

Charakterisierung der Cytokinin-*N*- Glucosyltransferase-Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* 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
Louisa Brock

Berlin 2020

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2012 bis Februar 2020 am Lehrstuhl für „Molekulare Entwicklungsbiologie der Pflanzen“ des Instituts für Biologie/Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Tomáš Werner angefertigt.

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

Disputation am 01.07.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
Zusammenfassung	x
Summary	xii
1 Einleitung	1
1.1 Das Pflanzenhormon Cytokinin	1
1.1.1 Die Cytokinin-Signaltransduktion	2
1.2 Der Cytokinin-Metabolismus	5
1.2.1 Die Cytokinin-Biosynthese	6
1.2.2 Die Interkonversion zwischen Cytokininbasen, Nucleosiden und Nucleotiden	7
1.2.3 Der Cytokininabbau	9
1.2.4 Die Konjugation der Cytokinine	10
1.2.5 Der Cytokinintransport	16
1.3 Das apikale Sprossmeristem.....	18
1.3.1 STM und Cytokinin im SAM	20
1.3.2 Die CLAVATA-WUSCHEL-Regulation	21
1.3.3 Die Organinitiation im SAM	22
1.4 Ansätze der reversen Genetik	22
1.5 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	27
2.1.2 Analysesets (Kits)	28
2.1.3 Oligonukleotide	28
2.1.4 Plasmide	29
2.1.5 Nährmedien und Zusätze	31
2.1.6 Mikroorganismen	32
2.1.7 Pflanzenmaterial	33
2.1.8 Software und Internetressourcen	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Arbeiten mit Mikroorganismen	35
2.2.2 Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden	42
2.2.4 Bestimmung der Transkriptabundanz	50
2.2.5 Nachweis und Analyse von Proteinen	53
2.3 Statistische Analysen	56
2.4 Kollaborationen	56
3 Ergebnisse	57

3.1	UGT76C1 und UGT76C2 sind im Zytosol und im Nukleus lokalisiert	57
3.2	<i>UGT76C2</i> zeigt gewebe- und entwicklungsspezifische Expressionsmuster.....	58
3.2.1	Die <i>UGT76C1</i> - und <i>UGT76C2</i> -Loci enthalten <i>cis</i> -regulatorische Elemente von B-Typ- ARR und WUSCHEL-Transkriptionsfaktoren	58
3.2.2	Reporterkonstrukte zur Untersuchung der Promotoraktivität von <i>UGT76C2</i>	60
3.2.3	Das Expressionsmuster von <i>UGT76C2</i> ist gewebe- und entwicklungsspezifisch.....	61
3.3	Die Überexpression von <i>UGT76C1-GFP</i> und <i>UGT76C2-GFP</i> beeinflusst die pflanzliche Entwicklung und die Cytokinin-Sensitivität	69
3.3.1	Herstellung von <i>UGT76C1</i> - und <i>UGT76C2</i> -Überexpressionslinien	69
3.3.2	Charakterisierung der <i>UGTC1ox</i> - und <i>UGTC2ox</i> -Linien.....	71
3.4	Herstellung von Linien, bei denen <i>UGT76C2-myc</i> gezielt in spezifischen Domänen des Meristems exprimiert wird.....	82
3.5	Herstellung von <i>ugt76c1 ugt76c2</i> Doppel-Knockout-Mutanten	83
3.5.1	<i>Ds</i> -Transposon-basierter Ansatz zur Herstellung einer <i>ugt76c1 ugt76c2</i> Doppelmutante.....	84
3.5.2	Anwendung des CRISPR/Cas9-Ansatzes zur Herstellung von <i>ugt76c1 ugt76c2</i> -Doppel-Knockout-Mutanten	91
3.6	Molekulare und phänotypische Charakterisierung der <i>ugt76c1,2</i> Doppel- Knockout-Mutanten	102
3.6.1	Der Doppel-Knockout von <i>UGT76C1</i> und <i>UGT76C2</i> führt zum Verlust der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierungsaktivität.....	102
3.6.2	Der Verlust der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung kann weitgehend kompensiert werden.....	104
3.6.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten	109
3.6.4	Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen <i>UGT76C1</i> und <i>UGT76C2</i> und bekannten Komponenten des Cytokininsignalwegs sowie des Cytokinin-Metabolismus	116
3.7	Die Knockout- und Knockdown-Mutanten von <i>UGT76C1</i> und <i>UGT76C2</i> haben unterschiedliche Phänotypen.....	120
3.7.1	Die <i>ugt76c1,2</i> -Knockdown-Mutanten können nicht komplementiert werden.....	123
3.8	Untersuchung der Toleranz von <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten und <i>UGTC2ox</i> -Linien gegenüber Salzstress und osmotischem Stress	125
4	Diskussion.....	127
4.1	<i>UGT76C1</i> und <i>UGT76C2</i> sind die einzigen Cytokinin- <i>N</i> -Glucosyltransferasen in <i>Arabidopsis</i>	127
4.2	Veränderungen der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierungsaktivität haben Auswirkungen auf die Cytokininhomöostase und den Cytokinin-Status	128
4.3	Veränderungen der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierungsaktivität wirken sich teilweise auf die Cytokinin-Sensitivität aus	131
4.4	Die Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung beeinflusst das Sprosswachstum.....	133
4.4.1	Die Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung ist an der Regulation des Blattwachstums beteiligt.....	135

4.4.2 Die regulative Funktion der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung im apikalen Sprossmeristem.....	138
4.5 Der Einfluss der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung auf die Wurzelentwicklung.....	147
4.6 Der Vergleich der verwendeten Ansätze der reversen Genetik	151
5 Literaturverzeichnis.....	156
6 Anhang.....	175
7 Danksagung	183

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Chemische Struktur der Cytokinine und deren Modifikationen.....	2
Abbildung 2. Schematische Darstellung der Cytokininsignaltransduktion und der zellulären Verteilung der Komponenten der Cytokininhomöostase in <i>Arabidopsis</i>	4
Abbildung 3. Schematische Darstellung des Cytokinin-Metabolismus.....	8
Abbildung 4. Phylogenetischer Stammbaum der UDP-Glucosyltransferasen aus <i>Arabidopsis</i>	12
Abbildung 5. Der Aufbau des apikalen Sprossmeristems und die Verteilung makromolekularer Signale.....	19
Abbildung 6. Subzelluläre Lokalisation von freiem GFP sowie der Fusionsproteine UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP in Wurzeln stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.	58
Abbildung 7. Übersicht über die <i>cis</i> -regulatorischen Elemente von B-Typ-ARR- und WUS-Transkriptionsfaktoren im <i>UGT76C1</i> - und <i>UGT76C2</i> -Locus sowie über den Aufbau der <i>UGT76C2</i> -Reporterkonstrukte.....	59
Abbildung 8. Nachweis der <i>UGT76C2</i> -Reporteraktivität in Infloreszenzmeristemen von <i>Arabidopsis</i>	61
Abbildung 9. Auswirkung der Cytokininzugabe auf die <i>UGT76C2</i> -Reporteraktivität im Infloreszenzmeristem.	63
Abbildung 10. Nachweis der <i>UGT76C2</i> -Reporteraktivität in verschiedenen Blütenstadien von <i>Arabidopsis</i>	64
Abbildung 11. Nachweis der <i>UGT76C2</i> -Reporteraktivität im Hauptwurzelpapex von <i>Arabidopsis</i>	65
Abbildung 12. Nachweis der <i>UGT76C2</i> -Reporteraktivität während der Lateralwurzelentwicklung von <i>Arabidopsis</i>	66
Abbildung 13. Aktivität des <i>pUGT76C2:UGT76C2-GFP</i> -Reporters während der Embryogenese von <i>Arabidopsis</i>	67
Abbildung 14. Die Expression der Transgene und die Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierungsaktivität ist in homozygoten <i>UGTC1ox</i> - und <i>UGTC2ox</i> -Linien stark erhöht.....	70
Abbildung 15. Die Expression von Cytokininantwortgenen ist in den Überexpressionslinien <i>UGTC1ox</i> und <i>UGTC2ox</i> verringert.	71
Abbildung 16. Auswirkung der Überexpression von <i>UGT76C1-GFP</i> und <i>UGT76C2-GFP</i> auf den Cytokinin-Gehalt.....	73
Abbildung 17. In <i>UGTC1ox</i> - und <i>UGT76C2ox</i> -Überexpressions-Linien ist der Cytokinin-Metabolismus verändert.	74
Abbildung 18. Die Überexpression von <i>UGT76C1-GFP</i> und <i>UGT76C2-GFP</i> führt zu einer verminderten Cytokinin-Sensitivität.....	75
Abbildung 19. Behandlung der <i>UGTC1ox</i> - und <i>UGTC2ox</i> -Linien mit dem CKX-Inhibitor INCYDE.	76
Abbildung 20. Veränderung des Sprosswachstums von <i>UGTC1ox</i> und <i>UGTC2ox</i> -Pflanzen.	78

Abbildung 21. Das Wurzelwachstum von Pflanzen der <i>UGTC1ox</i> - und <i>UGTC2ox</i> -Linien ist verstärkt.	79
Abbildung 22. Die Penetranz der Phänotypen von <i>UGTC2ox</i> -Pflanzen ist unvollständig und der Ausprägungsgrad des Phänotyps wird nicht vererbt.	80
Abbildung 23. Der Phänotyp von <i>UGTC2ox</i> -Pflanzen ist abhängig von der Expressionsstärke.....	81
Abbildung 24. Herstellung von <i>STM:UGT76C2-myc-Arabidopsis</i> -Linien.....	83
Abbildung 25. Übersicht über das WiscDsLoxHs Transposon basierte Mutagenesesystem zur Herstellung von <i>ugt76c1 ugt76c2</i> -Doppel-Knockout-Mutanten und über den Ablauf des Screens.	85
Abbildung 26. Identifikation der HS2-Pools mit <i>Ds</i> -Transposon-Insertionen in den <i>UGT76C2</i> -Locus und Verifikation der Kandidaten durch <i>nested</i> -PCRs und Restriktionsverdaue.	88
Abbildung 27. Übersicht der verifizierten <i>Ds</i> -Transposon-Insertionen im <i>UGT76C2</i> -Locus.	89
Abbildung 28. Design der <i>guide</i> RNAs, verwendetes CRISPR/Cas9-System und Klonierungsstrategie.	92
Abbildung 29. Generalisierter Ablauf zur Herstellung und Identifikation von <i>ugt76c1-ugt76c2</i> -Doppel-Knockout-Mutanten.....	93
Abbildung 30. Identifikation von G18, G8 oder G1 exprimierenden T1-Pflanzen in denen der CRISPR/Cas9-Komplex aktiv ist.	95
Abbildung 31. Identifikation von Linien mit germinalen <i>ugt76c1</i> -Mutationen.	99
Abbildung 32. Identifizierung und molekulare Charakterisierung homozygoter <i>ugt76c1,2</i> -Doppel-Konockout-Mutanten.....	100
Abbildung 33. Untersuchung der <i>Off-target</i> -Aktivität des zur Mutagenese von <i>UGT76C1</i> verwendeten G18- <i>Spacers</i>	101
Abbildung 34. <i>Ugt76c1,2</i> -Mutanten bilden keine Cytokinin- <i>N</i> -Glucoside.....	103
Abbildung 35. Bestimmung des Cytokinin-Status und der Regulation zur Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase in <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten.....	105
Abbildung 36. Cytokinin-Sensitivität des Wurzelwachstums von <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten ist nicht verändert.....	106
Abbildung 37. Cytokinin-Sensitivität der <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten und Aktivierung der Cytokininhomöostase nach exogener Cytokininzugabe.	108
Abbildung 38. Auswirkung des Verlusts der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung auf das vegetative Sprosswachstum.	110
Abbildung 39. Bei den <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten sind die Übergänge von der juvenilen zur adulten vegetativen Phase und von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase unverändert.	111
Abbildung 40. Die natürliche Blattseneszenz ist in <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten verzögert.....	112
Abbildung 41. Die <i>ugt76c1,2</i> -Mutanten weisen eine erhöhte Blütenbildungsrate auf und produzierten mehr Schoten.....	113
Abbildung 42. Die <i>ugt76c1,2_a</i> -Mutante bilden vergrößerte und aktivere Sprossmeristeme mit einer veränderten Cytokininantwort.....	114

Abbildung 43. Die Blüten- und Schotenentwicklung ist in <i>ugt76c1,2_a</i> -Mutanten unverändert.	115
Abbildung 44. Der Verlust der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung hat keinen Einfluss auf die Wurzelelongation und die Anzahl der Seitenwurzeln.	116
Abbildung 45. <i>ugt76c1,2_a</i> und <i>ckx3,5</i> haben keinen additiven Effekt auf die Meristemaktivität und -größe.	117
Abbildung 46. <i>UGT76C1</i> und <i>UTG76C2</i> sind für die Inaktivierung von Cytokinin relevant.	118
Abbildung 47. Die Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierung ist nicht an der <i>zgt1-1</i> -vermittelten Regulation der Blattentwicklung beteiligt.	119
Abbildung 48. Dem Cytokininmangel des Sprosses in <i>rio1.3</i> -Mutanten wird durch den Verlust der Cytokinin- <i>N</i> -Glucosylierungsaktivität nicht entgegengewirkt.	120
Abbildung 49. <i>35S:amiUGT76C</i> -Linien im Vergleich zu <i>ugt76c1,2</i> -Doppel-Knockout-Linien.	121
Abbildung 50. Transkriptlevels des <i>UGT76C</i> -Genclusters in <i>35S:amiUGT</i> -Linien.	122
Abbildung 51. Herstellung des <i>pUGT76C2:UGT76C2-GFP</i> -Konstrukts für die Komplementation der <i>35S:amiUGT</i> -Linien.	123
Abbildung 52. <i>35S:amiUGT/pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP</i> -Linien zeigen keine Reversion des Cytokinin-Insensitivität-Phänotyps.	124
Abbildung 53. <i>UGT76C2</i> -Überexpressionslinien und <i>ugt76c1,2</i> -Knockout-Mutanten zeigen eine veränderte Toleranz gegenüber Salzstress und osmotischen Stress.	126
Abbildung S1. Herstellung von <i>35S:UGT76C1-GFP</i> -Überexpressionslinien.	179
Abbildung S2. Bestimmung der genauen Position der T-DNA-Insertion in der <i>WiscDsLoxHs114_05B</i> -Mutante <i>ugt76c1-2</i>	180
Abbildung S3. Konditionaler Phänotyp von <i>ugt76c1,2_a</i> -Mutanten.	182

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Enzyme.....	27
Tabelle 2. Verwendete Kits.....	28
Tabelle 3. Verwendete Vektoren.....	29
Tabelle 4. Liste der im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide.....	30
Tabelle 5. Nährmedien für Bakterien und Pflanzen.....	31
Tabelle 6. Für die Selektion von Pflanzen oder Bakterien verwendete Antibiotika.	32
Tabelle 7. Verwendete Mikroorganismen.....	32
Tabelle 8. Verwendete <i>Arabidopsis</i> -Mutanten und transgene Linien.....	33
Tabelle 9. Im Rahmen dieser Arbeit generierte <i>Arabidopsis</i> -Linien.....	33
Tabelle 10. Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes.	44
Tabelle 11. Standard PCR-Programm.	44
Tabelle 12. Übersicht über die verwendeten CAPS und dCAPS Marker.....	49
Tabelle 13. Übersicht Genotypisierung von T-DNA-Insertionsmutanten.....	50
Tabelle 14. Zusammensetzung von Reaktionsansätzen der qPCR.....	52
Tabelle 15. qPCR-Programm.....	53
Tabelle 16. Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngels.....	54
Tabelle 17. Cytokinin-Gehalt in <i>UGTC1ox</i> - und <i>UGTC2ox</i> -Linien im Vergleich zum WT.....	72
Tabelle 18. Übersicht der Linien und Arbeitsschritte zur Identifikation der <i>ugt76c1</i> <i>ugt76c2</i> -Doppelmutante.....	97
Tabelle 19. Cytokinin-Gehalt in <i>UGT76C1</i> und <i>UGT76C2</i> Einzel- und <i>ugt76c1,2</i> - Doppelmutanten im Vergleich zum WT.....	102
Tabelle S1. Liste der verwendeten Primer.	175
Tabelle S2. Sequenzanalyse des Übergangs zwischen <i>Ds</i> -Transposon und genomischer <i>UGT76C2</i> -DNA der relevanten Kandidaten der HS2-Pools.....	181
Tabelle S3. Cytokinin-Gehalt in <i>ugt76c1</i> - und <i>ugt76c2</i> -Einzelmutanten- und <i>ugt76c1,2</i> -Doppelmutanten im Vergleich zum WT.....	181

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
A	Adenin	ECR	Erweitertes Cytokinin Response Motiv
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EtBr	Ethidiumbromid
ABCG	<i>Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) subfamily G</i>	F1, F2, F3	Filialgeneration 1-3
ADK	Adenosin-Kinase	Fv/Fm	maximale photochemische Effizienz
ADP	Adenosindiphosphat	Fw	<i>forward</i>
amiRNA	<i>artificial microRNA</i>	G	Guanin
AMP	Adenosinmonophosphat	g	Erdbeschleunigung
ARF	AUXIN RESPONSE FAKTOREN	GFP	grünfluoreszierendes Protein
ARR	<i>Arabidopsis</i> -Responseregulator	GT	Glycosyltransferase
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GUS	β-Glucuronidase
ATP	Adenosintriphosphat	h	<i>hour(s)</i> , (Stunde[n])
att	<i>attachment site</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
BA	Benzyladenin	HS1, HS2	Filialgenerationen der hitzebehandelten Pflanzen 1-2
Bp	Basenpaar	ID	Identifikation
C	Cytosin	INDEL	Insertions- und Deletionsmutationen
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	iP	Isopentenyladenin
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>	iP7G	Isopentenyladenin- <i>N7</i> -Glucosid
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)	iP9G	Isopentenyladenin- <i>N9</i> -Glucosid
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation	iPR	Isopentenyl-Ribosid
CKX	Cytokininoxidase/Dehydrogenase	iPRDP	Isopentenylribosid-5'-Diphosphat
Col-0	Columbia-0	iPRMP	Isopentenylribosid-5'-Monophosphat
CRISPR	<i>clustered regulatory interspaced short palindromic repeats</i> (CRISPR)	iPRTP	Isopentenylribosid-5'-Triphosphat
Cas9	CRISPR-associated9 (Cas9)-System	kb	Kilobasen
Ct	cycle threshold	L1, L2, L3	klonale Meristemschicht 1-3
cZ	<i>cis</i> -Zeatin	LB	<i>left border</i>
cZ7G	<i>cis</i> -Zeatin- <i>N7</i> -Glucosid	LWP	Lateralwurzel-Primordien
cZ9G	<i>cis</i> -Zeatin- <i>N9</i> -Glucosid	M	Molar
cZOG	<i>cis</i> -Zeatin-O-Glucosid	min	Minute
cZR	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid	miRNA	microRNA
cZRMP	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat	MM	<i>mismatches</i>
cZROG	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid-O-Glucosid	mRNA	<i>messenger RNA</i>
dCAPS	<i>derived cleaved amplified polymorphic sequence</i>	<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
DHZ	Dihydrozeatin	OZ	organisatorisches Zentrum
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat	p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei statistischen Tests bzw. Plasmid bzw. Promotor
DMSO	Dimethylsulfoxid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)	PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
DNase	Desoxyribonuklease	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
DSB	Doppelstrangbruch	PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
dsRNA	doppelsträngige RNA		

<i>Pp</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	T	Thymin
PSPG	<i>plant secondary product glycosyltransferase</i>	T1-T4	Transformantengenerationen (T1 = Primärtransformant)
PTGS	Posttranskriptionelles Gen-Silencing	TA	<i>Annealing</i> -Temperatur
PVDF	Polyvinylidenfluorid	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
PZ	Periphere Zone	T-DNA	Transfer-DNA
QC	<i>quiescent center</i>	TNK	Tage nach der Keimung
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR	tRNA	Transfer-RNA
R	Resistenz bzw. Rest	tZ	<i>trans</i> -Zeatin
RAM	Wurzelpikalmeristem	tZ7G	<i>trans</i> -Zeatin- <i>N</i> 7-Glucosid
RB	<i>right border</i>	tZ9G	<i>trans</i> -Zeatin- <i>N</i> 9-Glucosid
RE	Restriktionsenzym	tZOG	<i>trans</i> -Zeatin- <i>O</i> -Glucosid
Rev	<i>reversed</i>	tZR	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)	tZRMP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat
RNAi	RNA-Interferenz	tZROG	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid- <i>O</i> -Glucosid
RNase	Ribonuklease	U	<i>Unit</i>
rRNA	ribosomale RNA	UDP	Uridin-5'-diphosphat
RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkriptase	UGT	UDP-Glycosyltransferase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR	<i>UTR</i>	<i>untranslated region</i>
RZ	Rippenzone	WT	Wildtyp
s	Sekunden	WUS	WUSCHEL
SAM	Sprossapikalmeristem	Z	Zeatin
SDS	Natriumdodecylsulfat	ZFN	Zink-finger-Nukleasen
sgRNA	<i>single-guide</i> RNA	<i>Zm</i>	<i>Zea mays</i>
SZ	Stammzellen	ZZ	Zentrale Zone

Zusammenfassung

Das Pflanzenhormon Cytokinin spielt bei vielen physiologischen Vorgängen und Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle. Die Konzentration des aktiven Cytokinins wird im Gewebe unter anderem durch deren Degradation durch Cytokininoxidasen/Dehydrogenasen (CKX), aber auch durch die Konjugation mit Zucker reguliert. Bisher wurden in *Arabidopsis* nur zwei Glucosyltransferasen, UGT76C1 und UGT76C2, beschrieben, welche die Reaktion der Cytokinin-*N*-Glucosylierung katalysieren. Die genaue physiologische Bedeutung des Stoffwechselwegs der Cytokinin-*N*-Glucosylierung ist noch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Überexpressionslinien *35S:UGT76C1-GFP* und *35S:UGT76C2-GFP* generiert und charakterisiert. Diese wiesen cytokinindefiziente Phänotypen auf, hatten einen reduzierten Cytokininstatus und waren verglichen mit dem WT Cytokinin-insensitiver. Dabei hatte die Expression von *UGT76C2* stärkere Auswirkungen als die von *UGT76C1*. Die Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei der Cytokinin-*N*-Glucosylierung um einen inaktivierenden Stoffwechselweg handelt.

Einzel-Knockout-Mutanten von *UGT76C1* und *UGT76C2* zeigten keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen. Dies lässt auf eine funktionale Redundanz der beiden Glucosyltransferasen schließen. Mit Hilfe eines Transposonansatzes sowie des CRISPR/Cas9-Systems wurden Doppelmutanten der gekoppelten Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* hergestellt. Cytokiningehaltsmessungen von Einzel- und Doppel-Knockout-Linien zeigten, dass UGT76C2 die Hauptkomponente der Regulation des aktiven Cytokininpools durch die *N*-Glucosylierung darstellt. Die vollständige Abwesenheit von Cytokinin-*N*-Glucosiden in *ugt76c1,2*-Doppelmutanten belegte erstmals, dass es sich bei UGT76C1 und UGT76C2 um die einzigen Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen in *Arabidopsis* handelt. Weiterhin belegten die Cytokininmessungen die hohe Kapazität des Cytokininmetabolismus die Konzentration der aktiven Cytokininbasen anzupassen. Dies konnte auch durch qPCR-Messungen und Cytokinin-Sensitivitätstests bestätigt werden.

UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP lokalisierten im Cytosol und im Nukleus, in diesen Kompartimenten erfolgt demnach die Cytokinin-*N*-Glucosylierung und damit die Inaktivierung der Cytokininbasen. Die Untersuchungen der Expressionsdomänen von *UGT76C2* durch die Reporterkonstrukte *pUGT76C2:GFP* und *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* ergab, dass die Expression durch in der kodierenden Sequenz enthaltene regulatorische Elemente spezifiziert wird. Das translationale Reporterkonstrukt war in spezifischen Domänen des apikalen Spross- und Wurzelmeristems sowie in Wurzel-, Blatt- und Blütenprimordien aktiv. Das Expressionsmuster wurde bereits sehr früh in der Embryogenese angelegt.

Die *ugt76c1,2*-Doppelmutante bildete größere und aktivere Infloreszenzmeristeme als der Wildtyp. Demnach konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Cytokinin-*N*-

Glucosylierung die Meristemaktivität und -größe negativ reguliert. Die erhöhte Meristemaktivität ging mit spezifischen Veränderungen der räumlichen Verteilung des Reporters der Cytokininantwort *pTCSn:GFP* einher. Außerdem zeigten die Untersuchungen, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung an der Regulation des Blattwachstums beteiligt ist.

Untersuchungen zur Redundanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung mit anderen Cytokinin-Inaktivierungsmechanismen zeigten, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung und der CKX-vermittelte Cytokininabbau teilweise zwar den gleichen Cytokininpool regulieren, der Abbau der Cytokine aber den Hauptinaktivierungsweg darstellt. Demnach scheint der Beitrag, den die Cytokinin-*N*-Glucosylierung zur Regulation der Cytokininhomöostase leistet, kleiner zu sein als bisher angenommen wurde oder nur unter bestimmten physiologischen Umständen zum Tragen zu kommen. Erste Untersuchungen zur Rolle der Cytokinin-*N*-Glucosylierung bei Salz- und Trockenstress zeigten, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in die Regulation dieser Prozesse involviert ist.

Summary

Cytokinins are plant hormones which regulate many aspects of plant growth and development. Cytokinin homeostasis is regulated by different mechanisms, such as the degradation through cytokinin oxidases/dehydrogenases (CKX) or inactivation by metabolic conjugation with sugars. Two enzymes with cytokinin *N*-glucosyltransferase activity, UGT76C1 and UGT76C2, have been identified so far in *Arabidopsis*. However, the physiological relevance of the cytokinin-*N*-glucosylation pathway is not well understood.

In this work, lines expressing *p35S:UGT76C1-GFP* and *p35S:UGT76C2-GFP* were generated and characterized. These lines displayed cytokinin deficiency phenotypes, as well as a reduced cytokinin status and a reduced cytokinin sensitivity in comparison to wild type plants. The effects of the overexpression of *UGT76C2* were more severe than those of the *UGT76C1* gene. Hence, the results confirm the proposed role of cytokinin *N*-glucosylation as an inactivating pathway.

Single knockout lines of *UGT76C1* and *UGT76C2* showed no obvious phenotypic changes, indicating functional redundancy of the two genes. A transposon-based approach as well as the CRISPR/Cas9 system were used to generate double knockout lines of the linked genes *UGT76C1* and *UGT76C2*. Cytokinin measurements of the single and the double knockout lines confirmed the dominant role of UGT76C2 in regulating the pool of active cytokinin bases. In *ugt76c1,2* double mutant lines the cytokinin *N*-glucosides were completely absent, proving for the first time that *UGT76C1* and *UGT76C2* are the only cytokinin *N*-glucosyltransferases encoded in *Arabidopsis*. Furthermore, the results revealed a robust capacity of cytokinin metabolism to maintain the concentrations of active cytokinin bases. This was confirmed by qPCR analyses and cytokinin response assays.

