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, W.E. Cohn, and K. Moldave, eds. (New York: Academic Press), pp. 127-162.
- Rhoads, A., and Au, K.F.** (2015) PacBio Sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13**, 278-289.
- Riefler, M., Novák, O., Strnad, M., and Schmülling, T.** (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40-54.
- Rigo, R., Bazin, J.R.M., Crespi, M., and Charon, C.L.** (2019) Alternative splicing in the regulation of plant-microbe interactions. *Plant and Cell Physiology* **60**, 1906-1916.
- Robert, H.S., Crhak Khaitova, L., Mroue, S., and Benková, E.** (2015) The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **66**, 5029-5042.
- Rohmer, M.** (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565-574.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmülling, T.** (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* **57**, 4051-4058.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmülling, T.** (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytologist* **218**, 41-53.
- Rosikiewicz, W., and Makalowska, I.** (2016) Biological functions of natural antisense transcripts. *Acta Biochimica Polonica* **63**, 665-673.
- Růžička, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M.C., and Benková, E.** (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4284-4289.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R.** (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 437-447.
- Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A.** (2008) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal* **24**, 703-711.
- Sakakibara, H.** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual review of plant biology* **57**, 431-449.
- Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M., and Sugiyama, T.** (1998) A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *The Plant Journal* **14**, 337-344.
- Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J.R., Kliebenstein, D.J., and Estelle, M.** (2019) Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in *Arabidopsis* by regulating glucosinolate levels. *Nat Commun* **10**, 4021.
- Salinas-Grenet, H., Herrera-Vásquez, A., Parra, S., Cortez, A., Gutiérrez, L., Pollmann, S., León, G., and Blanco-Herrera, F.** (2018) Modulation of auxin levels in pollen grains affects stamen development and anther dehiscence in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci* **19**, 2480.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I., and Estelle, M.** (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* **5**, 301-307.
- Sasaki, T., Suzuki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kawaguchi, M.** (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* **5**, 4983.
- Scadden, A.D., and Smith, C.W.** (2001) Specific cleavage of hyper-edited dsRNAs. *EMBO Journal* **20**, 4243-4252.
- Schachtman, D.P., and Goodger, J.Q.** (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *trends in plant science* **13**, 281-287.
- Schaller, G.E., Kieber, J.J., and Shiu, S.H.** (2008) Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arabidopsis Book* **6**, e0112.
- Scharein, B., Voet-van-Vormizeele, J., Harter, K., and Groth, G.** (2008) Ethylene signaling: identification of a putative ETR1-AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Analytical Biochemistry* **377**, 72-76.
- Schein, A., Zucchelli, S., Kauppinen, S., Gustincich, S., and Carninci, P.** (2016) Identification of antisense long noncoding RNAs that function as SINEUPs in human cells. *Scientific reports* **6**, 33605.
- Schlereth, A., Möller, B., Liu, W., Kientz, M., Flipse, J., Rademacher, E.H., Schmid, M., Jürgens, G., and Weijers, D.** (2010) MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature* **464**, 913-916.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., and Bartrina y Manns, I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241-252.
- Scholl, R.L., May, S.T., and Ware, D.H.** (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**, 1477-1480.
- Schoor, S., Farrow, S., Blaschke, H., Lee, S., Perry, G., von Schwartzberg, K., Emery, N., and Moffatt, B.** (2011) Adenosine kinase contributes to cytokinin interconversion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **157**, 659-672.

- Schulz-Knappe, P., Schrader, M., and Zucht, H.D. (2005) The peptidomics concept. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **8**, 697-704.
- Séguéla, M., Briat, J.-F., Vert, G., and Curie, C. (2008) Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *The Plant Journal* **55**, 289-300.
- Sehra, B., and Franks, R.G. (2015) Auxin and cytokinin act during gynoecial patterning and the development of ovules from the meristematic medial domain. *Wiley Interdisciplinary Reviews - Developmental Biology* **4**, 555-571.
- Setsuie, R., and Wada, K. (2007) The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International* **51**, 105-111.
- Shang, X., Cao, Y., and Ma, L. (2017) Alternative splicing in plant genes: a means of regulating the environmental fitness of plants. *Int J Mol Sci* **18**, 432.
- Shearwin, K.E., Callen, B.P., and Egan, J.B. (2005) Transcriptional interference - a crash course. *Trends in Genetics* **21**, 339-345.
- Shen, L., Liang, Z., Wong, C.E., and Yu, H. (2019) Messenger RNA modifications in plants. *trends in plant science* **24**, 328-341.
- Shi, B., and Vernoux, T. (2019) Patterning at the shoot apical meristem and phyllotaxis. *Curr Top Dev Biol* **131**, 81-107.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., and Yang, S. (2012) Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2578-2595.
- Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Sarkar Das, S., Verma, S., Mishra, V., Mukherjee, S., and Sarkar, A.K. (2018) Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* **248**, 545-558.
- Skalák, J., Vercruyssen, L., Claeys, H., Hradilová, J., Černý, M., Novák, O., Plačková, L., Saiz-Fernández, I., Skaláková, P., Coppens, F., et al. (2019) Multifaceted activity of cytokinin in leaf development shapes its size and structure in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **97**, 805-824.
- Skinner, M.E., and Holmes, I.H. (2010) Setting up the JBrowse genome browser. *Current protocols in bioinformatics* Chapter 9, Unit-9.13.
- Skoog, F., and Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118-130.
- Skoog, F., Strong, F.M., and Miller, C.O. (1965) Cytokinins. *Science* **148**, 532-533.
- Šmehilová, M., Dobrušková, J., Novák, O., Takáč, T., and Galuszka, P. (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1264.
- Smith, H. (1982) Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 481-518.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Somarowthu, S., Legiewicz, M., Chillon, I., Marcia, M., Liu, F., and Pyle, A.M. (2015) HOTAIR forms an intricate and modular secondary structure. *Mol Cell* **58**, 353-361.
- Song, J., Jiang, L., and Jameson, P.E. (2012) Co-ordinate regulation of cytokinin gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat. *BMC Plant Biology* **12**, 78.
- Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M., and Schmölling, T. (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299-1305.
- Squires, J.E., Patel, H.R., Nousch, M., Sibbritt, T., Humphreys, D.T., Parker, B.J., Suter, C.M., and Preiss, T. (2012) Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res* **40**, 5023-5033.
- Stein, L.D., Mungall, C., Shu, S., Caudy, M., Mangone, M., Day, A., Nickerson, E., Stajich, J.E., Harris, T.W., Arva, A., et al. (2002) The generic genome browser: a building block for a model organism system database. *Genome Res* **12**, 1599-1610.
- Steiner, E., Efroni, I., Gopalraj, M., Saathoff, K., Tseng, T.S., Kieffer, M., Eshed, Y., Olszewski, N., and Weiss, D. (2012) The *Arabidopsis* O-linked N-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers. *Plant Cell* **24**, 96-108.
- Steklov, M.Y., Lomin, S.N., Osolodkin, D.I., and Romanov, G.A. (2013) Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Reports* **32**, 781-793.
- Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A., and Schmölling, T. (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal* **67**, 157-168.
- Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Struhl, K. (2007) Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 103-105.
- Subbiah, V., and Reddy, K.J. (2010) Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *Journal of Biosciences* **35**, 451-458.
- Subramanian, B., Gao, S., Lercher, M.J., Hu, S., and Chen, W.-H. (2019) Evolvview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res* **47**, W270-W275.

- Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H., and Zuo, J. (2005) *Arabidopsis* *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in *planta*. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 588-603.
- Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1998) Histidine-containing phosphotransfer (Hpt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **39**, 1258-1268.
- Suzuki, T., Ishikawa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002) An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (Hpt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of *AHP2* in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant and Cell Physiology* **43**, 123-129.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001a) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107-113.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (2001b) Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 37-45.
- Szabo, L., and Salzman, J. (2016) Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nature Reviews Genetics* **17**, 679-692.
- Szakonyi, D., and Duque, P. (2018) Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1174.
- Takei, K., Sakakibara, H., and Sugiyama, T. (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., and Sugiyama, T. (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**, 85-93.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2004a) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1053-1062.
- Takei, K., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2004b) *Arabidopsis* *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., and Hasezawa, S. (2006) Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**, 2259-2266.
- Tanaka, Y., Suzuki, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004) Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **68**, 462-465.
- Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Sugiyama, T. (1998) Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Letters* **429**, 259-262.
- Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T., and Oka, A. (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant and Cell Physiology* **48**, 263-277.
- Tao, G.-Q., Letham, D.S., Yong, J.W.H., Zhang, K., John, P.C.L., Schwartz, O., Wong, S.C., and Farquhar, G.D. (2010) Promotion of shoot development and tuberisation in potato by expression of a chimaeric cytokinin synthesis gene at normal and elevated CO₂ levels. *Functional Plant Biology* **37**, 43-54.
- Tenen, D.G. (2003) Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Reviews Cancer* **3**, 89-101.
- Tian, Q., Uhlir, N.J., and Reed, J.W. (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **14**, 301-319.
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G., and Jones, J.D. (1999) Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**, 1841-1852.
- To, J.P., Deruere, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901-3914.
- To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruere, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Kieber, J.J. (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**, 658-671.
- To, J.P., and Kieber, J.J. (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *trends in plant science* **13**, 85-92.
- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T., and Sakakibara, H. (2012) *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal* **69**, 355-365.
- Torarinsson, E., Sawera, M., Havgaard, J.H., Fredholm, M., and Gorodkin, J. (2006) Thousands of corresponding human and mouse genomic regions unalignable in primary sequence contain common RNA structure. *Genome Res* **16**, 885-889.
- Tran, L.S., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20623-20628.

- Tycowski, K.T., You, Z.-H., Graham, P.J., and Steitz, J.A. (1998) Modification of *U6* spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol Cell* **2**, 629-638.
- Uhde-Stone, C., Zinn, K.E., Ramirez-Yáñez, M., Li, A., Vance, C.P., and Allan, D.L. (2003) Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiol* **131**, 1064-1079.
- Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *FEBS Letters* **478**, 227-232.
- van Heesch, S., van Iterson, M., Jacobi, J., Boymans, S., Essers, P.B., de Bruijn, E., Hao, W., MacInnes, A.W., Cuppen, E., and Simonis, M. (2014) Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome biology* **15**, R6.
- van Staden, J., and Drewes, F.E. (1992) The stability and metabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus. *Journal of Plant Physiology* **140**, 92-95.
- Vandivier, L.E., Anderson, S.J., Foley, S.W., and Gregory, B.D. (2016) The conservation and function of RNA secondary structure in plants. *Annual review of plant biology* **67**, 463-488.
- Vaňková, R., Gaudinová, A., Kamínek, M., and Eder, J. (1992). The effect of interaction of synthetic cytokinin and auxin on production of natural cytokinins by immobilized tobacco cells (The Hague: SPB Academic Publishing).
- Vanstraelen, M., and Benková, E. (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**, 463-487.
- Vatén, A., Soyars, C.L., Tarr, P.T., Nimchuk, Z.L., and Bergmann, D.C. (2018) Modulation of asymmetric division diversity through cytokinin and SPEECHLESS regulatory interactions in the *Arabidopsis* stomatal lineage. *Developmental Cell* **47**, 53-66
- Veerabagu, M., Elgass, K., Kirchler, T., Huppenberger, P., Harter, K., Chaban, C., and Mira-Rodado, V. (2012) The *Arabidopsis* B-type response regulator 18 homomerizes and positively regulates cytokinin responses. *The Plant Journal* **72**, 721-731.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M., and Schell, J. (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology* **26**, 33-48.
- Villegas, V.E., and Zaphiropoulos, P.G. (2015) Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *Int J Mol Sci* **16**, 3251-3266.
- Vojta, P., Kokas, F., Husickova, A., Gruz, J., Bergougnoux, V., Marchetti, C.F., Jiskrova, E., Jezilova, E., Mik, V., Ikeda, Y., et al. (2016) Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress. *New Biotechnology* **33**, 676-691.
- Vyroubalová, S., Václavíková, K., Turečková, V., Novák, O., Šmehilová, M., Hluska, T., Ohnoutková, L., Frébort, I., and Galuszka, P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol* **151**, 433-447.
- Waidmann, S., Ruiz Rosquete, M., Schöller, M., Sarkel, E., Lindner, H., LaRue, T., Petřík, I., Dünser, K., Martopawiro, S., Sasiharan, R., et al. (2019) Cytokinin functions as an asymmetric and anti-gravitropic signal in lateral roots. *Nat Commun* **10**, 3540.
- Wang, A., Hu, J., Gao, C., Chen, G., Wang, B., Lin, C., Song, L., Ding, Y., and Zhou, G. (2019a) Genome-wide analysis of long non-coding RNAs unveils the regulatory roles in the heat tolerance of Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. chinensis*). *Scientific reports* **9**, 5002.
- Wang, B., Kumar, V., Olson, A., and Ware, D. (2019b) Reviving the transcriptome studies: an insight into the emergence of single-molecule transcriptome sequencing. *Frontiers in Genetics* **10**, 384.
- Wang, H., Chua, N.H., and Wang, X.J. (2006) Prediction of trans-antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome biology* **7**, R92.
- Wang, H., Chung, P.J., Liu, J., Jang, I.C., Kean, M.J., Xu, J., and Chua, N.H. (2014a) Genome-wide identification of long noncoding natural antisense transcripts and their responses to light in *Arabidopsis*. *Genome Res* **24**, 444-453.
- Wang, H., Niu, Q.W., Wu, H.W., Liu, J., Ye, J., Yu, N., and Chua, N.H. (2015) Analysis of non-coding transcriptome in rice and maize uncovers roles of conserved lncRNAs associated with agriculture traits. *The Plant Journal* **84**, 404-416.
- Wang, H.V., and Chekanova, J.A. (2017) Long noncoding RNAs in plants. *Adv Exp Med Biol* **1008**, 133-154.
- Wang, J., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Hou, B.K. (2011a) *N*-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 2200-2213.
- Wang, J., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Hou, B.K. (2013) Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin *N*-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **65**, 9-16.
- Wang, X., Ding, J., Lin, S., Liu, D., Gu, T., Wu, H., Trigiano, R.N., McAvoy, R., Huang, J., and Li, Y. (2020) Evolution and function of cytokinin genes in angiosperms 2: do ancient CKXs play housekeeping roles while non-ancient CKXs play regulatory roles? *Horticulture Research* **7**, 29.
- Wang, Y., Fan, X., Lin, F., He, G., Terzaghi, W., Zhu, D., and Deng, X.W. (2014b) *Arabidopsis* noncoding RNA mediates control of photomorphogenesis by red light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 10359-10364.

- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y.Q., and Wu, Y. (2011b) Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by downregulating ABI5 expression. *The Plant Journal* **68**, 249-261.
- Wang, Y., Luo, X., Sun, F., Hu, J., Zha, X., Su, W., and Yang, J. (2018) Overexpressing lncRNA LAIR increases grain yield and regulates neighbouring gene cluster expression in rice. *Nat Commun* **9**, 3516.
- Wanowska, E., Kubiak, M.R., Rosikiewicz, W., Makalowska, I., and Szcześniak, M.W. (2018) Natural antisense transcripts in diseases: from modes of action to targeted therapies. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA* **9**, e1461.
- Washietl, S., Hofacker, I.L., Lukasser, M., Huttenhofer, A., and Stadler, P.F. (2005) Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nature Biotechnology* **23**, 1383-1390.
- Wen, X., Gao, L., Guo, X., Li, X., Huang, X., Wang, Y., Xu, H., He, R., Jia, C., and Liang, F. (2018) lncSLdb: a resource for long non-coding RNA subcellular localization. *Database (Oxford)* **2018**, 1-6.
- Werner, S. (2016) Einfluss von Cytokinin auf die Organgröße und auf Entwicklungsübergänge in *Arabidopsis thaliana*. Institut für Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit**.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., and Schmölling, T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 371-381.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmölling, T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmölling, T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10487-10492.
- Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., and Schmölling, T. (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* **22**, 3905-3920.
- Werner, T., and Schmölling, T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527-538.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., et al. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**, 581-590.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135**, 635-648.
- Wight, M., and Werner, A. (2013) The functions of natural antisense transcripts. *Essays in Biochemistry* **54**, 91-101.
- Wilk, R., Hu, J., Blotsky, D., and Krause, H.M. (2016) Diverse and pervasive subcellular distributions for both coding and long noncoding RNAs. *Genes & Development* **30**, 594-609.
- Will, C.L., and Luhrmann, R. (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a003707-a003707.
- Williams, T., Ngo, L.H., and Wickramasinghe, V.O. (2018) Nuclear export of RNA: different sizes, shapes and functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **75**, 70-77.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- Wood, E.J., Chin-Inmanu, K., Jia, H., and Lipovich, L. (2013) Sense-antisense gene pairs: sequence, transcription, and structure are not conserved between human and mouse. *Frontiers in Genetics* **4**, 183.
- Wormit, A., Traub, M., Florchinger, M., Neuhaus, H.E., and Mohlmann, T. (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal* **383**, 19-26.
- Wu, C.H., Yeh, L.-S.L., Huang, H., Arminski, L., Castro-Alvear, J., Chen, Y., Hu, Z., Kourtesis, P., Ledley, R.S., Suzek, B.E., et al. (2003) The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Res* **31**, 345-347.
- Wu, J., Okada, T., Fukushima, T., Tsudzuki, T., Sugiyama, M., and Yukawa, Y. (2012) A novel hypoxic stress-responsive long non-coding RNA transcribed by RNA polymerase III in *Arabidopsis*. *RNA Biol* **9**, 302-313.
- Wu, R., Lucke, M., Jang, Y.T., Zhu, W., Symeonidi, E., Wang, C., Fitz, J., Xi, W., Schwab, R., and Weigel, D. (2018) An efficient CRISPR vector toolbox for engineering large deletions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **14**, 65.
- Wulfetange, K., Lomin, S.N., Romanov, G.A., Stolz, A., Heyl, A., and Schmölling, T. (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* **156**, 1808-1818.
- Wunderlich, M., Gross-Hardt, R., and Schoffl, F. (2014) Heat shock factor HSFB2a involved in gametophyte development of *Arabidopsis thaliana* and its expression is controlled by a heat-inducible long non-coding antisense RNA. *Plant Molecular Biology* **85**, 541-550.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K., and Oliver, D.J. (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Molecular Biology* **40**, 711-717.
- Xie, M., Chen, H., Huang, L., O'Neil, R.C., Shokhirev, M.N., and Ecker, J.R. (2018) A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat Commun* **9**, 1604.

- Xu, J., Wang, Q., Freeling, M., Zhang, X., Xu, Y., Mao, Y., Tang, X., Wu, F., Lan, H., Cao, M., *et al.* (2017) Natural antisense transcripts are significantly involved in regulation of drought stress in maize. *Nucleic Acids Res* **45**, 5126-5141.
- Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G.V. (2009) Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4941-4946.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017-1023.
- Yamaki, S., Nagato, Y., Kurata, N., and Nonomura, K. (2011) Ovule is a lateral organ finally differentiated from the terminating floral meristem in rice. *Dev Biol* **351**, 208-216.
- Yao, X., Tian, L., Yang, J., Zhao, Y.N., Zhu, Y.X., Dai, X., Zhao, Y., and Yang, Z.N. (2018) Auxin production in diploid microsporocytes is necessary and sufficient for early stages of pollen development. *PLoS Genetics* **14**, e1007397.
- Yazhini, A. (2018) Small open reading frames. *Resonance* **23**, 57-67.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* **13**, 134.
- Yin, G., Ji, C., Wu, T., Shen, Z., Xu, X., Xie, Y., and Mao, Y. (2006) Cloning, characterization and subcellular localization of a gene encoding a human Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) homologous to the *Arabidopsis thaliana* UBC-16 gene product. *Frontiers in Bioscience* **11**, 1500-1507.
- Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2007) Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **48**, 84-96.
- Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiol* **134**, 1654-1661.
- Yoshihama, M., Nakao, A., and Kenmochi, N. (2013) snOPY: a small nucleolar RNA orthological gene database. *BMC Research Notes* **6**, 426.
- Yu, D., Ma, X., Zuo, Z., Wang, H., and Meng, Y. (2018) Classification of transcription boundary-associated RNAs (TBARs) in animals and plants. *Frontiers in Genetics* **9**, 168.
- Yu, S., and Pilot, G. (2014) Testing the efficiency of plant artificial microRNAs by transient expression in *Nicotiana benthamiana* reveals additional action at the translational level. *Frontiers in Plant Science* **5**, 622-622.
- Yuan, J.H., Liu, X.N., Wang, T.T., Pan, W., Tao, Q.F., Zhou, W.P., Wang, F., and Sun, S.H. (2017) The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of *lncRNA-PXN-AS1*. *Nature Cell Biology* **19**, 820-832.
- Zalewski, W., Galuszka, P., Gasparis, S., Orczyk, W., and Nadolska-Orczyk, A. (2010) Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *J Exp Bot* **61**, 1839-1851.
- Zalewski, W., Gasparis, S., Boczkowska, M., Rajchel, I.K., Kała, M., Orczyk, W., and Nadolska-Orczyk, A. (2014) Expression patterns of *HvCKX* genes indicate their role in growth and reproductive development of barley. *PLoS One* **9**, e115729.
- Zdunek, E., and Lips, S.H. (2001) Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *J Exp Bot* **52**, 1269-1276.
- Zeevaart, J.A.D. (2003). Regulators of growth: abscisic acid. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, B. Thomas, ed. (Oxford: Elsevier), pp. 995-999.
- Zhang, K., Novák, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., and Liu, C.J. (2014a) *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat Commun* **5**, 3274.
- Zhang, R., Calixto, C.P.G., Marquez, Y., Venhuizen, P., Tzioutziou, N.A., Guo, W., Spensley, M., Entizne, J.C., Lewandowska, D., Ten Have, S., *et al.* (2017) A high quality *Arabidopsis* transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **45**, 5061-5073.
- Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D.S., McKinney, S.A., and Higgins, T.J.V. (1995) The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. *Planta* **196**, 84-94.
- Zhang, X., Chen, Y., Lin, X., Hong, X., Zhu, Y., Li, W., He, W., An, F., and Guo, H. (2013) Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **6**, 1661-1672.
- Zhang, Y., Liu, X.S., Liu, Q.R., and Wei, L. (2006) Genome-wide *in silico* identification and analysis of *cis* natural antisense transcripts (*cis*-NATs) in ten species. *Nucleic Acids Res* **34**, 3465-3475.
- Zhang, Y.C., Liao, J.Y., Li, Z.Y., Yu, Y., Zhang, J.P., Li, Q.F., Qu, L.H., Shu, W.S., and Chen, Y.Q. (2014b) Genome-wide screening and functional analysis identify a large number of long noncoding RNAs involved in the sexual reproduction of rice. *Genome biology* **15**, 512.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**, 203-214.
- Zhao, X., Li, J., Lian, B., Gu, H., Li, Y., and Qi, Y. (2018) Global identification of *Arabidopsis* lncRNAs reveals the regulation of MAF4 by a natural antisense RNA. *Nat Commun* **9**, 5056.
- Zhao, Y. (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology* **61**, 49-64.

- Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J., and Lohmann, J.U. (2010) Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**, 1089-1092.
- Zhou, Y., Li, W., You, W., Di, Z., Wang, M., Zhou, H., Yuan, S., Wong, N.K., and Xiao, Y. (2018) Discovery of *Arabidopsis* UGT73C1 as a steviol-catalyzing UDP-glycosyltransferase with chemical probes. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **54**, 7179-7182.
- Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology* **53**, 247-273.
- Zhu, Q.H., Stephen, S., Taylor, J., Helliwell, C.A., and Wang, M.B. (2014) Long noncoding RNAs responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **201**, 574-584.
- Zinad, H.S., Natasya, I., and Werner, A. (2017) Natural antisense transcripts at the interface between host genome and mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology* **8**, 2292.
- Zoulias, N., Harrison, E.L., Casson, S.A., and Gray, J.E. (2018) Molecular control of stomatal development. *Biochemical Journal* **475**, 441-454.
- Zubo, Y.O., Blakley, I.C., Yamburenko, M.V., Worthen, J.M., Street, I.H., Franco-Zorrilla, J.M., Zhang, W., Hill, K., Raines, T., Solano, R., et al. (2017) Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E5995-E6004.
- Zucchelli, S., Fasolo, F., Russo, R., Cimatti, L., Patrucco, L., Takahashi, H., Jones, M.H., Santoro, C., Sblattero, D., Cotella, D., et al. (2015) SINEUPs are modular antisense long non-coding RNAs that increase synthesis of target proteins in cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 174.
- Zuckerman, B., and Ulitsky, I. (2019) Predictive models of subcellular localization of long RNAs. *RNA* **25**, 557-572.
- Zúñiga-Mayo, V.M., Gómez-Felipe, A., Herrera-Ubaldo, H., and de Folter, S. (2019) Gynoecium development: networks in *Arabidopsis* and beyond. *J Exp Bot* **70**, 1447-1460.
- Zúñiga-Mayo, V.M., Reyes-Olalde, J.I., Marsch-Martinez, N., and de Folter, S. (2014) Cytokinin treatments affect the apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium and resemble the effects of polar auxin transport inhibition. *Frontiers in Plant Science* **5**, 191.
- Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., and Müller, B. (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* **353**, 1027-1030.
- Zürcher, E., and Müller, B., eds. (2016). Cytokinin synthesis, signaling, and function - advances and new insights (Academic Press).
- Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P.T., and Müller, B. (2013) A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network *in planta*. *Plant Physiol* **161**, 1066-1075.
- Zwack, P.J., and Rashotte, A.M. (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J Exp Bot* **66**, 4863-4871.
- Zwack, P.J., Robinson, B.R., Risley, M.G., and Rashotte, A.M. (2013) Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology* **54**, 971-981.

Anhang

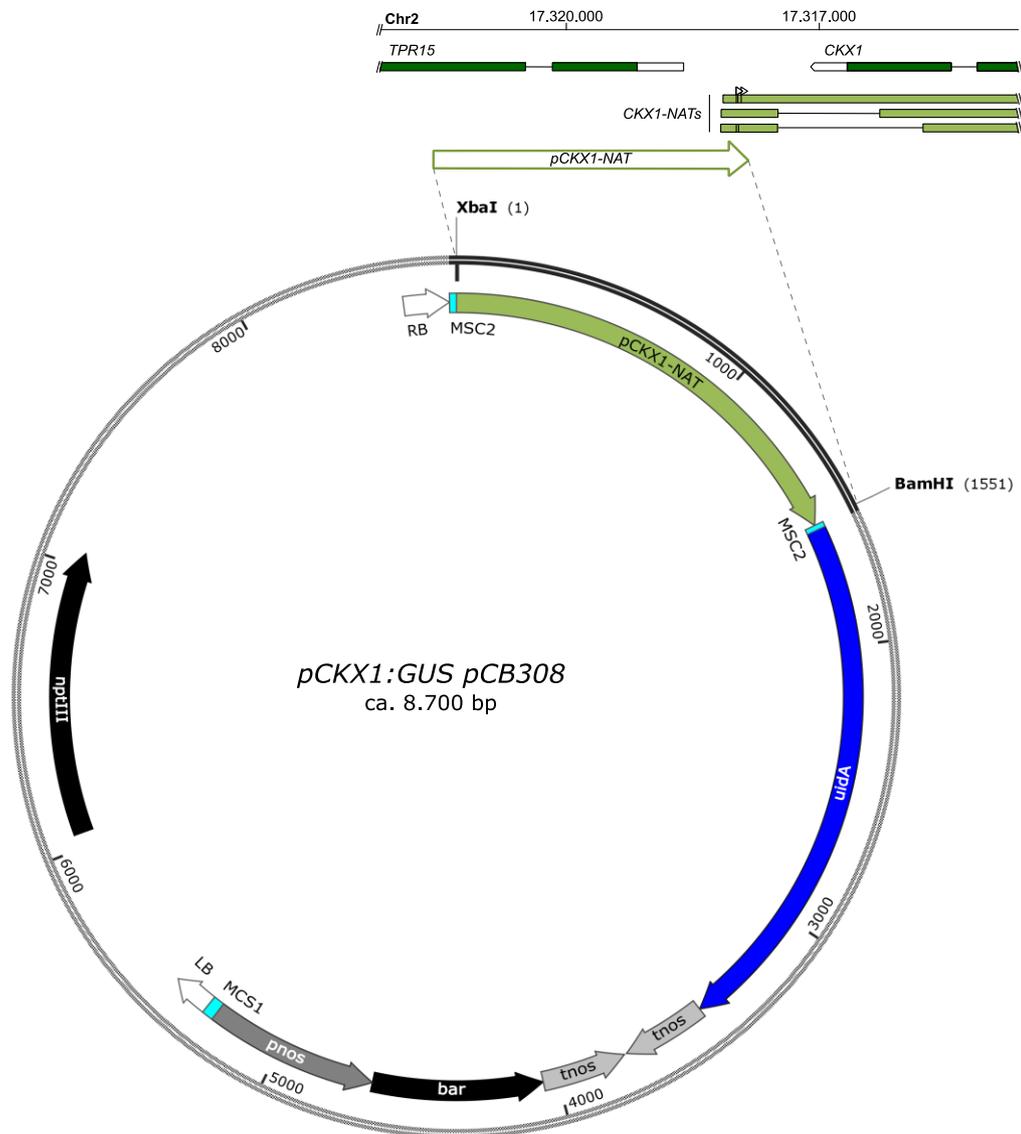


Abbildung 28: Vektorkarte von *pCKX1-NAT pCB308*.

Grafische Darstellung des Reportergenkonstruktes zur Analyse der *CKX1-NAT*-Promotoraktivität. Oben: Schematische Darstellung des genomischen Bereiches des *CKX1-NAT*-Promotors und der darin befindlichen Transkripte *CKX1*, *TPR15* sowie der innerhalb der 5'-RACE-Analyse identifizierten *CKX1-NAT*-Isoformen. Unten: Grafische Darstellung des klonierten Vektors. *bar* = Phosphinothricin *N*-Acetyltransferase, Neomycin-Phosphotransferase II = Kanamycin-Resistenz, *pnos* = Nopaline-Synthase-Promotorsequenz, *tnos* = Nopaline-Synthase-Terminatorsequenz, LB = left border, RB = right border, MCS = multiple cloning site

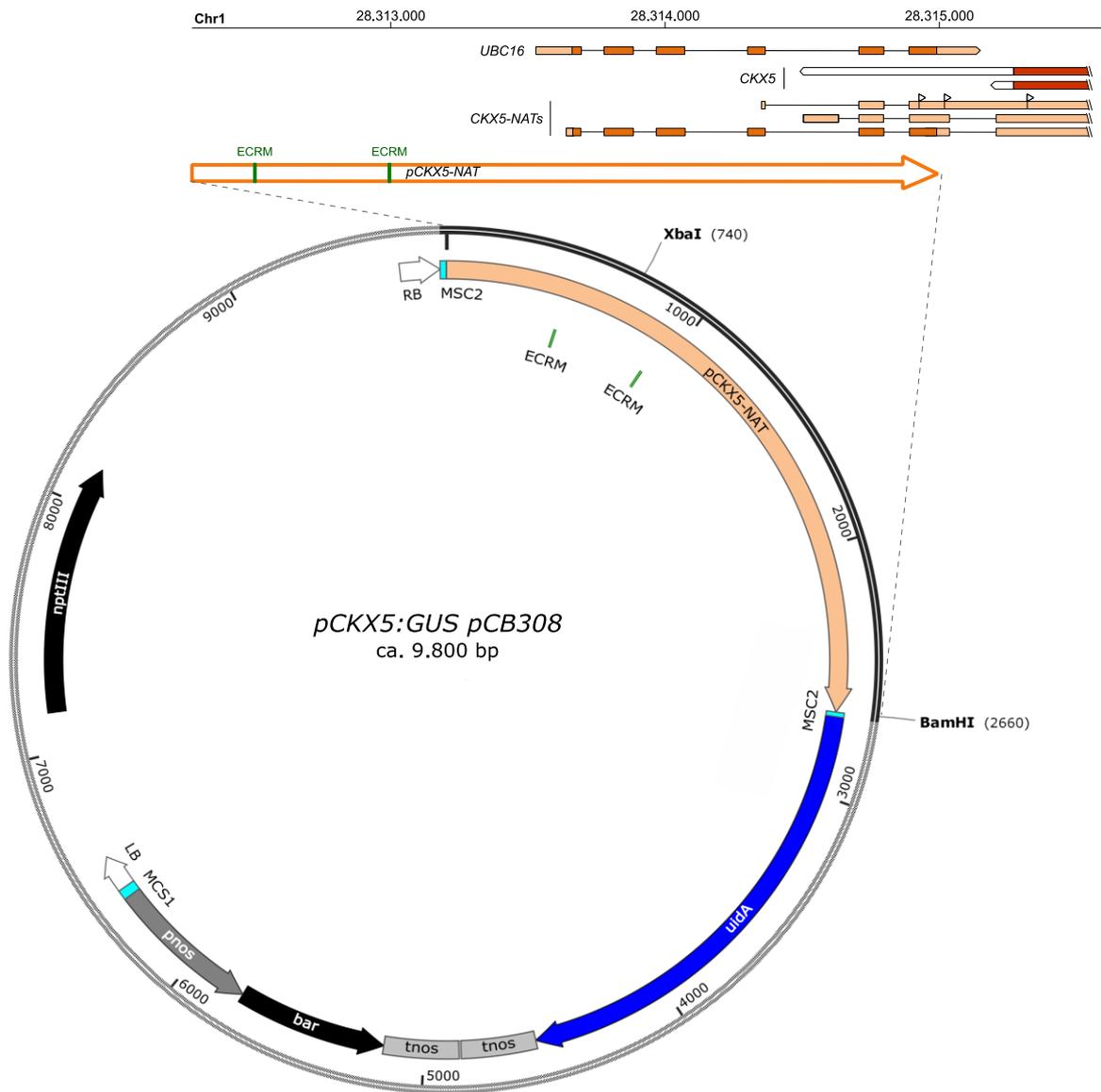


Abbildung 29: Vektorkarte von *pCKX5-NAT pCB308*.