Further analyses showed that UGT76C1-GFP and UGT76C2-GFP were localized in the cytosol and nucleus, suggesting that the cytokinin *N*-glucosylation pathway operates mainly in these compartments. Analysis of the expression patterns of the reporter constructs *pUGT76C2:GFP* and *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* revealed that the expression of *UGT76C2* is influenced by regulatory elements within the coding sequence. The translational reporter was active in specific domains of the shoot and root apical meristems as well as in root, leaf and flower primordia. The expression patterns were established already early during embryogenesis.

The inflorescence meristem of the *ugt76c1,2* double mutant was increased in size and activity, indicating a negative impact of cytokinin *N*-glucosylation on meristem regulation. The enhanced meristem activity was associated with distinct changes in spatial distribution of the cytokinin output sensor *pTCSn:GFP*. Furthermore, a negative regulatory effect of cytokinin *N*-glucosylation on leaf growth was shown.

Analysis of the functional redundancy between cytokinin *N*-glucosylation and other cytokinin inactivation pathways showed that cytokinin *N*-glucosylation and CKX-mediated cytokinin breakdown partially regulate the same cytokinin pool, but cytokinin degradation is the predominant inactivation mechanism. Hence, the contribution of the cytokinin *N*-glucosylation in regulating the homeostasis of cytokinin appears to be less important than anticipated. Alternatively, cytokinin *N*-glucosylation may come into effect only under specific physiological conditions. In this line, preliminary experiments indicated that cytokinin *N*-glucosylation is involved in the response to salt and drought stress.

1 Einleitung

1.1 Das Pflanzenhormon Cytokinin

Eine Klasse der Pflanzenhormone bilden die Cytokinine. Dabei handelt es sich um N^6 -substituierte Adeninderivate (Sakakibara 2006, Skoog *et al.* 1965). Entdeckt wurden die Cytokinine aufgrund ihrer zellteilungsfördernden Eigenschaft in Embryo- und Kalluskulturen (Haberlandt 1913, Miller *et al.* 1955, van Overbeek *et al.* 1941). Seither wurde erkannt, dass Cytokinine an der Steuerung von nahezu allen Prozessen der pflanzlichen Entwicklung beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die Aufrechterhaltung und Regulation der Aktivität und Größe des Sprossapikal- und Wurzelmeristems (Bartrina *et al.* 2011, Dello Iorio *et al.* 2007, Kurakawa *et al.* 2007, Werner *et al.* 2003, Werner *et al.* 2001), die Gametenbildung (Hejatko *et al.* 2003, Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto 2011), die Entwicklung der Leitgewebe in den Wurzeln (Bishopp *et al.* 2011b, Mähönen *et al.* 2006a) und die Regulation der Seneszenz (Gan und Amasino 1995, Kim *et al.* 2006, Šmehilova *et al.* 2016). Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Pathogenresistenz (Albrecht und Argueso 2016) und der Reaktion auf Umwelteinflüsse (Guan 2017, Li *et al.* 2016, Werner und Schmülling 2009). Viele der genannten Prozesse werden in enger Wechselwirkung mit anderen Pflanzenhormonen, insbesondere Auxin, reguliert (El-Showk *et al.* 2013, Liu *et al.* 2017, Müller und Sheen 2008, Vanstraelen und Benkova 2012).

Die natürlich vorkommenden Cytokinine werden anhand ihrer N^6 -Seitenkette in isoprenoide und aromatische Cytokinine eingeteilt (Abbildung 1) (Mok und Mok 2001). Cytokinine mit ungesättigten Isoprenresten werden weiter unterteilt in Cytokinine des Isopentenyladenin (iP)-Typs und solche mit hydroxylierten Isoprenresten, des Zeatin (Z)-Typs. Die Isoformen von Zeatin werden jeweils *trans*-Zeatin (*tZ*) und *cis*-Zeatin (*cZ*) bezeichnet. Bei Dihydrozeatin (DHZ) liegt der Isoprenrest gesättigt und hydroxyliert vor. Aromatische Cytokinine mit einem Furfurylrest an der N^6 -Position werden Kinetin (Kin) und mit einem Benzylrest Benzyladenin (BA) genannt. BA-Derivate bei denen der Benzylring hydroxyliert oder methoxyliert ist, werden als Topoline bezeichnet (Strnad 1997). Die aromatischen Cytokinine konnten in Pflanzen bisher nur begrenzt nachgewiesen werden und über ihre genaue biologische Funktion und Biosynthese ist bisher wenig bekannt. Die am besten charakterisierten isoprenoiden Cytokinine sind iP und *tZ* (Zürcher und Müller 2016). Die Zusammensetzung und Abundanz der verschiedenen Cytokinintypen variiert innerhalb einer Pflanze zwischen unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben sowie zwischen verschiedenen Pflanzenarten (Sakakibara 2006). In Arabidopsis sind iP und *tZ* die Cytokininformen mit der höchsten Abundanz, in Reis und Mais (*Zea mays*) sind die Hauptformen dahingegen Cytokinine vom *cZ*-Typ (Osugi und Sakakibara 2015, Stolz *et al.* 2011).

In Pflanzen treten Cytokinine als aktive, freie Cytokininbasen und in vielen verschiedenen Modifikationsformen auf. Die aktive Form der Cytokinine stellen die freien Basen dar (Lomin *et al.* 2015, Yamada *et al.* 2001), wohingegen modifizierte Cytokininformen in der Regel nicht aktiv sind (Sakakibara 2006).

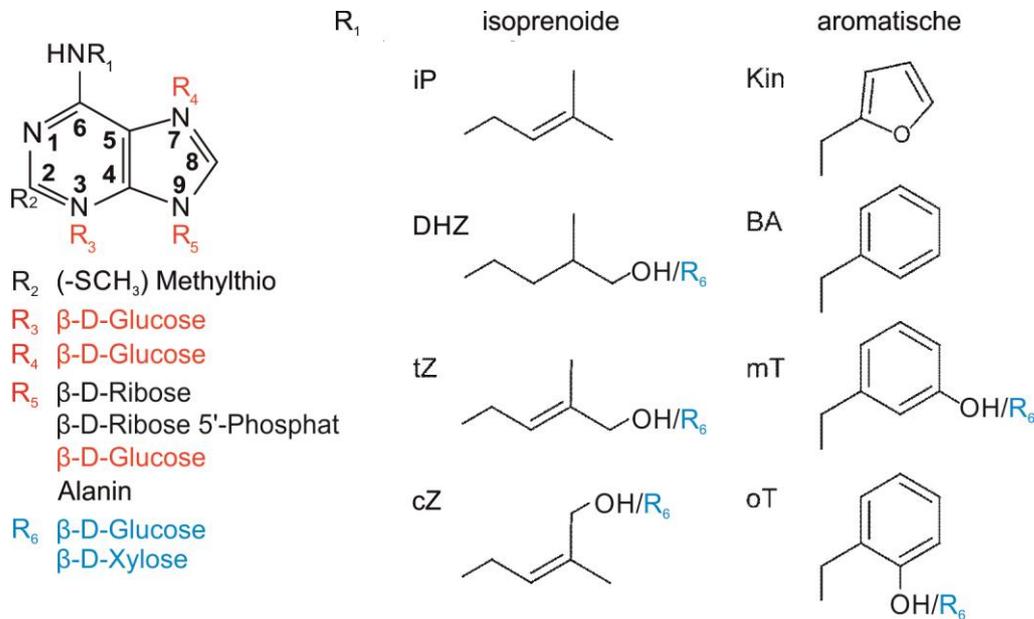


Abbildung 1. Chemische Struktur der Cytokinine und deren Modifikationen.

Dargestellt ist die Struktur der Cytokinine und ihrer Modifikationsformen. Unter R₁ sind die verschiedenen N⁶-Seitenketten dargestellt, R₂-R₆ zeigen die Cytokininconjugate mit Zuckern, Zuckerphosphaten und anderen Resten. Die Positionen der O-Glycosylierung sind in Blau und die Positionen der N-Glycosylierung sind in Rot dargestellt. Abbildung modifiziert nach Sakakibara (2006) und Spíchal (2012).

1.1.1 Die Cytokinin-Signaltransduktion

Die Transduktion des Cytokininsignals in Pflanzen erfolgt durch ein mehrstufiges Phosphorylierungssystem, ähnlich dem klassischen Zweikomponentensystem aus Bakterien (Abbildung 2) (To und Kieber 2008). Der Phosphatrest wird dabei erst innerhalb des aktiven Cytokinin-Rezeptors von einem konservierten Histidinrest auf einen konservierten Asparaginsäurereste übertragen. Anschließend erfolgt der Transfer des Phosphatrests auf einen konservierten Histidinrest in einem Arabidopsis Histidinphosphotransferprotein (AHP) und nachfolgend wiederum auf einen konservierten Asparaginsäurerest eines B-Typ *Arabidopsis*-Responseregulator (ARR)-Transkriptionsfaktors, welcher im Zellkern cytokininabhängige Gene reguliert. Die Komponenten der Cytokinin-signalkaskade werden durch Multigenfamilien kodiert, deren Funktionen teilweise überlappen (Kieber und Schaller 2014, Pils und Heyl 2009). In Arabidopsis gibt es drei Cytokininrezeptorhistidinkinasen (AHK) CRE1/AHK4, AHK2 und AHK3 (Hwang und Sheen 2001, Inoue *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2001, Yamada *et al.* 2001). Die Cytokininrezeptoren sind membranständig und bestehen aus einer nach außen gerichteten, N-terminalen Cytokininbindedomäne (CHASE-Domäne), einer nach innen gerichteten Histidinkinasedomäne und einer phosphorylierbaren C-terminalen Receiver-

domäne (Heyl *et al.* 2012, Steklov *et al.* 2013). Die subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren ist noch nicht vollständig geklärt. Anfänglich wurde angenommen, dass die Cytokininrezeptoren in der Plasmamembran lokalisiert sind. Neuere Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass die Mehrheit der Cytokininrezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) vorkommen, wobei die Cytokininbindedomäne in das ER-Lumen gerichtet ist (Caesar *et al.* 2011, Lomin *et al.* 2011, Romanov *et al.* 2018, Wulfetange *et al.* 2011). Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch die Cytokininbindung und führt zu einer Dimerisierung der Rezeptoren und zu einer Transphosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in der Histidinkinasedomäne. Anschließend wird der Phosphatrest innerhalb des Rezeptors auf einen konservierten Aspartatrest der Receiverdomäne übertragen. Der AHK4-Rezeptor besitzt zusätzlich eine intrinsische Phosphataseaktivität, deren Aktivität unterhalb einer bestimmten Signalschwelle überwiegt. Dadurch werden dem Cytokinin-Signalsystem der Zelle, in Abwesenheit des Liganden, aktivierende Phosphatreste entzogen (Mähönen *et al.* 2006b). Alle drei Cytokininrezeptoren zeigten hohe Bindungsaffinitäten für die freien Cytokininbasen iP und tZ und niedrige für die Cytokinin-Konjugate (Kieber und Schaller 2014). Dennoch unterscheiden sich die Isoformen der Rezeptoren auch in ihren Bindungsaffinitäten. Beispielsweise bindet AHK3 tZ mit einer höheren Affinität als iP, wohingegen AHK2 und AHK4 eine höhere Affinität für iP als für tZ zeigten (Stolz *et al.* 2011). Auch die Verteilung der Rezeptoren innerhalb der Pflanze unterscheidet sich. In den Wurzeln erfolgt die Signalperzeption hauptsächlich über AHK4 und im Spross vor allem über AHK2 und AHK3 (Higuchi *et al.* 2004, Nishimura *et al.* 2004). AHK3 nimmt außerdem eine Schlüsselrolle bei der Initiation der Seneszenz ein (Kim *et al.* 2006).

Von den Rezeptoren wird der Phosphatrest auf einen konservierten Histidinrest eines AHP-Proteins übertragen (Abbildung 2). Diese interagieren im Zellkern direkt mit B-Typ-ARR-Transkriptionsfaktoren, die durch die Phosphorylierung aktiviert werden (Hwang und Sheen 2001, Hwang *et al.* 2012, Punwani *et al.* 2010). Die AHP-Genfamilie umfasst bei *Arabidopsis* sechs Mitglieder AHP1-6, die teilweise redundant sind. Eine Sonderstellung unter den AHPs nimmt AHP6 ein. Es besitzt anstelle des konservierten Histidinrests einen Asparaginrest und ist somit nicht Teil des Phosphorylierungssystems (Hutchison *et al.* 2006, Mähönen *et al.* 2006a), konkurriert aber mit anderen AHPs um die Rezeptorbindungen und ist somit ein negativer Regulator des Cytokinin-Signals. Besonders aktiv ist AHP6 in der Vaskulatur, im Embryo und in den Meristemen (Besnard *et al.* 2014, Bishopp *et al.* 2011a, Mähönen *et al.* 2006a, Ohashi-Ito *et al.* 2014). Die aktivierten B-Typ-ARRs initiieren die Expression der primären Cytokininantwortgene (Abbildung 2). Dazu gehören unter anderem auch A-Typ-ARRs, die zum einen als Negativregulatoren dem Cytokinin-Signal entgegenwirken, zum anderen die cytokininabhängige Regulation anderer Signalwege bewirken (Brenner *et al.* 2012, Hwang *et al.* 2012, Rashotte *et al.* 2003).

Im *Arabidopsis*-Genom sind insgesamt 23 *ARRs* kodiert, die anhand C-terminaler Unterschiede in drei Gruppen eingeteilt werden. Die elf B-Typ *ARRs* (*ARR1*, *ARR2*, *ARR10-14*, *ARR18-21*) sind durch eine Receiverdomäne und eine C-terminale DNA-Bindedomäne charakterisiert. Die bevorzugten DNA-Bindemotive der B-Typ *ARRs* wurden bereits identifiziert und kommen in vielen Promotoren cytokininregulierter Gene vor (Kieber und Schaller 2018). Eine cytokininabhängige Bindung der B-Typ *ARRs* an die Zielsequenzen konnte *in planta* gezeigt werden (Zubo *et al.* 2017).

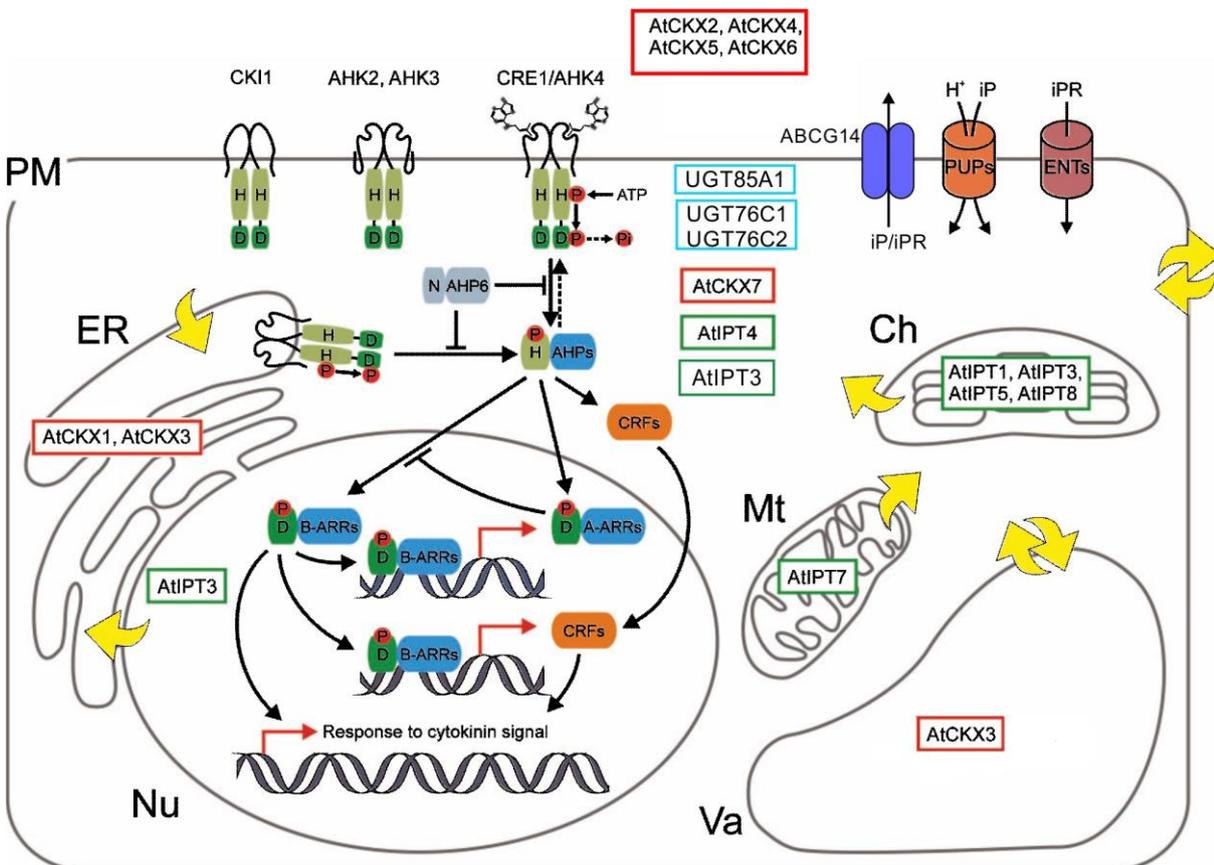


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Cytokininsignaltransduktion und der zellulären Verteilung der Komponenten der Cytokininhomöostase in *Arabidopsis*.

Cytokinin bindet an die Cytokininbindedomäne der membranständigen Rezeptoren (AHK2-AHK4), dies führt zur Autophosphorylierung der Histidinkinasedomäne des Rezeptors. Anschließend wird der Phosphatrest auf die Receiverdomäne des Rezeptors und von dort auf ein AHP-Protein übertragen. Im Zellkern erfolgt die Übertragung des Phosphatrestes von den AHP-Proteinen auf die B-Typ *ARR*- oder *CRF*-Transkriptionsfaktoren. Diese werden durch die Phosphorylierung aktiviert und regulieren die Expression von Cytokininantwortgenen. Zu diesen gehören unter anderem die A-Typ *ARRs*, welche die Signaltransduktion negativ regulieren. Weitere Negativregulatoren sind AHP6 und die C-Typ *ARRs*.

Die Cytokinin-Biosynthese wird katalysiert von Isopentenyltransferasen (IPT, grüne Rahmen), die Degradation der Cytokinine erfolgt durch Cytokininoxidasen/-dehydrogenasen (CKX, rote Rahmen) und die irreversible und reversible Konjugation der Cytokinine mit Zuckern durch UDP-Glycosyltransferasen (cyanfarbige Rahmen). Gelbe Pfeile geben an, über welche Membranen der Transport von Cytokinin erfolgt. Bisher bekannte Cytokinintransporter für den Transport von Cytokinin in die Zelle sind die Purinpermeasen (PUPs) sowie die äquilibrierenden Nucleosidtransporter (ENTs) und für den Export von Cytokinin der ATP-binding cassette-Transporter (ABCG14). D, Aspartatrest; H, Histidinrest; P, Phosphatrest; ER, Endoplasmatisches Retikulum; PM, Plasmamembran; Ch, Chloroplast; Mt, Mitochondrium, Va, Vakuole, Nu, Nukleus. Abbildung modifiziert nach (Spíchal 2012).

Die A-Typ *ARRs* besitzen nur eine Receiverdomäne und keine DNA-Bindedomäne. In *Arabidopsis* sind zehn A-Typ *ARRs* bekannt (*ARR3-9*, *ARR15-17*). Die Transkription der A-Typ-*ARRs* wird nicht nur durch Cytokinin, sondern auch durch andere Faktoren gesteuert (z.B. Auxin) und gewebespezifisch reguliert. Dadurch kann die Cytokinin-Sensitivität an bestimmte Umweltbedingungen oder verschiedene Zelltypen angepasst werden (Kieber und Schaller 2018), limitiert aber auch deren Eignung als Cytokininreporter (Zürcher und Müller 2016). Wie das Cytokininsignal durch die A-Typ *ARRs* moduliert wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es werden zwei Modelle diskutiert: 1. Die A-Typ *ARRs* konkurrieren mit den B-Typ *ARRs* um die Phosphorylierung durch die AHPs. 2. Die phosphorylierten A-Typ *ARRs* interagieren mit bisher nicht bekannten regulatorischen Proteinen (Shanks *et al.* 2018, To *et al.* 2007).

Über die *ARRs* des C-Typs (*ARR22* und *ARR24*) ist wenig bekannt. Sie besitzen keine DNA-Bindedomäne. Ihre Expression beschränkt sich auf die reproduktiven Gewebe und wird durch Cytokinin nicht beeinflusst. Knockout-Mutanten der C-Typ *ARRs* zeigen keine auffälligen Veränderungen der Phänotypen, wohingegen sich ihre ektopische Expression auf die Cytokininantwort auswirkt und zu phänotypischen Veränderungen führt, die der *wooden leg (wo)* Mutante stark ähneln (Gattolin *et al.* 2006, Kiba *et al.* 2004).

Eine weitere Gruppe der primären Cytokininantwortgene sind die 8 *Cytokinin Response Factors (CRF 1-8)*, die zu der Familie der *AP2/ERF*-Transkriptionsfaktoren gehören (Rashotte und Goertzen 2010, Rashotte *et al.* 2006). Die CRFs interagieren direkt mit den AHPs und ihre Zielgene überlappen weitgehend mit denen der B-Typ *ARRs* (Cutcliffe *et al.* 2011, Rashotte *et al.* 2006). Mutationen einzelner *CRF*-Gene beeinflussen die Morphologie der Pflanzen kaum. Daher ist anzunehmen, dass diese redundant sind. Mehrfachmutanten zeigen Veränderungen der Blattseneszenz, der Rosettengröße, des Wurzelwachstum, der Meristemgröße und in der Embryogenese (Raines *et al.* 2016, Zwack *et al.* 2013).

1.2 Der Cytokinin-Metabolismus

Die Regulation zur Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher ist bekannt, dass für die Steuerung von physiologischen Vorgängen in der Pflanze, die gewebespezifische und zelluläre Konzentration der biologisch aktiven Cytokininformen entscheidend ist. Der Pool der aktiven Cytokinine wird durch die Regulation der Biosynthese, der Interkonversion, des Transports, der Konjugation und der Degradation kontrolliert (Abbildung 2 und Abbildung 3) (Zürcher und Müller 2016). Auch die Beobachtung, dass die inaktiven Formen der Cytokinine eine höhere Abundanz aufweisen als die aktiven Cytokininbasen belegt, dass die Konzentration des aktiven Cytokinins streng kontrolliert wird. Dadurch kann die Spezifität des Cytokininsignals aufrecht erhalten werden (Kiba *et al.* 2013, Miyawaki *et al.* 2006, Šmehilová *et al.* 2016).

1.2.1 Die Cytokinin-Biosynthese

Der erste und limitierende Schritt in der Cytokininsynthese besteht in der Übertragung eines Isoprenrestes von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) auf einen Adeninrest von AMP, ADP, ATP oder innerhalb einer tRNA. Katalysiert wird diese Reaktion von Isopentenyltransferasen (IPTs) (Abbildung 3). In *Arabidopsis* gibt es neun homologe *IPT*-Gene (*IPT1-9*), wobei es sich bei *IPT6* um ein Pseudogen handelt (Kakimoto 2001, Takei *et al.* 2001a). Die IPTs werden in zwei Klassen eingeteilt. Die ATD/ADP-Isopentenyltransferasen *IPT1* und *IPT3-8* nutzen bevorzugt ADP oder ATP und kaum AMP als Prenylakzeptoren. Als Reaktionsprodukte entstehen je nach Prenylakzeptor Isopentenylribosid-5'-diphosphat bzw. -triphosphat (iPRDP und iPRTP), die Vorstufen von iP (Kakimoto 2001). Cytokinine des tZ-Typs werden durch die Hydroxylierung von iP-Nukleotiden zu tZ-Nukleotiden gebildet (Abbildung 3). Katalysiert wird diese Reaktion durch die Cytochrom-P450-Monooxygenasen *CYP735A1* und *CYP735A2*. Diese werden vor allem in den Wurzeln, aber kaum in den Sprossen exprimiert. Es wird daher angenommen, dass die Wurzeln der Hauptsyntheseort für Cytokinine vom tZ-Typ sind und der akropetale Transport von tZ und tZR ein wichtiges Signal für die Wurzel-Spross-Kommunikation darstellt (Abschnitt 1.2.5) (Takei *et al.* 2004b). Die Existenz eines alternativen Synthesewegs für Cytokinine des tZ-Typs, der von iP unabhängig ist, wird ebenfalls diskutiert (Åstot *et al.* 2000). DHZ kann aus tZ durch die Reduktion der Doppelbindung gebildet werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Zeatin-Reduktase (Martin *et al.* 1989) (Abbildung 3).

Die tRNA-Isopentenyltransferasen *IPT2* und *IPT9* nutzen als Prenylgruppenakzeptor ein in einer tRNA gebundenes Adenosin, dabei entsteht die Vorstufe von cZ. Die Freisetzung der aktiven Cytokininbase aus der tRNA erfolgt durch Hydrolyse (Miyawaki *et al.* 2006). Doppel-Knockout-Mutanten von *IPT2* und *IPT9* bilden keine Cytokinine des cZ-Typs und haben ein stark beeinträchtigtes Wurzelwachstum (Köllmer *et al.* 2014). Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass Cytokinine des cZ-Typs ausschließlich über die Prenylierung der tRNA von *IPT2* und *IPT9* hergestellt werden. Eine Umwandlung zwischen tZ und cZ findet kaum statt (Gajdošová *et al.* 2011, Miyawaki *et al.* 2006). Über den Syntheseweg der aromatischen Cytokinine ist wenig bekannt (Sakakibara 2006).

Die Isoformen der IPTs sind subzellulär unterschiedlich lokalisiert (Abbildung 2). *IPT1*, *IPT3*, *IPT5* und *IPT8* sind in den Plastiden zu finden, dabei kann *IPT3*, in Abhängigkeit von einer Farnesylierung, auch im Zytosol oder Zellkern vorkommen (Galichet *et al.* 2008, Kasahara *et al.* 2004). *IPT2* und *IPT4* sind im Zytosol und *IPT7* in den Mitochondrien zu finden (Kasahara *et al.* 2004). Die verschiedenen *IPT*-Gene zeigen zum Teil gewebespezifische Expressionsmuster (Miyawaki *et al.* 2004, Takei *et al.* 2004a).

Die Untersuchungen von *ipt*-Knockout-Mutanten belegen die funktionelle Redundanz der *IPT*-Gene. *ipt1,3,5,7*-Mutanten zeigen neben einem verringerten Spross- und verstärkten Wurzelwachstum, auch verringerte Cytokinin-Konzentrationen des iP- und tZ-Typs.