Grafische Darstellung des Reportergenkonstruktes zur Analyse der *CKX5-NAT*-Promotoraktivität. Oben: Schematische Darstellung des genomischen Bereiches des *CKX5-NAT*-Promotors und der darin befindlichen Transkripte *CKX*, *UBC16* sowie der innerhalb der 5'-RACE-Analyse identifizierten *CKX5-NAT*-Isoformen. Unten: Grafische Darstellung des klonierten Vektors. *bar* = Phosphinothricin *N*-Acetyltransferase, Neomycin-Phosphotransferase II = Kanamycin-Resistenz, *pnos* = Nopalinsynthase-Promotorsequenz, *tnos* = Nopalinsynthase-Terminatorsequenz, LB = left border, RB = right border, MCS = multiple cloning site, ECRM = extended cytokinin response motif

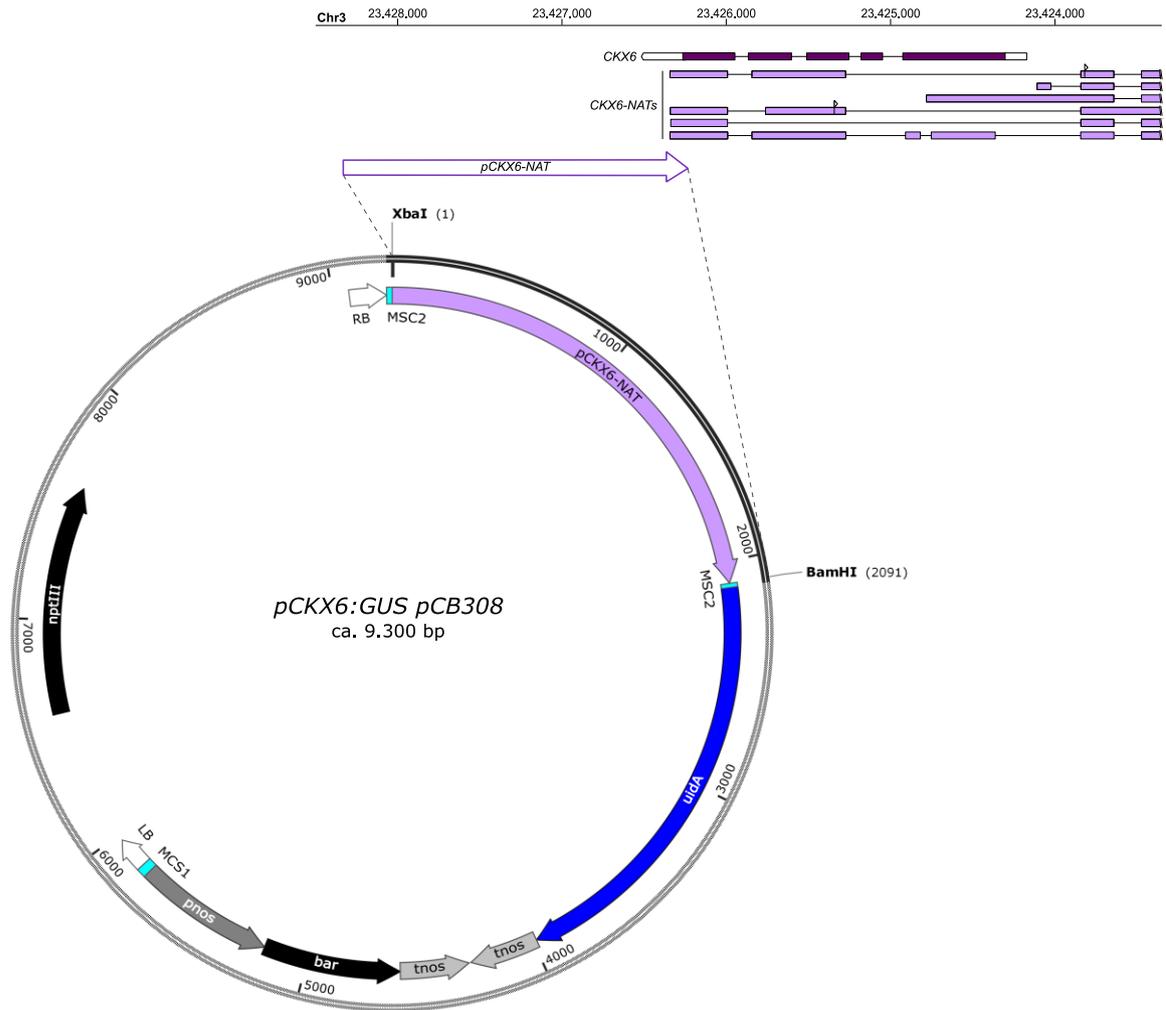


Abbildung 30: Vektorkarte von *pCKX6-NAT pCB308*.

Grafische Darstellung des Reportergenkonstrukt zur Analyse der *CKX6-NAT*-Promotoraktivität. Oben: Schematische Darstellung des genomischen Bereiches des *CKX6-NAT*-Promotors und des darin befindlichen *CKX6*-Transkripts sowie der innerhalb der 5'-RACE-Analyse identifizierten *CKX6-NAT*-Isoformen. Unten: Grafische Darstellung des klonierten Vektors. *bar* = Phosphinothricin N-Acetyltransferase, Neomycin-Phosphotransferase II = Kanamycin-Resistenz, *pnos* = Nopaline-Synthase-Promotorsequenz, *tnos* = Nopaline-Synthase-Terminatorsequenz, LB = left border, RB = right border, MCS = multiple cloning site

Tabelle 24: Verwendete T-DNA-Insertionslinien.

Linie	NASC-ID ¹	Insertionsort ²	Sequenzierungsprimer
<i>ckx1-nat-S1</i>	N925009	<u>CTAAGCGTCAATTTGTTATGGGAGGTCCA</u>	LBb1.3
<i>ckx1-nat-S2</i>	N692626	<u>TTTGTTTACACCACAATATATGGCACTCA</u>	LBb1.3
<i>ckx1-nat-S3</i>	N563049	<u>AGCGTCAATGTGATATATTCATGGCGGAAA</u>	LBb1.3
<i>ckx1-nat-G1</i>	N2030281	<u>GGTACCATTTACAACGAAGAATAAGAAGTA</u>	GKo8474
<i>ckx5-nat-S1</i>	N617512	<u>TTACACCACAATATATCCTGTGTCACCATG</u>	LBb1.3
<i>ckx5-nat-S2</i>	N564735	<u>CAATGTGTTATTAAGTTCTCTATTAGGTCA</u>	LBb1.3
<i>ckx5-nat-S3</i>	N653416	<u>CTGGTCATACTATGTACACAATAACAAATT</u>	CKX5-NAT-P8
<i>ckx5-nat-S4</i>	N660025	<u>TGACTATATTTGGGTGACTCTGAGTAAGA</u>	CKX5-NAT-P6
<i>ckx5-nat-SM1</i>	N105763	<u>CTTTTTCTTGTAGTGTGTCACATGTGC</u>	3dSpm
<i>ckx5-nat-S5</i>	N629807		
<i>ckx5-nat-S6</i>	N617833		
<i>ckx5-nat-S7</i>	N554433		
<i>ckx5-nat-S8</i>	N579183		
<i>ckx5-nat-S9</i>	N587901		
<i>ckx5-nat-S10</i>	N560742		
<i>ckx5-nat-S11</i>	N660025		
<i>ckx5-nat-S12</i>	N640084		
<i>ckx5-nat-S13</i>	N640082		
<i>ckx5-nat-G1</i>	N418529		

¹ stock-ID laut NASC (Centre)

² Sequenz des Übergangs von T-DNA zur flankierenden genomischen DNA; die genomische DNA ist unterstrichen

Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide.

Verwendete Primer	Sequenz ¹
CKX1-NAT-P1	GGACCCCAAATCAACAAC
CKX2-NAT-P1	GCTCTTCTCTATCCAACAAACCGGA
CKX2-NAT-P2	TCAAAAAGATGTCTTGCCCTGGAGA
CKX3-NAT-P1	TCCTTTAGCCGCTCGTGGTCA
CKX3-NAT-P2	TCGAAAAACGTACGAAGTTCTTTGTTG
CKX5-NAT-P1	TCTCAACGAACCCTCCGCACA
CKX5-NAT-P2	TGTCACCATGAAGCCGCTGACGA
CKX6-NAT-P1	GGACAGGCCTCCTGAACAGCTGGA
CKX6-NAT-P2	TCCCCACTTGTCCCCGAAATGGGA
CKX7-NAT-P1	ATCCGGCGGTGATGCCACGG
CKX7-NAT-P2	CGTGGTCCGGGTGGAGGGGAA
CKX1-NAT-GSP1	GAGCTCCAAATCAACCGTTGGCTAC
CKX1-NAT-nGSP1	AGCAAACCTCAACGTGAAGC
CKX1-NAT-GSP2	CGGTTGATTTGGAGCTCTCTGTGG
CKX1-NAT-nGSP2	GCTAGCTTCTTCTGGGTTGAAA
CKX5-NAT-GSP1	CTAGACACGTGGTACATGGGATTG
CKX5-NAT-nGSP1	GTCCCAATCAGATTCTCCTAGACC
CKX5-NAT-GSP2	GAGATCGGTTTGGTCTAGGAGAAT
CKX5-NAT-nGSP2	ATCCCATGTACCACGTGTCTAGTT
CKX6-NAT-GSP1	CCCGCTAGTGCTCTCTGGTCGCTTC
CKX6-NAT-nGSP1	GCACAATCTCCACTGGGCCACCTTT
CKX6-NAT-GSP2	GCTGTGGCAGCTCAAAGCAAAGCAA
CKX6-NAT-nGSP2	AAGGGACGGCTATGGTGGTGTGGA
pJET1.2_fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2_rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
Actin7-P1	AATGGTGAAGGCTGGTTTTG
Actin7-P2	TCCACATCTGTTGGAAGGTG
CKX1-NAT-nGSP3	AAACTACCACCATTGCCGCAGAA
CKX1-NAT-GSP3	GCGCCAAATTTCTGCCATCT
CKX1-NAT-P2	TCTTCACGGGTGATACAACACAAGC
CKX1-NAT-P3	ATGCGGTGCTGGTTCAGAGAGAT
CKX1-NAT-P4	TATTTCTGCGGCAATGGTGGTAG
CKX1-NAT-P5	CGCAAAGCGGTTCCACATGCAGC
CKX1-NAT-P6	TGACCATGGCCTCTAGC
CKX1-NAT-P7	TGCAGTGCCAAATTCCTC
CKX1-NAT-P8	TTCATGCTTTATCTCTGCGGTA
CKX1-NAT-P9	GTTTTCCCATCTGACTTGAA
CKX1-NAT-P10	CTCCCTGGTGACGTTTCATGTG
CKX5-NAT-P3	CCAGCCATGACGGTGAGTT
CKX6-NAT-P3	AGCCGTCCCTTCGACACTTTGGC
CKX6-NAT-P4	TCCCCACTTGTCCCCGAAATGGGA
CKX1-qPCR1	ATGGATCAGGAAACTGGCAA
CKX1-qPCR2	AGATGAAAACAAAGTGGATGGAA
CKX1-NAT-qPCR1	TGCTTCCATTTTTCCCGACT
CKX1-NAT-qPCR2	ATGTGTATCCTCTCTTGCCGT
CKX5-qPCR1	CGACTCGTCAGAACAGCTTAC
CKX5-qPCR2	GTTACGCCGTGGTTCATT
CKX5-NAT-qPCR1	CACTTCGTCGGCTCGTATTTTC
CKX5-NAT-qPCR2	ATGTGCGGAGGGTTCGTT
CKX6-qPCR1	AAAGAGGCAGAACACGCGACT
CKX6-qPCR2	TGCTATTCTTGCCCGCGTTA
CKX6-NAT-qPCR1	CTTTGCTTTGAGCTGCCACA

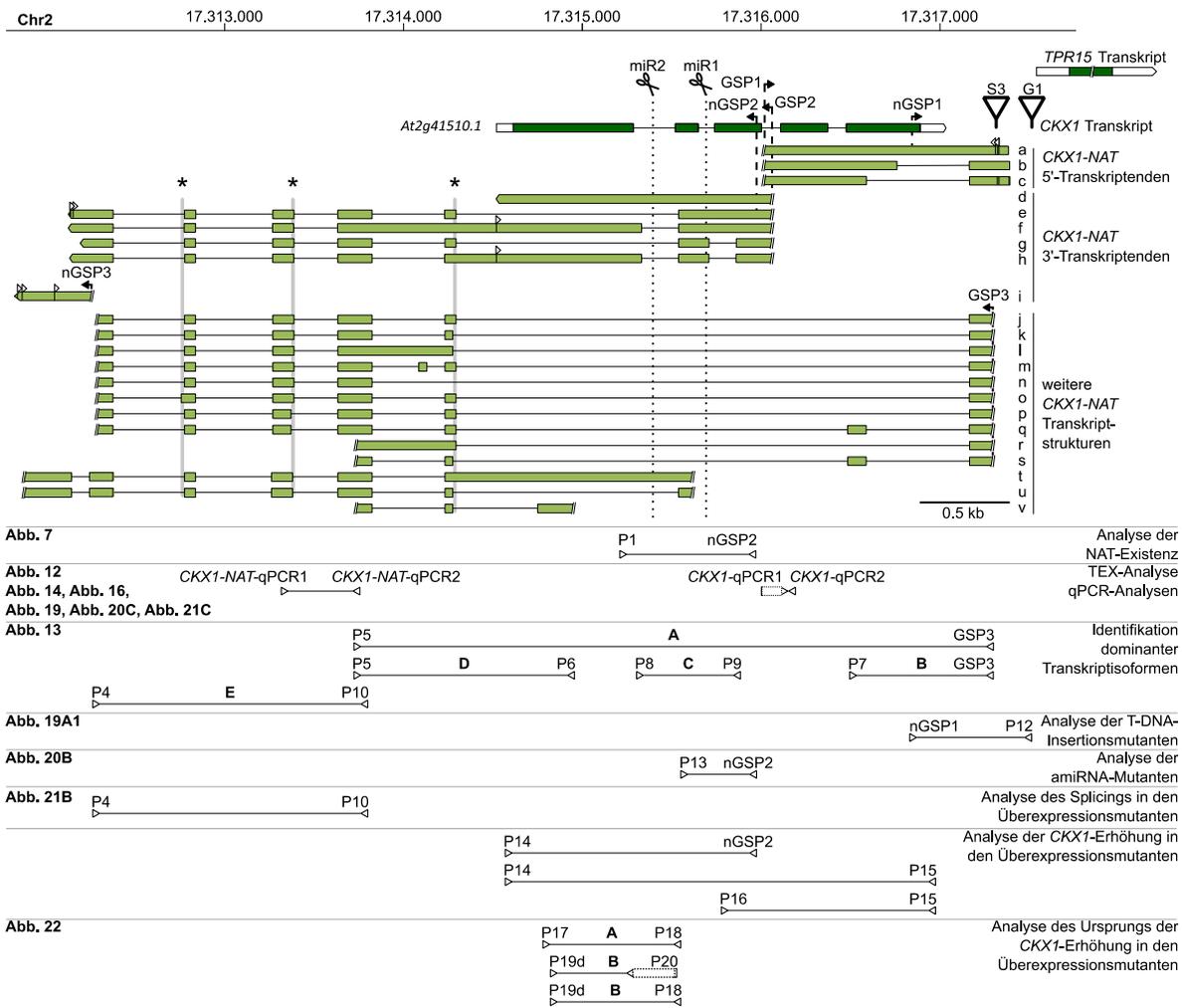


Abbildung 31: Übersicht über Transkripte, Primerpositionen und Mutanten am CKX1-Locus.

Schematische Darstellung des *CKX1*-Locus. Unterhalb von *CKX1* sind alle identifizierten Transkriptenden des *CKX1-NAT* gezeigt. Boxen repräsentieren Exons, wobei kodierende Bereiche dunkel dargestellt sind. Weiße Pfeile zeigen alternative Transkriptionsstarts und -stops an. Schwarze Pfeile markieren die Positionen der genspezifischen RACE-Primer. Sterne markieren Exon-Intron-Grenzen, welche sich in verschiedenen Isoformen um wenige Nukleotide unterscheiden. Kleinbuchstaben kennzeichnen die verschiedenen Isoformen der NATs. Dreiecke markieren die Positionen der T-DNA-Insertionen. Gepunktete Linien zeigen die amiRNA-Zielsequenzen an. Durch Linien verbundene Pfeilköpfe zeigen die Lage der Primer für die jeweiligen PCR-Reaktionen an, welche auf den entsprechenden Abbildungen bzw. im Text dargestellt sind. Intron überspannende Primer sind durch gepunktete Linien unterbrochen.

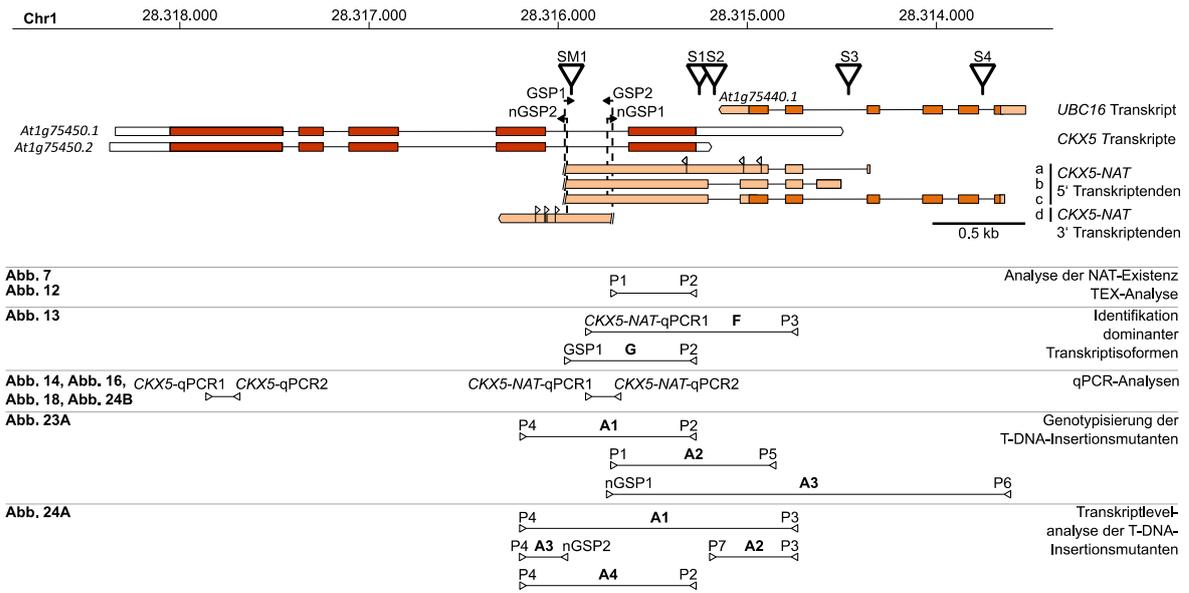


Abbildung 32: Übersicht über Transkripte, Primerpositionen und Mutanten am CKX5-Locus.

Schematische Darstellung des *CKX5*-Locus. Unterhalb von *CKX5* sind alle identifizierten Transkriptenden des *CKX5-NAT* gezeigt. Boxen repräsentieren Exons, wobei kodierende Bereiche dunkel dargestellt sind. Weiße Pfeile zeigen alternative Transkriptionsstarts und -stopps an. Schwarze Pfeile markieren die Positionen der genspezifischen RACE-Primer. Kleinbuchstaben kennzeichnen die verschiedenen Isoformen der NATs. Dreiecke markieren die Positionen der T-DNA-Insertionen. Durch Linien verbundene Pfeilköpfe zeigen die Lage der Primer für die jeweiligen PCR-Reaktionen an, welche auf den entsprechenden Abbildungen dargestellt sind.

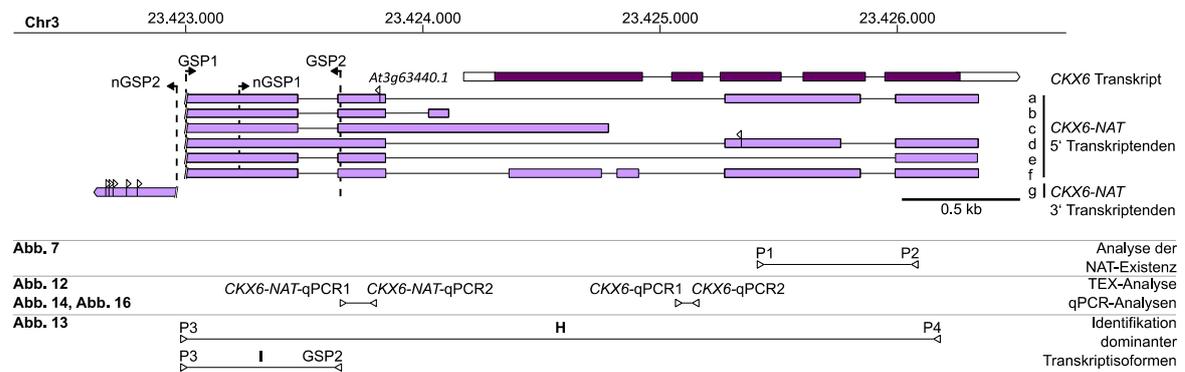


Abbildung 33: Übersicht über Transkripte, Primerpositionen und Mutanten am CKX6-Locus.

Schematische Darstellung des *CKX6*-Locus. Unterhalb von *CKX6* sind alle identifizierten Transkriptenden des *CKX6-NAT* gezeigt. Boxen repräsentieren Exons, wobei kodierende Bereiche dunkel dargestellt sind. Weiße Pfeile zeigen alternative Transkriptionsstarts und -stopps an. Schwarze Pfeile markieren die Positionen der genspezifischen RACE-Primer. Kleinbuchstaben kennzeichnen die verschiedenen Isoformen der NATs. Durch Linien verbundene Pfeilköpfe zeigen die Lage der Primer für die jeweiligen PCR-Reaktionen an, welche auf den entsprechenden Abbildungen dargestellt sind.

UCCUUCGAAAUCAGAUUUUCUUGGUCCCUUGAAAUGCAGAAAAGUCAGAGUAGAGUACCCUGAUCCAUUUAACCUAUUUAAAAGUUUUUUGACUGUGUCAGGAAAAGUGGUUCUAGAAUCAUAG
 CGUAUAUUGUUUGAACUUUGUUCAGAUAGAACUUUACCAUAUGCGGGUGCUGGUUCAAGAGAGAUCCGUGCCCGGGUGAUUAUGCCAAACUGUCCAAGCCCGCCAAAGAACACUGAAGAAAAGUU
 CAGAAUUCGCUUCUCAGAACAGGUUAGUAAUUCACAUCGCGGGUACAUAUAUUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUUCCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUUCUGCCGUA
 AAUUGCUUAAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUUGGAAACGCUUUUGCGUUAUCUCAGUAUCACAGAAUUCACCUUUCAGCAUGCAUAUUGAACAGGAGCAUAUAAAAGUUUGAUGUU
 CUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACCAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGCGGAAAAAUGGAAGCAAAGGCUGAAGAAGAUUGUAAUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUACGAAU
 AAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGCUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAACAUUUUUUCUUCUUAUGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAAGUAGAUAGUUGGGCAUUAGAC
 UGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCACAAUAUGAAUAUUAAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUAAGGUUAAACUCCACAAAACGUAUUUUAUCAUACUCUAUGUAUGUAUCAUUAUCUU
 AUUUUUUCUUGUCUCACCAUUGUAAAUGUUAGAUUUCUCAAUUUCAAGUUUAUUAAGAGAGAGGUAAGUAAAAGAGAG

CKX1-NAT f

CGGUUGAUUUGGAGCUCUCUGUGGAAAUAAGUCUAGUUAUAUUGCUUUACAUCUUAACUGAUCCAUAAGAGCUAGCUUCUUCUGGGUUGAAAUAUUUGACCACUUCUAGGCAAUAAAAGAGU
 UUUCCCAUCUGACUUGAAUCUGCUUGCCUGUGUGGAAUCGUUGGGACUGAAUGACGAUCGCCAAUUAUUGAGAAGGUCUGUUCUAUUGAUUAUCACAAAUCUUAACGUAUUAUAAAAGUUUUC
 UCCUUCGAAAUCAGAUUUUCUUGGUCCCUUGAAAUGCAGAAAAGUCAGAGUAGAGUACCCUGAUCCAUUUAACCUAUUUAAAAGUUUUUUGACUGUGUCAGGAAAAGUGGUUCUUAAGAAUCAUAG
 CGUAUAUUGUUUGAACUUUGUUCAGAUAGAACUUUACCAUAUGCGGGUGCUGGUUCAAGAGAGAUCCGUGCCCGGGUGAUUAUGCCAAACUGUCCAAGCCCGCCAAAGAACACUGAAGAAAAGUU
 CAGAAUUCGCUUCUCAGAACAGGUGCAUAUUUUUUUGAGACUACCGCAGAGAUAAAGCAUGAAUUGAAAUACCUUGUAACAAUCUCUAGCUGGUAGACGUUGUUGAUUUUGGGGUCUAGCUUGAA
 UGCUUGACCGCUGAUUCCAGCAUUAAGAUAGUUAUCCUACCGGUCAAAUGAAGGUAGUCUGUCCAGGACUUUGGUGAAAAGACCGUAUUUUUAGAGUCUCGCGUAAGAUUUUUAUCCAUUUUCA
 CCACCUAGACAUCAUAUUGGUUGCUUCCCUUUAUAAAUCUGAUUAUCAGGACUUCGAAGUGACUCCAUUUUGAUGACAACACCUUGAUGAGCUAGAGCUUGCCUUGAAGCGAGUGACCAU
 GGCCUCUAGCUGCUACUGUAAGAUUUUGAGGUGGAGCCAGAUUACUUAUUGCUUCAUCGAUAAAUAUCUUAUUGAAGUUAUUGCCAAAGGUGGUAACUGGUUAUCUGUU
 GCCAAAGUCCUUGGCCACAUUGUGGACAUCGUCGAAGCUUAUAUAAACCCUCCAAAUCUAGUGAACAUAUAGGAAACGAAUAUCUGAAGGAUUUGAAGAAGGUAUUUUCUUUUGGGUACUAACA
 GAAUGAUUGGAACAAAGAUUGGUUCUACCGUUAUACAGCUUAGAACCAAGAUCAUGAAGAUUCCGAGGAAAGUCUUGUUGUUUUGUCUAUGGAACCGUAAGGAUGAGGCUAAUCCCAUUUCUA
 CUUUUGGAGAAAUUGCAAAGAAUAAGAGCGGAAUGGUUAUAGAGAAUGAGAGGUAUAAACUUGAGGUUAAGAGUACUCUCUGAGGGAAAAAAGAGGUAAGAAAGGGGAAUUUAAAAGG
 AAAGGUUUUAGGCGGUACAGUCAUAUACUUGUUCACUAUAUAGCUGGAUUGCCAUAUUCUUUUGUCUCUUGCUGCAAAUUAAGAUUUCUUGUGACGUUUUUAUUUUUCUUGCAUUAUA
 UUAUGUGGAAAGUUUACUAGAAAAGUUAUUUCUAAUUCUUAUUUCUUAUUUUUUAUGGUAAGUUUAUUGUCAGAGCAUGUACACUAGGGCCCUACUUGGGUCUCAUGGUACUUGAGCUCAGUUUAAG
 UAAAAUUUUUUUACUGCAUAGUUAUUUACUUGUUUAUUUUUUGUCUUUUGGCUAAGUUUAUUGUCAGAGCAUGUACACUAGGGCCCUACUUGGGUCUCAUGGUACUUGAGCUCAGUUUAAG
 AGAAGACAUCUUGCCCACCACCCUCUACACUGGUAACUCUAUUUGGAUCAUGCUUAUUGGGACCAUUUUGCAUCACUUGAUCUUGAUCUUGCAGUUCUUGCAGUAUAUUAUUUUUUGACUAUAAAGCU
 UGGAAGUAAGUUUACCCUUAAGGACCAAACUACAGCAUCGGCUCUCUUCUUGCAGGAUGGAUACAGAGCUGUCUAAAACACAUUGUUAACCUAGCAUUCUUUUUCAUGAUUCUUAAGAGAG
 AAAUAUACUGUUGUUAUACAUUUUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAUUUUGCUUAAGAAAGGAAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCG
 UUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUACUUUCAGCAUGACAUUUGAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCUGAUAGACCAAUUGAUGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGG
 AAAAAUGGAAGCAAAGGCUAAGAAAGAUUGGUAUUGUGGAGUACAGUUUAGACAAAGGAGGCAUUAACGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCUAGUGGACAAAUAAC
 AGGAGAAAUAUUUUUCUUCUAGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAAGUAGAUAGUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCACAAUUGAAAUAUUAAACUACCACCAU
 GCCGCAGAAAUAAGGUUAAACUCCACAAAACGUAUUUUAUCAUUAUCUCUAUGUAUGGAUACAUGUAUCUUAUUUUUCUUGUCUCUACCAUUGUAAAUGUUAGAUUCAUUAUUUCAAGUUA
 UUAUGAGAGAGGUAAGUAAAAGAGAG

CKX1-NAT g

CGGUUGAUUUGGAGCUCUCUGUGGAAAUAAGUCUAGUUAUAUUGCUUUACAUCUUAACUGAUCCAUAAGAGCUAGCUUCUUCUGGGUUGAAAUAUUUGACCACUUCUAGGCAAUAAAAGAGU
 UUUCCCAUCUGACUUGAAUCUGCUUGCCUGUGUGGAAUCGUUGGGACUGAAUGACGAUCGCCAAUUAUUGAGAAGGAAAGUGGUUCUUAAGAAUCAUAGCGUAUAUUGUUGAACUUUGUUCAG
 AUAGAACUUUACCAUAUUGCGGUGCUGGUUCAAGAGAGAUCCGUGCCCGGUGAUAUUGGCAACUUGUCCAAGCCCGCCAAAGAACACUGAAGAAAAGUUUCAGAAUUCGCUUCUCAGAACAGGU
 AGUAAUUCACAUUCGCGGUACAUAUAUUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUUCCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUUCUUGCCGUAUUUUGCUUAAGAAAGGAAAAAGUAC
 CACAGCUGCAUGGAAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUACAUUUCAGCAUGACAUUAUUGAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCUGAUAGACCAA
 UGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGGAAAAAUGGAAGCAAAGGCUAAGAAAGAUUGUAAUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAACGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUAC
 CUUGGUCGUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAAACAUUUUUUCUUCUUAUGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAAGUAGAUAGUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCAC
 AAUAUGAAAUAUAAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUAAGGUUAAACUCCACAAAACGUAUUUUAUCAUUAUCUCUAUGUAUGGAUACAUGUAUCUUAUUUUUCUUGUCUCU

CKX1-NAT h

CGGUUGAUUUGGAGCUCUCUGUGGAAAUAAGUCUAGUUAUAUUGCUUUACAUCUUAACUGAUCCAUAAGAGCUAGCUUCUUCUGGGUUGAAAUAUUUGACCACUUCUAGGCAAUAAAAGAGU
 UUUCCCAUCUGACUUGAAUCUGCUUGCCUGUGUGGAAUCGUUGGGACUGAAUGACGAUCGCCAAUUAUUGAGAAGGAAAGUGGUUCUUAAGAAUCAUAGCGUAUAUUGUUGAACUUUGUUCAG
 UCCUUCGAAAUCAGAUUUUCUUGGUCCCUUGAAAUGCAGAAAAGUCAGAGUAGAGUACCCUGAUCCAUUUAACCUAUUUAAAAGUUUUUUGACUGUGUCAGGAAAAGUGGUUCUUAAGAAUCAUAG
 CGUAUAUUGUUUGAACUUUGUUCAGAUAGAACUUUACCAUAUGCGGGUGCUGGUUCAAGAGAGAUCCGUGCCCGGGUGAUUAUGCCAAACUGUCCAAGCCCGCCAAAGAACACUGAAGAAAAGUU
 CAGAAUUCGCUUCUCAGAACAGGUGCAUAUUUUUUUGAGACUACCGCAGAGAUAAAGCAUGAAUUGAAAUACCUUGUAACAAUCUCUAGCUGGUAGACGUUGUUGAUUUUGGGGUCUAGCUUGAA
 UGCUUGACCGCUGAUUCCAGCAUUAAGAUAGUUAUCCUACCGGUCAAAUGAAGGUAGUCUGUCCAGGACUUUGGUGAAAAGACCGUAUUUUUAGAGUCUCGCGUAAGAUUUUUAUCCAUUUUCA
 CCACCUAGACAUCAUAUUGGUUGCUCUCCCUUUAUAAAUCAGGACUUCUUAUUGAAGUACUCCAUUUUUGAAGACACCUUUGGAUGUAGAAUUGCCAAAGGUGGUAACUGGUUAUCUGUU
 GGCCUCUAGCUGCUACUGUAAGAUUUUGAGGUGGAGCCAGAUUACUUAUUGCUUCAUCAUCGAUAAAUAUAAAAACUGACCUUUGGAUGUAGAAUUGCCAAAGGUGGUAACUGGUUAUCUGUU
 GCCAAAGUCCUUGGCCACAUUGUGGACAUCGUCGAAGCUUAUAUAAACCCUCCAAAUCUAGUGAACAUAUAGGAAACGAAUAUCUGAAGGAUUUGAAGAAGGUAUUUUCUUUUGGGUACUAACA