1.2.2 Die Interkonversion zwischen Cytokininbasen, Nukleosiden und Nukleotiden

Die wechselseitige Umwandlung zwischen den freien Cytokininbasen und den korrespondierenden Nukleosiden und Nukleotiden stellt einen weiteren Aspekt der homöostatischen Regulation dar (Abbildung 3). Die in der Biosynthese gebildeten Vorstufen von iP und tZ sind deren inaktiven Diphosphat- und Triphosphatformen. Für die Herstellung der aktiven, freien Cytokininbasen werden zwei Wege postuliert. Zuerst wurde vermutet, dass die für die Aktivierung notwendige sukzessive Dephosphorylierung und Deribosylierung in zwei Stufen erfolgt (Abbildung 3). Die entsprechenden Phosphatasen und Ribonukleotid-Phosphohydrolasen, die Cytokinin als Substrat nutzen sind bisher noch nicht bekannt. Teilaufgereinigte Enzymen aus Weizenkeimlingen zeigten eine breite Substratspezifität und setzten neben Cytokinin auch Adenosin und AMP mit hoher Affinität um. Daher wird angenommen, dass diese Reaktionen durch Enzyme des allgemeinen Purinstoffwechsels katalysiert werden. (Chen und Kristopeit 1981, Kamada-Nobusada und Sakakibara 2009, Mok und Mok 2001). Für die Umwandlung der Cytokininnukleoside in die freien Cytokininbasen konnten entsprechende Purin-Nukleosid-Ribohydrolasen (NRH), aus *Physcomitrella patens* (*PpNRH1*) und Mais (*ZmNRH3*) isoliert werden (Kopečna *et al.* 2013). Die physiologische Relevanz der Reaktion und in welchem Kontext die identifizierten Komponenten zu der Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase beitragen ist noch nicht im Detail aufgeklärt.

Mittlerweile ist ein zweiter Weg zur Herstellung der freien Cytokininbasen bekannt. Dabei erfolgt die Aktivierung Cytokininnukleotide in einem einzigen Schritt. Diese Reaktion wird katalysiert durch cytokininspezifische Phosphoribohydrolasen LONELY GUYS (LOG) (Kurakawa *et al.* 2007) (Abbildung 3). Erstmalig wurden die LOGs in Reis entdeckt. In *Arabidopsis* konnten sieben funktionelle Proteine (*LOG1-LOG5*, *LOG7* und *LOG8*) isoliert werden (Kurakawa *et al.* 2007, Kuroha *et al.* 2009). Die LOGs sind im Zytosol und im Zellkern lokalisiert und nutzen als Substrate vorrangig Cytokinin-Ribosidmonophosphate (Kuroha *et al.* 2009). Die LOGs sind in fast allen Geweben der Pflanzen exprimiert. Die Expressionsdomänen der einzelnen LOGs überlappen teilweise, sind aber auch spezifisch (Chickarmane *et al.* 2012, Kuroha *et al.* 2009), was auf eine gewisse funktionale Redundanz der LOGs hinweist. Die Studie von LOG-Mehrfachmutanten zeigte, dass der größte Anteil der Cytokininbasen von den LOGs gebildet wird (Tokunaga *et al.* 2012). Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass auch die zweistufige Umwandlung der Cytokininnukleotide von physiologischer Relevanz ist. Dafür spricht beispielsweise, dass die Konzentration der Cytokininriboside im Gewebe teilweise sehr hoch ist und dass die Cytokininriboside eine der Haupttransportform darstellen (Hirose *et al.* 2008).

Auch die Umwandlungen der freien Cytokininbasen in die korrespondierenden Cytokininnukleoside und Cytokininnukleotide kann für die Regulation der Cytokininhomöostase von Bedeutung sein. Beispielsweise wurde gezeigt, dass exogen appliziertes Cytokinin unter

anderen in die korrespondierenden Nucleosid- und Nucleotidformen umgesetzt wird (Letham und Palni 1983, Moffatt *et al.* 1991, Niemann *et al.* 2015). Eine Purin-Nucleosid-Phosphorylase (PNP), welche den Transfer eines Riboserestes auf die freie Cytokininbase katalysiert, konnte in *Solanum tuberosum* (*StCKP1*) (Bromley *et al.* 2014) identifiziert werden. Die Umwandlung der Cytokininnucleoside in Cytokininnucleotide, katalysieren in *Arabidopsis* zwei Isoformen von Adenosin-Kinasen (ADK1 und ADK2) (Abbildung 3). Für beide Enzyme konnte *in vivo* gezeigt werden, dass diese Cytokinine als Substrat nutzen, obwohl *in vitro*-Messungen belegen, dass beide Enzyme eine größere Affinität zu Adenosin haben als zu den Cytokininribosiden (Moffatt *et al.* 2000). Der *knockdown* beider Gene führt zu Veränderungen der Cytokininaktivität (Schoor *et al.* 2011). Für ADK1 wurde gezeigt, dass dieses im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist (Lee *et al.* 2012). In der Pflanze wird es ubiquitär exprimiert (Moffatt *et al.* 2000).

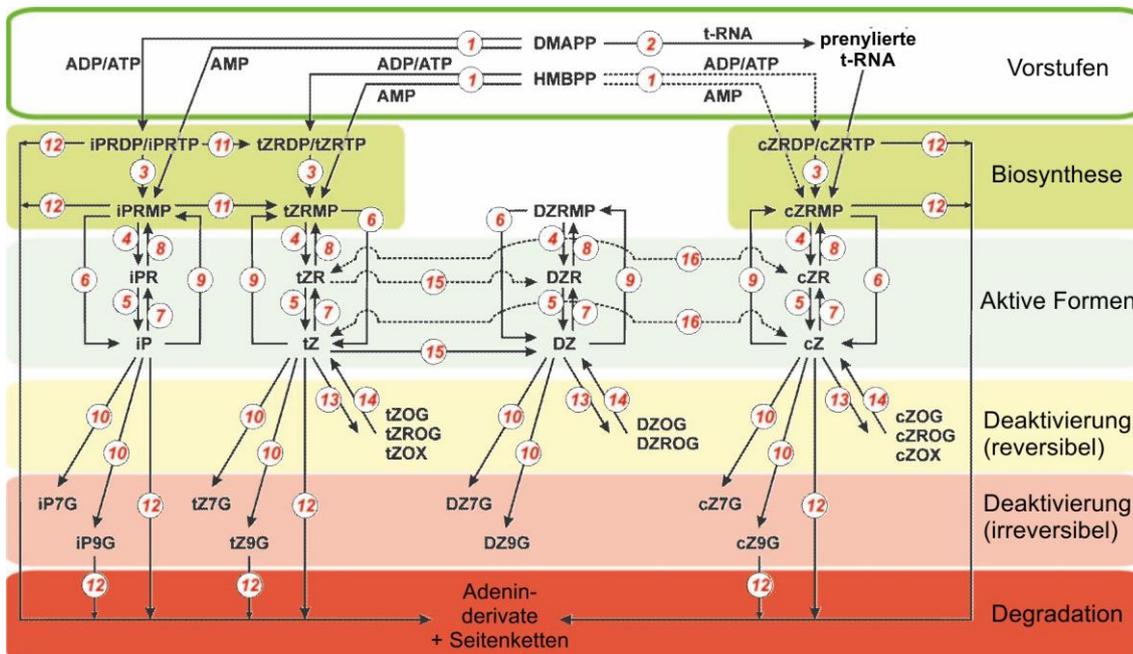


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Cytokinin-Metabolismus.

Schema der Biosynthese, Interkonversion, Konjugation und Degradation der Cytokinine und der involvierten Enzyme (rote Nummern). Gestrichelte Linien markieren Stoffwechselwege, die noch nicht vollständig aufgeklärt wurden. (1) Adenylat-Isopentenyltransferase (ADT/ATP-IPT); (2) tRNA-spezifische Isopentenyltransferase (tRNA-IPT); (3) Phosphatase; (4) Ribonucleotid-Phosphohydrolase; (5) Purin-Nucleosidribohydrolase (NRH) (6) Cytokinin-Phosphoribohydrolase *LONELY GUYS* (LOG); (7) Purin-Nucleosid-Phosphorylase (PNP); (8) Adenosin-Kinase (ADK); (9) Adenin-Phosphoribosyltransferase (APT); (10) Cytokinin-*N*-UDP-Glucosyltransferase (UGT); (11) Cytochrome-P450-Monooxygenase (CYP); (12) Cytokinin-Dehydrogenase; (13) Cytokinin-*O*-UDP-Glucosyltransferase; (14) β -Glucosidase; (15) Zeatin-Reduktase; (16) Zeatin-Isomerase. DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; HMBPP, 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(*E*)-Butenyldiphosphat; iPRDP, Isopentenylribosid-5'-diphosphat; iPRTTP, Isopentenylribosid-5'-triphosphat; iPRMP, Isopentenylribosid-5'-monophosphat; iPR, Isopentenyadenosin; iP7G, Isopentenyadenosin-7-Glucosid; iP9G, Isopentenyadenosin-9-Glucosid, und die äquivalenten Formen von tZ, DHZ und cZ; tZOG, *trans*-Zeatin-*O*-Glucosid; tZROG, *trans*-Zeatin-*O*-Glucosid-Ribosid und die äquivalenten Formen vom DZ und cZ; tZOX, *trans*-Zeatin-*O*-Xylosid; cZOX, *cis*-Zeatin-*O*-Xylosid. Abbildung modifiziert nach Spíchal (2012).

Als Gegenspieler zu den LOGs existieren Adenin-Phosphoribosyltransferasen (APTs), von denen die Umwandlung der freien Cytokininbasen in die korrespondierenden Cytokinin-nukleosidmonophosphate katalysiert wird (Moffatt *et al.* 1991). In *Arabidopsis* besteht die Familie der APTs aus fünf Vertretern. Innerhalb der Zelle sind APT1-3 im Zytosol lokalisiert (Allen *et al.* 2002). Die Lokalisation der anderen APTs ist unbekannt. Die APTs sind nicht cytokininspezifisch und binden auch Adenin. Obwohl in den durchgeführten *in vitro*-Messungen APT2 und APT3 deutlich höhere Affinitäten gegenüber Cytokinin zeigten als APT1, nimmt dieses in Bezug auf die Cytokinin-Konversion eine Schlüsselposition ein (Allen *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2013b). Der Knockout von *APT1* führt zu einer Akkumulation von freien Cytokininbasen und zu einer veränderten Cytokininantwort (Zhang *et al.* 2013b).

1.2.3 Der Cytokininabbau

Ein wichtiger Aspekt für die Regulation der Cytokininhomöostase ist der Abbau der Cytokinine. Deren irreversible Deaktivierung erfolgt durch die Abspaltung der N^6 -Seitenkette. Als Produkte entstehen ein Adenin bzw. Adenosin und das Seitenkettenaldehyd (Abbildung 3) (Brownlee *et al.* 1975, McGaw und Horgan 1983). Katalysiert wird diese Reaktion von Cytokinin-oxidasen/Dehydrogenasen (CKX), die als Co-Faktor FAD benötigen (Bilyeu *et al.* 2001). Eine Veränderung der CKX-Aktivität wirkt sich direkt auf die Cytokinin-Konzentration im Gewebe aus. Daher spielen die CKX-Enzyme für die Regulation cytokininabhängiger Prozesse eine wichtige Rolle. Außerdem wird sowohl die Cytokininaktivität (Motyka *et al.* 2003) als auch die Expression der CKX-Gene durch Cytokinin positiv reguliert (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012). Die ersten CKX-Enzyme wurden aus Mais isoliert. Seitdem wurden diese auch in vielen anderen Pflanzenarten (z.B. Tabak und Gartenbohnen) gefunden (Houba-Hérin *et al.* 1999, Morris *et al.* 1999, Schmülling *et al.* 2003, Werner *et al.* 2001). In *Arabidopsis* besteht die CKX-Genfamilie aus sieben Mitgliedern (*CKX1* bis *CKX7*) (Köllmer 2009, Werner *et al.* 2003). Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Expression, subzellulärer Lokalisation und in ihren biochemischen Eigenschaften (Schmülling *et al.* 2003).

Untersuchungen, von mit GFP fusionierten CKX-Proteinen, zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation, deuten auf eine Spezialisierung der einzelnen Enzyme: CKX1 und CKX3 sind im ER und der Vakuole lokalisiert, CKX7 im Zytosol und bei CKX2, CKX4 und CKX6 handelt es sich wahrscheinlich um sekretorische Proteine (Abbildung 2) (Köllmer 2009, Niemann *et al.* 2018, Werner *et al.* 2003).

Die Substratspezifität der verschiedenen CKX-Isoformen ist unterschiedlich und abhängig vom pH-Wert. Die sekretorischen Proteine CKX2, CKX4 und CKX6 zeigten insgesamt die stärksten Enzymaktivitäten und bevorzugten als Substrate die freien Cytokininbasen von tZ und iP (Galuszka *et al.* 2007). CKX1 wies die höchste Aktivität gegenüber den Cytokinin-nukleosidmono-, -di- und triphosphat-Formen auf. CKX3 bevorzugte als Substrat iPRMP,

iPRDP und iPRTP. CKX1 und das im Zytosol lokalisierte CKX7 nutzen auch iP9G als Substrat (Galuszka *et al.* 2007, Kowalska *et al.* 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass CKX1, CKX5 und CKX7 eine Affinität gegenüber cZ besitzen (Gajdošová *et al.* 2011, Köllmer *et al.* 2014). DHZ, Kin und BA sind hingegen gegen den Abbau durch CKX-Enzyme resistent (Galuszka *et al.* 2007, Zalabák *et al.* 2016). In den verschiedenen Geweben weisen die verschiedenen CKX-Gene jedoch spezifische, kaum überlappende Expressionsdomänen auf. Daher ist anzunehmen, dass die einzelnen Isoformen auch spezifische Funktionen einnehmen und den Cytokinin-Gehalt gewebespezifisch regulieren. Die CKX-Gene werden vor allem in teilungsaktivem Gewebe exprimiert z.B. im Sprossapex (CKX1, CKX2, CKX3), jungen Blättern (CKX4, CKX5) und im Procambium des Wurzelmeristems (CKX5), aber auch im Leitgewebe (CKX6, CKX7) (Bartrina *et al.* 2011, Köllmer *et al.* 2014, Werner *et al.* 2003). Teilweise überlappen die Expressionsdomänen von CKX und IPT. In diesen Bereichen finden oft verstärkt Zellteilungen statt, was auf eine parakrine oder autokrine Cytokininaktivität hinweisen könnte (Werner *et al.* 2006). Andererseits lässt die Kollokalisierung von CKX6 und IPT3 im Leitgewebe vermuten, dass durch die beiden Komponenten auch eine endokrine Funktion des Cytokininsignals gesteuert wird (Miyawaki *et al.* 2004, Werner *et al.* 2006).

Einzel-Knockouts von CKX-Genen haben in der Regel keine phänotypischen Veränderungen zur Folge, was die Redundanz der CKX-Gene belegt (Bartrina 2006, Bartrina *et al.* 2011). Daneben sprechen die Unterschiede in der Substratspezifität, den Expressionsdomänen und der subzellulären Lokalisation auch für eine Spezialisierung der einzelnen CKX-Gene. Die Überexpression verschiedener CKX-Gene führt zu Pflanzen mit stark verringertem endogenen Cytokinin-Gehalt und zu unterschiedlich stark ausgeprägten phänotypischen Veränderungen, die unter dem Begriff „Cytokinindefizienzsyndrom“ zusammengefasst werden. Charakteristischerweise zeigen diese Pflanzen eine verlangsamte Entwicklung mit einer Verzögerung des Blühzeitpunkts. Die Rosettenblätter und das apikale Sprossmeristem sind verkleinert, wohingegen die Wurzeln ein verstärktes Wachstum zeigen und mehr Lateralwurzeln bilden (Werner *et al.* 2003). Davon abweichend zeigen Überexpressionslinien von CKX7 einen Phänotyp mit einem stark verringerten Wurzelwachstum (Köllmer *et al.* 2014).

1.2.4 Die Konjugation der Cytokinine

Cytokinine können durch die Konjugation mit Ribose, Ribosephosphat, Glucose, Xylose, Alanin oder Methylthiogruppen modifiziert werden (Abbildung 1) (Sakakibara 2006). Modifizierte Cytokinine sind in der Regel biologisch inaktiv und unterscheiden sich in ihrer Stabilität und ihren Transporteigenschaften. Daher trägt die Konjugation zur Regulation des aktiven Cytokininpools bei (Hothorn *et al.* 2011, Mok und Mok 2001, Spíchal *et al.* 2004). Es wurden auch Cytokinine identifiziert, die an der N3-, N6-, oder N9-Position des Purinrings mit Ribose, Xylose oder Alanin modifiziert sind oder die an der N2-Position eine Methylthiogruppe

tragen. Die genaue physiologische Bedeutung dieser Cytokininformen ist jedoch unbekannt (Sakakibara 2006).

Die Cytokininformen mit der größten Abundanz sind neben den Cytokininnukleosiden (am $N9$ -Atom modifiziert mit Ribose) und den Cytokininnukleotiden (am $N9$ -Atom modifiziert mit Ribosephosphat) die Cytokininglucoside ($N7$ -, $N9$ - und O -Glucoside). Auch für die Cytokinin-Glucokongulate konnte bisher keine biologische Aktivität nachgewiesen werden (Spíchal *et al.* 2004). Je nachdem, ob der Zuckerrest dabei mit einem Hydroxylrest der N^6 -Seitenkette oder einem Stickstoffatom des Purinrings verknüpft wird, unterscheidet man zwischen O - und N -Glucosylierungen. Die Übertragung des Zuckers erfolgt durch UDP-Glucosyltransferasen (UGT) (Bowles *et al.* 2005). Diese Klasse wird auch als Glycosyltransferase Familie 1 bezeichnet und stellt unter den Glycosyltransferasen die größte Gruppe dar. Sie nutzen in der Regel Uridin-5'-diphosphat (UDP)-Glucose als Zucker-Donor und werden definiert durch das Vorhandensein des konservierten UDPGT-Sequenzmotivs (PROSITE Akzessionsnummer PS00375) (MacKenzie *et al.* 1997a, Ross *et al.* 2001). Bei pflanzlichen UGTs ist dieses erweitert und wird *plant secondary product glycosyltransferase* (PSPG)-Motiv genannt. Es ist an der Bindung des Zucker-Donors beteiligt und befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins. Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich die Akzeptorbindedomäne. Diese zeichnet sich durch eine höhere Sequenzvariabilität aus (Hughes und Hughes 1994, Paquette *et al.* 2009). Da die meisten pflanzlichen UGTs keine bekannten Signalsequenzen oder Transmembransequenzen aufweisen wird allgemein angenommen, dass sie im Zytosol lokalisiert sind (Bowles *et al.* 2006). Für die UGTs wurde eine eigene Nomenklatur entwickelt. Die Grundlage für die Einteilung der UGTs in Familien und Subfamilien erfolgt dabei nach Aminosäure-Sequenzähnlichkeit (Mackenzie *et al.* 1997b). Die UGTs bilden bei *Arabidopsis* eine der größten Genfamilien und zählen über 120 Vertreter (Paquette *et al.* 2009). Die UGT-Gene sind über das ganze Genom verteilt und bilden typischerweise Cluster aus zwei bis sieben Genen. Untereinander weisen diese häufig eine hohe Sequenzhomologie auf und bilden oft Subfamilien. In der Regel haben die UGTs bis zu zwei Introns, mehr als die Hälfte hat jedoch kein Intron (Ross *et al.* 2001). *In vitro*-Studien zeigen, dass die individuelle Bandbreite der Substrate sehr unterschiedlich sein kann. Während einige Enzyme viele Substrate nutzen, sind andere sehr spezifisch. Es gibt bisher keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen Sequenzidentität und Substratspezifität. Eine Vorhersage der Substratspezifität aufgrund phylogenetischer Analysen ist daher nicht möglich (Meek *et al.* 2008, Osmani *et al.* 2009). Im Jahr 2004 wurden in *Arabidopsis* von Hou *et al.* (2004) die ersten Cytokinin-Glucosyltransferasen identifiziert. Insgesamt sind im *Arabidopsis*-Genom bisher 107 UGTs annotiert (Ross *et al.* 2001). In dem durchgeführten Screen konnten unter 105 *in vitro* getesteten UGTs fünf identifiziert werden, die Cytokinin als Substrat nutzen. Unter diesen waren zwei Cytokinin- N -Glucosyltransferasen (UGT76C1 und UGT76C2) und drei

Mok und Mok 2001). Diese Annahme wird von der Tatsache unterstützt, dass die Überexpression von Cytokinin-O-Glucosyltransferasen in Mais (Pineda Rodó *et al.* 2008) und Tabak (Havlová *et al.* 2008, Martin *et al.* 2001a) zu der Akkumulation von Cytokinin-O-Glucosiden und der Ausbildung von Cytokinindefizienz-Phänotypen führt (Havlová *et al.* 2008, Pineda Rodó *et al.* 2008). Die beiden O-Glucosyltransferasen aus Mais sind stereospezifisch und nutzen hauptsächlich *cZ* als Substrat und *tZ* nur schwach (Martin *et al.* 2001b, Veach *et al.* 2003). Dies ist jedoch nicht der Fall bei den aus *Arabidopsis* identifizierten Enzymen UGT85A1, UGT73C5 und UGT73C1. *in vitro*-Messungen der Enzymaktivitäten rekombinanter Enzyme zeigten für UGT85A1 im Vergleich zu UGT73C1 und UGT73C5 um ein bis zwei Größenordnungen höhere Substratumsätze. UGT73C1 und UGT73C5 wiesen hingegen die höchste Aktivität gegenüber DHZ auf (Hou *et al.* 2004).

In Bezug auf UGT73C1 und UGT73C5 ist anzumerken, dass diese nicht cytokininspezifisch zu sein scheinen. Für UGT73C5 wurde gezeigt, dass dieses auch eine Aktivität gegenüber Brassinosteroiden aufweist (Poppenberger *et al.* 2005). Überexpressionslinien von UGT73C5 zeigen verringerte Brassinosteroid-Konzentrationen und einen Brassinosteroid-Defizienz-Phänotyp (Poppenberger *et al.* 2005). Für UGT73C1 wurde außerdem eine Substratspezifität für Trinitrotoluol *in vivo* und für Steviol *in vitro* nachgewiesen (Gandia-Herrero *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2018). Die Expression von *UGT73C1* wird zudem durch Trinitrotoluol induziert, was die physiologische Relevanz dieser Reaktion untermauert (Gandia-Herrero *et al.* 2008). Daher scheint UGT85A1 unter den bisher bekannten Cytokinin-O-Glucosyltransferase die wichtigste Rolle zu spielen. Überexpressionslinien von *35S:UGT85A1* zeigen eine deutliche Akkumulation von *tZ*-O-Glucosiden. Unter Standardwachstumsbedingungen waren keine morphologischen Veränderungen zu beobachten, wobei das Wurzelwachstum weniger sensitiv gegenüber Cytokinin war (Jin *et al.* 2012). Auch der Knockout von *UGT85A1* führt unter Standardwachstumsbedingungen nicht zu einer Veränderung der Morphologie. Als einzige Auffälligkeit konnte in abgetrennten Blättern eine reduzierte Chlorophylldegradation, eine erhöhte Anthocyanakkumulation und eine veränderte Expression von stress- und seneszenzassoziierten Genen beobachtet werden (Šmehilová *et al.* 2016). Es ist denkbar, dass es noch weitere Cytokinin-O-Glucosyltransferasen gibt. Erst kürzlich wurde mit UGT85A3 eine weitere, putative Cytokinin-O-Glucosyltransferase beschrieben (Cucinotta *et al.* 2018). Dabei handelt es sich um die UGT mit der höchsten Sequenzhomologie zu UGT85A1 (Woo *et al.* 2007). Studien zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von UGT85A1 zeigen, dass dieses im Cytoplasma und im Nucleus lokalisiert ist (Jin *et al.* 2012). Die Speicherung der Cytokinin-O-Glucoside erfolgt in *Chenopodium rubrum* möglicherweise in der Vakuole. Dahingegen zeigten Messungen in *Arabidopsis* und Gerste, dass diese neben der Vakuole vor allem extrazellulär lokalisiert sind (Jiskrová *et al.* 2016, Kiran *et al.* 2012, Šmehilová *et al.* 2016). Die Cytokinin-O-Glucosyltransferasen werden gewebe- und entwicklungspezifisch

exprimiert. Sie kommen in gekeimten Samen, in Kotyledonen, im Hypokotyl der Primärwurzel und in Wurzelspitzen von jungen Keimlingen vor. In späteren Stadien sind sie hauptsächlich in der Blattperipherie und in Blattprimordien, in den Initialen von Seitenwurzeln und im Wurzelapex sowie im reifen Embryo exprimiert (Jin *et al.* 2012, Woo *et al.* 2007). Es wurde außerdem gezeigt, dass im Lauf der Seneszenz die Expression von *UGT85A1* hochreguliert wird und insbesondere tZOG akkumuliert (Šmehilová *et al.* 2016). Die gezielte Glucosylierung und Hydrolyse des Glucoserests stellen wahrscheinlich wichtige Mechanismen dar, um die Konzentration des aktiven Cytokinins zu regulieren. Die Abspaltung des Zuckerrestes wird von β -Glucosidasen katalysiert. Diese konnten bisher allerdings nur in Mais und *Brassica napus* identifiziert werden (EC 3.2.1.21) (Brzobohaty *et al.* 1993, Falk und Rask 1995).

1.2.4.2 Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung

Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung kann an den Stickstoffatomen des Purinrings *N3*, *N7* und *N9* erfolgen (Sakakibara 2006). In klassischen Bioassays wiesen *N3*-, nicht aber *N7*- und *N9*-Cytokininglucoside, eine biologische Aktivität auf. Allerdings besteht die Annahme, dass die *N3*-Glucosylierung von Cytokinin reversibel ist und die biologische Aktivität aus der metabolischen Freisetzung der aktiven Base rührt (Letham *et al.* 1975, Vanstaden und Drewes 1992). Es wird angenommen, dass alle Cytokinin-*N*-Glucoside von den AHK-Cytokininrezeptoren nicht gebunden werden können und *per se* biologisch inaktiv sind (Hothorn *et al.* 2011, Letham *et al.* 1983). Cytokinin-*N3*-Glucoside konnten bereits aus verschiedenen Pflanzenarten isoliert werden, jedoch ist der Syntheseweg und ihre genaue physiologische Bedeutung noch weitgehend unklar. Da sie biologisch inaktiv sind, die Modifikation aber reversibel ist, wird angenommen, dass die Cytokinin-*N3*-Glucoside eine Speicherform darstellen (Bajguz und Piotrowska 2009, Vanstaden und Drewes 1992). Die *N7*- und *N9*-Glucoside hingegen sind resistent gegen die Spaltung durch die bisher bekannten β -Glucosidasen (Brzobohaty *et al.* 1993, Letham und Palni 1983, Vanstaden und Drewes 1992). Daher wurde postuliert, dass Cytokinin-*N7*- und -*N9*-Glucosylierungen zu einer irreversiblen Inaktivierung von Cytokinin führt. Die Hypothese, dass es sich bei Cytokinin-*N*-Glucosiden um Stoffwechselprodukte handelt, wird auch durch neuere Studien unterstützt (Šmehilová *et al.* 2016). Demnach akkumulieren die Cytokinin-*N*-Glucoside im Laufe der pflanzlichen Entwicklung sehr stark (Šmehilová *et al.* 2016). Die Tatsache, dass nach der exogenen Zugabe von radioaktiv markiertem Cytokinin, neben den CKX-Abbauprodukten Adenin und Adenosin von Cytokinin, vor allem *N7*- und *N9*-Glucoside akkumulieren belegt deren Bedeutung für die Inaktivierung von überschüssigem Cytokinin (Letham und Palni 1983, Mcgaw *et al.* 1984, Niemann *et al.* 2015, Parker *et al.* 1973).