	GAAUGAUUGGAAACAAAGAUUGGUUCUACCGUUAUACAGCUUAGAACCAAGAUCAGUAGAAGAUUCCGAGGAAAGUCUUGUUGUUUGUCUAUGGAACCGUAAGGAUGAGGUCAAUCCCAUUCUA CUUUGUUGAGAGAAAUUGCAAAGAAUAAGAGGCGGAAUGGUUAUAGAGAAUGUAGAGGUAAACUUGAGGUUUAGAGUACUACUCUGAGGGAAAAAAGAGGUAGAAAGGGGAAUUUAAAGG AAAGGUUUUAGGCGGUACAGUCAUAUACUUGUUCACUAUUAUAGCUGGAUUGCCAUUACUUUUUGUCUCUUGCUGCAAAUUAAGAUUUCUUGUGACGUUUUAAUUAUUUCUUGCAUUAU UAUAGUGGAAAAGUUACUAGAAAAGUAUUUCUAAUUCUUAUUUCUUAUUUUUUAUGGUAGGUUAGUAAUUCACAUUCGCGGGUACAUACAUUCUCUCCUGCCAAAGAUUUACUGCAUAAUAGG UCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUCA GCAUGACAUAUUAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUUGGUGUCCUGAUAGACCAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGAAAAUUGGAAGCAAAGGCUGAAGAAGUUGUA AUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUCAGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGCUCUAGUGGACAAUACACAGGAGAAACAUUUUUCUUCUAGUAAAUCGC CGUGAAGAUUGCAAUAGUAGUAGUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCACAUAUUGAAAUAUUAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUAAGGUUAAAACUCCACAAAACG UAUUUAUCAUUACUCUAUGUAUGUAGUAUCAUGUAUCUUAUUUUUCUUGUCUCACCAUUGUAAAUUGUAGAUUCUCAUUUAUUAAGUUAUUAUAGAGAGAGGUAAG
<i>CKX1-NAT i</i>	AAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUAAGGUUAAACUCCACAAAACGUAUUUAAUCAUUAUCUCUAUGUAUGUGAUACAUGUAUCUUAUUUUUCUUGUCUCACCAUUGUAAAUGUUAAGUAUUC UCAUUUCAAGUUAUUAUAGAGAGAGGUAAGUAAAGAGGAGAAAAGUAGUCCCAAGUAUAGAAUUGUCGAGUGGUAUUUGGAGUUUGAGCUCUAGUCCUAGUUCGUUAGAAUAGGUUUUCA AUUGUCUUAUUAUUUAGAGAUACCUUUUGCUGCAGUGAUGGGUUAUUUUCUUUCUUGUUUCAGAAAAUUAUUGUCUCCUUCUUCUUCUUCUCCUCCUCAAUUUUCUUAUAAAAGUUUU UUAAAAUUUUUAGGAUUUGAACCUACUUAACAAUUUGCCUAUUAUGCUUGUGUUGUAUCACCCGUGAAGAAACAAAAAUGUUGUAGACCCUAUGAGUCCAUUAUACCAAAGAAUA UUAGUUCUUUU
<i>CKX1-NAT j</i>	GCGCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAAGCUUGGCCUCAAUACGAGAUUCUGGACCCAAUUGAGAAUCGA UUCUUAAGGUUAGUAAUUCACAUUCGCGGGUACAUAUCAUUCUCUCCUGCCAAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAUUUGCUUAAAGAA GGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCC UGAUGACCAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGGAAAAUUGGAAGCAAAGGCUUAGAAAGAUUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAAGAAUAAAUAUAAAUGAAA AGCUCACAUAUACCUUGGUCGCUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAAACUUUUUCUUCUAGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAGUAUUGGGAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAU CAUGAUGAGCACAUAUGAAAUAUUAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUA
<i>CKX1-NAT k</i>	GCGCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAAGCUUGGCCUCAAUACGAGAUUCUGGACCCAAUUGAGAAUCGA UUCUUAAGUAAUUCACAUUCGCGGGUACAUAUCAUUCUCUCCUGCCAAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAUUUGCUUAAAGAAAGGAAA AAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGUA GACCAAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGGAAAAUUGGAAGCAAAGGCUUAGAAAGAUUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAAGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUC ACAAUACCUUGGUCGCUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAAACUUUUUCUUCUAGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAGUAUUGGGAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGA UGAGCACAUAUAGAAAUAUUAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUA
<i>CKX1-NAT l</i>	GCGCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAAGCUUGGCCUCAAUACGAGAUUCUGGACCCAAUUGAGAAUCGA UUCUUAAGUAAUUCACAUUCGCGGGUACAUAUCAUUCUCUCCUGCCAAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUAUAAACUUUAUUUACUGCAUAGUUAUUACUUGUUAUUUUUUGCUUUUUGGCUAAG UUUAUUGUCAGAGCAUGUACACUAGGGCCCUACUUGGGUCUCAUGGUACUUGAGCUCAGUUUAGAGAGAACAACUUGCCACACCCUCUACACUGGUAACUCUUAUUGGAUCAUGCUUAU UGGGACCAUUUUGCAUCAUUGAUCUGUCAGUUCUUGCAGUAUUAUAAAUUUGACUUAUAAAGCUUGGAAGUAAGUUAACCCUUAAGGACCAAACAUCAGCAUCGGCUACUCUUCUUGCAGGA UGGAUACAGAGCUGUCCUAAACACAUUGUUAACCUAGCAUUCUUUUUUCAUGUCCUUAAGAGAGAAAUAUUCGUGUUGUUAUACAUAUUUUUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUC CUCUCUUGCCGUAUUUUGCUUAAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUUA AAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACCAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGAAAAUUGGAAGCAAAGGCUGAAGAAGAUUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGG AGGCAUUCAGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGCUCUAGUGGACAAUACACAGGAGAAAACUUUUUCUUCUAGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAGUAUAGUAGU UGGGCAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCACAUAUUGAAAUAUUAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUA
<i>CKX1-NAT m</i>	GCGCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAAGCUUGGCCUCAAUACGAGAUUCUGGACCCAAUUGAGAAUCGA UUCUUAAGGUUAGUAAUUCACAUUCGCGGGUACAUAUCAUUCUCUCCUGCCAAAGAUUUACUGCAUAAUAGGGCCCUACUUGGGUCUCAUGGUACUUGAGCUCAGUUUAGAGAGAACAACUUGCCACACCCUCUACACUGGUAACUCUUAUUGGAUCAUGCUUAU CCCCACCACCCUCUACACUGGUCUCCUGGUGACGUUAUCUUGUUAUCUUCUUGCCUUAUUUUGCUUAAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACCAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAUGUCGGAAAAUUGGAAGCAAAGGCUGAAGAAGAUUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGG CAAAGGCUGAAGAAGAUUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAAGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGCUCUAGUGGACAAUACACAGGAGAAAACU UUUUUCUUCUAGUAAAUCGCCGUGAAGAUUGCAAUAAAGUAGUAUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCACAUAUUGAAAUAUUAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUA
<i>CKX1-NAT n</i>	GCGCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAAGCUUGGCCUCAAUACGAGAUUCUGGACCCAAUUGAGAAUCGA UUCUUAAGGUUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAUUUGCUUAAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUC UCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACCAAUUGUAGAGCACAUAUUGAAAUAUUAACUACCACCAUUGCCGAGAAAUA

	GAAGAUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUACGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAACAUUUUUUCUUCUCAUGUAAAUCGCCUGAAGAUGCAUAAGUAGUAGUUGGGCAUUAGACUGUUUAGAUAGCAUCAUGAUGAGCACAAUUGAAAUAUUAAACUACCACCAUUGCCGCAGAAAUA
CKX1-NAT o	GCGCCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAGCUUGGCCUCCAUAACAGAGAUUCUGGGACCAAUUGAGAAUCGAUUCUUAAGGUUAGUAAUUCACAUCGCGGGUACAUAACAUCUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAA GGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACAAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAAGUCGGGAAAAUUGGAAGCAAAGGCCUGAAGAAGAUGGUAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAACGAAUAAAUAUAAAUGAAA AGCUCACAAUACCUUGGUCGUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAAACAUUUUUUCUCAUGUAAGUAAAUCGCCUGAAGAUAUGCAUAAGUAGAUAUGUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGUAU GCAUCAUGAUGAGCACAAUUGAAAUAUUAAACUACCACCAUUGCCGCAGAAAUA
CKX1-NAT p	GCGCCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAGCUUGGCCUCCAUAACAGAGAUUCUGGGACCAAUUGAGAAUCGAUUCUUAAGGUUAGUAAUUCACAUCGCGGGUACAUAACAUCUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAA GGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUCAACUUUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACAAAUGGAAAGCAAAGCCUGCCUACAUAAGUCGGGAAAAUUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAACGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGUCUAGUGGACAAAUACACAGGAGAAAACAUUUUUUCUCAUGUAAGUAAAUCGCCUGAAGAUAUGCAUAAGUAGAUAUGUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGUAUGCAUCAUGAUGAGCACAAUUGAAAUAUUAAACUACCACCAUUGCCGCAGAAAUA
CKX1-NAT q	GCGCCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAGCUUGGCCUCCAUAACAGAGAUUCUGGGACCAAUUGAGAAUCGAUUCUUAAGGUUACUCUAGAUUGUUUUUCCUGAGGAAUUGGCACUGCAGAGGGGAGAAAGGCCUACGAGAUAGAUAUAUCUUAUUGGAGUUUAACAAGAUUGUAAUUCACAUCGCGGG UACAUAUAUUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAAC CGCUUUGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAAUCUACUUAUCAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACAAAGGGCCUCGCCUACAUAUGC GGAUAAAUGGAAAGCAAAGCCUGAAGAAGAUGGUAUUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGAAUACGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGUCUAGUGGACAAAUA CACAGGAGAAAACAUUUUUUCUCAUGUAAAUCGCCUGAAGAUAUGCAUAAGUAGAUAUGUUGGGCAUUAAGACUGUUUAGUAUGCAUCAUGAUGAGCACAAUUGAAAUAUUAAACUACCACC AUUGCCGCAGAAAUA
CKX1-NAT r	GCGCCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAGCUUGGCCUCCAUAACAGAGAUUCUGGGACCAAUUGAGAAUCGAUUCUUAAGGUUAGUAAUUCACAUCGCGGGUACAUAACAUCUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUUAAAACUUUUAUUUACUGCAUAGUUUAUACUUGUUUAUUUUGUCUUUUGG CUAAGUUUAUUGUCAGAGCAUGUACACUAGGGCCCUACUUGGGUCUCAUGGUACUUGAGCUCAGUUUAAGAGAAGACAACUUGCCCACCACCCUCUACACUGGUAAACUCUAUUGGAUCAUG CUUAUUGGGACCAUUAUGCAUCACUUGAUCUGUCCUGCAGUUCUUGCAGUUAUAUAAAUUGACUAUAAAAGCUGGAAGUAAGUUACCUCUAGGACCAACAUACAGCAUCGGCUACUCUUCUUG CAGGAUGGAUACAGAGCUGCCUAAACACAUGUUUAACUAGCAUUCUUUUUCAUGAUCUUAAGAGAGAAAAUAAUCGUGUUGUGUAACAUAUUUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGU GAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUUUGCG
CKX1-NAT s	GCGCCAAAUUUCUGCCAUCUUGAUGAGAAAUUGGGAAUAAUCGUUGUUGUUUCAGUACAAAAUCGAUUGGAAAAUCGUAGCUUGGCCUCCAUAACAGAGAUUCUGGGACCAAUUGAGAAUCGAUUCUUAAGGUUACUCUAGAUUGUUUUUCCUGAGGAAUUGGCACUGCAGAGGGGAGAAAGGCCUACGAGAUAGAUAUAUCUUAUUGGAGUUUAACAAGAUUAAUUCACAUCGCGGGUACAUA CAUUCUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUU UGCG
CKX1-NAT t	AUGCGGUGCUGGUUCAAGAGAGAUCGGUGCCGGGUGAUUAUGCCAAACUGUCCAAGCCCGCCAAGAACACUGAAGAAAAGUUCAGAAUCCCGUUCUCAGAACAGGUUACGACUUCUCCUUUC CUGAUUAAAUAUUGGAAUAUUAUUGCUUAUCAGUUGUUUGUUUAUUAACUUUUUUCUUGGUGCAUUAUUGUGUUGCAUUAUUCACAUUUUGGCCUUAUGCACUCUUGUUUAUAGU CAAAUAUUUAUAAAGUCGUCAGUUGUUUUUGCUAUGAAGAGAUUAUCUUUACUGGUGCAUUAUUUUUUGAGACUCCGACAGAUAAAAGCAUGAAAUAACUUAACAACUUCUAG CUGGUAGACGUUGUUGAUUUUGGGUCCAUGCUUGAAUGCUUAGCCCGCAUUAAGAUAGUUAUCCUACAGGUCUUAUUAAGAGUAGUACCUCUACAGGUCUUAUUAAGAGUAGUCUGUCCAGGACUUAUGGUGAAAGACCGUAU UUUAGAGUCUCGCGUAGAAUGUUUAUCCAUUAUUCACCACUGAGACAUAACAUAUGGUUGCUUCCUUUAUAAAUCUGAUUAUCAGGACUUCGAAGUAGACUCCAUUUUGAUGACAACCCUU GAUGAGCUAGAGCUUGUCUUGAAGCGAGUGACCAUGGCCUCUAGCUGCUACUGAAGAUUUAGGUGGAGCCCAGAUUACUAUAUGCUUCAUCAUGAUGAAUAUACAAAACUGACCUUGG AUGUAGAAUUGCAAAGGUGGUAACUGGUAUCUGUUGCCAAAGUCCUUGGCCACAUUUGGACAUUCGUCGAAGCUUAUAUAACCCUCCAAAUCUAGUGAAACUUAUAGGAAACGAAUAUCUGAA GGAUUGAAGAAGGUAUUCUUUGGGUACUAACAGAAUGAUUGGAACAAGAUUGGUUACCUUGGUAUACAGCUUAGAACAAGAUUGAAGAUUCCGAGGAAAGUCUUGUUUGUUGUC UAUGGAACCGUAAGGAUGAGGUCUAAUCCAUUUUCUACUUGUAGAGAAAAUUGCAAAGAAUAAAGAGGCCGGAUUGGUAUAAAGAGAAUAGAGGUAUAAACUUGAGGUUUAGAGUACUACUCUAGG GAAAAAAAAGAGGUAGAAAGGGGAAUUUAAAGGAAAGGUUUUAGGCGGUACAGUCAUAUACUUGUGUUCACUAUAUAGCUGGAUUGCCAUUACUUUUUGUCUCUUGCUGCAAUUAAAGUAU UCUUUGUGACGUUUUUAAUUAUUUCUUGCAUAUAUAUAGUGGAAAGUUAUCUAGAAAGUUAUUUUAACUUCUUAUUUCUCAUUUUUUUUGGUAGGUUAGUAUUUCACAUCGCGGGUACAUA CAUUCUCUCCUGCCAAGAUUUACUGCAUAAUAGGUCUCCUGGUGACGUUCAUGUGUAUCCUCUCUUGCCGUAAAUGCUUAAGAAAGGAAAAAGUACCACAGCUGCAUGUGGAACCGCUU UGCGUUAUCUCAGUACUACAGAAUCUCAACUUCUAGCAUGACAUAUUGAACAGGGCAUAUAAAAGUUUGAUGUUCUUAUUGGUGGUCCUGAUAGACCAAAUGUAGGGGCCUCGCCUACAUAU GCGGAAAAAUGGAAGCAAAGGCUGAAGAAGAUGGUAAUUGUGGAGUGACAGUUUGAACAAAGGAGGCAUUAACGAAUAAAUAUAAAUGAAAAGCUCACAAUACCUUGGUCGUCUAGUGGACAAAUA

<i>CKX5-NAT d</i>	GAGAUCGGUUUGGUCUAGGAGAAUCUGAAUUGGACCACCCACCAUGAGUUCUAGGAACUUA AAAACAAAUA AACCCAAUCUGGACCAUCGGAAUUGGUCACAAAACAAAAGAGAAUACGAG CCGACGAAGUGUUUGUCAAUUUAGCUGGUUCGAUGCACAUGUGGACAACGUUUUUUCGACAAUCCCAUGUACCACGUGUCUAGUUUUUUCAAUUUUGACAAAACUUUUUUUCUUGGACCAC UAAUUAUCCCCACAAGUGUAACUUUGCAUGCAUGCAAUGCAAAACUCGUUUUAUUCUUUUUUUCUAGAGAAGAAUUUAGAAGUAGUAAUCAAUGGUAUUGUCAAGACUUACUUGUCUUUGUUC AUGGGGUGAGUAAGAAUAGGGCCACUUGUUUUUUUCCAAAUGCCCUUGAAAACGCCUUUAUCGAAGUCAGAGAUUCUUGAUUUUGGCACGAAGAGGUUGAGCCAUGGGUGUGGAACCCUCC AUAAAUUCUUGGACC GGAGCUUCAAUUCGGCCUUGUGUAACCCGGUCGAGAAAGUCCACAUAUUGUAAAUCCGUUGUAAGACC GAUGUCGGUAUGAAAUCAAUUUCUUCACAG
<i>CKX6-NAT a</i>	AUGUACAAUCUUUACUGAUAGAGUUACUACAGAGAGAGAGAGGCCCCAAAUAUUCCACGAGACGACGGGUCAUGAGUAUGAGACUGCCUUUGAAAAUUUCGGUGGCCAGGCGCAAGAAU UGCCAAUGGAUCAUAUCUGGAUUUCCUCUCAAAAUCUCCCCACUUGUCCCGAAAUGGGGAUCUCCACUCUUCUUGUCGUGUAAUGGGCAGUAUCUGCUUAACCCUAUCCCUUGCUUCU UCACUGAAUUCAGUAUUCUUCUGUUCGGCCUCAAGAUCUCUUCUACUCCAUCUUUCCUGCCGACCUGGAGAUGCCGAUGUAGGAUCGCCACCAGACGAUGACUGGGCCGUUGCUUGUAUC CGUUAGUAUGUUUCCAAAUAACCCUCUUGCAAUUCAUUGAUUUUGCUUCUUGGUACCAGGAGGUUCAGCCAUGGAUGUGGCACUCCACUGCCUUUGCAUCGGAGUUUUACCCUAGACACA UGUACCCUGUCAAGAAUGCUUCAUAGUCUACCCUGUUGUAAAACAGUGUCGACGUCACGUAGCUUAGCUCUGAUAUUGUUUCUACUCCUGGAUUGGACAAAUAUAUAUUAUUUUUCAGU UCCAUGAAUGUCAUCUACCAAAGAAGAUUCUACCGAUUGCUUCUACUCUGUUUUCACCCUGGUUGAUUACGUCUUGUUAUCUUGCUCAAUACUUGGCAGCUCAGACAAUACAGAGUC CUUCCAAUAAAUCUUGAAUUGGCUUGCUUCUAAAGGCUCUUCUGCCGGUAAAGACAACUCUCCAGGUUCCAGGAGCCUUGCUUUUAUUCACAAAACCCUUAUGUAUUCGAAUUUUGGCG CCUGGGCAGAUUAUAGUUGCUUCUUGGCUUUGGCAAAAGCUGCAAAAUCAGGCUUUUGACUCAGAUAGCGCAAAAAGGAUUGGUUCCUGUAUCAUCCUGAGAGUAAAAGAAUGGUGGAAC GUGCAAGGGAAAAAUCCUUGUCUCUCUGUGGAAAAUAGGAGGCAUUUCACUAGUUGGACCCACAACACAUCUUGUAACUAAAAGAGGCUGUGGCAGCUCAAAGCAAAGCAACC AAUGAGUGGAUAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUCAGAUAGAAUCAUCUGGAGUGGUCCAUUUAUUUUUAUUACUACUUAUCUUCUUGGCACGAGUUAUCUUCAGUUUCUUAAGAUUA GGAUCAUUCUCAAUGGACCCAGCAAUAGUAAUCAGAAAAGGUUAUAAAAUGUUAUGGAGAAGGAUAAAAAAGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGACUGGUGACAAAAGGUGGCCAGUGGAG AUUGGCAACCCAUUAGAAAUCUGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGAUAGGUUUUGACCAGUCCAGUUUUUGAACAGAGAGUUAUUGGCUUCUUCUACUCCAUUGGUGCG GUGGUGGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUAACUGAAAACAGAGUUGGUGGAAAUGGUUGGUCUCUAGAAGCAGAGGAGAAGCGACCAGAGAGCACUAGCGGG
<i>CKX6-NAT b</i>	GGCGGAGAGAAGCCAUAAGGAGGAGCCUAGUUGAAGGAAAAAGUCACAAGAAAAGAAAGAUUCACGAAUCUUUUUAUCUUUGAUAAACAGCUUUUGACUCAGAUAGAAGCGCAAAAAGGAUUGG UUCUGUAUCAUCCGUGAGAGUAAAAGAAUGGUGGAACGUGCAAGGGAAAAAAUCCUUGUCUCUCUGUGGAAAAUAGGAGGCAUUUCACUAGUUGGGACCCAACAACACAUCUUGUA AACUAAAAGAGGCUGUGGCAGCUCAAAGCAAAGCAACCAAUGAGUGGAUAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUCAGAUAGAAUCAUCUGGAGUGGUCCAUUUAUUUUUAUACUACUUAU CUCUUGGCACGAGUUAUCUUCAGUUUCUUAAGAUUAGGAUCAUUCUCAAUGGAGCCAGCAAUAGUAUUCAGAAAGGUUAUAAAAUGUUAUGGAGAAGGAUUAAAAAAGAAAGAGAGAGAG AGAGAGAGAGACUGGUGACAAAAGGUGGCCAGUGGAGAUUUGUCACCCAUUAGAAAUCUGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGAUAGGUUUUGACCAGUCCAGUUUUUGAACAGAGAGUG AAGAAAGAAGUUGGGCUCUUCUACUCCAUUGGUGCGGUGGUGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUAACUGAAAACAGAGUUGGUGGAAAUGGUUGGUCUCUAGAAGCAGAGGAGAAGCGACC AGAGAGCACUAGCGGG
<i>CKX6-NAT c</i>	GGGUCUCAUGCAAAAUGUUUAUCCACAGCUCACCACCAGACACAUCAACAUAUGGAGCAGGGAAUCCACACUGUAGACCUGCAGCUUCUGGGGAUGGAGUGAUUCCAUUGUGUAUACA AUUCC AUGUCUUGUUUGAGCUUGGCCUUGGAGUGAAUGUCCACGACCUCUCGCUGCCACUGUAAGCUGUGAAUGAGUGCCCAUCAUCCAGAUUGUCGUUAGGCGAUGUCGUUACCGAUUUG GGAUGUAAGACCGCCAAAGGGAUCAACUGGUAUCGAUUUCCAAAUCUUUGAGGGCGUGAUGGACAUGUUAACUCCAAUUGGCCUACUAGGGGAAGCGCCUCAAAGAAGAAUGUGUCUAG AGAAGCAGCAAGCCAACUUAAGGCUAUGCAGCUGAGAAGCAAGAUGGUGAAACUUCUUAUAUAGCAUGGUUCUUUCCUGAGGAGGCUUGCAUGUAGAUAGCUCUAAGGCCUCUUGAUUU CUGAGAGACAAGAGUAUAGAAAACAAAGGAUGGAAAAGGGUUUUUGAUCUUUAUAAAUAUAAAUAUAAAAGUAGUGUAGUUUCGAAUUGGCCGAGGCAACCAAUCUCCGAAUUGGGGACUGAUUG UCUAAACAAAGGUAUAAAUAAGCUUUAUAGUUGAGGCCUCUCCCUUUUCUUGUUGGCCGAGAGAAGCCAUAAAAGGAGGAGCCUAGUUUAAGGAAAAAGUCACAAGAAAAGAAUGUACACGAU CUUUUAUCUUUUUGAUAAACAGUUAACCCACAACUUGGCUUUUCAAAGAAAAGGCAGACAAGAUCAUACCAUAACACUUUAUCUUUGAAACUUAACAUUUGAAGGAUUCUUUAUUUAUU AUCCUCUUAUCCCAUUGUUUCCAGUUGUAGGUUAGGUUAUUUGCUUUUUAGGCUGAGAUGAUUAUUAUGUGGUUUUUUACGGCUUUUGACUCAGAUAGAAGCGCAAAAAGGAUUGGUUCCUGUA UCAUCCGUGAGAGUAAAAGAAUGGUGGAACGUGCAAGGGAAAAAAUCCUUGUCUCUCUGUGGAAAAUAGGAGGCAUUUCACUAGUUGGGACCCAACAACACAUCUUGUAACUAAAA GAGGCUUGGGCAGCUCAAAGCAAAGCAACCAAUGAGUGGAUAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUCAGAUAGAAUCAUCUGGAGUGGUCCAUUUAUUUUUAUUAUCUUAUCUUCUUGG CACGAGUUACUUUCAGUUUCUUAAGAUUAGGAUCAUUCUCAAUGGAGGCAACAAUAGUUAUAAAAGUUAUAAAAGGAAAGGAUUAAAAAAGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGACUGGUGACAAAAGGUGGCCAGUGGAGAUUUGUCACCCAUUAGAAAUCUCGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGAUGAUGGUUUUGACCAGUCCAGUUUUUAACAGAGAGUGAAGAAAGA AGUUGGGCUCUUCUACUCCAUUGGUGCGGUGGUGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUAACUGAAAACAGAGUUGGUGGAAAUGGUUGGUCUCUAGAAGCAGAGGAGAAGCGACCAGAGAGCA CUAGCGGG
<i>CKX6-NAT d</i>	UACAUCUUUACUGAUAGAGUUUACUACAGAGAGAGAGAGGCCCCAAAUAUUCCACGAGACGACGGGUCAUGAGUAUGAGACUGCCUUUGAAAAUUUCGGUGGCCAGGCGCAAGAAUUGC CAAUGGAUCAUAUCUGGAUUUCCUCCUCAAAAUCUCCCCACUUGUCCCGAAAUGGGAUUCUCCACUCUUCUUCUUGUCGUGUAAUGGGCAGAUACUGCUUAACCCUAUCCCUUGCUUCU CUGAAUUCAGUAUUCUUCUUGCCUCUCAAAGAUUCUUCUACUCCAUCCUUUCCUGCCGACCCUGGAGUUGCCGAUGUUAAGGAUCGCCACCAGGAGGUUCAGCCAUGGAGUGGCACCUC ACUGCCUUUCGAGUCGAGUUUUAACUCAGACACAUGUACCCUGUCCAAAGAAUGCUUCAUAUGCUACCUCGGUUGUAAAACAGUGUCGACGUCACGUAGCUUAGCUCUGAUAAUGUUUCUUCAC UUCUGGAUUGGACAAAUAUAUAUAUUUUCAGUUCCAAUGAAUGUCAUCUACCAAAGAAGAUUCUACCGAUUGCUUCUACUCUGUUUCUACCCUGGUUGAUUAACGCUUUUGUUAUCUUGCU UCAAAUACUUGGCUAGCUCACAGACAAUACAGAGUCCUCCAUAACCUUGAAUUGGCUUCUUAAGGCUCUUCUGCGGUGAAAGACAACUCCAGCUGUUCAGGAGGCCUGUCUGUUUAU UAUCACAAACCCUUCUAUGUAUUCGAAUUUGGGCCUGGGCAGAUUAUAGUUGCUUCUUGGCUUUGGCAAAAGCUGCAAAAUCAGGCUUUUGACUCAGAUAGAAGCGCAAAAAGGAUUGGUUC

CUGUAUCAUCCGUGAGAGUAAAAGAAUGGUGGAAACGUGCAAGGGAAAAAUCCUUGUGCUCUCUGUGGGAAAAUAGGAGGCAAUUUCACUAGUGUUGGACCCAAACAACAUAUCCUUGUAAAC
UAAAAGAGGCUGUGGCAGCUCAAAAGCAAAGCAACCAUAGAGUAAGUCUUCUGUUACCUGACUGAUUUAAAGGCCUCCCAUUGCAGCUAGCUGACAAAACUAAAUGAAUCAUCUCUUCUUUUUCU
AAAUUCUUUUGAUCAGACAUUAUGAUAAGAUAUAGCUUUUAUUAUGCUUUAGUUAACUUUUGCUAAACAUCGGGCAGGUGGAUAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUUCAGAUAGAAUCAUC
UGGAGUGGUCCAUUUAUUUUUAUUACUACUUCUUCUUGGCACGAGUUACUUUCAGUUUCUUAAGAUUAGGUAUUCUUAAGAUUAGGUAUUCUUAAGAUUAGGUAUUCUUAAGAUUAGGUAUUCUUAAGAUU
GUUAUGGAGAAGGAUUAAAAAGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGACUGGUGACAAAAGGUGGCCAGUGGAGAUAUGGCACCCAUUAGAAAUCUCGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGA
UGAUGGUUUGACCAGUCCAGUUUAGAACAGAGAGUGAAGAAAGAAGUUGGGCUUCUCUACAUCUCAUUGGUGCGGUGGUGGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUGAACUGAAAACAGAGUUGGUGG
AAAUGGUUGGUCUCUAGAAGCAGAGAGAGAAGCGACCAGAGAGACUAGCGGG

CKX6-NAT e

AUGUACAAUCUUUACUGAUAGAGUUACUACAGAGAGAGAGAGAGGCCUAAAUAUUCACAGACGACGGGUCAUGAGUAUGAGACUGCCUUUUGAAAAUUCGGUGGCCAGGGCGAAGAAU
UGCCAAUGGAUCAUAUCUGGAUUUCUCCUCACAAAUCUCCCCACUUGUCGCCGAAAUGGGAUCUCCACUCUUCUUCUUGUCGUGUAAUGUGGCAGAUACUGCUUCAACCCUAUCCUGCUUCU
UCACUGAAUCCAGUAUUCUUCUGUUCCGCCUCAAGAUCUCUUCUACUCCAUCUUCUUGCCGACCCUGGAGAUGCCGAUGUUAAGGAUCGCCACCAGGCUUUUGACUCAGAUAGCGCAAAA
AGGAUUGGUUCCUGUAUCAUCCGUGAGAGUAAAAGAAUGGUGGAAACGUGCAAGGGAAAAAUCCUUGUCUCUCUGUGGAAAAUAGGAGGCAUUUCACUAGUUGGACCCAAACAACACAA
UCCUUGUAAACUAAAAGAGGCUGUGGCAGCUCAAAAGCAAAAGCAACCAUAGAGUGGAUAAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUUCAGAUAGAAUCAUCUGGAGUGGUCAUUUAUUUUUAUUCUA
CUUACUAUCUCUUUGGCAGAGUUACUUUCAGUUUCUUAAGAUAUAGGAUCAUUCUUCUUAUGGAGCCAGCAAUAGUAAUCAGAAAAGGUUAUAAAAGUUAUGGAGAAGGAUUAAAAAGAAAAG
AGAGAGAGAGAGAGAGACUGGUGACAAAAGGUGGCCAGUGGAGAUUGGCACCCAUUAGAAAUCUCGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGAUAGUUGGUUUGACCAGUCCAGUUUUGAAC
AGAGAGUGAAGAAAAGUUGGGCUCUUCUACAUCUCAUUGGUGCGGUGGUGGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUGAACUGAAAACAGAGUUGGUGGAAAUGGUUGGUCUCUAGAAGCAGAGGAG
AAGCACCAGAGAGACUAGCGGG

CKX6-NAT f

AUGUACAAUCUUUACUGAUAGAGUUACUACAGAGAGAGAGAGAGGCCUAAAUAUUCACAGACGACGGGUCAUGAGUAUGAGACUGCCUUUUGAAAAUUCGGUGGCCAGGGCGAAGAAU
UGCCAAUGGAUCAUAUCUGGAUUUCUCCUCACAAAUCUCCCCACUUGUCGCCGAAAUGGGAUCUCCACUCUUCUUCUUGUCGUGUAAUGUGGCAGAUACUGCUUCAACCCUAUCCUGCUUCU
UCACUGAAUCCAGUAUUCUUCUGUUCCGCCUCAAGAUCUCUUCUACUCCAUCUUCUUGCCGACCCUGGAGAUGCCGAUGUUAAGGAUCGCCACCAGGAGGUUCAGCCAUGGAUGGGACCU
CCCACUGCCUUUCGAUCGGAGUUUACUCCAGACACAUUACCCUGUCUCAAAGAAUGCUUCAUAUUGCUACUCCGUUGUAAACAGUGUCGACGUCACGUAAGCUUAGCUUCUUAUUGUUUCUU
CACUUCUGGAUUGGACAAAUAUAUAUAUUUUCAGUUCCAAUGAAUGUCAUCUACCAAAGAAGAUUCUACCGAUUGCUUCUACUCUGUUUUCUACCUGGUUGAUUACGUCUUUGUUAUCU
GCUUCAAAUACUUGGCUAGCUCAGACAAUACAGAGUCCUCCAUAACAUCUUAAGGCUUCUUGCGGUGAAAGACAACCUCAGCUGUUCAGGAGGCCUGUCCUGUU
UAUUUAUCACAAAACCUUCUAUGUAAUCGAAUUUGUGGCCUUGGGCAGAUUAUAGUUGCUUCUUGGUCUUGGCAAAAAGCUGCAAAAUCAGUUAAGUAACAUAUGCUAGUUCUGUGGCCAUUGUCGG
AAUGCCUGGCCGUUAUUCAGCAUUGGACAGAGUACCACUACAGUUAUAAUGCAGCUCACCACCAGACACAUAACAUAUGGAGCAGGGGAAUCCACACUGUAGACCUGCAGCUUCUGGGGAU
GGAGUGAUUCCAUGUGUAUAACAUAUCCAUGUCUUGUUGAGCUUUGGCCUUGGAGUGAAUGUCCAGACCUCUCGUCGCCACUGUAAGCUGUGAAUGAGUGCCCAUAUCCAGAUGUGUCGUAU
CGUUGAGGCGAUGUCGCUUACCGAUUUGGGAUUGAAGACCGCAAAGGGAUCAACUGGUAUCGAUUUCCAAAUCUUGGAGGCGUGAUGGACAUGUUCAAAUCCAAUUGGCCUACUAGGGGA
AGCGCCUUCAAAAGAAAGAAUGCUGCUAGAGAAGCAGCAAGCCAAUCUUAAGGCUAUGCAGCUGAGAAGCAAGAUUGGCUUUUGACUCAGAUAGGCGAAAAGGAUUGGUUCCUGUAUCAUCCG
UGAGAGUAAAAGAAUGGUGGAACGUGCAAGGGAAAAAAAUCCUUGUGCUCUCUGUGGGAAAAUAGGAGGCAAUUUCACUAGUUGUUGGACCCAAACAACAUAUCCUUGUAAAACUAAAAGAGGCUG
UGGCAGCUCAAAAGCAAAGCAACCAUAGAGUGGAUAAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUUCAGAUAGAAUCAUCUGGAGUGGUCAUUUAUUUUUAUUACUUCUUCUUCUUGGCACGAGU
UACUUCUUCAGUUUCUUAAGAUUAGGAUCAUUCUUAUUGGAGCCAGCAAUAGUAAUCAGAAAAGGUUAUAAAAGUUAUGGAGAAGGAUUAAAAAGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGACUGG
UGACAAAAGGUGGCCAGUGGAGAUUGGCACCCAUUAGAAAUCUCGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGAUAGUUGGUUUGACCAGUCCAGUUUUGAACAGAGAGUGAAGAAAGAAGUUGGG
CUCUUCUCAACUCAUUGGUGCGGUGGUGGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUGAACUGAAAACAGAGUUGGUGGAAAUGGUUGGUCUCUAGAAGCAGAGGAGAAGCGACCAGAGAGACUAGCGG
G

CKX6-NAT g

GCUGUGGCAGCUCAAAAGCAAAGCAACCAUAGAGUAAGUCUUCUGUUACCUGACUGAUUUAAAGGCCUCCCAUUGCAGCUAGCUGACAAAACUAAAUGAAUCAUCUCUUCUUUUUUUUUUUUUU
UUGAUCAGACAUUAUGAUAAGAUAUAGCUUUUAUUAUAGCUUUUAGUUAACUUUUGCUUAAACAUCGGGCAGGUGGAUAAACAGAGAGGGACUCACUGCUUCUUCAGAUAGAAUCAUCUGGAGUGG
UCCAUUUAUUUUUAUACUACUUAUCUUCUUGGCACGAGUUAUUCAGUUUCUUAAGAUUAGGAUCAUUCUUAAGGAGCCAGCAAUAGUAAUCAGAAAAGGUUAUAAAAGUUAUGGA
GAAGGAUUAAAAAGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGACUGGUGACAAAAGGUGGCCAGUGGAGAUUUGGCACCCAUUAGAAAUCUCGAGUGUAGGAGUAGGGUCAAAAGAGAGAUAGUUGUU
UGACCAGUCCAGUUUUGAACAGAGAGUGAAGAAAAGAUUUGGGCUCUUCUACAUCUCAUUGGUGCGGUGGUGGGCAUUGCAGAAUGAGGUGUGUGAACUGAAAACAGAGUUGGUGGAAAUGGUU
GGUCUCUAGAAGCAGAGGAGAAGCGACCAGAGAGCUCUAGCGGGAGAGUCUGGGGCAUAGCUUUGCCAAAGCAAUUCUUGGUCCAAUAUAAAUAUGCCUUUGAACAUUUGUCAGCCAAAG
UGUCGAAGGGACGGCUAUGGUGGUGUUGGAAGUGGAUUGGUCACGACUGGACCUCUCUGCAGUUUCACCUUUAUUAUAAUUGGUGCGUUCUCCACCUCUUCAGUGGCUUUUGUCCCC
CAUUAAACGUUUUUUUUCCACCUCAAAAAAAUAUAAAAGUGUGUGUUGUCUACCUUCUCUGUUUUUUUUUACAGUUUGGAAGAUUAUUAUUAUGAUUCUGUUUUUCAAAGAAAAGACUAC
UGGAGUAUGAUCCGUUUUCUUGCAUUAUUUUGAAAAUACAUAUCAGUUUUUUUUUU

Tabelle 27: Bioinformatische Vorhersage subzellulärer Lokalisation der CKX-NAT-Isoformen mittels Locate-R und IncLocator.