Die ersten Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen wurden 1979 aus Rettich (*Raphanussativus*) isoliert. Diese Enzyme zeigten die höchste Aktivität iP und die Glucosylierung erfolgte hauptsächlich an der *N7*-Position (Entsch und Letham 1979). Die aus *Arabidopsis* identifizierten Glucosyltransferasen *UGT76C1* und *UGT76C2* nutzen sowohl isoprene als auch aromatische Cytokinine als Substrate. Dabei erfolgte die Glucosylierung sowohl an der *N7*- und *N9*-Position des Cytokininpurinrings, abgesehen von BA wurde die *N7*-Position aber bevorzugt. Beide UGTs zeigten folgende Substratpräferenzen: DHZ >> iP > tZ >> tZOG >> cZ > BA. Für beide Glucosyltransferasen liegt das pH-Optimum bei 7,0 (Hou *et al.* 2004). Überexpressionslinien und Einzel-Transfer-DNA (T-DNA)-Insertionslinien von *UGT76C1* und *UGT76C2* in *Arabidopsis*, zeigen unter Standardwachstumsbedingungen keine auffälligen Veränderungen des Phänotyps (Hou *et al.* 2004, Wang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Der endogene Gehalt der Cytokinin-*N7*- und -*N9*-Glucoside war im Vergleich zu WT-Pflanzen allerdings in den Überexpressionslinien erhöht bzw. in der Knockout-Linie verringert (Hou *et al.* 2004, Wang *et al.* 2011). Außerdem zeigten die Mutantenlinien leichte Veränderungen in der Expression von Cytokininantwortgenen und in der Cytokinin-Sensitivität gegenüber exogen appliziertem Cytokinin. Dabei waren die beobachteten Veränderungen für *UGT76C2* eindeutiger als für *UGT76C1*. Die durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass zumindest *UGT76C2* zu der Regulation der Cytokininhomöostase beiträgt (Šmehilová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Für die physiologische Bedeutung von *UGT76C2* spricht auch, dass viele Studien die Induktion der Expression von *UGT76C2* durch Cytokinin belegen (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012, Šmehilová *et al.* 2016). Von Li *et al.* (2015b) wurde postuliert, dass *UGT76C2* eine Rolle bei der Adaption an Trockenstress spielt (Li *et al.* 2015b). Da die Einzel-Knockout-Mutanten von *UGT76C1* und *UGT76C2* keine auffälligen phänotypischen Veränderungen zeigten, ist anzunehmen, dass die beiden Gene zumindest teilweise funktional redundant sind. Dies verdeutlichtet weiterhin die Kapazität der Cytokininhomöostase Störungen des Cytokinin-Metabolismus auszugleichen und die Konzentrationen der aktiven Cytokinine aufrechtzuerhalten.

In transient und stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen war das Fusionsprotein *UGT76C2*-GFP im Zytosol und im Nukleus lokalisiert (Brock 2012, Šmehilová *et al.* 2016). Die in Tabak durchgeführten Lokalisationsstudien für *UGT76C1* waren nicht eindeutig und könnten neben dem Vorkommen im Zytosol und Nukleus auch auf eine Lokalisation im sekretorischen Weg hinweisen (Brock 2012). Die Cytokinin-*N*-Glucoside selbst sind in verschiedenen Zellkompartimenten zu finden. Beide Formen zeigten die höchsten Konzentrationen im Apoplast. Die Cytokinin-*N7*-Glucoside waren außerdem in der Vakuole lokalisiert, wo hingegen die Cytokinin-*N9*-Glucoside in allen Kompartimenten zu finden waren (Jiskrová *et al.* 2016). Die Studien zur subzellulären Lokalisation der Enzyme belegen, dass die Reaktion der Cytokinin-*N*-Glucosylierung zumindest teilweise im Zytosol stattfindet. Wie der Transport der

N-Glucoside aus der Zelle und in die Vakuole erfolgt, ist bisher nicht bekannt. Da keine Daten von Doppel-Knockout-Mutanten vorliegen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass es sich bei UGT76C1 und UGT76C2 um die einzigen Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen handelt. Die genaue physiologische Funktion der Cytokinin-*N*-Glucosylierung, wie diese zu der Regulation des aktiven Cytokininpools beiträgt und in welchen Entwicklungsstadien oder Geweben diese von Bedeutung ist, ist noch nicht vollständig verstanden.

1.2.5 Der Cytokinintransport

Aus den Beschreibungen der vorangegangenen Abschnitte wird deutlich, dass die verschiedenen Enzyme, welche die Cytokininhomöostase steuern und die Cytokinin-Metabolite selbst, in verschiedenen Zellkompartimenten auftreten. So finden Biosynthese und Perzeption von Cytokinin beispielsweise in unterschiedlichen Zellkompartimenten statt. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von gezielten Transportmechanismen, da die Verteilung der Cytokinin-Metabolite zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten für die Cytokininhomöostase von zentraler Bedeutung ist (Abbildung 2). Wie der Transport der Cytokinin-Metabolite zwischen den verschiedenen Zellorganellen erfolgt und reguliert wird, ist bisher noch nicht bekannt.

Innerhalb der Pflanze werden Cytokinine in vielen verschiedenen Geweben synthetisiert und wirken in vielen Zusammenhängen als lokales, parakrines Signal (Hwang *et al.* 2012). Beispiele dafür sind unter anderem die Regulation der Lateralwurzelbildung oder der Größe und Aktivität des apikalen Sprossmeristems (SAM) (Zürcher und Müller 2016). In diesen Fällen ist es denkbar, dass das Cytokinin zwischen den Zellen symplastisch transportiert wird. Für eine autokrine Wirkungsweise des Cytokininsignals gibt es keine gut dokumentierten Beispiele. Möglicherweise sind autokrine Cytokininsignale für die Regulation des Zellzyklus und für Schutzmechanismen gegen abiotischen Stress relevant (Romanov *et al.* 2018).

In vielen Geweben gibt es hingegen keine Überlappung zwischen den Expressionsdomänen von den *IPT*-Biosynthesegenen und den Bereichen, in denen die Cytokininaktivität messbar ist (Zürcher *et al.* 2013). Es wird daher angenommen, dass Cytokinin neben der Funktion als auto- und parakrines Signal auch als Langstreckensignal dient. Pfropfungsexperimente haben gezeigt, dass Cytokinine innerhalb der Pflanze durch die Leitgewebe in beide Richtungen transportiert werden und die Kommunikation zwischen Wurzel und Spross vermittelt. Aus den Wurzeln wird über das Xylem hauptsächlich tZR (~ 80 %) und zu einem geringeren Anteil auch tZ (~ 15 %) in den Spross transportiert. Von den Sprossen in die Wurzeln erfolgt vor allem der Transport von Cytokininen des iP-Typs über das Phloem (Hirose *et al.* 2008, Kamada-Nobusada und Sakakibara 2009, Kiba *et al.* 2013, Kudo *et al.* 2010, Miyawaki *et al.* 2004, Shimizu-Sato *et al.* 2009). Von den Cytokininen, die aus den Wurzeln in die Sprosse transportiert werden, ist tZR an der Regulation der Meristemaktivität und der Blattgröße

beteiligt. Das transportierte tZ trägt hingegen nur zur Regulation der Blattgröße bei (Osugi *et al.* 2017). In Abhängigkeit von Stickstoff verschiebt sich das Verhältnis des transportierten tZ und tZR. Daher wird angenommen, dass Cytokinin auch als Langstreckensignal für den Stickstoffstatus dient (Rahayu *et al.* 2005). Cytokinin scheint auch einer Rückkopplungsschleife für die Aufnahme von Makronährstoffen beteiligt zu sein (Brenner *et al.* 2005, Hirose *et al.* 2008). Es wird vermutet, dass die Pflanzen durch diese Modulationen das Sprosswachstum an die sich verändernden Umweltbedingungen anpassen (Miyawaki *et al.* 2004, Osugi *et al.* 2017, Takei *et al.* 2001b, Takei *et al.* 2004a). Der Transport des Cytokinins aus den Sprossen in die Wurzeln erfolgt im Phloem symplastisch. Das aus den Sprossen transportierte Cytokinin spielt in den Wurzeln eine wichtige Rolle für die Regulation des polaren Auxin-Transports und für die Bildung und Differenzierung des vaskulären Gewebes (Bishopp *et al.* 2011a, Bishopp *et al.* 2011b).

Damit Cytokinin als Langstreckensignal fungieren kann, muss es aus der Zelle ein- und ausgeschleust werden. Erst vor kurzem wurde in *Arabidopsis* der *ATP-binding cassette* Transporter (ABCG)14 identifiziert, durch welchen Cytokinin aus der Zelle in das Xylem gelangt. *ABCG14* wird hauptsächlich in Wurzelzellen des Perizykels und der Stele exprimiert und ist in der Plasmamembran lokalisiert. Der *ABCG14*-Knockout führt zu einem signifikant reduzierten Gehalt von Cytokinin des tZ-Typs im Xylem und zu cytokinindefizienten Sprossphänotypen (Ko *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2014). Die Familie der ABCG-Proteine umfasst viele weitere Mitglieder mit teilweise unbekannter Funktion. Daher ist es denkbar, dass es noch andere ABCG-Transporter gibt, die Cytokinin exportieren (Durán-Medina *et al.* 2017).

Es gibt zwei Proteinfamilien die als Influx-Carrier-Proteinen für Cytokinin fungieren. Zum einen die Familie der Purin-Permeasen (PUPs) (Bürkle *et al.* 2003, Gillissen *et al.* 2000, Zürcher *et al.* 2016) und zum anderen die Familie der äquilibrierenden Nucleosidtransporter (ENTs), wobei beide Gruppen nicht Cytokinin-spezifisch sind (Hirose *et al.* 2005, Sun *et al.* 2005, Wormit *et al.* 2004).

Die *PUP*-Genfamilie umfasst mehr als 20 Mitglieder, die vor allem Purine transportieren. Der Transport von freien Cytokininbasen und zu einem geringeren Anteil auch deren Ribosid-Formen wurde nur für *PUP1*, *PUP2* und *PUP14* nachgewiesen (Bürkle *et al.* 2003, Zürcher *et al.* 2016). Es ist jedoch möglich, dass weitere Vertreter dieser Familie Cytokinin transportieren (Zürcher und Müller 2016). Eine umfangreiche Studie der Expressionsdomänen von mehr als 12 verschiedenen PUPs hat gezeigt, dass diese in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert sind (Cedzich *et al.* 2008, Zürcher *et al.* 2016).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression von *PUP14* invers mit Domänen korreliert, in denen Cytokinin aktiv ist (Zürcher *et al.* 2016). Von den Autoren wurde ein Modell postuliert, nachdem *PUP14* das aktive Cytokinin aus dem Apoplast internalisiert, bevor dieses die Cytokininrezeptoren in der Plasmamembran aktivieren kann. Die *PUP14*-Aktivität stellt somit

einen weiteren Mechanismus zur Regulation der Cytokininsignalaktivität dar (Zürcher *et al.* 2016). Interessanterweise sind neben PUP14 auch andere Vertreter der PUP-Proteinfamilie in der ER-Membran lokalisiert. Demnach könnten diese auch an der Regulation der Cytokininkonzentration im ER-Lumen beteiligt sein (Romanov *et al.* 2018).

Für die Gruppe der ENT-Proteine konnte für *AtENT3*, *AtENT6* und *AtENT7* aus *Arabidopsis* und für *OsENT8* aus Reis in Hefen der Transport von Cytokininnukleosiden nachgewiesen werden (Hirose *et al.* 2005, Hirose *et al.* 2008, Sun *et al.* 2005). Auch die Studien der Knockout-Mutanten *ent8* und *ent3* belegen die physiologische Funktion der ENT-Proteine als Cytokininnukleosid-Transporter (Sun *et al.* 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von *AtENT8* den Überexpressionsphänotyp von *IPT8* unterdrückt (Sun *et al.* 2005). *AtENT6* und *OsENT2* sind unter anderem in der Vaskulatur exprimiert, was auf eine Funktion der Proteine im Langstreckentransport von Nukleosiden hinweist (Hirose *et al.* 2008).

1.3 Das apikale Sprossmeristem

In der pflanzlichen Entwicklung ist im Embryo der Bauplan des adulten Organismus noch nicht festgelegt. In der postembryonalen Entwicklung werden fortlaufend neue Organe, wie z.B. Blätter, Blüten und Seitenwurzeln, gebildet (Bäurle und Laux 2003). Das Teilungswachstum beschränkt sich bei *Arabidopsis*, wie bei den meisten Pflanzen, auf die Spitzen des Spross- und Wurzelpols. Die sogenannten Meristeme enthalten pluripotente Stammzellen. Dabei handelt es sich um Zellen, die immer wieder inäquale Zellteilungen durchlaufen. Von den entstehenden Tochterzellen behält eine die Stammzellidentität. Die zweite Tochterzelle differenziert sich in einen anderen Zelltyp, teilt sich aber vorerst weiter (Morrison *et al.* 1997). Durch die Erhaltung der Stammzellen im Meristem bleibt auch die Möglichkeit des fortlaufenden Wachstums und der Organneubildung bestehen, obwohl beständig Zellen an die umliegenden Gewebe abgegeben werden. Die apikalen Meristeme am Sprosspol (*shoot apical meristem*, SAM) und am Wurzelpol (*root apical meristem*, RAM) werden bereits sehr früh in der Embryogenese angelegt und daher auch als Primärmeristeme bezeichnet. Daneben existieren sogenannte Folgermeristeme oder auch Sekundärmeristeme, die erst nach der Keimung gebildet werden. Zum Beispiel entstehen in den Blattachsen am Spross bzw. in Perizykelzellen der Wurzeln neue Seitenmeristeme, von denen Seitensprosse bzw. Seitenwurzeln gebildet werden (Scheres 2007). In ihrer Funktion und ihrem Aufbau unterscheiden sich Seitenmeristeme nicht von den Primärmeristemen.

Das SAM bildet alle oberirdischen Organe der Pflanze. In der vegetativen Wachstumsphase werden Stängelsegmente und Blätter gebildet. Nach dem Übergang in die reproduktive Phase wird der Infloreszenzstamm ausgebildet und Blüten gebildet (Pfeiffer *et al.* 2017).

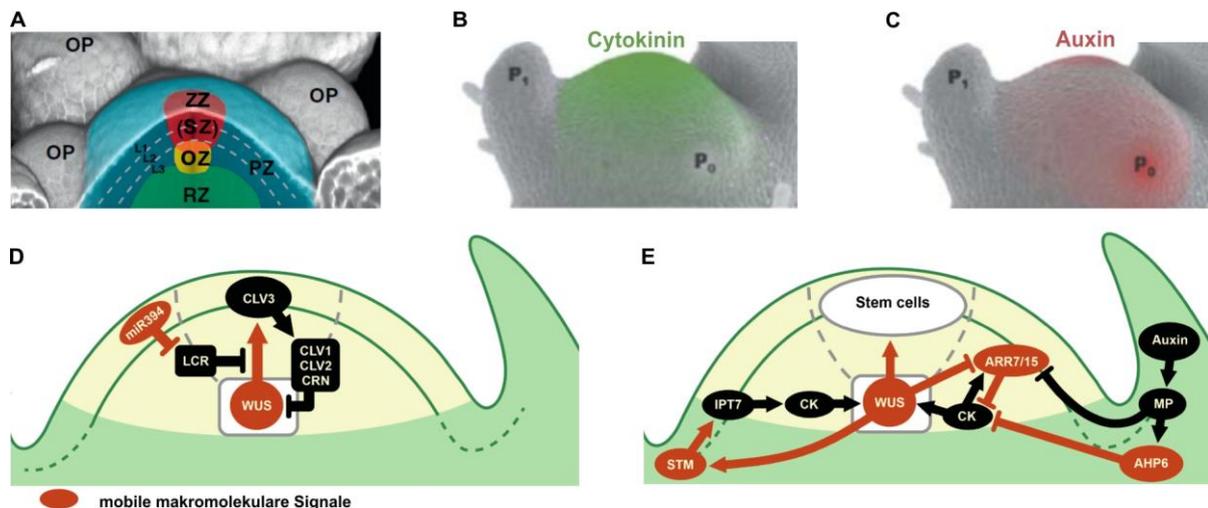


Abbildung 5. Der Aufbau des apikalen Sprossmeristems und die Verteilung makromolekularer Signale.

A) Das SAM kann in verschiedene Bereiche eingeteilt werden. Die Stammzellen (SZ) liegen in der Zentralen Zone (ZZ) in drei untereinanderliegenden Schichten (L1-L3). Neugebildete Zellen werden in die peripheren Bereiche (PZ) und in das Rippenmeristem (RZ) abgegeben. In der Peripherie differenzieren sich die Zellen und bilden Organprimordien (OP), die später zu Blüten und Blättern auswachsen. Unterhalb der SZ liegt das organisierende Zentrum (OZ), welches für die Aufrechterhaltung der Stammzellen notwendig ist.

B) und C) Verteilung der Pflanzenhormone Cytokinin und Auxin im SAM.

D) Der Transkriptionsfaktor *WUSCHEL* (*WUS*) wird im OZ exprimiert und migriert in die ZZ, in der er die Expression seines eigenen Negativregulators *CLAVATA3* (*CLV3*) induziert. *CLV3* aktiviert über die Rezeptoren *CLAVATA1* (*CLV1*) und *CLAVATA2* (*CLV2*)/*CORYNE* (*CRN*) eine Signalkaskade, durch welche *WUS* reprimiert wird. Durch die wechselseitige Beeinflussung von *CLV3* und *WUS* wird die Größe der Stammzellpopulation konstant gehalten. Die MicroRNA *mir334* wird in der L1 exprimiert und unterdrückt in den darunterliegenden Zellschichten die Expression von *LEAF CURLING RESPONSIVENESS* (*LCR*), wodurch wiederum die *WUS*-Aktivität gefördert wird.

E) *WUS* fördert die *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)-Expression, *STM* aktiviert seinerseits die Cytokinin-Biosynthese, indem es die Expression von *IPT7* induziert. *WUS* unterdrückt zudem die A-TYP *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOREN* (*ARR*) 7 und *ARR15*. Dadurch entsteht ein Cytokininmaximum im OZ, was wiederum die *WUS*-Expression induziert. In den Organprimordien wird. Abbildungen modifiziert nach (Gaillochet *et al.* 2015, Kitagawa und Jackson 2017, Shani *et al.* 2006).

Das apikale Sprossmeristem kann in verschiedene Bereiche unterteilt werden (Abbildung 5A). In der Mitte des kegelförmigen Meristems befindet sich die zentrale Zone (ZZ) des Meristems, welche die Stammzellen in drei untereinander liegenden Schichten (L1-L3) enthält. Die Zellen der L1 und der L2 teilen sich ausschließlich antiklin und bilden jeweils die Epidermis und das Grundgewebe. Aus den Zellen der L3 geht die Vaskulatur hervor und die Zellen teilen sich in alle Richtungen. Die von den Stammzellen gebildeten, noch undifferenzierten Zellen, verlassen die ZZ entweder seitlich in die periphere Zone (PZ) des Meristems oder basal in die Zone des Rippenmeristems (RZ). Die seitlich abwandernden Zellen bilden in der weiteren Entwicklung Organprimordien, die schließlich zu Blättern, Stängeln und Blüten auswachsen. Die basal abwandernden Zellen differenzieren zu Zellen der Vaskulatur oder des Stängels aus (Gaillochet *et al.* 2015). Unmittelbar unter den Stammzellen liegt die Domäne des organisatorischen Zentrums (OZ), welche für die Aufrechterhaltung der Stammzellidentität von Bedeutung ist. In der Literatur wird das OZ der ZZ oder der RZ zugeordnet (Aichinger *et al.* 2012, Perales und Reddy 2012). Die Zellidentität und die Fähigkeit zur Differenzierung einer Zelle ist abhängig von ihrer relativen Position innerhalb des pflanzlichen Gewebes und verändert sich mehrmals im Verlauf der zellulären Entwicklung (Pfeiffer *et al.* 2017). Dabei

müssen die teilungsaktiven Zellen im Zentrum in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden, während in den peripheren Bereichen des Meristems die Differenzierung der Zellen induziert werden muss. Gesteuert wird dieser Prozess durch ein Netzwerk aus genetischen Regulatoren im Zusammenspiel mit Pflanzenhormonen. Dabei spielen vor allem Cytokinin und Auxin eine entscheidende Rolle (Pierre-Jerome *et al.* 2018). Mutanten mit einem verringerten Cytokininlevel haben in der Regel auch verkleinerte SAM. *Vice versa* weisen Mutanten mit einer erhöhten Cytokinin-Konzentration vergrößerte Meristeme auf. Daher wird angenommen, dass Cytokinin ein Positivregulator der Zellteilung im SAM ist (Bartrina *et al.* 2011, Landrein *et al.* 2018). Anders als im RAM wirken Cytokinin und Auxin im SAM teilweise synergistisch, so verstärkt Auxin im OZ die Cytokinin-Sensitivität indem es *ARR7* und *ARR15* reprimiert (Zürcher und Müller 2016).

1.3.1 STM und Cytokinin im SAM

Eine Schlüsselkomponente in dem regulatorischen Netzwerk ist der Klasse I KNOTTED1 (KN1)-like- Homeobox (KNOX1) Transkriptionsfaktor SHOOTMERISTEMLESS (STM). *stm*-Mutanten können keine Meristeme bilden und stellen ihr Wachstum bereits nach der Kotyledonenbildung ein (Endrizzi *et al.* 1996). *STM* wird, von den Primordien abgesehen, im gesamten Meristem exprimiert (Long *et al.* 1996) und stimuliert durch die Aktivierung von *IPT7* die Cytokinin-Biosynthese (Yanai *et al.* 2005) (Abbildung 5E). Die für die Aktivierung der Cytokininvorstufen notwendigen Enzyme *LOG4* und *LOG7* sind im Meristem exprimiert. *LOG4* ist in der L1-Schicht und *LOG7* in Epidermisnähe, in der Peripherie bzw. jungen Primordien exprimiert (Gruel *et al.* 2016). Da die Zellen im Meristem durch Plasmodesmata miteinander verbunden sind, entsteht durch diese Verteilung und der Diffusion des aktiven Cytokinins ein Cytokiningradient (Abbildung 5B) (Chickarmane *et al.* 2012, Gruel *et al.* 2016, Kurakawa *et al.* 2007). Die Perzeption des Cytokinins erfolgt durch AHK-Rezeptoren (Absatz 1.1.1), die nur in der zentralen Domäne des OZ exprimiert sind (Gordon *et al.* 2009, Gruel *et al.* 2016, Pierre-Jerome *et al.* 2018). In diesem Bereich weist auch das synthetische Reporterkonstrukt der Cytokininantwort *pTCSn:GFP* die höchste Cytokininaktivität auf (Zürcher *et al.* 2013). Das Cytokinin induziert unter anderem die Expression von D-Typ Cyklinen (CYCD3s), welche die Zellteilung fördern und die Endoreplikation sowie die Zelldifferenzierung unterdrücken (Dewitte *et al.* 2003). Außerdem aktiviert Cytokinin in einer positiven Feedbackregulation die *STM* Expression (Kieber und Schaller 2014). *STM* reguliert auch die Gibberellinkonzentration im Meristem. Indem es die Gibberellinbiosynthese unterdrückt und gleichzeitig die Inaktivierung von Gibberellin, wird die Gibberellinaktivität auf die Primordien beschränkt, wo es die Blattentwicklung fördert (Hay *et al.* 2002, Jasinski *et al.* 2005).

Wie bereits beschrieben sind viele Komponenten der Cytokinin-signaltransduktion und des Cytokinin-Metabolismus, wie beispielsweise die AHKs, die IPT und die LOGs, im Meristem

domänenspezifisch exprimiert. Wahrscheinlich wird dadurch der Cytokinin-Status domänenspezifisch reguliert. Auch die Cytokinin-abbauenden Enzyme CKX3 und CKX5 sind im SAM domänenspezifisch exprimiert. *CKX3* wird stark im OZ exprimiert. Dahingegen ist *CKX5* vor allem in der RZ und im provaskulären Gewebe lokalisiert. *ckx3,5*-Doppelmutanten weisen vergrößerte Meristeme mit einer erhöhten Aktivität auf, und zeigen eine erhöhte WUS-Expression (Bartrina *et al.* 2011).

1.3.2 Die CLAVATA-WUSCHEL-Regulation

Ein weiterer Homöobox-Transkriptionsfaktor, der maßgeblich an der Regulation der Meristemaktivität beteiligt ist, ist WUSCHEL (WUS). Die WUS-Aktivität ist notwendig für den Erhalt der Stammzellidentität in den darüber liegenden Zellschichten. Der Verlust von WUS führt zur Ausdifferenzierung des Meristems (Laux *et al.* 1996). Aufgrund seiner regulatorischen Funktion der Stammzellaktivität wird die Domäne des OZ durch die Expression von *WUS* definiert (Abbildung 5D). Der im OZ translatierte WUS-Transkriptionsfaktor migriert über die Plasmodesmata in die Stammzelldomäne (Yadav *et al.* 2011). In den Stammzellen liegt WUS als Monomer vor und induziert die Expression seines eigenen Negativregulator CLAVATA3 (CLV3) (Rodriguez *et al.* 2016, Yadav *et al.* 2011). Im OZ selbst liegt WUS als Dimer vor und unterdrückt die *CLV3*-Expression (Perales *et al.* 2016). *CLV3* ist ein kleines Peptid der CLE-Proteinfamilie (Fletcher *et al.* 1999, Kondo *et al.* 2006). Da es nur in den Stammzellen exprimiert ist, wird es in Markeranalysen häufig als Stammzellenmarker verwendet. Das *CLV3*-Peptid wird von den Stammzellen in den Apoplast sekretiert und aktiviert in den basalen Zellschichten den CLV-Signalweg (Brand *et al.* 2002, Brand *et al.* 2001, Fletcher *et al.* 1999, Rojo *et al.* 2002). Die Signaltransduktion von *CLV3* erfolgt zum einen durch die membranständigen Rezeptorkinasen CLAVATA1 (CLV1) und RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2), als auch durch einen Rezeptorkomplex, der aus dem rezeptorähnlichen Protein CLV2 und der Membrankinase CORYNE (CRN) (CLV2/CRN) besteht (Jeong *et al.* 1999, Kinoshita *et al.* 2010, Lenhard und Laux 2003, Muller *et al.* 2008). Über den CLV-Signalweg wird die *WUS*-Expression negativ reguliert (Somssich *et al.* 2016). Der Verlust von *CLV3* führt zu einer Akkumulation von Stammzellen in der ZZ (Laufs *et al.* 1998). Die beiden Komponenten WUS und *CLV3* regulieren gegenseitig ihre Transkription und halten so die Größe der Stammzellpopulation im SAM konstant. Dabei stehen *WUS*-Repression und *CLV3*-Expression im Gleichgewicht.

Die Expression von *WUS* wird zudem auch durch Cytokinin induziert und WUS fördert seinerseits die Cytokininaktivität, indem es die Negativregulatoren der Cytokininantwort ARR7 und ARR15 unterdrückt (Abbildung 5E). Die beiden Komponenten begünstigen sich somit gegenseitig (Leibfried *et al.* 2005, Meng *et al.* 2017).

Neben Proteinen fungieren im SAM auch *small non-coding RNAs* (sRNAs) als mobile Signale und tragen zur Regulation der Stammzellaktivität bei. Beispielsweise wird die microRNA (miRNA) *MIR394* in der L1-Schicht des Meristems exprimiert, migriert in die L2- und L3-Schichten und reprimiert dort die Expression ihres Zielgens *LEAF CURLING RESPONSIVENESS* (*LCR*). Diese Regulation ist für die Aufrechterhaltung der Stammzellaktivität notwendig (Knauer *et al.* 2013, Tucker *et al.* 2008).