Transkript- isoform	Locate-R					IncLocator					
	Vorhergesagte Lokalisation	Wahrscheinlichkeiten für				Vorhergesagte Lokalisation	Wahrscheinlichkeiten für				
		Nukleus	Cytoplasma	Ribosom	Exosom		Nukleus	Cytoplasma	Cytosol	Ribosom	Exosom
<i>CKX1-NAT a</i>	Cytoplasma	0,13	0,68	0,05	0,14	Nukleus	0,53	0,32	0,03	0,03	0,08
<i>CKX1-NAT b</i>	Cytoplasma	0,16	0,65	0,05	0,14	Nukleus	0,63	0,30	0,02	0,02	0,03
<i>CKX1-NAT c</i>	Cytoplasma	0,18	0,59	0,06	0,17	Nukleus	0,79	0,17	0,01	0,01	0,02
<i>CKX1-NAT d</i>	Cytoplasma	0,00	0,90	0,01	0,09	Nukleus	0,84	0,14	0,01	0,00	0,01
<i>CKX1-NAT e</i>	Cytoplasma	0,06	0,66	0,06	0,22	Nukleus	0,85	0,13	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT f</i>	Cytoplasma	0,00	0,88	0,01	0,11	Nukleus	0,71	0,25	0,01	0,01	0,02
<i>CKX1-NAT g</i>	Cytoplasma	0,08	0,64	0,06	0,22	Nukleus	0,92	0,06	0,00	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT h</i>	Cytoplasma	0,00	0,88	0,01	0,11	Nukleus	0,82	0,15	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT i</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Cytoplasma	0,35	0,42	0,02	0,03	0,19
<i>CKX1-NAT j</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,87	0,09	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT k</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,88	0,09	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT l</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,80	0,17	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT m</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,77	0,18	0,02	0,00	0,03
<i>CKX1-NAT n</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,86	0,11	0,01	0,00	0,03
<i>CKX1-NAT o</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,87	0,10	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT p</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,84	0,12	0,01	0,00	0,03
<i>CKX1-NAT q</i>	Cytoplasma	0,27	0,36	0,12	0,25	Nukleus	0,89	0,08	0,01	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT r</i>	Cytoplasma	0,24	0,32	0,17	0,28	Nukleus	0,66	0,29	0,01	0,01	0,04
<i>CKX1-NAT s</i>	Cytoplasma	0,27	0,36	0,12	0,25	Nukleus	0,65	0,26	0,01	0,01	0,07
<i>CKX1-NAT t</i>	Cytoplasma	0,01	0,89	0,02	0,09	Nukleus	0,74	0,22	0,02	0,00	0,02
<i>CKX1-NAT u</i>	Cytoplasma	0,15	0,47	0,13	0,25	Nukleus	0,73	0,20	0,01	0,01	0,05
<i>CKX1-NAT v</i>	Cytoplasma	0,18	0,48	0,08	0,26	Cytoplasma	0,32	0,49	0,01	0,01	0,16
<i>CKX5-NAT a</i>	Cytoplasma	0,00	0,99	0,01	0,00	Nukleus	0,77	0,19	0,01	0,01	0,03
<i>CKX5-NAT b</i>	Cytoplasma	0,00	0,99	0,01	0,00	Nukleus	0,72	0,25	0,01	0,00	0,02
<i>CKX5-NAT c</i>	Cytoplasma	0,00	0,99	0,01	0,00	Nukleus	0,83	0,14	0,01	0,00	0,01

Transkript- isoform	Locate-R					IncLocator					
	Vorhergesagte Lokalisation	Wahrscheinlichkeiten für				Vorhergesagte Lokalisation	Wahrscheinlichkeiten für				
		Nukleus	Cytoplasma	Ribosom	Exosom		Nukleus	Cytoplasma	Cytosol	Ribosom	Exosom
<i>CKX5-NAT d</i>	Cytoplasma	0,02	0,82	0,12	0,04	Nukleus	0,73	0,19	0,01	0,01	0,06
<i>CKX6-NAT a</i>	Cytoplasma	0,48	0,50	0,02	0,00	Nukleus	0,66	0,31	0,01	0,01	0,02
<i>CKX6-NAT b</i>	Cytoplasma	0,01	0,93	0,06	0,00	Cytoplasma	0,11	0,43	0,15	0,07	0,24
<i>CKX6-NAT c</i>	Cytoplasma	0,00	0,98	0,02	0,00	Cytoplasma	0,06	0,72	0,10	0,05	0,07
<i>CKX6-NAT d</i>	Nukleus	0,55	0,44	0,01	0,00	Cytoplasma	0,53	0,44	0,01	0,01	0,02
<i>CKX6-NAT e</i>	Cytoplasma	0,42	0,55	0,03	0,00	Cytoplasma	0,20	0,62	0,04	0,03	0,10
<i>CKX6-NAT f</i>	Nukleus	0,60	0,40	0,00	0,00	Nukleus	0,68	0,28	0,01	0,01	0,03
<i>CKX6-NAT g</i>	Cytoplasma	0,03	0,94	0,03	0,00	Cytoplasma	0,39	0,56	0,02	0,01	0,02

Tabelle 29: Hinweise auf die Existenz von NATs an CKX-Loci verschiedener Pflanzenspezies.

CKX-Homolog ¹ Genname ²	NCBI-ID des Genlocus	Spezies	Annotierte Antisense-Transkripte		Länge [nt]	Typ ⁴	CDS Länge [nt]	Position	Intronannotation	
			NCBI-ID des NAT bzw.NAT-Locus	Genname des NAT ³					Intron ⁵	Alternatives Spleißen ⁶
<i>AtCKX1</i>	AT2G41510	<i>A. thaliana</i>	AT2G41505.1 AT2G41505.2 AT2G41505.3 AT2G41515		804 469 465 886	proteinkodierend proteinkodierend proteinkodierend proteinkodierend	321 321 321 780	<i>head-to-head</i> <i>head-to-head</i> <i>head-to-head</i> <i>tail-to-tail</i>	n.a.	
<i>AtCKX2</i>	AT2G19500	<i>A. thaliana</i>	AT2G00640.1 AT2G00640.2 AT2G00640.3 AT2G19490 AT2G07235	<i>RecA2</i>	1011 1814 1111 1249 231	nicht-kodierend nicht-kodierend nicht-kodierend proteinkodierend nicht-kodierend	 1293 	<i>head-to-head</i> <i>head-to-head</i> <i>head-to-head</i> <i>tail-to-tail</i> Promotor	n.a.	
<i>AtCKX3</i>	AT5G56970	<i>A. thaliana</i>							n.a.	
<i>AtCKX4</i>	AT4G29740	<i>A. thaliana</i>							n.a.	
<i>AtCKX5</i>	AT1G75450	<i>A. thaliana</i>	AT1G09553 AT1G75440	<i>ubiquitin-conjugating enzyme 16</i>	390 892	nicht-kodierend proteinkodierend	 486	<i>head-to-head</i> <i>tail-to-tail</i>	n.a.	
<i>AtCKX6</i>	AT3G63440	<i>A. thaliana</i>	AT3G63445.1 AT3G63445.2 AT3G63445.3 AT3G63445.4 AT3G63445.5 AT3G63445.6		2417 2078 1327 1739 942 973	nicht-kodierend nicht-kodierend nicht-kodierend nicht-kodierend nicht-kodierend nicht-kodierend	 	<i>head-to-head</i> <i>fully overlapping</i> <i>fully overlapping</i> <i>fully overlapping</i> <i>head-to-head</i> <i>fully overlapping</i>	n.a.	
<i>AtCKX7</i>	AT5G21482	<i>A. thaliana</i>							n.a.	
<i>AICKX1</i>	LOC9317846	<i>A. lyrata</i>	LOC110228910 ARALYDRAFT_903471 LOC110228908 LOC110228909		284 221 473 638	nicht-kodierend proteinkodierend proteinkodierend nicht-kodierend	 168 165 	<i>fully overlapping</i> <i>tail-to-tail</i> Promoter Promoter	ja	ja
<i>AICKX2</i>	LOC9322103	<i>A. lyrata</i>							ja	nein
<i>AICKX3</i>	LOC9302249	<i>A. lyrata</i>							ja	nein
<i>AICKX4</i>	LOC9305487	<i>A. lyrata</i>							nein	
<i>AICKX5</i>	LOC9325089	<i>A. lyrata</i>	LOC110230768 LOC110230769 LOC110230770 LOC110230771	<i>probable ubiquitin- conjugating enzyme E2 16 isoform X1</i> <i>probable ubiquitin- conjugating enzyme E2 16 isoform X2</i> <i>probable ubiquitin- conjugating enzyme E2 16 isoform X3</i> <i>probable ubiquitin- conjugating enzyme E2 16 isoform X4</i>	915 689 644 818	proteinkodierend	486 411 411 402	<i>tail-to-tail</i> <i>tail-to-tail</i> <i>tail-to-tail</i> <i>tail-to-tail</i>	ja	ja

ANHANG

CKX-Homolog ¹			Annotierte Antisense-Transkripte					Intronannotation		
Genname ²	NCBI-ID des Genlocus	Spezies	NCBI-ID des NAT bzw. NAT-Locus	Genname des NAT ³	Länge [nt]	Typ ⁴	CDS Länge [nt]	Position	Intron ⁵	Alternatives Spleißen ⁶
AICKX6	LOC9312791	A. lyrata	LOC110228168		1187	nicht-kodierend		Promotor	nein	
			LOC9312792	<i>zinc finger CCCH domain-containing protein 46</i>	2354	proteinkodierend	1275	<i>tail-to-tail</i>	nein	
<i>AICKX7</i>	LOC9308045	<i>A. lyrata</i>							nein	
<i>BrCKX1-X1</i>	LOC103866566	<i>B. rapa</i>							nein	
BrCKX1-X2	LOC103865890	B. rapa							ja	nein
<i>BrCKX1-X3</i>	LOC103857986	<i>B. rapa</i>	LOC103857985	<i>S-formylglutathione hydrolase</i>	1087	proteinkodierend	855	<i>tail-to-tail</i>	nein	
<i>BrCKX2-X1</i>	LOC103249144	<i>B. rapa</i>							nein	
<i>BrCKX2-X2</i>	LOC103849258	<i>B. rapa</i>							nein	
<i>BrCKX3-X1</i>	LOC103249171	<i>B. rapa</i>							nein	
<i>BrCKX3-X2</i>	LOC103845129	<i>B. rapa</i>							nein	
<i>BrCKX4</i>	LOC103861901	<i>B. rapa</i>							nein	
<i>BrCKX5</i>	LOC103831996	<i>B. rapa</i>	LOC103831997	<i>probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 16</i>	732	proteinkodierend	486	<i>tail-to-tail</i>	nein	
BrCKX6	LOC103842132	B. rapa	LOC103842133		845	nicht-kodierend		head-to-head	ja	ja
<i>BrCKX7-X1</i>	LOC103845596	<i>B. rapa</i>							nein	
<i>BrCKX7-X2</i>	LOC103851408	<i>B. rapa</i>							nein	
CsCKX1	LOC101222887	C. sativus							ja	nein
<i>CsCKX2</i>	LOC101207014	<i>C. sativus</i>							nein	
<i>CsCKX3-X1</i>	LOC101222481	<i>C. sativus</i>							nein	
<i>CsCKX3-X2</i>	LOC105434535	<i>C. sativus</i>							nein	
<i>CsCKX5</i>	LOC101212272	<i>C. sativus</i>	LOC101212996	<i>ribosomal RNA small subunit methyltransferase I</i>	3173	proteinkodierend	1098	<i>tail-to-tail</i>	nein	
CsCKX6	LOC101205347	C. sativus							ja	ja
<i>CsCKX7</i>	LOC101217899	<i>C. sativus</i>							nein	
CsCKX9	LOC101217722	C. sativus	LOC105434997		3656	nicht-kodierend		head-to-head	ja	ja
			LOC105434997		3652	nicht-kodierend		head-to-head		
			LOC105434997		2935	nicht-kodierend		head-to-head		
			LOC101207074		1257	proteinkodierend	381	<i>tail-to-tail</i>		
			LOC101207074		772	proteinkodierend	369	<i>tail-to-tail</i>		
<i>PtCKX1-X1</i>	LOC7496121	<i>P. trichocarpa</i>	LOC7473603		835	proteinkodierend	471	<i>tail-to-tail</i>	nein	
			LOC7473603		834	proteinkodierend	423	<i>tail-to-tail</i>		
			LOC7473603		827	proteinkodierend	471	<i>tail-to-tail</i>		
			LOC7473603		807	proteinkodierend	423	<i>tail-to-tail</i>		
			LOC7473603		768	proteinkodierend	423	<i>tail-to-tail</i>		
<i>PtCKX1-X2</i>	LOC7468923	<i>P. trichocarpa</i>	LOC18106124		634	proteinkodierend	474	<i>tail-to-tail</i>	nein	
			LOC18106124		805	proteinkodierend	375	<i>tail-to-tail</i>		
			LOC18106124		742	proteinkodierend	375	<i>tail-to-tail</i>		

ANHANG

CKX-Homolog ¹ Genname ²	NCBI-ID des Genlocus	Spezies	NCBI-ID des NAT bzw. NAT-Locus	Annotierte Antisense-Transkripte			CDS Länge [nt]	Position	Intronannotation						
				Genname des NAT ³	Länge [nt]	Typ ⁴			Intron ⁵	Alternatives Spleißen ⁶					
<i>PtCKX3-X1</i>	LOC7497623	<i>P. trichocarpa</i>	LOC18099677	<i>ribosomal RNA small subunit methyltransferase I</i>	1663	proteinkodierend	1089	<i>tail-to-tail</i>	nein						
<i>PtCKX3-X2</i>	LOC7462570	<i>P. trichocarpa</i>							nein						
<i>PtCKX5-X1</i>	LOC7479715	<i>P. trichocarpa</i>							nein						
<i>PtCKX5-X2</i>	LOC7477637	<i>P. trichocarpa</i>							nein	nein					
<i>PtCKX6-X1</i>	LOC18094319	<i>P. trichocarpa</i>							LOC112326286	521	nicht-kodierend	head-to-head	ja	ja	
<i>PtCKX6-X2</i>	LOC7462767	<i>P. trichocarpa</i>							LOC112326796	639	nicht-kodierend	tail-to-tail	ja	ja	
									LOC112326797	1471	nicht-kodierend	head-to-head			
<i>PtCKX7</i>	LOC7492296	<i>P. trichocarpa</i>												nein	
<i>VvCKX1</i>	LOC100260570	<i>V. vinifera</i>												ja	ja
<i>VvCKX3-X1</i>	LOC100853726	<i>V. vinifera</i>												nein	
<i>VvCKX3-X2</i>	LOC100265401	<i>V. vinifera</i>						nein							
<i>VvCKX3-X3</i>	LOC100854562	<i>V. vinifera</i>						nein							
<i>VvCKX3-X4</i>	LOC100242449	<i>V. vinifera</i>						nein							
<i>VvCKX3-X5</i>	LOC100263730	<i>V. vinifera</i>						nein							
<i>VvCKX5-X1</i>	LOC100267760	<i>V. vinifera</i>	VIT_00009787001		177	proteinkodierend	177	head-to-head	nein						
<i>VvCKX5-X2</i>	LOC100852458	<i>V. vinifera</i>	VIT_00028613001		188	proteinkodierend	129	intronic	nein						
<i>VvCKX7-X1</i>	LOC100245978	<i>V. vinifera</i>							nein						
<i>VvCKX7-X2</i>	LOC100245801	<i>V. vinifera</i>							nein						
<i>VvCKX9</i>	LOC100256802	<i>V. vinifera</i>	LOC104881297		6146	nicht-kodierend		tail-to-tail	ja	ja					
			LOC104881297		5852	nicht-kodierend		tail-to-tail							
			LOC104881297		5855	nicht-kodierend		tail-to-tail							
			LOC104881297		4073	nicht-kodierend		tail-to-tail							
			LOC104881297		5217	nicht-kodierend		tail-to-tail							
			LOC104881297		6138	nicht-kodierend		tail-to-tail							
<i>OsCKX1</i>	LOC4325668	<i>O. sativa</i>							nein						
<i>OsCKX2</i>	LOC4327333	<i>O. sativa</i>							nein						
<i>OsCKX3</i>	LOC4348932	<i>O. sativa</i>							nein						
<i>OsCKX4</i>	LOC4326515	<i>O. sativa</i>							ja	ja					
<i>OsCKX5</i>	LOC4327887	<i>O. sativa</i>							nein						
<i>OsCKX6</i>	LOC107275892	<i>O. sativa</i>	Os02g0219950		570	proteinkodierend	570	<i>head-to-head</i>	nein						
<i>OsCKX7</i>	LOC107275724	<i>O. sativa</i>	Os02g0220050		408	proteinkodierend	408	<i>head-to-head</i>	nein						
<i>OsCKX8</i>	LOC107275925	<i>O. sativa</i>							nein						
<i>OsCKX9</i>	LOC4338605	<i>O. sativa</i>	LOC4338604		2957	nicht-kodierend		fully overlapping	ja	ja					
			Os05g0374000		315	proteinkodierend	315	Promotor							
<i>OsCKX10</i>	LOC107276418	<i>O. sativa</i>	Os06g0572350		372	proteinkodierend	372	overlapping	nein						