1.3.3 Die Organinitiation im SAM

Die Initiation von Primordien erfolgt periodisch in den peripheren Bereichen des Meristems. Dabei wird das neugebildete Primordium immer im maximalen Abstand zu den bereits vorhandenen angelegt. Dieser Prozess wird im Wesentlichen durch Auxin reguliert. Der polare Transport von Auxin durch PIN1-Auxin-Carrier führt zu der Entstehung von lokalen Auxinmaximum, an denen die Primordienbildung ausgelöst wird. Um die Primordien entstehen lokale Auxinminima, die auch inhibitorische Felder genannt werden (Abbildung 5C). Auf molekularer Ebene werden unter anderen *AUXIN RESPONSE FAKTOREN* (*ARFs*) aktiviert, wie beispielsweise der Transkriptionsfaktor *ARF5 MONOPTEROS* (*MP*). *MP* ist für die Organinitiation essenziell und koordiniert die Cytokinin- und Auxinsignale, indem es unter anderem den Cytokinin-Negativregulator *AHP6* aktiviert, der im Bereich um die Primordien die Cytokinin-Aktivität inhibiert (Abbildung 5E) (Gaillochet *et al.* 2015, Kitagawa und Jackson 2017). An der Regulation der Organinitiation und Phyllotaxis sind viele Komponenten und neben Cytokinin und Auxin auch weitere Pflanzenhormone, wie beispielsweise Gibberellin, beteiligt. Dieses wirkt antagonistisch zu Cytokinin und fördert zusammen mit Auxin die Primordienbildung und die Blattentwicklung in den peripheren Bereichen des SAMs (Shani *et al.* 2006).

1.4 Ansätze der reversen Genetik

Das Ziel von genetischen Analysen besteht in der Aufklärung von Genfunktionen. Es werden dabei zwei grundlegende Vorgehensweisen unterschieden: In der klassischen Genetik (auch Vorwärts-Genetik) werden unter Mutantenpopulationen Individuen mit phänotypischen Veränderungen ausgewählt. Anschließend wird das Gen identifiziert, welches die für den Phänotyp ursächliche Mutation trägt und so auf die Funktion des Gens geschlossen. In der reversen Genetik (auch Rückwärts-Genetik) wird diese Vorgehensweise umgekehrt. Dabei wird das zu untersuchende Gen modifiziert und anschließend untersucht, wie sich diese Veränderung auf den Phänotyp auswirkt. Ansätze der reversen Genetik setzen voraus, dass die Genomsequenzen der untersuchten Organismen bekannt sind und dass die Genfunktion durch molekularbiologische Methoden verändert werden können. Der rückwärts-genetische Ansatz wurden daher erst mit der Weiterentwicklung der entsprechenden Technologien möglich.

Die Genfunktion kann durch die Veränderung der Genomsequenz selbst oder auf RNA-Ebene modifiziert werden. Einige Methoden, die auf Transkriptionsebene angreifen und gezielt die Expression von bestimmten Genen unterdrücken, basieren auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz, einem in vielen Eukaryoten hochkonservierten Mechanismus, durch den die Genexpression über kleine RNA Moleküle gesteuert wird (Fire *et al.* 1998, Small 2007). Zu diesen small RNA (sRNA) gehören unter anderem microRNAs (miRNAs) und *short interfering RNAs* (siRNAs). Beide gehören zu den nicht-proteinkodierenden RNAs und regulieren die Genexpression auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene, indem sie sequenzspezifisch Chromatin-Modifikationen bzw. den Abbau und Hemmung der Ziel-mRNA bewirken oder die Translation der Zielgene inhibieren (Carthew und Sontheimer 2009, Matzke und Birchler 2005). Mechanismen, die zu einem Abbau der mRNA führen oder die Translation reprimieren, werden unter dem Begriff *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) zusammengefasst (Jander und Barth 2007). siRNA und miRNA unterscheiden sich vor allem in ihrer Biosynthese. Die siRNAs gehen aus zwei komplementären RNA-Doppelsträngen hervor, wohingegen miRNAs aus einzelsträngigen Vorläufer-RNAs gebildet werden, die durch Rückfaltung charakteristische Strukturen ausbilden, die dsRNA-Bereiche enthalten (Ossowski *et al.* 2008). Aus diesen doppelsträngigen Bereichen wird durch RNaseIII Dicer-Proteine eine 21 bp lange doppelsträngige RNA prozessiert (Carmell und Hannon 2004). Einer der beiden Stränge dient als miRNA und bildet einen Komplex mit Proteinen der ARGONAUTE-Familie, den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC), welcher durch die Bindung an komplementäre RNA-Zielsequenzen meist eine Reduktion der Expression des entsprechenden Gens bewirkt (Small 2007).

Die sRNAs haben sich innerhalb kurzer Zeit zu einem wichtigen Werkzeug der Molekularbiologie entwickelt und finden in Gen-*silencing*-Technologien Anwendung, wie beispielsweise der Expression von *Antisense*-RNA-Transkripten der Zielgene (Ossowski *et al.* 2008) oder in dem für *Arabidopsis* von Schwab *et al.* (2006) entwickelten *Artificial-microRNA* (amiRNA)-System. Diese Methoden führen in der Regel nicht zu einem vollständigen Knockout der Zielgene, sondern zu einer Verminderung der Expression. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass mehrere Gene gleichzeitig herunterreguliert werden können und dass sie auch verwendet werden können, wenn der vollständige Knockout letal ist. Nachteilig ist, dass die Zielsequenzen oft nicht gut definierbar sind und dass es durch unspezifische Bindungen der sRNAs auch die Expression anderer Gene beeinflusst werden können.

In *Arabidopsis* standen bis zur Entwicklung von Methoden die programmierbare Endonukleasen nutzen kaum Möglichkeiten zur exakten, sequenzspezifischen Genomeditierung zur Verfügung. Um die Genfunktionen studieren zu können, wurden große Kollektionen von *Arabidopsis*-Mutantenlinien hergestellt. In diesen erfolgte die Mutagenese durch die zufällige Insertion von T-DNAs oder Transposons in das *Arabidopsis*-Genom.

Anschließend wurde in den einzelnen Mutantenlinien die Insertionsorte der T-DNA oder des Transposons durch PCR-basierte Sequenzierungen bestimmt und kartiert (Alonso *et al.* 2003, Sessions *et al.* 2002, Walbot 1992). Erfolgt die Insertion innerhalb der kodierenden Gensequenz, so führt diese in der Regel zu einem Knockout des jeweiligen Gens. In den so erhaltenen *Arabidopsis*-Mutantenkollektionen stehen mittlerweile für die meisten Gene Insertionsmutanten zur Verfügung (Alonso und Ecker 2006), die genutzt werden können, um die Funktion von Genen zu untersuchen. Eine häufige Problematik bei Ansätzen der reversen Genetik bei Pflanzen besteht in der funktionalen Redundanz vieler Gene. Obwohl *Arabidopsis* ein kleineres Genom und weniger repetitive Sequenzen besitzt als die meisten anderen bekannten Pflanzenarten (Page und Grossniklaus 2002), kommen viele Gene als Multigenfamilien vor, die aus Genduplikationen hervorgegangen sind. Die Mitglieder dieser Familien können als Gencluster auftreten oder vereinzelt über das Genom verteilt sein (Bouche und Bouchez 2001). Bei Genfamilien ist es oft notwendig Mehrfach-Knockout-Linien herzustellen, um morphologisch sichtbare oder auf molekularer Ebene messbare phänotypische Änderungen zu erhalten (Jander und Barth 2007). Bei ungekoppelten Genen können diese leicht durch die Kreuzung von Einzel-Knockout-Mutanten erzeugt werden. Etwa 17 % aller Gene liegen bei *Arabidopsis* jedoch in Gruppen, oft gleicher Orientierung (*tandem-array*) vor (Kaul *et al.* 2000). Bei benachbarten Genen ist es technisch sehr schwierig Mehrfachmutanten durch Kreuzungen der Einzel-Knockout-Mutanten zu erzeugen, weil dicht beieinanderliegende Gene nur selten durch die meiotische Rekombination getrennt werden.

Um die Funktion von geclusterten, homologen Genen zu untersuchen, sind Ansätze, die auf RNAi beruhen, gut geeignet, führen aber wie bereits beschrieben meistens nur zu einer Repression der Zielgene. Um stabile Mehrfach-Knockout-Mutanten von Genclustern zu erzeugen, ist beispielsweise die Herstellung von Deletionsmutanten möglich. Dazu wird unter den Nachkommen von mit Neutronen bestrahlten Pflanzensamen nach Mutanten gescreent, bei denen der betreffende Chromosomenabschnitt deletiert ist (Jander und Barth 2007). Es besteht auch die Möglichkeit der sequenziellen Mutagenese. Dabei wird eine bereits vorhandene Einzel-Knockout-Mutante weiter mutagenisiert, beispielsweise durch eine EMS-Behandlung. Anschließend wird unter den Nachkommen nach Mutationen in den weiteren Zielgenen gescreent. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Doppelmutanten benachbarter Gene, besteht in der Verwendung von T-DNA-Mutantenkollektionen, die in der T-DNA ein aktivierbares *Dissociation (Ds)*-Transposon enthalten. *Ds*-Transposons neigen dazu, sich nach der Exzision in der Nähe ihres ursprünglichen Insertionsortes wieder in das Genom zu integrieren (Machida *et al.* 1997). Bei dieser Methode wird die Transposition während der generativen Wachstumsphase induziert. Anschließend wird unter den Nachkommen nach Mutanten gescreent, bei denen das Transposon in das zweite Zielgen integriert wurde (Jander und Barth 2007).

Erfolgsversprechende Methoden zur zielgerichteten Mutagenese, der sogenannten Genomeditierung, wurden für *Arabidopsis* erst in den letzten zehn Jahren entwickelt. Der geläufigste Ansatz besteht in der Einführung von Doppelstrangbrüchen (DSB) am Ziellocus, welche durch zelleigene Reparatursysteme wieder zusammengefügt werden. Erfolgt die Reparatur über den fehleranfälligen *Non-homologous-end-joining* (NHEJ)-Prozess, kommt es häufig zu kurzen Insertions- und Deletionsmutationen (INDELS). Diese Mutationen sind zufällig und können zu einem Funktionsverlust des Gens führen. Alternativ kann die Reparatur auch über die homologe Rekombination erfolgen, dabei erfolgt die Reparatur anhand eines Matrizenstranges. Da dieser nach eigenen Vorgaben designt werden kann, ist in diesem Fall auch der Sequenzaustausch oder das Einfügen von DNA-Abschnitten (beispielsweise Marker, Tags etc.) möglich. Bisher wird vor allem der Ansatz über NHEJ verwendet, da die Synthese und Bereitstellung des DNA-Templates oft schwierig und zurzeit auch in vielen Fällen nicht effizient ist (Feng *et al.* 2013, Gaj *et al.* 2013).

Der DSB kann über verschiedene Weisen erzeugt werden. Anfangs wurden vor allem künstliche, „programmierbare“ Zink-finger-Nukleasen (ZFNs) (Zhang *et al.* 2010) oder *Transcription Activator Like Effector*-Nukleasen (TALEN) (Forner *et al.* 2015) verwendet. Die hergestellten chimären Proteine bestehen aus einer sequenzspezifischen DNA-Bindedomäne und einer DNA-Nuklease. Die DNA-Bindung erfolgt jeweils über die Zink-Finger- oder die TAL-Effektor-Domäne, welche so designt werden, dass sie an die gewünschte Zielsequenz binden. Das Design der DNA-Bindedomäne ist im Fall der Zink-Finger-Domäne schwieriger und zeit-aufwendiger als bei der TALE-Domäne. Aus diesem Grund ist der TALEN-Ansatz verbreiteter (Gaj *et al.* 2013).

Erst kürzlich wurde mit dem CRISPR/Cas9-System (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9*) ein neuartiges Werkzeug für die zielgerichtete Mutagenese vorgestellt, welches die Methode der Genom-Editierung innerhalb kürzester Zeit völlig revolutioniert hat (Mao *et al.* 2013). Das CRISPR/Cas9-System stammt aus Bakterien und Archaeobakterien, denen es als adaptives Immunsystem zur Degradation von invasiver viraler oder plastidärer Fremd-DNA dient. Der genaue Mechanismus wurde erst 2012 aufgeklärt (Gasiunas *et al.* 2012, Jinek *et al.* 2012). Bereits 2013 wurde das CRISPR/Cas-System als Werkzeug zur Genomeditierung in zahlreichen Organismen beschrieben, darunter auch in *Arabidopsis* und vielen anderen Pflanzenarten (Cong *et al.* 2013, Ding *et al.* 2016, Feng *et al.* 2013, Friedland *et al.* 2013, Mao *et al.* 2013). Das modifizierte System zur gezielten Veränderung genomischer DNA besteht aus zwei Komponenten: einer Cas9-Endonuklease, die einen Doppelstrangbruch in das Genom einführt, und einer sogenannten *single-guide* RNA (sgRNA). Die sgRNA steuert die Sequenzspezifität der Endonuklease über eine 20 bp lange Sequenz (Spacer), die komplementär zum Ziellocus (Protospacer) ist. Der Spacer muss vor einer drei Nukleotide langen Erkennungssequenz liegen, die *Protospacer adjacent motif*

(PAM) genannt wird. Beide Komponenten werden in den Zielorganismus eingebracht und exprimiert. Die Cas9-Endonuklease und die sgRNA bilden einen Komplex und erzeugen einen DSB 3 bp neben der PAM-Sequenz.

Mittlerweile wurden zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten beschrieben, darunter auch die zielgerichtete Sequenzmodifikation des Zielgens oder der Einbau von Markern wie GFP oder Resistenzgenen (Miki *et al.* 2018). Bei allen drei beschriebenen Methoden zur Genomeditierung (ZFNs, TALENs oder CRISPR/Cas9) kann es durch unspezifische DNA-Bindungen im Genom zu weiteren, ungewollten Hintergrundmutationen kommen (Satheesh *et al.* 2019).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, den Prozess der Cytokinin-*N*-Glucosylierung und dessen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung und die Cytokininhomöostase aufzuklären. Im Mittelpunkt des Projekts stand die phänotypische, histologische und molekulare Analyse von Pflanzenlinien, bei denen die Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* ausgeschaltet oder überexprimiert sind. Dabei sollten sowohl die bereits vorhandenen Linien (*35S:UGT76C2-GFP*, *35S:amiUGTC1/2*, *ugt76c1-1*; *ugt76c2-2*) weiter untersucht werden, als auch neugenerierte Linien (*ugt76c1 ugt76c2*; *35S:UGT76C1-GFP*) in die Analysen miteingeschlossen werden.

In *Arabidopsis* wurden bisher nur zwei Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen (*UGT76C1* und *UGT76C2*) beschrieben (Hou *et al.* 2004). Die höchste Priorität wurde der Herstellung einer Doppel-Knockout-Linie der gekoppelten Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* eingeräumt. Die Untersuchung dieser Mutante sollte die Frage beantworten, ob diese Gene, die einzigen Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen in *Arabidopsis* kodieren und für welche physiologischen Funktionen die Cytokinin-*N*-Glucosylierung von zentraler Bedeutung ist. Die Herstellung dieser Mutante sollte mit Hilfe eines von Nishal *et al.* (2005) publizierten transposonbasierten Systems bzw. des CRISPR/Cas9-Systems erfolgen.

Um Erkenntnisse über die Wechselwirkungen und das Zusammenspiel der Cytokinin-*N*-Glucosylierung mit anderen Prozessen der Regulation der Cytokininhomöostase zu gewinnen, bestand ein weiterer Aspekt in der Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen *UGT76C1* und *UGT76C2* mit bekannten Komponenten des Cytokinin-Signalweges und -Metabolismus.

Ein weiteres Teilprojekt stellte die Analyse des Expressionsmusters von *UGT76C2* dar. Dazu sollte die gewebsspezifische Expression von *UGT76C2* durch Promotor-Reportergen-Konstrukte untersucht werden.

Außerdem sollten die bereits in meiner Masterarbeit begonnenen Arbeiten zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* in *35S:UGT76C1-GFP* bzw. *35S:UGT76C2-GFP Arabidopsis*-Linien fortgeführt werden.

2 Material und Methoden

Einige der verwendeten Methoden wurden durchgeführt wie in meiner Masterarbeit (Brock 2012) beschrieben. Beschreibungen der Methoden und der Materialien wurden teilweise aus meiner Masterarbeit übernommen, ohne eine gesonderte Kennzeichnung.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien und Zusätze für Medien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Bioline (Luckenwalde, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Rapidozym (Berlin, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland), Stratagene (Amsterdam, Niederlande) und Olchemim (Olomouc, Tschechien).

Die Enzyme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Verwendete Enzyme.

Enzym	Firma	Verwendung
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	DNA-Verdau nach RNA-Extraktion
Immolase™ DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde, Deutschland	qRT-PCR
Lysozym	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Plasmidisolierung
<i>Pfu/ Taq</i> -Polymerase	AG Schuster (Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin)	Klonierungen, Genotypisierungen
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Plasmidisolierung
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierungen, Ligation
CIAP-Phosphatase/ Fast AP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierungen, Dephosphorylierungen
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Waltham, USA	cDNA-Synthese

Fortsetzung nächste Seite.

Tabelle 1. Verwendete Enzyme.

Enzym	Firma	Verwendung
SuperSignal® West Pico Detektionskit	Invitrogen, Waltham, USA	Nachweis von Antigen-Antikörperkomplexen in Western Blots
Diverse Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierungen, Genotypisierungen (CAPS-Marker)
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierungen
Gateway® BP Clonase® enzyme mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierungen
Gateway® LR Clonase® II Plus enzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klonierungen

2.1.2 Analysesets (Kits)

Die verwendeten Kits sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2. Verwendete Kits.

Kit	Hersteller	Verwendung
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel, Duren, Deutschland	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder von PCR-Produkten
NucleoSpin Plasmid EasyPure	Machery-Nagel, Duren, Deutschland	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin RNA Plant	Machery-Nagel, Duren, Deutschland	Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Pflanzenmaterial
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	cDNA-Synthese
SuperSignal® West Pico Detektionskit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Nachweis von Antigen-Antikörperkomplexen bei Western Blot-Analysen
Simolean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, USA	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder von PCR-Produkten
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Pflanzenmaterial
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison, USA	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Produkten

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA bezogen. Die verwendeten Primer und deren Sequenzen sind der Tabelle S1 des Anhangs zu entnehmen.

2.1.4 Plasmide

Die für die Klonierungsarbeiten verwendeten Ausgangsplasmide sind in Tabelle 3 und die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Verwendete Vektoren.

Vektor	Funktion	Referenz
pDONR221	Gateway TM Entry-Vektor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pB7FWG2	Gateway TM Expressionsvektor	(Karimi <i>et al.</i> 2002)
pK7FWG2-35S_del	Gateway TM Expressionsvektor	(Leuendorf <i>et al.</i> 2014)
pJET1	Vektor für pJET-Klonierung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pEn-Chimera	sgRNA coding vector	(Fauser <i>et al.</i> 2014)
pDe-CAS9	Cas9 expression vector	(Fauser <i>et al.</i> 2014)
pDONR P4-P1R/pWUS	Donorplasmid für Gateway-Multisite	(Otto 2013)
pDONR P4-P1R/pSTM	Donorplasmid für Gateway-Multisite	Ireen Köllmer
pDONR P2R-P3/4xMyc	Donorplasmid für Gateway-Multisite	Klaas Wulfetange
pDONR221/UGT76C2ns	Donorplasmid für Gateway- Multisite	(Brock 2012)
pB7FWG2/UGT76C1	Stabile Überexpression von <i>UGT76C1</i> in <i>Arabidopsis</i>	(Brock 2012)
pK7m24GW,3	Zielvektor Gateway-Multisite	(Karimi <i>et al.</i> 2005).

Tabelle 4. Liste der im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide.

Plasmid	Verwendung
pK7m24GW,3/STM:UGT76C2-myc	Expression von <i>UGT76C2-myc</i> in der STM-Domäne des Meristems
pK7m24GW,3/WUS:UGT76C2-myc	Expression von <i>UGT76C2-myc</i> in der WUS-Domäne des Meristems
pK7FWG2-35S_del/pUGT76C2(800):UGT76C2-GFP	Reporterstudie von <i>UGT76C2</i>
pK7FWG2-35S_del/pUGT76C2(1500):UGT76C2-GFP	Reporterstudie von <i>UGT76C2</i>
pK7FWG2-35S_del/pUGT76C2(800):GFP	Reporterstudie von <i>UGT76C2</i>
pK7FWG2-35S_del/pUGT76C2(1500):GFP	Reporterstudie von <i>UGT76C2</i>
pEn-Chimera/G1	Zwischenklonierung der GuideRNA G1
pEn-Chimera/G8	Zwischenklonierung der GuideRNA G8
pEn-Chimera/G18	Zwischenklonierung der GuideRNA G18
pDe-CAS9/G1	Mutagenese von <i>UGT76C1</i> in <i>Arabidopsis</i> mit dem CRISPR/Cas-System
pDe-CAS9/G8	CRISPR/Cas-Mutagenese von <i>UGT76C1</i> mit dem CRISPR/Cas-System
pDe-CAS9/G18	CRISPR/Cas-Mutagenese von <i>UGT76C1</i> in <i>Arabidopsis</i> mit dem CRISPR/Cas-System

2.1.5 Nährmedien und Zusätze

Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien zur Kultivierung von Bakterien und Pflanzen sind in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgelistet. Alle Nährmedien wurden bei 120 °C für 15 Minuten (min) autoklaviert. Die zur Selektion von transformierten Bakterienzellen oder *Arabidopsis*-Pflanzen verwendeten Antibiotika und deren verwendete Konzentration im Medium sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die angesetzten Antibiotika wurden sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium erst vor dem Gebrauch hinzugefügt.

Tabelle 5. Nährmedien für Bakterien und Pflanzen.

Medium	Zusammensetzung
Nährmedien für Bakterien:	
<i>Lysogeny broth</i> (LB) (Bertani 1951)	1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, pH 7 (eingestellt mit NaOH); für Festmedium erfolgte Zugabe von 1,5 % Agar
<i>Super optimal broth</i> (SOB) (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); nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 10 mM MgCl ₂ und 10 mM MgSO ₄
<i>Super optimal broth with catabolite repression</i> (SOC) (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), nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ und 20 mM Glucose
<i>Yeast extract broth</i> (YEB) (Vervliet <i>et al.</i> 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 ; Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 mit NaOH
Nährmedien für Pflanzen:	
½ Murashige-Skoog-Medium (MS) (Murashige und Skoog 1962)	0,215 % (w/v) MS-Salze; 0,05 % (w/v) MES; 1 % (w/v) Saccharose; Einstellen des pH-Wertes auf 5,7 mit KOH; für Festmedium Zugabe von 0,7 % (w/v) bzw. 1,2 % Agar oder 10 % Phytage TM (Sigma Aldrich)

Tabelle 6. Für die Selektion von Pflanzen oder Bakterien verwendete Antibiotika.

Zusatz	Endkonzentration im Medium
Für Bakterien:	
Carbenicillin	50 µg/ml
Gentamicin	25 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Spectinomycin	50 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml
Für Pflanzen:	
Streptomycin	125 µg/ml
Phosphinothricin (PPT)	10 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Hygromycin B (*)	15 µg/ml

Alle Komponenten wurden als 1000x Stammlösungen angesetzt und steril filtriert (0,45 µm ø), oder blieben unfiltriert (*) und wurden bei -20 °C oder 4 °C (*) gelagert.

2.1.6 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. Verwendete Mikroorganismen.

Spezies/ Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendung
<i>Escherichia coli</i>:			
DH5α	F- <i>endA1 hsdR_{J7} (r_k, m_k⁺) supE44 thi-JA⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoRΔ(lacZYAargF)-U169 Φ80d lacZΔM15</i>	(Grant <i>et al.</i> 1990)	Plasmidvermehrung, Klonierungen
DH10B	F- <i>araDJ39 Δ(ara, leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR Φ80d lacZΔM15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ(mrr hsdRMSmcrBC)</i>	(Grant <i>et al.</i> 1990)	Plasmidvermehrung, Klonierungen
DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA)mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1</i>	(Bernard und Couturier 1992)	Plasmidvermehrung von Vektoren mit <i>ccdB</i> , Klonierungen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>:			
GV3101:pMP90	Rif ^R , Gent ^R	(Koncz und Schell 1986)	Transformation von Pflanzen

2.1.7 Pflanzenmaterial

Alle verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gehörten zum Ökotyp Columbia-0. Diese Linie wurde in allen Experimenten als Wildtyp (WT)-Kontrolle verwendet.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Arabidopsis*-Mutanten und transgenen Linien sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst (Tabelle 8).

Tabelle 8. Verwendete *Arabidopsis*-Mutanten und transgene Linien.

Pflanzenlinie	Hintergrund	Referenz
<i>rock4</i>	Col-0	(Bartrina 2006, Jensen 2013).
<i>ugt76c1-1</i> (SALK_144355C)	Col-0	(Wang <i>et al.</i> 2013)
<i>ugt76c2-1</i> (SALK_135793C)	Col-0	(Wang <i>et al.</i> 2011)
<i>ugt76c2-2</i> (SALK_10205)	Col-0	(Brock 2012)
35S: <i>amiUGT-1</i>	Col-0	(Brock 2012)
35S: <i>amiUGT-3</i>	Col-0	(Brock 2012)
<i>zgt1-1</i> (GABI_076C12)	Col-0	(Christine Rausch, unpubliziert)
<i>ckx3,5</i> (<i>ckx3-1</i> , SALK_050938) (<i>ckx5-1</i> , SLAK_064309)	Col-0	(Bartrina <i>et al.</i> 2011)
35S: <i>CKX1</i>	Col-0	(Werner <i>et al.</i> 2003)
35S: <i>GFP</i>	Col-0	(Werner <i>et al.</i> 2003)
<i>TCSn:GFP</i>	Col-0	(Zürcher <i>et al.</i> 2013)
35S: <i>UGT76C2-GFP</i>	Col-0	(Brock 2012)

In der nachfolgenden Tabelle 9 sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten transgenen *Arabidopsis*-Linien zusammengefasst.

Tabelle 9. Im Rahmen dieser Arbeit generierte *Arabidopsis*-Linien.

Pflanzenlinie	Hintergrund	Verwendete Abkürzung
35S: <i>UGT76C1-GFP</i>	Col-0	<i>UGTC1ox</i>
<i>STM:UGT76C2-GFP</i>	Col-0	
<i>pUGT76C2(1500):UGT76C2-GFP</i>	Col-0	<i>pUGT76C2:UGT76C2-GFP</i>
<i>pUGT76C2(815):UGT76C2-GFP</i>	Col-0	
<i>pUGT76C2(1500):GFP</i>	Col-0	<i>pUGT76C2:GFP</i>
<i>pUGT76C2(815):GFP</i>	Col-0	
<i>ugt76c1-2 ugt76c2-2</i>	Col-0	<i>ugt76c1,2_a</i>
<i>ugt76c1-3 ugt76c2-1</i>	Col-0	<i>ugt76c1,2_b</i>
35S: <i>amiUGT-1/</i>	Col-0	
<i>pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP</i>		
35S: <i>amiUGT-3/</i>	Col-0	
<i>pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP</i>		

2.1.8 Software und Internetressourcen

Für Sequenzinformationen wurden die Datenbanken *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Wheeler *et al.* 2008) sowie *The Arabidopsis Information Resource* (Tair; <http://www.arabidopsis.org/>) (Huala *et al.* 2001) verwendet.

Sequenzvergleiche erfolgten mit dem Programm Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Goujon *et al.* 2010, Sievers *et al.* 2011) oder mit dem *Basic local alignment search tool* (Blast) (Altschul *et al.* 1990) von NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) oder Tair (<https://www.arabidopsis.org/Blast/>).

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mithilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen und Skaletsky 2000) entworfen. Die Überprüfung der Spezifität der Primer wurde mit dem Blast-Tool von Tair oder NCBI überprüft. Alternativ wurden die Primer direkt mit dem Primer-Blast-Tool von NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Ye *et al.* 2012) designt. Die Qualität von Primern für qPCR-Analysen wurde mit der NetPrimer-Software (PREMIER Biosoft, Kalifornien, USA) überprüft.

Zur Vorhersage von Restriktionsschnittstellen wurde das Programm NEB Cutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) der Firma *New England Biolabs* (NEB, Massachusetts, USA) oder das WatCut-Tool (<http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php>) verwendet.

Die Auswertung von Wurzelassays erfolgte unter Verwendung des Bildverarbeitungsprogramms Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Die Durchführung und Auswertung von qRT-PCR-Reaktionen erfolgte mit der 7500 Software Version 2.03 der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, USA) bzw. mit dem Bio-Rad CFX Manager 3.1 der Firma *Bio-Rad Laboratories* (Kalifornien, USA).

Die Auswertung von Sequenzdaten nach Sequenzierungen, die von der Firma GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt wurden, erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.01.

Für *in silico* Analysen der Genexpression, basierend auf Microarray-Daten, wurden die Programme Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/>) (Zimmermann *et al.* 2004) und *electronic Fluorescent Pictograph* (eFP)-Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter *et al.* 2007) verwendet.

Am konfokalen Mikroskop erfolgte die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder mit dem Programm *Leica Application Suite* (LAS) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und am Binokular mit der Software *Olympus CellSens* (Olympus, Tokio).

Die Bildbearbeitung und die Erstellung von Abbildungen erfolgte mit *Corel Draw Graphics suite X6* (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) und *Microsoft Office PowerPoint 2016* (Washington, USA).

Berechnungen zur Datenauswertung, die Erstellung von Diagrammen sowie die statistische Auswertung erfolgte mit *Microsoft Office Excel 2016* (Washington, USA) und JMP® Pro 13.0.0 (SAS Institute Inc.).

Die Arbeit wurde mit *Microsoft Office Word 2016* (Washington, USA) verfasst und die Verwaltung der Literatur und der Quellenangaben erfolgte mit EndNote (Thomas Reuters, New Mexico, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Mikroorganismen

2.2.1.1 Kultivierung und Selektion von Mikroorganismen

Die standardmäßige Anzucht von *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) erfolgte in LB-Flüssigmedium (Tabelle 5) bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 28 °C (*A. tumefaciens*) unter Schütteln. Für die Kultivierung auf LB-Festmedium wurde dem Medium Agar hinzugefügt (Tabelle 5). Zur Selektion von rekombinanten Plasmiden mit Resistenzgenen wurden die Medien mit Antibiotika entsprechend (Tabelle 6) versetzt.

Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden von diesen Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurde 1 ml einer frischen LB-Übernachtskultur in Kryo-Röhrchen mit 800 µl 70%igem (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium (0) bzw. YEB-Medium (0) 1:100 mit einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen Stamms (2.1.6) inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 28 °C (*A. tumefaciens*) unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,45-0,55 erreicht wurde. Die Zellen wurden 20-30 min zum Abkühlen auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (3000 g, 4 °C für 5 min). Das Zellpellet wurde zweimal mit je 40 ml eiskaltem bidestillierten Wasser (ddH₂O) und anschließend mit 20 ml eiskaltem 20%igen Glycerin gewaschen und dann jeweils bei 3000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 10%igen Glycerin gelöst, als 50 µl Aliquotes in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation elektrokompenter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens*-Zellen

Die Ligationsansätze (Abschnitt 2.2.3.9) aus Klonierungen wurden vor der Transformation auf einer Dialysemembran (VSWP02500, Millipore, Billerica, USA) für 20 min gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Gatewayansätze (Abschnitt 2.2.3.11) wurden direkt in die entsprechenden Zellen transformiert.

Für die Elektrottransformation von *E. coli* oder *A. tumefaciens* wurden 50 µl elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 4 µl (20-100 ng) Plasmid-DNA vermischt und nach einer kurzen Inkubationszeit in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte bei 1,8 kV (*E. coli*) bzw. 2,5 kV (*A. tumefaciens*) für 3 bis 5 ms (Micro Pulser; Bio-Rad, Hercules, USA). Unmittelbar nach der Elektroporation wurden 950 µl SOC-Medium (Tabelle 5) zu den transformierten Zellen gegeben. Der gesamte Ansatz wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 Std. bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 2 Std. bei 28 °C (*A. tumefaciens*) unter Schütteln inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen wurden die Transformationsansätze auf antibiotikahaltigen LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C (*E. coli*) bzw. zwei Tage bei 28 °C (*A. tumefaciens*) inkubiert. Die Verifizierung der positiven Klone erfolgte zunächst durch eine Kolonie-PCR (Abschnitt 2.2.3.4). Von positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert (Abschnitt 2.2.3.1) und eine Restriktionsanalyse (Abschnitt 2.2.3.8) durchgeführt.

2.2.2 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

2.2.2.1 Kultivierung und Selektion von *Arabidopsis*-Pflanzen

Für die Kultivierung der *Arabidopsis*-Pflanzen auf Erde wurden die Samen auf Aussaaterde (T-Erde, P-Erde und Sand im Verhältnis 1:1:8) ausgelegt, die zuvor mit dem Fungizid Previcur (Bayer Corp Science AG, Monheim, Deutschland) behandelt wurde. Die Aussaat wurde zwei bis drei Tage bei 4 °C stratifiziert. Die Anzucht erfolgte standardmäßig unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit), teilweise aber auch unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) im Gewächshaus, im Kulturraum oder in Phytoschränken bei 22 °C, bei einer Luftfeuchtigkeit von 30-65 % und Lichtintensitäten von 100-150 µmol m⁻² s⁻¹. Zehn Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge in Einzeltöpfe mit Pikiererde (T-Erde, P-Erde und Perlite Perligran G im Verhältnis 2:2:1) umgesetzt. Zur Keimung und nach dem Vereinzeln wurden die Pflanzenschalen mit einer Plastikhaube abgedeckt, um die Pflanzen vor dem Austrocknen zu schützen. Für die Gewinnung von Samen wurden die Pflanzensprosse bei einsetzender Schotenreife in Pergamentpapiertüten eingepackt und bis zur vollständigen Reife und Abtrocknung der Schoten weiter im Gewächshaus kultiviert, jedoch nicht mehr gegessen.

Für die sterile *in vitro*-Kultivierung wurden die *Arabidopsis*-Samen vor der Verwendung einer Oberflächensterilisation nach Nemhauser *et al.* (2003) unterzogen. Die Samen wurden für 10 min in 750 µl 70%igem Ethanol mit 0,1 % (v/v) TritonX-100 unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Samen unter sterilen Bedingungen zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurden die sterilen *Arabidopsis*-Samen auf sterilem ½-MS-Festmedium (0) mit 7 g/l Agar und für die Hochkantkultivierung mit 12 g/l Agar oder 10 g/l Phytigel ausgelegt. Die Aussaat wurde zwei bis vier Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend unter Langtagbedingungen in der Klimakammer oder in Phytoschränken unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei 22 °C kultiviert. Bei Segregationsanalysen wurden die resistenten Keimlinge 10 Tage nach der Keimung (TNK) auf Pikiererde umgesetzt und zur Samengewinnung im Gewächshaus kultiviert.

2.2.2.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen und Selektion von transgenen Pflanzen

Die stabile Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen mittels *A. tumefaciens* erfolgte mit der *Flower-Dip*-Methode nach Clough und Bent (1998). Von den verifizierten, transgenen *A. tumefaciens*-Zellen wurde eine 20 ml Vorkultur in LB- oder YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt und über Nacht, bei 28 °C, unter Schütteln inkubiert. Mit 3 ml der Vorkultur wurden 300 ml LB-Medium oder YEB-Medium angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Nach zwei Tagen wurde die Kultur bei 4500 g und Raumtemperatur (RT) für 15 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Infiltrationsmedium (50 g/l Saccharose, 2,2 g/l MS-Salze, 0,03 % Silwet L-77, pH-Wert 5,8 eingestellt mit KOH) resuspendiert. Für die Transformation wurden die blühenden Sprosse von drei bis vier Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen zweimal für etwa 30 Sekunden (s) in die Bakterienlösung getaucht, einen Tag liegend unter einer Plastikhaube inkubiert und anschließend im Gewächshaus bis zur Samenernte kultiviert.

Zur Selektion der transgenen Pflanzen wurden die Samen der transformierten Pflanzen auf Erde angezogen (Abschnitt 2.2.2.1) und nach der Keimung zweimal im Abstand von einer Woche mit 0,1% (v/v) Basta® (Bayer, Leverkusen) besprüht oder in Sterilkulturen auf antibiotikahaltigem oder herbizidhaltigem Medium (Abschnitt 2.2.2.1) ausgelegt.

Die anschließenden Segregationsanalysen in der T2- und T3-Generation zur Identifikation von homozygoten T-DNA-Einzelinsertionslinien erfolgten in Sterilkultur durch die Anzucht auf Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika bzw. Herbiziden (Abschnitt 2.2.2.1).

2.2.2.3 Kreuzungen von *Arabidopsis*-Pflanzen

Bei der Kreuzung von zwei *Arabidopsis*-Linien wurden bei der Mutterpflanze für die Kreuzung Blüten, mit noch geschlossenen Pollensäcken, ausgewählt. Alle anderen noch vorhandenen Blüten und Schoten wurden entfernt. In den ausgewählten Blüten wurden die Pollensäcke entfernt und die Narben mit Pollen von reifen Staubblättern des Kreuzungspartners bestäubt.

2.2.2.4 Untersuchung des Wurzelwachstums mit und ohne Cytokinin

Die Charakterisierung des Wurzelwachstums erfolgte in sterilen Hochkantkulturen (Abschnitt 2.2.2.1) in Petrischalen (12 x 12 cm). Dabei wurde die Elongation der Hauptwurzel sowie die Anzahl der gebildeten Lateralwurzeln, in einem definierten Zeitraum untersucht. Die Länge der Hauptwurzel wurde zu den angegebenen Zeitpunkten markiert und am Ende für die Auswertung fotografiert. Die Messung der Elongation der Hauptwurzel im angegebenen Zeitraum erfolgte mit dem Computerprogramm Image J. Die Auszählung der Seitenwurzeln erfolgte unter dem Binokular. Es wurden nur Seitenwurzeln gezählt, welche die Epidermis durchbrochen hatten. Für die Untersuchung der Cytokinin-Sensitivität erfolgte die Anzucht der Linien auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit den iP-Endkonzentrationen: 0, 10, 25, 50 und 100 nM iP. Die iP-Stocklösungen wurden mit DMSO angesetzt. Die Endkonzentration von DMSO war nie größer als 0,01%.

2.2.2.5 Untersuchung verschiedener Sprosswachstumsparameter

Der Rosettendurchmesser wurde zum angegebenen Zeitpunkt pro Pflanze an drei verschiedenen Positionen mit dem Lineal gemessen und der Mittelwert bestimmt.

Zur Bestimmung der Blattfläche wurden die angegebenen Rosettenblätter abgeschnitten, eingescannt und die Blattfläche am Computer mit Image J ausgemessen.

Als Blühbeginn wurde der Zeitpunkt definiert, an dem die Infloreszenz 0,5 cm hoch war, der Blühzeitpunkt wurde in TNK angegeben. Teilweise wurden zusätzlich auch die Anzahl der Rosettenblätter zu diesem Zeitpunkt bestimmt. Für die Pflanzen in einem Experiment wurde der Blühbeginn immer zur gleichen Tageszeit dokumentiert. Mit dem Zählen der TNK wurde jeweils zwei Tage nachdem die Pflanzen ins Licht gestellt wurden begonnen.

Die Höhe der Pflanzen wurde nach Beendigung der Blühphase mit einem Lineal ausgemessen. Zur Abschätzung des Infloreszenzstängeldurchmessers wurden jeweils der Bereich des Stängels unmittelbar über dem ersten Internodium mit dem Stereomikroskop SZX12 (Olympus, Tokyo, Japan) fotografiert.

Für die Bestimmung der Schotenanzahl wurden nur die Schoten am Hauptspross gezählt, nachdem die Blühphase beendet war. Die Bestimmung der Schotenlänge und der Samenanzahl pro Schote erfolgten von ausgewachsenen, noch grünen, definierten Schoten. Für die Bestimmung der Schotenlänge wurden die Schoten fotografiert und mit Image J ausgemessen.

Die Samenanzahl pro Schote wurde unter dem Stereomikroskop SZX12 (Olympus, Tokyo, Japan) ausgezählt und die geöffneten Schoten wurden anschließend fotografiert.

2.2.2.6 Cytokinin-Induktion von *Arabidopsis*-Keimlingen

Um zu untersuchen, wie sich die Cytokininzugabe in *ugt76c1,2*-Mutanten auf die Expression von Genen der Cytokininantwort und des Cytokinin-Metabolismus auswirkt, wurden *Arabidopsis*-Keimlinge mit Cytokinin induziert. Die Samen wurden sterilisiert und in 12 *well*-Kulturplatten mit je 2,5 ml $\frac{1}{2}$ MS-Flüssigmedium (Abschnitt 2.1.5) überführt. In ein *well* wurden jeweils 10 *Arabidopsis*-Samen gegeben. Nach zweitägiger Stratifizierung erfolgte die Anzucht unter Langtagbedingungen in Phytoschränken (Abschnitt 2.2.2.1). Elf TNK erfolgte die Cytokinin-Induktion mit Benzyladenin (BA). Die Endkonzentration im Medium betrug dabei 1 nM bzw. 100 nM BA. Für die Induktion wurde eine 100 mM BA-Stammlösung in 1 M KOH in 0,005 % (w/v) MES (pH nicht eingestellt) hergestellt. Diese wurde anschließend auf 100 nM bzw. 1 nM BA verdünnt. Für die Mock-Behandlung wurde das gleiche Volumen 1M KOH mit der MES-Lösung verdünnt. In den hergestellten Induktionslösungen wurde der pH auf 6,0 eingestellt. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 25 μ l pro *well*. Die Proben wurden direkt nach der Ernte, zu definierten Zeitpunkten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion der RNA (Abschnitt 2.2.4.1) bei -70 °C gelagert. Nach der Extraktion wurde die RNA in cDNA (Abschnitt 2.2.4.3) umgeschrieben und die Transkriptlevel der zu untersuchenden Gene mittels qPCR bestimmt (Abschnitt 2.2.4.5).

2.2.2.7 Bestimmung der photochemischen Effizienz (F_v/F_m) zur Bewertung der Seneszenz

Der F_v/F_m -Wert ist ein Maß für die photochemische Effizienz des Photosystems II (Baker 2008). Er beschreibt auch dessen physiologischen Status und nimmt im Verlauf der natürlichen Blattseneszenz ab. Die F_v/F_m -Werte wurden zwischen Tag 32 und 41 nach der Keimung jeweils von Blatt sechs und sieben bestimmt, um zu beurteilen, ob der Verlauf der natürlichen Seneszenz in den *ugt76c1,2*-Mutanten verändert war. Die Messung erfolgte mittels *Pulse Amplitude Modulated* (PAM)-Fluorometrie mit Hilfe einer Fluoreszenzkamera (FluorCam800 MF, Photon System Instruments, Brno, Tschechien). Von den Pflanzen wurde zum angegebenen Zeitpunkt das sechste und siebte Blatt geerntet, in Petrischalen mit ddH₂O überführt und vor der Messung 20-30 min dunkeladaptiert. Im Verlauf der Messung wurde von den dunkeladaptierten Blättern erst die minimale Fluoreszenz (F_0) und anschließend durch die Verabreichung eines sättigenden Lichtpulses ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) die maximale Fluoreszenz (F_m) bestimmt. Aus diesen Werten kann die variable Fluoreszenz F_v berechnet werden ($F_v = F_m - F_0$) sowie der F_v/F_m -Wert ($F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$) berechnet werden.

2.2.2.8 Messung des Cytokinin-Gehalts in Pflanzenmaterial

Für die Messung wurden die *Arabidopsis*-Samen in Sterilkultur auf ½-Ms-Medium angezogen. Am elften TNK wurden entweder der gesamte Keimling oder die Wurzeln und Sprosse getrennt geerntet. Dabei wurden für eine Probe jeweils ~20 oder ~100 mg Pflanzenmaterial und für jeden Genotyp etwa drei bis fünf biologische Replikate geerntet. Die Messung des Cytokinin-Gehalts der Proben erfolgte massenspektroskopisch in Kooperation mit Dr. O. Novák (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien) nach Novák *et al.* (2008).

2.2.2.9 Untersuchungen von abiotischem Stress

Für die Untersuchung, ob in den Mutanten die Trocken- und Salztresstoleranz verändert war, wurden die Samen der Mutanten und des WT in Sterilkulturen (2.2.2.1) unter Langtagbedingungen in der Phytokammer angezogen. Vier TNK wurden die Keimlinge auf mannitol- und natriumchloridhaltiges Medium umgesetzt und weiter unter Langtagbedingungen in der Phytokammer kultiviert. Für die Auswertung wurde nach weiteren vier Tagen die Anzahl der Seitenwurzel unter dem Stereomikroskop ausgezählt und die Elongation der Hauptwurzel bestimmt (2.2.2.4).

2.2.2.10 Transposon-basierte Mutagenese von *UGT76C2*

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete System für die Transposon-basierte Mutagenese von *UGT76C2* wurde von Nishal *et al.* (2005) beschrieben. Als Ausgangspunkt für die Mutagenese diente die *Arabidopsis*-Linie WiscDsLoxHs114_05B (*ugt76c1-2*) der Wisconsin WiscDsLoxHs-*Arabidopsis* Mutantenkollektion. Es wurden folgende Änderungen des Originalprotokolls vorgenommen: Die Hitzebehandlung erfolgte unter Verwendung des Aracon-Kultivierungssystems, dreimal am Tag alle zwei Tage, bei 39 °C. Die Streptomycin-Konzentration zur Selektion der *Arabidopsis*-Keimlinge mit somatischen und germinalen Transpositionen erfolgte bei 125 mg/l. Für das Screening der Transposonreintegrationen in das *UGT76C2*-Gen erfolgte die Extraktion der genomischen DNA mit Hilfe der CTAB-Methode (2.2.3.3). Die PCRs zur Selektion nach Transposonreintegrationen erfolgten als zwei aufeinanderfolgende PCRs, mit *nested* Primern, wobei die erste PCR als Template für die zweite PCR diente.

2.2.2.11 CRISPR/Cas9-Mutagenese von *UGT76C1*

Das hier verwendete CRISPR/Cas-System wurde von der Arbeitsgruppe von Holger Puchta entwickelt und zur Verfügung gestellt. Eine genauere Beschreibung ist der Publikation Fauser *et al.* (2014) oder der Webseite: (<http://www.botanik.kit.edu/molbio/990.php>) zu entnehmen.

Eine Übersicht über den Aufbau der T-DNA des Systems und die Klonierungsstrategie zeigt Abbildung 28B. Das Design der *UGT76C1-guide* RNAs erfolgte wie in Absatz 3.5.2.1 beschrieben und die Klonierung der gewählten *guide* RNAs in den Ausgangsvektor für die CRISPR/Cas9 Mutagenese wie beschrieben im Abschnitt 2.2.3.12. Ein Schema des generalisierten Ablaufs der Herstellung und Identifikation von *ugt767c1-ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutanten zeigt Abbildung 29.

2.2.2.12 Mikroskopischer Nachweis von GFP durch konfokale *laser scanning* Mikroskopie

Der Nachweis von GFP oder dem Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (Roth, Karlsruhe) im *Arabidopsis*-Gewebe erfolgte mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskop TCS SP5 (Leica, Wetzlar). Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm oder dem *diod pumped solid state* (DPSS)-Laser bei 561 nm. Die Detektion der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 498 bis 538 nm und die der Propidiumiodid-Fluoreszenz bei 600-700 nm (Maximum bei 617 nm).

Für die Untersuchung des Fluoreszenzsignals in den Wurzeln von *Arabidopsis*-Keimlingen wurden die Pflanzen in Sterilkultur auf Hochkantplatten angezogen. Die Zellwände der Wurzeln wurden teilweise vor der Untersuchung mit Propidiumiodid angefärbt. Dafür wurde eine Stocklösung (1 mg/ml) hergestellt und 1:100 in Flüssigmedium ($\frac{1}{2}$ -MS) oder ddH₂O verdünnt. Die Wurzeln wurden darin unmittelbar vor dem Mikroskopieren für etwa fünf Minuten inkubiert. Für die Untersuchung des Fluoreszenzsignals im Meristem wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen unter Kurztagbedingungen in Phytoschränken angezogen und nach etwa sechs Wochen zur Blühinduktion in das Gewächshaus mit Langtagbedingungen überführt. Die Infloreszenzen wurden abgeschnitten, wenn diese eine Höhe von 3-10 cm erreicht hatten. Die Präparation des SAM erfolgte unter dem Binokular. Dabei wurden so viele Primordien entfernt, dass das SAM gut sichtbar war. Die präparierten Infloreszenzen wurden kurzzeitig in einer MES-Lösung (0,5 g/l, pH 5,8) verwahrt. Ein Tropfen, einer 50 °C warmen *low melting* Agarose-Lösung (1% in 0,5 g/l MES [pH 5,8]), wurde zum Erstarren in die Mitte eines Objektträgers gegeben. Zur späteren Stabilisation des Deckgläschens, wurden vier weitere Tropfen des warmen Wachses um den mittleren Tropfen verteilt. Der Infloreszenzstängel wurde direkt unter dem SAM abgeschnitten und das SAM leicht in die Agaroselösung gedrückt und unter dem Binokular so ausgerichtet, dass das SAM nach oben hin geöffnet war. Das SAM wurde mit einer MES-Lösung (0,5 g/l, pH 5,8) überschichtet und mit einem Deckgläschen versehen. Die eingebetteten Proben wurden unter dem Lasermikroskop untersucht. Die Aufnahmen des SAMs erfolgten mit der Z-Stapelfunktion der Leica Software (Bildabstand 0,5-2 µm, Frame average 8, Frequenz 400 Hz, Format 512 x 512 Pixel).

2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens* Bakterienkulturen

Die Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*-Übernachtskulturen erfolgte entweder mit Hilfe des Kits NucleoSpin Plasmid EasyPure (Tabelle 2) entsprechend den Angaben des Herstellers oder nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, mit einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Dafür wurden 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur bei 12.000 g für 1 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A), resuspendiert. Nach Hinzugabe von 250 µl der Lösung II (200 mM NaOH, 1 % SDS) und mehrmaligem invertieren wurden 150 µl der Lösung III (3 M Kaliumacetat [pH 5,5]) hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellrümpfer, Proteine und genomische DNA, wurden durch die Zentrifugation bei 16.000 g für 15 min beseitigt. Vom Überstand wurden 400 µl abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Hinzugabe von 400 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und für 15 min bei 16.000 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal durch das Hinzufügen von 750 µl 70%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g gewaschen. Danach wurde das Pellet für 10 min bei 60 °C getrocknet und schließlich in 100 µl ddH₂O gelöst.

Die Plasmidextraktion aus *A. tumefaciens* erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, jedoch mit einigen Anpassungen. Es wurden 3 ml einer für zwei Tage kultivierten Bakterienkultur für eine min bei 9.300 g zentrifugiert. Zur Ablösung der Zuckerketten von den Zellwänden wurde das Pellet in 500 µl 10x Tris-EDTA (TE) [pH 8] mit 150 mM NaCl resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension für 1 min bei 9.300 g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Zum Aufbrechen der Zellwände erfolgte ein Lysozym-Verdau. Dazu wurde dem Ansatz 18 µl von einer Lysozym-Lösung (50 mg/ml) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 18 °C wurde zu dem Ansatz erst 300 µl von Lösung II (200 mM NaOH, 1 % SDS) und dann 350 µl von Lösung III (3 M Kaliumacetat [pH 5,5]) hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 9.300 g für 10 min. Dann wurden 400 µl des Überstands in einem neuen Reaktionsgefäß mit 400 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C für 5 min bei 16.000x g. Die in der oberen, wässrigen Phase enthaltene DNA wurde in einem neuen Reaktionsgefäß, durch Hinzugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und bei 16.000 g für 15 min, bei 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C, 16.000 g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl sterilem ddH₂O gelöst.

2.2.3.2 Schnelle Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis* nach Edwards *et al.* (1991)

Bei diesem modifizierten Protokoll nach Edwards *et al.* (1991) handelt es sich um eine schnelle Methode der DNA-Extraktion, deren Qualität ausreicht, um sie in PCR-Reaktionen einsetzen zu können. Für die Extraktion wurden 100-200 mg Blattmaterial in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl [pH 7,5], 250 mM NaCl, 25 mM EDTA [pH 8,0], 0,5 % (w/v) SDS in ddH₂O) in einer Schwingmühle MM300 (Retsch, Haan) zweimal 2 min bei 30 Hz zerkleinert und bei 16.000 g für 5 min zentrifugiert. 300 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die DNA wurde durch die Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 16.000 g für 5 min wurde das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation bei 16.000 g für 2 min getrocknet und in 100 µl ddH₂O aufgenommen. Zum Lösen wurde die DNA über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.3.3 Extraktion sauberer genomischer DNA aus *Arabidopsis* für den Screen nach Transposon-Reinsertionen

Für den Screen von *Arabidopsis*-Linien mit Transposon-Reintegrationen in den *UGT76C2*-Locus erfolgte die Extraktion der genomischen DNA aus *Arabidopsis* mit der CTAB-Methode nach Weigel und Glazebrook (2002). Dafür wurden 100-500 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit der Schwingmühle MM 300 (Retsch, Haan) zerkleinert. Zu dem Blattmaterial wurden 400 µl Extraktionspuffer (100 mM TRIS-HCl [pH 8], 20 mM EDTA [pH 8], 1,4 M NaCl, 2 % CTAB, 1 % PVP) hinzugegeben und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, kräftig gemischt und der Ansatz für 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und erneut für 2 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß zum Fällen der DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 16000 g für 15 min bei RT pelletiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH8], 1 mM EDTA) resuspendiert.

2.2.3.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation von bestimmten DNA-Fragmenten für Klonierungen und als Nachweisreaktion und erfolgte nach Mullis und Faloona (1987). Für Klonierungen erfolgten die Amplifikationen mit Polymerasen, die über eine *Proofreading*-Aktivität verfügten. Es wurden dafür die *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*)- oder die

Phusion- (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) Polymerasen verwendet. Kolonie-PCRs und PCRs zum Nachweis von spezifischen DNA-Abschnitten erfolgten mit der *Thermus aquaticus* (*Taq*)- Polymerase. Bei kommerziellen Enzymen erfolgte die Durchführung der PCR nach Herstellerangaben. Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes für die *Taq*- und die *Pfu*-Polymerase ist in Tabelle 10 aufgeführt. Der 10x *Taq*-Puffer bestand aus 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1 %, Tween-20 und 15 mM MgCl_2 und der 10x *Pfu* Puffer aus 200 mM Tris-HCl [pH 8,8], 100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 , 1 mg/ml Nuklease-freies BSA, 1 % Triton X-100.