ANHANG

CKX-Homolog ¹ Genname ²	NCBI-ID des Genlocus	Spezies	NCBI-ID des NAT bzw. NAT-Locus	Annotierte Antisense-Transkripte			CDS Länge [nt]	Position	Intronannotation	
				Genname des NAT ³	Länge [nt]	Typ ⁴			Intron ⁵	Alternatives Spleißen ⁶
<i>OsCKX11</i>	LOC4345764	<i>O. sativa</i>	Os08g0460650		339	proteinkodierend	339	<i>tail-to-tail</i>	nein	
<i>ZmCKO1</i>	LOC542585	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKO2</i>	LOC542507	<i>Z. mays</i>	LOC103650766			nicht-kodierend		<i>tail-to-tail</i>	ja	ja
			LOC103650766		1218	proteinkodierend	399	<i>fully overlapping</i>		
			LOC103650766		1195	proteinkodierend	399	<i>fully overlapping</i>		
<i>ZmCKO3</i>	LOC542056	<i>Z. mays</i>							ja	ja
<i>ZmCKX4-X1</i>	LOC100272805	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX4-X2</i>	LOC100526752	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX5</i>	LOC100526749	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX6</i>	LOC100526750	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX7</i>	LOC103654801	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX8</i>	LOC100526747	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX9</i>	LOC103640050	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX10</i>	LOC100280446	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX11</i>	LOC103641859	<i>Z. mays</i>							nein	
<i>ZmCKX12</i>	LOC100526753	<i>Z. mays</i>							ja	nein
<i>SmCKX1-X1</i>	LOC9637003	<i>S. moellendorffii</i>							nein	
<i>SmCKX1-X2</i>	LOC9657515	<i>S. moellendorffii</i>							nein	
<i>SmCKX2-X1</i>	LOC9629067	<i>S. moellendorffii</i>							nein	
<i>SmCKX2-X2</i>	LOC9639361	<i>S. moellendorffii</i>							nein	
<i>PpCKX9-X1</i>	LOC112285983	<i>P. patens</i>							nein	
<i>PpCKX9-X2</i>	LOC112275628	<i>P. patens</i>							nein	
<i>PpCKX9-X3</i>	LOC112273101	<i>P. patens</i>							nein	
<i>PpCKX9-X4</i>	LOC112285956	<i>P. patens</i>							nein	
<i>PpCKX9-X5</i>	LOC112276425	<i>P. patens</i>							nein	
<i>PpCKX9-X6</i>	LOC112276058	<i>P. patens</i>	LOC112276059	<i>triacylglycerol lipase 1-like</i>	2284	proteinkodierend	1686	<i>tail-to-tail</i>	nein	

n.a. keine Informationen verfügbar

¹ Gene homologer CKX-Proteine identifiziert mittels KEGG Orthology (Tabelle 7; Stand 03.05.2019)

² Name entspricht dem KEGG *Gene name*

³ Name entspricht dem NCBI *Protein title*

⁴ Klassifizierung der proteinkodierenden bzw. nicht-kodierenden Transkripten in Abhängigkeit von der Länge existierender CDS (> 300 nt: proteinkodierend ; ≤ 300 nt: nicht-kodierend)

⁵ Existenz von Intron-überspannenden RNA-Seq-Sequenzen, deren Introngrenzen den eukaryontischen Konsensussequenzen entsprechen

⁶ Existenz von mindestens zwei Introns mit unterschiedlichen Größen für den gleichen Sequenzbereich

Loci mit Hinweisen auf nicht-kodierende NATs (annotierte Transkripte überlappend mit *CKX*-Transkript bzw. ≤1000 bp *upstream* von *CKX*-Transkript und ORF ≤ 300 bp oder annotierte Introns überlappend mit *CKX*-Transkript) sind fettgedruckt.



Abbildung 34: Genloci von *PtCKX1-X1*, *PtCKX1-X2* und *BrCKX1-X3*.

Transkriptannotationen an den Loci der CKX1-Homologe, für welche keine Hinweise auf die Existenz eines IncNAT gefunden wurden. Darstellung der Annotation von Transkripten und Intronbereichen modifiziert nach der Visualisierung der Loci im NCBI Graphical Sequence Viewer (Tabelle 8; Stand 08.05.2020).

Tabelle 30: Identifizierung von homologen Transkriptsequenzen mittels BLAST. Homologe Sequenzen mit gegenläufiger Orientierung sind in grau dargestellt.

NCBI Annotation ¹	Spezies	<i>E-value</i> ²	<i>Query cover</i> ³	<i>Identity</i> ⁴	Beschreibung
BLAST-Analyse für <i>CKX1-NAT f</i>					
LOC104793064	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	84.79%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 268 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104793063)
LOC104785228, Transkriptisofom X13	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	84.55%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X10	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	83.99%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X9	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	83.99%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X5	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	83.99%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X4	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	83.99%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X3	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	83.99%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X1	<i>Camelina sativa</i>	0.0	72%	83.99%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC110228908	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	33%	93.32%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 165, <i>upstream</i> NAT von <i>CKX1</i> (LOC9317846)
LOC104785228, Transkriptisofom X12	<i>Camelina sativa</i>	7e-173	63%	86.14%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC110228909	<i>Arabidopsis lyrata</i>	3e-164	28%	92.35%	<i>upstream</i> lncNAT von <i>CKX1</i> (LOC9317846)
LOC104785228, Transkriptisofom X2	<i>Camelina sativa</i>	8e-153	66%	83.65%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104782643, Transkriptisofom X5	<i>Camelina sativa</i>	5e-124	40%	86.70%	lncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)
LOC104785228, Transkriptisofom X11	<i>Camelina sativa</i>	3e-114	50%	87.43%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X8	<i>Camelina sativa</i>	3e-114	61%	87.43%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X7	<i>Camelina sativa</i>	3e-114	59%	87.43%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC104785228, Transkriptisofom X6	<i>Camelina sativa</i>	3e-114	65%	87.43%	lncNAT von <i>CKX1-like</i> (LOC104785229)
LOC9315992	<i>Arabidopsis lyrata</i>	2e-110	44%	73.26%	<i>F-box/kelch-repeat protein</i>
LOC17887842	<i>Capsella rubella</i>	7e-103	22%	88.82%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC111831218, Transkriptisofom X6	<i>Capsella rubella</i>	4e-100	40%	81.59%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 185 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1</i> (LOC17887842)
LOC104785229	<i>Camelina sativa</i>	2e-91	21%	87.54%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC104793063	<i>Camelina sativa</i>	2e-91	22%	86.17%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC111831218, Transkriptisofom X5	<i>Capsella rubella</i>	4e-80	40%	75.06%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 185 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1</i> (LOC17887842)
LOC111831218, Transkriptisofom X4	<i>Capsella rubella</i>	3e-56	27%	77.52%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 185 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1</i> (LOC17887842)
LOC111831218, Transkriptisofom X3	<i>Capsella rubella</i>	3e-56	27%	77.52%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 185 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1</i> (LOC17887842)
LOC111831218, Transkriptisofom X1	<i>Capsella rubella</i>	3e-56	40%	77.52%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 185 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1</i> (LOC17887842)
LOC111831218, Transkriptisofom X2	<i>Capsella rubella</i>	4e-55	48%	77.36%	hypothetisch proteinkodierend, CDS 185 nt, <i>head-to-head</i> -NAT von <i>CKX1</i> (LOC17887842)
LOC103865890	<i>Brassica rapa</i>	5e-54	67%	76.04%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC104782643, Transkriptisofom X2	<i>Camelina sativa</i>	2e-52	41%	89.94%	lncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)

NCBI Annotation ¹	Spezies	E-value ²	Query cover ³	Identity ⁴	Beschreibung
LOC104782643, Transkriptisofom X3	<i>Camelina sativa</i>	9e-45	27%	84.88%	IncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)
LOC104782643, Transkriptisofom X6	<i>Camelina sativa</i>	2e-39	27%	81.11%	IncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)
LOC104782643, Transkriptisofom X7	<i>Camelina sativa</i>	3e-38	24%	84.66%	IncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)
LOC104782643, Transkriptisofom X4	<i>Camelina sativa</i>	3e-38	24%	84.66%	IncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)
LOC104782643, Transkriptisofom X1	<i>Camelina sativa</i>	3e-38	24%	84.66%	IncNAT von <i>CKX1</i> (LOC104782642)
LOC103857986, transcript variant X2	<i>Brassica rapa</i>	2e-28	8%	83.85%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC103857986, Transkriptisofom X1	<i>Brassica rapa</i>	6e-28	8%	83.72%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC18026475	<i>Eutrema salsugineum</i>	7e-27	5%	96.30%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC104801962	<i>Tarenaya hassleriana</i>	2e-26	18%	71.33%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC103866566	<i>Brassica rapa</i>	4e-24	23%	67.07%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC9317846	<i>Arabidopsis lyrata</i>	3e-18	7%	84.00%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC110228910	<i>Arabidopsis lyrata</i>	6e-15	4%	92.19%	<i>head-to-head</i> IncNAT von <i>CKX1</i> (LOC9317846)
LOC108811715, Transkriptisofom X2	<i>Raphanus sativus</i>	1e-11	7%	78.79%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC108811715, transcript variant X1	<i>Raphanus sativus</i>	4e-05	5%	78.08%	<i>CKX1</i> -Homolog
LOC117128008	<i>Brassica rapa</i>	0,005	4%	80,70%	
BLAST-Analyse für <i>CKX6-NAT e</i>					
LOC110228168	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	82%	88.12%	<i>upstream</i> IncNAT von <i>CKX6</i> (LOC9312791)
LOC104699532	<i>Camelina sativa</i>	0.0	74%	78.49%	<i>upstream</i> IncNAT von <i>CKX6</i> (LOC104704111)
LOC111830395	<i>Capsella rubella</i>	3e-176	65%	82.69%	<i>head-to-head</i> -IncNAT von <i>CKX6</i> (LOC17885237)
LOC112087125	<i>Eutrema salsugineum</i>	3e-145	65%	81.20%	<i>head-to-head</i> -IncNAT von <i>CKX6</i> (LOC18020194)
LOC103842133	<i>Brassica rapa</i>	8e-70	25%	79.63%	<i>head-to-head</i> -IncNAT von <i>CKX6</i> (LOC103842132)
LOC106406333	<i>Brassica napus</i>	3e-68	25%	79.08%	<i>head-to-head</i> -IncNAT von <i>CKX6</i> (LOC106406332)

¹ entsprechend der NCBI-Annotation

² *Expect value* (deutsch: Erwartungswert), näher beschrieben in Kapitel 2.2.8.1.2

³ prozentualer Anteil der Länge des Alignments an der Gesamtlänge der *Query*-Sequenz

⁴ prozentualer Anteil identischer Nukleotide von der Gesamtlänge des Alignments

Tabelle 31: Analyse der Sequenzidentität homologer intergenischer Bereiche verschiedener Spezies.

Spezies	Downstream von <i>At3g63230</i> -Homolog	Downstream von <i>At3g63240</i> -Homolog	Downstream von <i>At2g44940</i> -Homolog	Downstream von <i>At2g44950</i> -Homolog
<i>A. lyrata</i>	66,4%	75,5%	77,0%	50,5%
<i>C. sativa</i>	58,4%	42,2%	73,0%	63,4%
<i>C. rubella</i>	45,2%	57,9%	71,4%	54,2%
<i>E. salsugineum</i>	51,8%	57,0%	65,2%	42,5%

Sequenzidentitäten als prozentuale Anteile der identischen Nukleotide der orthologen Transkripte bezogen auf die Länge des Alignments

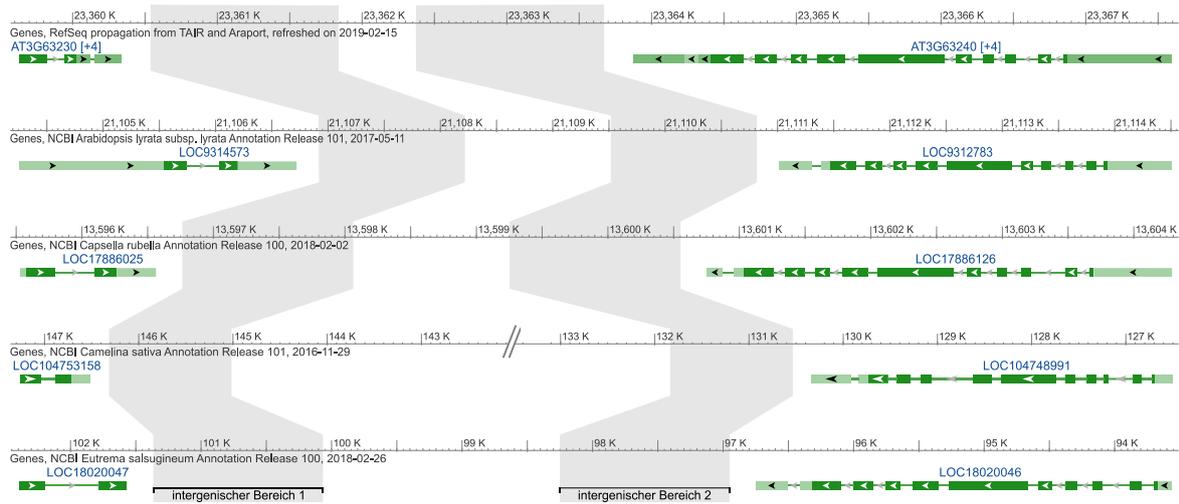


Abbildung 35: Darstellung der als Kontrollen genutzten intergenischen Bereiche downstream von *At3g63230* und downstream von *At3g63240*.

Schematische Darstellung genomischer Bereiche, welche als Kontrollen der durchschnittlichen Sequenzkonservierung homologer, nicht-funktioneller DNA-Bereiche genutzt wurden, am Beispiel der intergenischen Bereiche downstream der *At3g63230*-Homologen (intergenischer Bereich 1) und downstream der *At3g63240*-Homologen (intergenischer Bereich 2) der entsprechenden analysierten Spezies. Alignt wurden jeweils 1,3 kb lange Bereiche 200 bp downstream des jeweiligen Transkriptendes.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, ohne die diese Doktorarbeit niemals hätte fertiggestellt werden können.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Tomáš Werner danken, für die langjährige Betreuung, die zahlreichen Tipps und konstruktiven Diskussionen, die immer wieder neue Blickwinkel und Ideen hervorgebracht haben.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Thomas Schmülling für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt den permanenten und zeitweiligen Mitgliedern der 107er Crew, insbesondere Louisa Brock, Georgeta Leonte, Tianqi Guo, Michael Niemann, Henriette Weber, Tomáš Hluska, Antonia Niedobitek, Joshua Alcaniz und Philipp Grenz, für die wundervolle Zusammenarbeit, für die fachlichen und weniger fachlichen Gespräche im Institut, aber auch für die tollen Karaokeabende, die Dachterrassen-Grill-Events, die Casino-Weihnachtsfeier und all die anderen unvergesslichen Labactivities.

Natürlich möchte ich auch allen anderen Mitgliedern des Instituts für Angewandte Genetik danken für die offenen Ohren, die hilfreichen Hände und die unvergleichlich schöne Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich den TAs, die stets als Ansprechpartner für Laborfragen zur Verfügung standen und sich nebenbei noch alles Organisatorische gekümmert haben, dem Gärtnerteam, das den Durst meiner Pflänzchen gestillt hat, unseren Frauen in der Spülküche, Prof. Dr. Wolfgang Schuster für seinen unermüdlich Einsatz bei der Lösung von Computer- und Netzwerkproblemen und Sabine Thiel, die mir mehr als einmal bei Fragen zu Anträgen und Finanzen geholfen hat.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie mein unendlicher Dank. Meinen Eltern, Stiefeltern und Schwiegereltern danke ich für die beständige Unterstützung, die Flexibilität und das Verständnis - danke, dass ihr mir, wann immer nötig, den Rücken freigehalten habt! Dominique danke ich für seine Unterstützung, sein Durchhaltevermögen und die Hilfe beim Setzen von Prioritäten. Am meisten danke ich meinen Söhnen, Ben und Jim - dafür, dass sie mich mit ihrem Lächeln immer wieder motiviert und daran erinnern haben, das Wichtigste nicht aus den Augen zu verlieren.

Selbstständigkeitserklärung

zur

Dissertation

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel

**Molekulare und genetische Analyse natürlich-vorkommender *Antisense*-Transkripte an
Cytokininoxidase/-dehydrogenase-Genloci in *Arabidopsis thaliana***

um eine von mir selbst und ohne unerlaubte Beihilfe verfasste Originalarbeit handelt.

Ich bestätige überdies, dass die Arbeit als Ganze oder in Teilen nicht zur Abgeltung anderer Studienleistungen eingereicht worden ist.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche in der oben genannten Arbeit enthaltenen Bezüge auf fremde Quellen (einschließlich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich nach bestem Wissen sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen (Zitaten) als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen anderer Autorinnen oder Autoren (Paraphrasen) die Urheberschaft angegeben habe.

Ich nehme zur Kenntnis, dass Arbeiten, welche die Grundsätze der Selbstständigkeitserklärung verletzen – insbesondere solche, die Zitate oder Paraphrasen ohne Herkunftsangaben enthalten –, als Plagiat betrachtet werden können.

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit dieser Angaben.

25.01.2021

Jenny Engelmann

Datum, Name