Tabelle 10. Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes.

Komponente	<i>Taq</i> -PCR	<i>Pfu</i> -PCR
Template DNA ¹	0,1-500 ng	0,1-500 ng
10x Puffer	1x	1x
Polymerase	2,5 U	2,5 U
dNTPs	jedes dNTP 200 μM	Jedes dNTP 200 μM
Vorwärtsprimer	2 μM	0,375 μM
Rückwärtsprimer	2 μM	0,375 μM
Endvolumen	20 μl	50 μl

¹Bei Kolonie-PCRs wurde das Template-Volumen durch Wasser ersetzt und als Template eine Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in den PCR-Ansatz getaucht und anschließend auf einer frischen LB-Platte ausgestrichen.

Das verwendete Standard-PCR-Programm zeigt Tabelle 11. Das Programm wurde an die jeweils verwendete Polymerase, die Annealing-Temperatur (T_A) der Primer und die Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst.

Tabelle 11. Standard PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95 °C	1 min
2. Denaturierung	95 °C	45 s
3. Annealing	T_A -Primer	45 s
4. Elongation	72 °C <i>Taq</i> -Polymerase	1 min/kb
	68 °C <i>Pfu</i> -Polymerase	2 min/kb
5. Elongation	72 °C <i>Taq</i> -Polymerase	2x Elongationszeit
	68 °C <i>Pfu</i> -Polymerase	
6. Ende	16 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25-30x zyklisch wiederholt.

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe und Qualität von DNA-Fragmenten sowie für deren Quantifizierung, wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei werden die Nukleinsäuren ihrer Größe nach in einer Agarose-Matrix aufgetrennt. Je nach der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 1%ige oder 2%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA) verwendet. Zum Anfärben der Nukleinsäurebanden wurden den Gelen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10x Ladepuffer (1x TAE-Puffer, 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) vermischt. Zur Größenabschätzung der Fragmente wurden je 3 µl des Größenstandards Hyperladder I (Bioline USA Inc., Randolph, USA) mit aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 60-80 Volt für 30-60 min. Zur Dokumentation wurden die Gele in der Geldokumentationsanlage fotografiert.

2.2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen erfolgte mit denselben Kits (Tabelle 2). Zur Aufreinigung eines DNA-Fragmentes aus einem Gel wurde die gewünschte Bande auf einem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten, mit Extraktionspuffer gemischt und durch die Inkubation bei 60 °C gelöst. PCR-Ansätze wurden zur Aufreinigung direkt mit dem Extraktionspuffer gemischt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.3.7 Konzentrations- und Qualitätsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe des Spektrophotometers Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Die Konzentration wird aus der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 ng/µl (bzw. 40 ng/µl für RNA). Zusätzlich wurden zur Abschätzung der Qualität die Extinktionen bei 280 und 230 nm bestimmt. Über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm können Aussagen über mögliche Proteinkontaminationen getroffen werden. Für reine DNA sollte dieses bei 2,0 und für reine RNA bei 1,8 liegen. Zum Teil wurden die Proben zur Abschätzung der Konzentration und Qualität der Nukleinsäuren auch einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen und mit einem Standard verglichen (Abschnitt 2.2.3.5).

2.2.3.8 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

DNA-Moleküle können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch geschnitten werden. Sie dienen zur Analyse von DNA-Molekülen und als Werkzeug um spezifische DNA-Fragmente zu erzeugen, die dann zu neuen Konstrukten ligiert werden können. Für einen Restriktionsansatz wurden 10 bis 500 ng DNA mit 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U/ml), bidestilliertem Wasser und die entsprechende Menge des entsprechenden 10x Reaktionspuffers (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) gemischt. Der Reaktionsansatz wurde mindestens für eine Stunde bei der für das Restriktionsenzym vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und anschließend nach Herstellerangaben inaktiviert. Im Falle eines Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen erfolgte der Verdau nach Herstellerempfehlungen. Für die Analyse oder zur Isolation spezifischer Fragmente wurde der Restriktionsansatz in einem Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.2.3.5).

2.2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Überhängen erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) nach Herstellerangaben.

2.2.3.10 Sequenzierung kurzer DNA-Abschnitte

Die Sequenzierungen von DNA-Molekülen erfolgten durch die Firma GATC-Biotech AG (Konstanz, Deutschland).

2.2.3.11 Gateway-Klonierungen

Das Gateway®- und Multisite-Gateway-Klonierungssystem (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) basiert auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem, das der λ-Bakteriophage für die sequenzspezifische Integration (bzw. Exzision) in das *E. coli*-Genom benutzt. Für die Rekombination sind bestimmte Erkennungssequenzen notwendig, die sogenannten *attachement sites* (*att*). Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden in zweiaufeinanderfolgenden PCRs amplifiziert (Abschnitt 2.2.3.4) und dabei mit den entsprechenden *attB1*- und *attB2*-Rekombinationssequenzen versehen. In der ersten PCR wurden genspezifische Primer verwendet, die jeweils eine Teilsequenz der *attB*-Sequenzen als Überhang enthielten. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (Abschnitt 2.2.3.6) und in einer zweiten PCR als Template eingesetzt in der die *attB*-Adapter durch die Verwendung geeigneter Primer (*attB1*, *attB2*, Tabelle S1) vervollständigt wurden. Die Amplifikate mit den vollständigen *attB*-Adaptoren wurden aufgereinigt und über eine BP-Reaktion in den *Donor*-Vektor pDONR221 kloniert. Die dabei entstandenen Vektoren werden *Entry*-Vektoren

genannt. Das klonierte Fragment wurde durch Sequenzierungen auf seine Fehlerfreiheit überprüft und dann in einer LR-Reaktion in einen *Destination*-Vektor umkloniert. Die BP-Reaktion erfolgte in 10 µl-Ansätzen und bestand aus 300 ng *Donor*-Vektor, 40 bis 100 fmol des aufgereinigten PCR-Produktes mit den *attB*-Adaptoren und 0,5 µl BP-Clonase (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) in 1x BP-Puffer. Die LR-Reaktion erfolgte ebenfalls als 10 µl -Ansatz und enthielt 150 ng des *Entry*-Vektors, 150 ng *Destination*-Vektor und 0,5 µl LR-Clonase (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) in 1x LR-Puffer. Die Ansätze wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde am nächsten Tag durch die Hinzugabe von 3 µg Proteinase K und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C abgestoppt. Anschließend wurde die Proteinase K durch die Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Zur Vervielfältigung der hergestellten Vektoren wurden diese in elektrokompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Abschnitt 2.2.1.3). Dabei wurde er BP-Ansatz bzw. LR-Ansatz direkt für die Transformation eingesetzt.

2.2.3.12 Klonierungsstrategien

Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die Klonierungsarbeiten zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte (Tabelle 4). Die einzelnen Arbeitsschritte wie die Amplifikation von DNA-Fragmenten der zu klonierenden Fragmente (Abschnitt 2.2.3.4) oder deren Nachweis (Abschnitte 2.2.3.4 und 2.2.3.8), die Aufreinigung von DNA-Fragmenten (Abschnitt 2.2.3.6), die Ligation von DNA-Fragmenten (Abschnitt 2.2.3.9), die Rekombination von Fragmenten durch Gateway®-Klonierungen (2.2.3.11), die Transformation und Vervielfältigung von Plasmiden in *E. coli* (Abschnitt 2.2.1.3 und 2.2.1.1) sowie die Extraktion von Plasmiden aus *E. coli*. wurden (Abschnitt 2.2.3.1) in den vorangegangenen Abschnitten ausführlich beschrieben.

Klonierung der *UGT76C2*-Reporterkonstrukte

Für die Klonierung der Reporterkonstrukte *pUGT76C2(1500 bp):GFP*, *pUGT76C2(800 bp):GFP*, *pUGT76C2(1500 bp):UGT76C2-GFP* und *pUGT76C2(800 bp):UGT76C2-GFP* wurde ein 800 bp- und ein 1500 bp-langes DNA-Fragment vor dem Startcodon von *UGT76C2* amplifiziert. Zusätzlich wurden die beiden Promotorfragmente auch mit der kodierenden Sequenz von *UGT76C2* ohne Stoppcodon mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente wurden bei der Amplifikation mit *attB*-Adaptersequenzen versehen (Abschnitte 2.2.3.4 und 2.2.3.11). Als Template diente dabei genomische DNA des Ökotyps *Arabidopsis thaliana*. In einer BP-Reaktion wurden die vier DNA-Fragmente in den Vektor pDONR221 kloniert (Abschnitt 2.2.3.11; Tabelle 3). Die klonierten DNA-Fragmente wurden sequenziert und in einer LR-

Reaktion in den modifizierten *Destination*-Vektor pK7FWG2-35S_del (Tabelle 3) umkloniert. In dem Vektor pK7FWG2-35S_del wurde der 35S-Promotor deletiert.

Herstellung der Komplementationskonstrukte für die 35S:*amiUGT*-Linien

Für die Herstellung der Konstrukte zur Komplementation der *amiRNA*-Linien wurde das Reporterkonstrukt pDONR221/pUGT76C2(1500):UGT76C2 als Ausgangsvektor verwendet. Die Erkennungssequenz der UGT-*amiRNA* wurde von CAAGGTTGCATCAACCCTATGCTT zu CAAGGTTGTATCAATCCAATGTTT verändert. Die Mutagenese wurde von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Das mutagenisierte Fragment *pUGT76C2(1500):UGT76C2*-Fragment wurde anschließend in einer Gateway® LR-Reaktion in den *Destination*-Vektor pK7FWG2-35S_del umkloniert.

Klonierung der Konstrukte zur Expression von UGT76C2-myc im Meristem

Die Klonierung der STM:UGT76C2-myc und *wus*:UGT76C2-myc Konstrukte wurden mit Hilfe des MultisiteGateway-Systems hergestellt. Dabei können in einer LR-Reaktion drei Fragmente aneinander kloniert werden. Als Ausgangsvektoren dienten dabei die *Entry*-Vektoren pDONR221/UGT76C2ns, pDONR P4-P1R/pWUS, pDONR P4-P1R/pSTM und pDONR P2R-P3/4xMyc (Tabelle 4). Mit Hilfe des Gateway® LR Clonase® Enzym II Mix (Tabelle 2) wurden STM:UGT76C2ns-myc und WUS:UGT76C2ns-myc in den *Destination*-Vektor pB7m34GW rekombiniert.

Herstellung der Vektoren für die CRISPR/Cas-Mutagenese von UGT76C1

Das hier verwendete CRISPR/Cas-System wurde von der Arbeitsgruppe von Holger Puchta entwickelt und zur Verfügung gestellt. Eine genauere Beschreibung ist der Publikation von Fauser *et al.* (2014) oder der Webseite: (<http://www.botanik.kit.edu/molbio/990.php>) zu entnehmen. Eine Übersicht über den Aufbau der T-DNA des Systems mit den wesentlichen Komponenten und die Klonierungsstrategie zeigt Abbildung 28B. Das System besteht aus zwei Ausgangsvektoren, dem Gateway® *Entry*-Vektor pEn-Chimera und dem *Destination*-Vektor pDe-CAS9. Zuerst wurden die ausgewählten *Spacer* (G1, G8 und G18) in die sgRNA-Kassette des pEN-Chimera kloniert. Hinter dem *U6*-Promotor und vor der sgRNA-Sequenz befinden sich zwei gegeneinander gerichtete *BbsI*-Schnittstellen (Abbildung 28B). Durch den Verdau des Vektors mit *BbsI* entstanden *sticky ends*, die nicht miteinander kompatibel waren. Die Sequenzen, die für die *Spacer* (G1, G8 und G18), kodieren wurden als komplementäre Oligonukleotide synthetisiert und dabei mit Überhängen versehen, die zu der *BbsI*-Schnittstelle komplementär waren (Abbildung 28B) Die komplementären Oligonukleotide wurden miteinander hybridisiert und anschließend gerichtet in die *BbsI*-Schnittstelle des pEnChimera-

Vektors ligiert. Die *Entry*-Vektoren wurden durch Sequenzierungen verifiziert. In einem zweiten Schritt wurde die Kasette mit der sgRNA in den *Destination*-Vektor pDe-CAS9 durch eine Gateway® LR-Reaktion (Abbildung 28B) umkloniert. Die drei fertiggestellten Vektoren zur Mutagenese von *UGT76C1* U6:G1sgRNA, U6:G8sgRNA und U6:G18sgRNA werden im folgenden G1, G8 und G18 genannt.

2.2.3.13 Genotypisierung durch CAPS und dCAPS Markeranalyse

Die Untersuchung auf das Vorhandensein der mutierten Allele *rock4* und *rio1.3* erfolgten durch den Nachweis der Punktmutation mittels *cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS) bzw. *derived* CAPS (dCAPS) Markeranalyse nach Neff *et al.* (1998). Dabei wird der Bereich um die Punktmutation per PCR amplifiziert (Abschnitt 2.2.3.4) und mit Restriktionsenzymen verdaut (Abschnitt 2.2.3.8). Die Punktmutation liegt hierbei in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym. Daher erfolgt der Verdau des DNA-Fragmentes nur bei der Mutante oder dem WT. Eine Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme sowie die nach dem Verdau erhaltenen Fragmentgrößen, ist in Tabelle 12 aufgeführt. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang aufgeführt (Tabelle S1). Die Analyse der Fragmentgrößen erfolgte durch die gelelektrophoretische Auftrennung des Restriktionsansatzes (2.2.3.4).

Tabelle 12. Übersicht über die verwendeten CAPS und dCAPS Marker.

Allel	Primer	Restriktionsenzym	WT-Allel/ Mutantenallel (bp) ¹	Referenz
<i>rock4</i>	ROCK4-dCAPS-F1+ ROCK4-dCAPS-R1	Sall	212; 13/ 225	Dr. H. Jensen
<i>rio1.3</i>	Rio1-F+ Rio1-R	Bccl	184; 399/ 583	Dr. M. Niemann
<i>ugt76c1-3</i> <i>ugt76c1-4</i>	CRISP_HPY99I_Fw+ CRISP_HPY99I_rev	HPY99I	705; 277; 143/ 983; 143	L. Brock

¹ Angegeben ist die Größe der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau.

2.2.3.14 Nachweis von T-DNA-Insertionen

Die Genotypisierung der T-DNA-Insertionsallele von *ZGT1*, *CKX3*, *CKX5*, *ABCG14*, *UGT76C1* und *UGT76C2* erfolgte durch PCR. Zum Nachweis der T-DNA wurde eine PCR mit einem T-DNA spezifischen Primer und einem genspezifischen Primer durchgeführt. Zum Nachweis des WT-Allels erfolgte eine PCR mit Primern, welche den T-DNA-Insertionsort überspannten. Eine Übersicht über die verwendeten Primer, Allele, Amplifikatlängen und Referenzen zeigt Tabelle 13. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang aufgeführt (Tabelle S1). Die Analyse der Fragmentgrößen erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3.4).

Tabelle 13. Übersicht Genotypisierung von T-DNA-Insertionsmutanten.

Allel	ID	ATG-Nr.	Primer	Amplifikat- länge (bp)	Referenz
<i>zgt1-1</i>	Gabl_076C12	AT1G224400	zgt1-1_rev + IS_LB_GABI	~500	L. Brock
<i>ZGT1</i>		AT1G224400	zgt1-1_fw + zgt1-1_rev	~680	L. Brock
<i>ckx3</i>	salk_050938	AT5G56970	A8+Lb1.3	~600	Dr. I. Bartrina
<i>CKX3</i>		AT5G56970	A8+A7	871	Dr. I. Bartrina
<i>ckx5</i>	salk_064309	AT1G75450	A6+LB1.3	~800	Dr. I. Bartrina
<i>CKX5</i>		AT1G75450	A6+A5	580	Dr. I. Bartrina
<i>ugt76c2-1</i>	SALK_135793	AT5G05870	RT5+LB1.3	~800	L. Brock
<i>UGT76C2</i>		AT5G05870	RT3+RT5	789	L. Brock
<i>ugt76c2-2</i>	SALK_010205	AT5G05870	RT2+LB1.3	~800	L. Brock
<i>UGT76C2</i>		AT5G05870	RT1+RT2	~1000	L. Brock
<i>ugt76c1-1</i>	SALK_144355C	AT5G05860	RT8+LB	~434	L. Brock
<i>UGT76C1</i>		AT5G05860	RT6+RT8	~1400	L. Brock
<i>ugt76c1-2</i>	WiscDsLoxHs114_05B	AT5G05860	RT6+L4	~700	L. Brock
<i>UGT76C1</i>		AT5G05860	RT6+RT7	~1400	L. Brock

2.2.4 Bestimmung der Transkriptabundanz

2.2.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus *Arabidopsis* wurden 100-200 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit der Schwingmühle MM 300 (Retsch, Haan) zerkleinert. Die Isolierung der RNA erfolgte je nach Anwendung entweder mit dem RNeasy Plant Mini Kit oder dem NucleoSpin RNA Plant Kit (Tabelle 2) nach Herstellerangaben, oder mit der Trizol-Methode. Bei Letzterer wurde zu dem gefrorenen Pflanzenpulver 1 ml TRIsure (Bioline, Luckenwalde) hinzugegeben und homogenisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 12000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz für 15 s gründlich gemischt, dann zur Phasentrennung 3 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und nach Zugabe von 500 µl kalten Isopropanols durch Invertieren gemischt. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal durch Zugabe von 1000 µl

80%igem Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und 4 °C gewaschen, dann für 5 min bei 60 °C getrocknet und in 25-40 µl ddH₂O gelöst. Anschließend wurde die RNA-Konzentration und -Qualität der Proben mit dem Spektrometer (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (Abschnitt 2.2.3.7) bestimmt. Zusätzlich wurde als Kontrolle jeweils 1 µg der extrahierten RNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.2.3.5).

2.2.4.2 Aufreinigung und DNase I-Verdau

Die RNA-Proben wurden für die weitere Verwendung einem DNaseI-Verdau (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) unterzogen, um eventuell noch vorhandene DNA zu beseitigen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach dem DNaseI-Verdau wurde die Integrität der RNA erneut in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die Konzentrationen der RNA wurden neu bestimmt.

2.2.4.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Für die Bestimmung der Transkriptlevel mittels qPCR (2.2.4.4) wurde die isolierte mRNA durch eine reverse Transkriptase in first-strand-cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Tabelle 1) nach Herstellerangaben. Für die cDNA-Synthese wurde je Reaktion 1,5 µg aufgereinigte, DNase I verdaute RNA (Abschnitte 2.2.4.1 und 2.2.4.2) eingesetzt. Es wurde dabei eine Kombination aus an den Poly-A-Schwanz bindenden Oligo(dT)-Primern und Random-Primern (Hexamere) verwendet. Letztere sollten die cDNA-Ausbeute erhöhen und gewährleisten, dass bei langen Transkripten auch die 5'-Bereiche vollständig in cDNA umgesetzt werden. Vor dem Gebrauch der cDNA in qPCR-Analysen (2.2.4.4) wurde diese 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4 Primer-Design für qPCR-Analysen

Die Primer zur Verwendung in qPCR-Analysen wurden mit dem Programm Primer-Blast von NCBI (2.1.8) entworfen. Dabei wurden die Parameter wie folgt gewählt: optimale Schmelztemperatur 60 °C, GC-Gehalt zwischen 20 % und 30 %, PCR-Produktlänge zwischen 100 und 200 bp. Die Spezifität und Qualität der Primer wurde zusätzlich mit der NetPrimer-Software (2.1.8) überprüft.

Vor der Verwendung der Primer in qPCR-Analysen wurden die Primereffizienzen getestet. Dafür wurde von WT-cDNA eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640) hergestellt und als Template in einer Test-qPCR eingesetzt. Pro Verdünnung wurden dabei drei technische Replikate gemessen. Die erhaltenen C_t-Werte wurden logarithmisch

über die cDNA-Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung der erhaltenen Regressionsgrade erfolgte die Berechnung der Primereffizienz ($E = (10^{-1/\text{Steigung der Regressionsgeraden}}) * 100$). Die Primer wurden verwendet, wenn die Effizienz zwischen 85 % und 115 % lag. Die qPCR-Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle S1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgeführt.

2.2.4.5 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Bei der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) handelt es sich um eine Methode, mit der spezifische Transkripte quantitativ nachgewiesen werden können. Dabei wird die Zunahme der synthetisierten DNA bereits während der PCR-Reaktion durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I gemessen. Dessen Lichtemission verhält sich proportional zur DNA-Menge. Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellwert überschreitet, wird als *cycle threshold* (C_t)-Wert bezeichnet und ist direkt proportional zu der im Ausgangsmaterial enthaltenen Kopienanzahl des gemessenen Gens. Die Auswertung und Normalisierung erfolgte mit der vergleichenden C_t -Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) nach (Vandesompele *et al.* 2002). Zur Überprüfung, ob die Amplifikation der Zielgene spezifisch war, wurden nach dem Abschluss der PCR-Zyklen Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit der 7500 Fast-Real-Time-PCR-Maschine der Firma Applied Biosystems unter Verwendung der zugehörigen *7500 Software* (Version 2.03) oder der CFX96 TouchTM-PCR-Maschine (Bio-Rad, Kalifornien, USA) unter Verwendung der zugehörigen Software *CFX Manager* (Version 3.1). Die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsansatzes zeigt Tabelle 14. Abgesehen von der cDNA wurden alle Komponenten zu einem Mastermix zusammenpipettiert. In jedes *well* einer Mikrotiterplatte wurden 18 μ l Mastermix mit 2 μ l verdünnter cDNA gegeben. Das verwendete qPCR-Programm ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 14. Zusammensetzung von Reaktionsansätzen der qPCR.

Komponente:	Volumen	Endkonzentration
Immolase-Puffer 10x	2,00 μ l	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0,80 μ l	2 mM
dNTP-Mix (20 mM)	0,40 μ l	100 μ M
SYBR Green I (10x)	0,20 μ l	0,1x
ROX ¹ (25 μ M)	0,04 μ l	50 nM
5'-Primer (50 μ M)	0,12 μ l	300 nM
3'-Primer (50 μ M)	0,12 μ l	300 nM
Immolase (5 U/ μ l)	0,04 μ l	0,01 U
cDNA ²	2,00 μ l	

¹ Rox wurde den qPCR-Ansätzen nur bei der Verwendung der 7500 Fast-Real-Time-PCR-Maschine hinzugesetzt und in den Ansätzen der CFX96 TouchTM-PCR-Maschine durch ddH₂O ersetzt. ²Bei Standard-Transkriptanalysen wurden die cDNA 1:10-verdünnt.

Tabelle 15. qPCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. initiale Denaturierung/Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	15 min
2. Denaturierung	95 °C	2 s
3. Primer-Annealing	55 °C	15 s
4. Elongation	72 °C	15 s
5. Aufnahme der Schmelzkurve		

Die Schritte 1 und 5 wurden nur einmal durchgeführt. Die Schritte 2-4 wurden vierzigmal zyklisch wiederholt. Die Schmelzkurve diente der Überprüfung der Spezifität der Amplifikation. Die Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgte bei Schritt 3 oder Schritt 2.

2.2.5 Nachweis und Analyse von Proteinen

2.2.5.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis*

Zur Extraktion der Gesamtproteine aus *Arabidopsis* wurden 3-4 Keimlinge in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 100 µl Proteinextraktionspuffer (100 mM TRIS-HCl [pH 7,5]; 1 mM PMSF und 0,3 % TritonX-100) hinzugefügt und mit Hilfe einer Schwingmühle MM300 (Retsch, Haan) zerkleinert (3 min, 30 Hz). Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert und bei 6.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.2.5.2).

2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) ist eine photometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Dabei wird der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 verwendet, dessen Absorptionsmaximum sich unter sauren Bedingungen in Anwesenheit von Proteinen von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Es wurden je 998 µl der 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz-Lösung (Bio-Rad, Kalifornien, USA) mit 2 µl des Proteinextrakts vermischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend die OD₅₉₅ bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen aus den Absorptionswerten wurde eine Konzentrationsreihe mit dem Proteinstandard BSA (*bovine serum albumin*) hergestellt, vermessen und eine Eichgrade ermittelt.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach erfolgte durch eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Laemmli 1970). Die verwendeten SDS-Gele (8,5 x 10 x 0,1 cm) bestanden aus einem 10 %-igen Trenngel [pH 8,8] und einem 4 %-igen Sammelgel [pH 6,8]. Die genaue Zusammensetzung der SDS-Gele kann Tabelle 16 entnommen werden. Vor der eigentlichen Auftrennung wurden die Proteine in dem

Sammelgel fokussiert. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine proportional zu ihrer Molekülmasse, da das negativ geladene SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die Elektrophorese wurde in einer *Hoefler SE 250 Mighty Small II* Elektrophoreseapparatur (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 1x SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,2 % SDS), bei maximal 200 V und konstanten 20-25 mA pro Gel, durchgeführt. Vor der Beladung des Gels, wurden die die Proben mit 4x SDS-Ladepuffer (250 mM Tris-HCl [pH 6,8], 8 % SDS, 10% β -Mercaptoethanol, 40 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau) versetzt (1:4), 5 min bei 95 °C denaturiert und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Abschätzung der Proteingrößen im SDS-Gel wurden 6 μ l des Protein-Größenstandards PageRuler (prestained) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit aufgetrennt.

Tabelle 16. Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngels.

Komponente	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, [pH 6,8])	-	1149 μ l
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, [pH 9])	2,5 ml	-
Acryl:Bisacryl 40 % (Rotiphorese® Gel 30)	2,5 ml	600 μ l
ddH ₂ O	4,9 μ l	4,2 ml
20 % SDS	50 μ l	23 μ l
10 % APS	50 μ l	23 μ l
TEMED	5 μ l	1,8 μ l

2.2.5.4 Immunoblot-Analyse

Der Nachweis der GFP- bzw. myc-Epitope der Fusionsproteine erfolgte mittels Immunoblot-Analysen. Für die Immunodetektion wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Immobilon-P, Merck Millipore, Darmstadt) übertragen (geblottet) (Gultekin und Heermann 1988). Vor dem Blotten wurden die Membranen 20 s in Methanol aktiviert, dann für 2 min in H₂O und anschließend im Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris) equilibriert. Das Gel wurde jeweils 10 min in ddH₂O und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge auf der schwarzen Seite des Trärgitters der Blot-Apparatur aufgebaut: Schwamm, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filterpapier und Schwamm. Das Trärgitter wurde geschlossen und zwischen Anode und Kathode in der Mini Trans-Blot®-Apparatur (Bio-Rad, Kalifornien, USA) platziert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei konstant 50 mA und 4 °C.

Für den immunologischen Nachweis der GFP-Fusionsproteine wurde die Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter ständiger Rotation in einem Rotator (FINEPCR, Geumjeong-dong, Südkorea). Die Membran

wurde zunächst für 60 min in 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS-T. Die nicht gebundenen Antikörper wurden in drei Waschschrritten mit 10 ml PBS-T für jeweils 5 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls in 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS-T. Die Inkubationszeiten mit den primären und sekundären Antikörpern wurden jeweils an die verwendeten Antikörper angepasst. Die Membran wurden anschließend erneut drei Mal mit 5 ml PBS-T für je 10 min gewaschen. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch die Detektion der Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Aktivität des sekundären Antikörpers mit Hilfe des SuperSignal® West Pico Detektionskits (Tabelle 2) nach Herstellerangaben. Die entstandene Chemilumineszenz wurde durch die Exposition der Membran gegen einen CL-XPosure Röntgenfilm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nachgewiesen.

Der Nachweis von GFP erfolgte durch die Verwendung des primären anti-GFP Mouse Antikörpers (Cat:1181446001, Roche, Mannheim, Deutschland) in einer 1:1000 Verdünnung und den sekundären HRP-gekoppelten anti-Mouse-Goat Antikörper (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in einer 1:2000 Verdünnung.

Zum Nachweis des myc-Epitops wurde der als primärer Antikörper der „Anti-myc Tag, clone 4A6“ Antikörper (Merck Millipore, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt. In Kombination mit dem sekundären Antikörper „Goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005“ (Santa Cruz, Dallas, USA) in einer Verdünnung von 1:5000. Für die Bestimmung der Größe der detektierten Proteine wurde der mit aufgetrennte Größenstandard PageRuler (prestained) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit auf die Membran geblottet.

2.2.5.5 Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen mit Ponceau S und Coomassie-Brilliant-Blau

Die Proteine auf der PVDF-Membran wurden mit Ponceau S oder Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dadurch wurde überprüft, ob die Proteine aus dem Gel beim Blotten gleichmäßig auf die PVDF-Membran übertragen wurden und ob die Proteinkonzentration der verschiedenen Proben gleichmäßig war. Für die Ponceau-Färbung wurden die Membranen in 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure inkubiert und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen, bis die gewünschte Färbung erreicht war (Stochaj *et al.* 2006). Für die Coomassie-Färbung wurden die Membranen 10 min in Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (w/v), 50 % Methanol (v/v), 10 % Eisessig (v/v)) inkubiert und dabei geschwenkt und anschließend mit Entfärbelösung (5 % Methanol (v/v), 9 % Eisessig (v/v)) gewaschen.

2.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen erfolgten mit Excel oder JMP (2.1.8). Mit Hilfe von Quantil-Quantil (QQ)-Diagrammen und dem Shapiro-Wilk-Test wurde zuerst überprüft, ob die Daten Normalverteilt waren. Die Varianzgleichheit wurde mit anschließend mit dem Welch-Test überprüft. Wenn die Analysen zeigten, dass die Annahme der Normalverteilung und der Varianzgleichheit gerechtfertigt war, erfolgte die statistische Auswertung mit dem zweiseitigen *students* T-Test oder mit einer einfachen Varianzanalyse (*one-way* ANOVA, Tukey Kramer Test). Andernfalls erfolgte die statistische Auswertung mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Rangsummen Test.

2.4 Kollaborationen

Die Cytokinin-Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. O. Novák (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien) nach Novák *et al.* (2008).

In Zusammenarbeit mit Dr. Benoit Landrein (*University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien*) wurde die Untersuchung der Größe und des Plastochronratios des Meristems von *pTCSn:GFP ugt76c1,2_a* Mutanten (Zürcher *et al.* 2013, diese Arbeit) und *ckx3,5 ugt76c1,2_-*Quadrupelmутanten durchgeführt. Von ihm wurden außerdem die Arbeiten zur Charakterisierung der *pTCS:GFP*-Domäne, im Hintergrund der *ugt76c1,2_a*-Mutationen mit und ohne die Zugabe von Cytokinin, durchgeführt. Die von ihm durchgeführten Arbeiten erfolgten wie beschrieben in: Landrein *et al.* (2015) und Gruel *et al.* (2016).

Die Bestimmung der Anzahl der juvenilen Blätter zur Beurteilung ob der Übergang von der juvenilen zur adulten vegetativen Wachstumsphase verändert war, erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Sören Werner (Freie Universität, Berlin) nach (Werner 2016).

In Kooperation mit Bruno Müller (Universität Zürich, Zürich, Schweiz) wurde die Morphologie von *Arabidopsis*-Embryonen der *ugt76c1,2_a*-Doppelmutanten nach Zürcher *et al.* (2016) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 UGT76C1 und UGT76C2 sind im Zytosol und im Nukleus lokalisiert

Die Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen sind wichtig, da sie zeigen, in welchem Zellkompartiment der Stoffwechselweg der Cytokinin-*N*-Glucosylierung angesiedelt ist und wie dieser in das Cytokininhomöostase-System einzuordnen ist. Im Rahmen meiner Masterarbeit erfolgte die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *Arabidopsis* UGT76C1-GFP- und UGT76C2-GFP-Fusionsproteinen in transient transformierten *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*)-Blättern. Das GFP-Signal war hauptsächlich im Zytosol und im Nukleus detektierbar (Brock 2012). Neben den flächigen Signalen des Zytosols waren zudem auch vesikuläre Strukturen zu beobachten, die keinem Kompartiment klar zugeordnet werden konnten. *In-silico*-Sequenzanalysen wiesen für beide Glucosyltransferasen auf das mögliche Vorhandensein N-terminaler Signalsequenzen des sekretorischen Wegs hin (Brock 2012). Um Überexpressionsartefakte der transienten Expression auszuschließen, wurden in meiner Masterarbeit bereits stabile *35S:UGT76C2-GFP-Arabidopsis*-Linien hergestellt und in der T1-Generation oberflächlich charakterisiert (Brock, 2012).

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden für *35S:UGT76C2-GFP* homozygote Linien identifiziert und stabile *35S:UGT76C1-GFP-Arabidopsis*-Linien hergestellt, von denen ebenfalls homozygote Linien isoliert wurden (s. Abschnitt 3.3.1).

Zuerst wurde die subzelluläre Lokalisation von UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP im Detail untersucht. Zum Vergleich für eine zytoplasmatische Lokalisation wurde die räumliche Verteilung von freiem GFP analysiert. Die Untersuchungen erfolgten in Wurzelspitzen von sieben Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen mittels konfokaler Mikroskopie (Abbildung 6). Das freie GFP zeigte in den peripheren, die zentrale Vakuole umgebenden, Zellbereichen das typische flächige Muster zytosolischer Proteine und eine klare Trennung zur Zellmembran. Auch im Nukleus war ein eindeutiges Signal erkennbar, wobei ein Bereich, wahrscheinlich der Nukleolus, ausgespart blieb. Die Signale von UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP zeigten insgesamt sehr ähnliche Muster. Die Untersuchungen belegen, dass UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP im Cytoplasma und im Nukleus lokalisiert sind. Vesikuläre Strukturen, die in den transient transformierten Tabakblättern zu erkennen waren (Brock, 2012) und auf eine Lokalisation im sekretorischen Weg hinweisen könnten, wurden nicht beobachtet. Demnach ist davon auszugehen, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung hauptsächlich im Cytoplasma erfolgt.

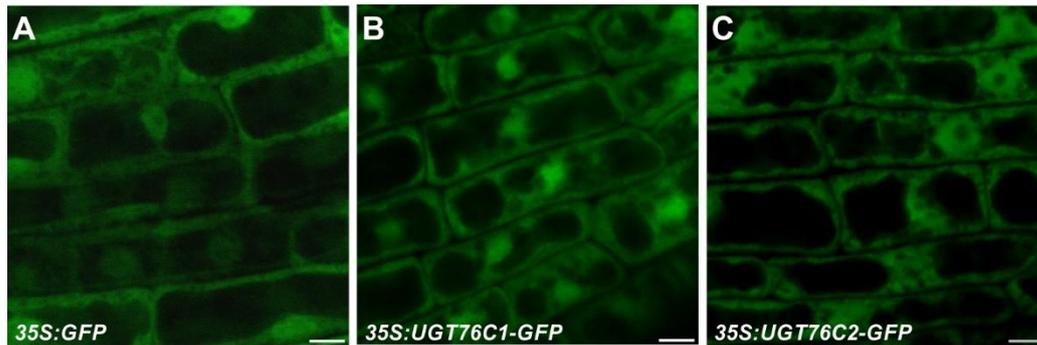


Abbildung 6. Subzelluläre Lokalisation von freiem GFP sowie der Fusionsproteine UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP in Wurzeln stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen.

Das GFP-Protein (A) und die Fusionsproteine UGT76C1-GFP (B) und UGT76C2-GFP (C) waren im Zytosol und im Nukleus lokalisiert. Die Analysen der Wurzelepidermiszellen der transgenen *Arabidopsis*-Linien 35S:GFP, 35S:UGT76C1-GFP und 35S:UGT76C2-GFP erfolgten mittels konfokaler Mikroskopie am siebten Tag nach der Keimung (TNK). Der Maßstab entspricht 10 µm.

3.2 UGT76C2 zeigt gewebe- und entwicklungsspezifische Expressionsmuster

Die Untersuchung der Expressionsdomänen eines Gens kann wichtige Hinweise dafür liefern, welche Entwicklungsstadien und Prozesse von diesem beeinflusst werden. Für *UGT76C1* und *UGT76C2* wurde bereits eine Reporterstudie durchgeführt (Wang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Die Konstrukte enthielten als Promotorfragment eine 2000 bp lange Sequenz vor dem *UGT76C2*-Startcodon (Wang *et al.* 2011) bzw. für *UGT76C1* eine 350 bp lange Sequenz vor dessen Startcodon. Die Ergebnisse dieser Arbeiten stimmen mit vorhandenen Microarraydaten nur bedingt überein (Schmid *et al.* 2005). Dies könnte darauf hinweisen, dass in den publizierten Reporterkonstrukten nicht alle relevanten *cis*-regulatorischen Elemente enthalten waren. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Reporterkonstrukte generiert werden. Dafür wurde zuvor eine bioinformatische Analyse durchgeführt, um alle relevanten *cis*-regulatorischen Elemente in die Reporterfragmente einzuschließen. Dabei wurde das Vorkommen und die Verteilung bekannter Bindemotive von B-Typ-ARRs und des WUS-Transkriptionsfaktors im *UGT76C1*- und *UGT76C2*-Locus untersucht.

3.2.1 Die *UGT76C1*- und *UGT76C2*-Loci enthalten *cis*-regulatorische Elemente von B-Typ-ARR und WUSCHEL-Transkriptionsfaktoren

UGT76C2 gehört zu der Gruppe der gut charakterisierten Cytokininantwortgene. Zahlreiche Studien belegen, dass dessen Expression durch Cytokinin induziert wird (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012, Šmehilová *et al.* 2016). Die Transkription der primären Cytokininantwortgene wird durch aktivierte B-Typ-ARR-Transkriptionsfaktoren initiiert (Brenner *et al.* 2005). Für ARR1, ARR2, ARR10 und ARR12 wurde das *In-vitro*-Bindemotiv AGAT(C/T) identifiziert und als Cytokininantwortmotiv (Cytokinin *response motif*, CRM) bezeichnet (Hosoda *et al.* 2002, Imamura *et al.* 2003, Ramireddy *et al.* 2013, Sakai *et al.* 2000, Sakai *et al.* 2001). Für ARR1 konnte das CRM erweitert werden (AAGAT(C/T)TT, *extended CRM*, ECRM)

(Taniguchi *et al.* 2007) und es wurden auch weitere Varianten des ECR-Motivs identifiziert, beispielsweise AGAT(A/T)CG für ARR1 und CGGATCCG für ARR10 (Zubo *et al.* 2017). Metaanalysen von Microarray-Daten zeigen, dass die Häufigkeit des Auftretens von CRM-Sequenzen in den Promotorregionen von bekannten Cytokininantwortgenen nicht signifikant erhöht ist, die des ECRMs aber schon (Bhargava *et al.* 2013). Daher wurde in die vorliegende Analyse das CRM nicht miteingeschlossen.

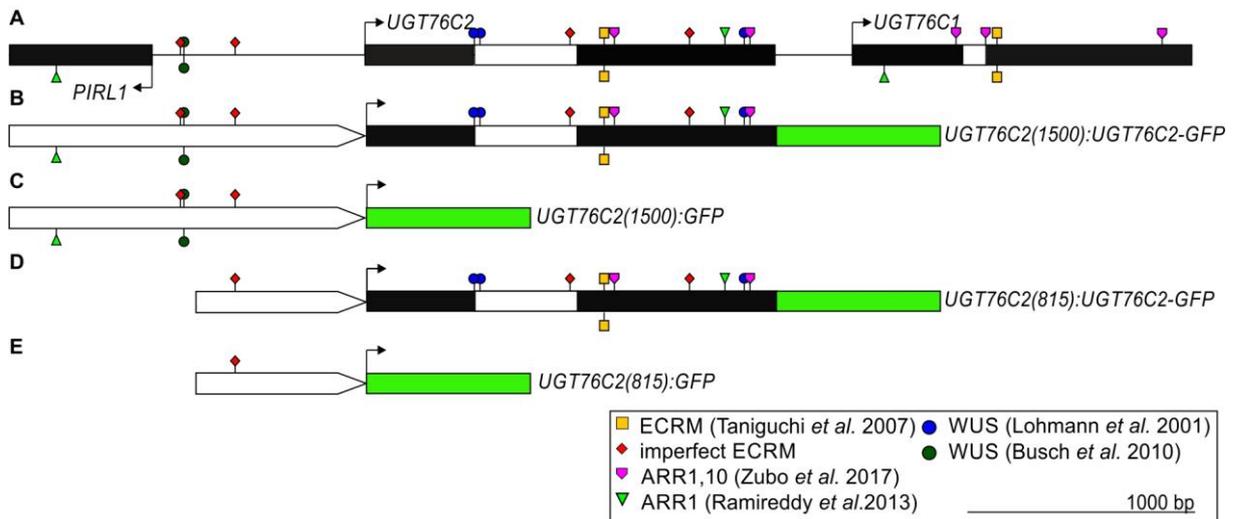


Abbildung 7. Übersicht über die cis-regulatorischen Elemente von B-Typ-ARR- und WUS-Transkriptionsfaktoren im UGT76C1- und UGT76C2-Locus sowie über den Aufbau der UGT76C2-Reporterkonstrukte.

A) Darstellung der genomischen Struktur des UGT76C1- und des UGT76C2-Locus mit Bindestellen von B-Typ-ARR- und WUS-Transkriptionsfaktoren (siehe Legende).

B) bis E) Übersicht über die UGT76C2-Reporterkonstrukte. Als Promotorsequenzen wurden Fragmente mit einer Länge von 1500 bp (UGT76C2(1500)) bzw. 815 bp (UGT76C2(815)) vor dem UGT76C2-Startcodon entweder vor die gesamte genomische Sequenz von UGT76C2 mit GFP (**B** und **D**) oder GFP allein kloniert (**C** und **E**). Weißer Pfeil: Promotorfragment; Schwarzer Pfeil: Startcodon; Schwarze Balken: Exons; weiße Balken: Introns; grüne Balken: GFP.

Die UGT76C1- und UGT76C2-Loci enthalten mehrere der beschriebenen B-Typ-ARR-Bindemotive, eine Übersicht zeigt Abbildung 7A. Das ECR-Motiv wurde zwei Mal identifiziert und liegt jeweils im zweiten Exon von UGT76C1 und UGT76C2. Vier Mal konnten ECR-Motive mit leichten Abweichungen von der Konsensussequenz beobachtet werden. Diese weisen anstelle des vorletzten „T“ ein „G“ oder anstelle des „TT“ ein „CG“ auf (AAGATTGT und AAGATCGT). Diese Variationen des ECR-Motivs werden hier als „imperfekte ECRM“ bezeichnet und traten bei UGT76C2 zwei Mal im Promotor und ein Mal im Intron sowie im zweiten Exon auf (Abbildung 7A). Die ARR1- und ARR10-Bindemotive, die von Zubo *et al.* (2017) und Ramireddy *et al.* (2013) beschrieben wurden, kamen einmal im Promotor und drei Mal im zweiten Exon von UGT76C2 vor und bei UGT76C1 jeweils zwei Mal im ersten sowie im zweiten Exon vor. Interessanterweise liegen die meisten der B-Typ-ARR-Bindestellen nicht wie erwartet in den mutmaßlichen Promotor-Regionen, sondern vor allem in den kodierenden Bereichen. Elf der insgesamt 13 identifizierten B-Typ-ARR-Bindemotive liegen in der intragenischen Sequenz von UGT76C1 und UGT76C2. In den Promotorregionen hingegen

konnten für *UGT76C2* nur drei B-Typ-ARR-Bindemotive identifiziert werden und in der intergenischen Region zwischen *UGT76C2* und *UGT76C1* gab es keine Typ-B-ARR-Bindemotive. *Microarray*-Daten geben Hinweise darauf, dass *UGT76C1* und *UGT76C2* spezifisch in der SAM-Domäne des organisierenden Zentrums (Wuschel-Domäne), welches die Stammzellen reguliert, exprimiert werden (Winter *et al.* 2007, Yadav *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurden die *UGT76C1*- und *UGT76C2*-Loci auch auf das Vorhandensein von bekannten Bindestellen des WUS-Transkriptionsfaktors untersucht.

Die Promotor-Regionen und die kodierenden Sequenzen des *UGT76C*-Locus enthalten vier WUS-Bindesequenzen: das CACGT-Motiv (Busch *et al.* 2010) im Promotor und das TTAATSS-Motiv (Lohmann *et al.* 2001) zwei Mal im Intron und ein Mal im zweiten Exon (Abbildung 7A). Auch hier befindet sich das TTAATSS-Motiv nur in der intragenischen Sequenz von *UGT76C2*.

Transkriptomdaten zeigten außerdem, dass durch Auxin die Expression von *UGT76C2* herunter und die von *UGT76C1*-induziert wird (persönliche Mitteilung Dr. E. Benková). Daher wurden die *UGT76C1*- und *UGT76C2*-Loci auf das Vorhandensein des Auxin-Response-Elements (AuxRe:TGTCTC) (Ulmasov *et al.* 1997, Ulmasov *et al.* 1995) hin untersucht. Dieses konnte zwei Mal in der Promotorregion von *UGT76C2* identifiziert werden (Abbildung 7A).

3.2.2 Reporterkonstrukte zur Untersuchung der Promotoraktivität von *UGT76C2*

Die beiden Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* liegen direkt nebeneinander und sind nur durch eine 183 bp lange intergenische Region getrennt. Ihre Expression scheint jedoch zumindest teilweise unabhängig voneinander reguliert zu werden. Beispielsweise wird nur die Expression von *UGT76C2* durch Cytokinin induziert. Die Abgrenzung des Promotors von *UGT76C1* fällt schwer, da dieser möglicherweise mit der kodierenden Sequenz von *UGT76C2* überlappt. Aus diesem Grund und da der Vergleich der Einzelmutanten darauf hinweist, dass *UGT76C2* die bedeutendere Komponente der Cytokinin-*N*-Glucosylierung zu sein scheint (Šmehilová *et al.* 2016), wurde in dieser Arbeit nur das Expressionsmuster von *UGT76C2* untersucht.

Wie oben beschrieben, geben *Microarray*-Daten Hinweise auf eine domänenspezifische Expression beider Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen im SAM (Yadav *et al.* 2009). Um die genauen Expressionsdomänen im Meristem mittels konfokaler Mikroskopie untersuchen zu können, wurde als Reporter GFP verwendet. Um die Bedeutung der intragenischen Bindemotive der Transkriptionsfaktoren WUS und der B-Typ-ARRs untersuchen zu können, wurde die Expression des GFP-Signals von Konstrukten mit und ohne genomische *UGT76C2*-Sequenz verglichen. Eine Übersicht über die vier hergestellten Reporter-Konstrukte ist in Abbildung 7B-E dargestellt. Als mutmaßliche Promotoren wurden eine 1500 bp (*pUGT76C2(1500)*) und eine 815 bp lange Sequenz (*pUGT76C2(815)*) vor dem *UGT76C2*-Startcodon mit und ohne die genomische *UGT76C2*-Sequenz vor die *eGFP*-Sequenz kloniert.

3.2.3 Das Expressionsmuster von *UGT76C2* ist gewebe- und entwicklungsspezifisch

In der T1- und T2-Generation wurden die Expressionsmuster der vier *UGT76C2*-Reporterkonstrukte (Abbildung 7B-E) unter dem Fluoreszenzmikroskop in Wurzeln von jeweils 8-22 Linien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Länge der gewählten Promotorfragmente keinen Einfluss auf das Expressionsmuster hatte. Die Expressionsmuster der Reporterkonstrukte, bei denen GFP allein oder als *UGT76C2*-GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde, unterschieden sich hingegen deutlich. Dies impliziert zum einen, dass bereits die kürzere Version des Promotors alle wesentlichen Elemente für die Regulation der Expression enthält und unterstreicht zum anderen die Wichtigkeit der intragenischen *cis*-regulatorischen Elemente.

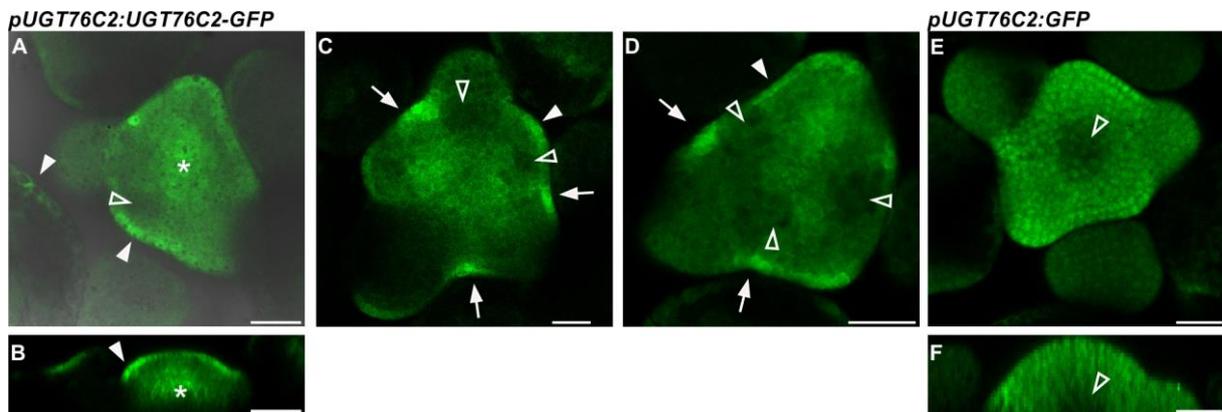


Abbildung 8. Nachweis der *UGT76C2*-Reporteraktivität in Infloreszenzmeristemen von *Arabidopsis*.

Die Untersuchung der Expression von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* bzw. von *pUGT76C2:GFP* erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Das Meristem ist von oben (**A, C, D** und **E**) oder von der Seite (**B** und **F**) dargestellt. Die Überlagerung des grünen GFP-Signals mit dem Durchlicht zeigt Abbildung (**A**) und das GFP-Signal allein zeigen die Abbildungen (**B, C, D, E** und **F**). Gefüllte Pfeilspitzen markieren die Expression in der L1-Zellschicht. Sternchen kennzeichnen die Expressionsdomäne im Zentrum des Meristems. Lokale Expressionsmaxima sind mit Pfeilen und lokale Expressionsminima durch ungefüllte Pfeilspitzen markiert. Der Maßstab entspricht 25 µm.

In der T2-Generation wurden anhand der Segregation des Selektionsmarkers Einzelinsertionslinien identifiziert. Aus zeitlichen Gründen wurden alle weiteren Untersuchungen nur mit den Konstrukten durchgeführt, welche die längere Version des Promotors enthielten (*UGT76C2(1500):UGT76C2-GFP* und *UGT76C2(1500):GFP*). Diese werden im Folgenden als *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* und *pUGT76C2:GFP* bezeichnet. Für beide Konstrukte wurden jeweils mehrere homozygote Linien isoliert, mit denen die detaillierten Untersuchungen der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expressionsmuster durchgeführt wurden. Der Fokus der Analysen wurde auf die Untersuchung des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstruktes gelegt, da dieses die Expression von *UGT76C2* wahrscheinlich am besten reflektiert. Um die Relevanz der intragenischen, regulatorischen *cis*-Elemente zu untersuchen, wurde die Expression der Reporterkonstrukte mit und ohne genomische *UGT76C2*-Sequenz (*pUGT76C2:UGT76C2-GFP* und *pUGT76C2:GFP*) verglichen.

Beide Reporterkonstrukte wurden im Infloreszenzmeristem domänenspezifisch exprimiert. Für das Reporterkonstrukt *UGT76C2:UGT76C2-GFP* konnte das stärkste Signal im Protoderm (L1-Schicht) detektiert werden (Pfeilspitzen, Abbildung 8A und B).

In der L2- und L3-Schicht nahm das Signal deutlich ab. Ein zweites Signalmaximum des Reporterkonstrukts konnte im Bereich des OZ und in der oberen Zone des RZs-, beobachtet werden (Stern, Abbildung 8A und B). Weitere Bereiche mit stärkeren GFP-Signalen traten teilweise lokal in der L1/L2-Schicht in unmittelbarer Nähe zu Primordiengrenzen auf (Abbildung 8C und D, Pfeile). Zum anderen konnten auch Bereiche mit einer deutlich schwächeren Signalintensität beobachtet werden (ungefüllte Pfeilspitzen, Abbildung 8A, C und D).

Interessanterweise zeigte das *pUGT76C2:GFP*-Konstrukt ein abweichendes Expressionsmuster. Zwar war das Signal im Meristem auch stark, zeigte aber keine klar abgegrenzte L1-Schicht (Abbildung 8E und F). Das Signal umfasste auch die Schichten unter der L1-Schicht. Dabei wurde das Signal nach unten hin graduell schwächer (Abbildung 8F). Es ist denkbar, dass die Gradient-Bildung des Signals eine Konsequenz der Diffusion des GFP-Proteins ist. Weiterhin unterschieden sich die Expressionsmuster der beiden Reporterkonstrukte deutlich in einem Bereich, der das OZ und den oberen Teil des RZs umfasste. In dieser Domäne war das Signal für das *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukt stark (Stern, Abbildung 8A und B), wohingegen das *pUGT76C2:GFP*-Konstrukt kaum nachweisbar exprimiert wurde (unausgefüllte Pfeilspitze, Abbildung 8A und B). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die regulatorischen *cis*-Elemente der Exons und des Introns im Meristem für die Regulation der Expression von *UGT76C2* physiologisch relevant sind.

In Zusammenarbeit mit Dr. Benoit Landrein (*University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien*) wurde die Expression der Reporterkonstrukte *pUGT76C2:GFP* und *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* im Meristem mittels konfokaler Mikroskopie mit und ohne der Zugabe von 50 μ M tZ nach 24 und 48 Stunden untersucht und quantifiziert (Abbildung 9).

Beide Reporterkonstrukte wiesen zum Startpunkt (0 h) die zuvor beschriebenen, charakteristischen Expressionsmuster auf (Abbildung 9A-D). Bei allen Proben konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenzsignale im zeitlichen Verlauf immer schwächer wurden (Abbildung 9A-C). Dabei war die Abnahme der GFP-Fluoreszenzsignale bei den mit Cytokinin-behandelten Proben deutlich schwächer (Abbildung 9B und D). Auch die Quantifizierung zeigte dies deutlich. In den Proben von *pUGT76C2:GFP* lag die Signalintensität 24 h nach der Induktion bei den mit Cytokinin-behandelten Proben ~58 % (bzw. nach 48 h ~56%) über der von den unbehandelten Referenzproben (Abbildung 9E).

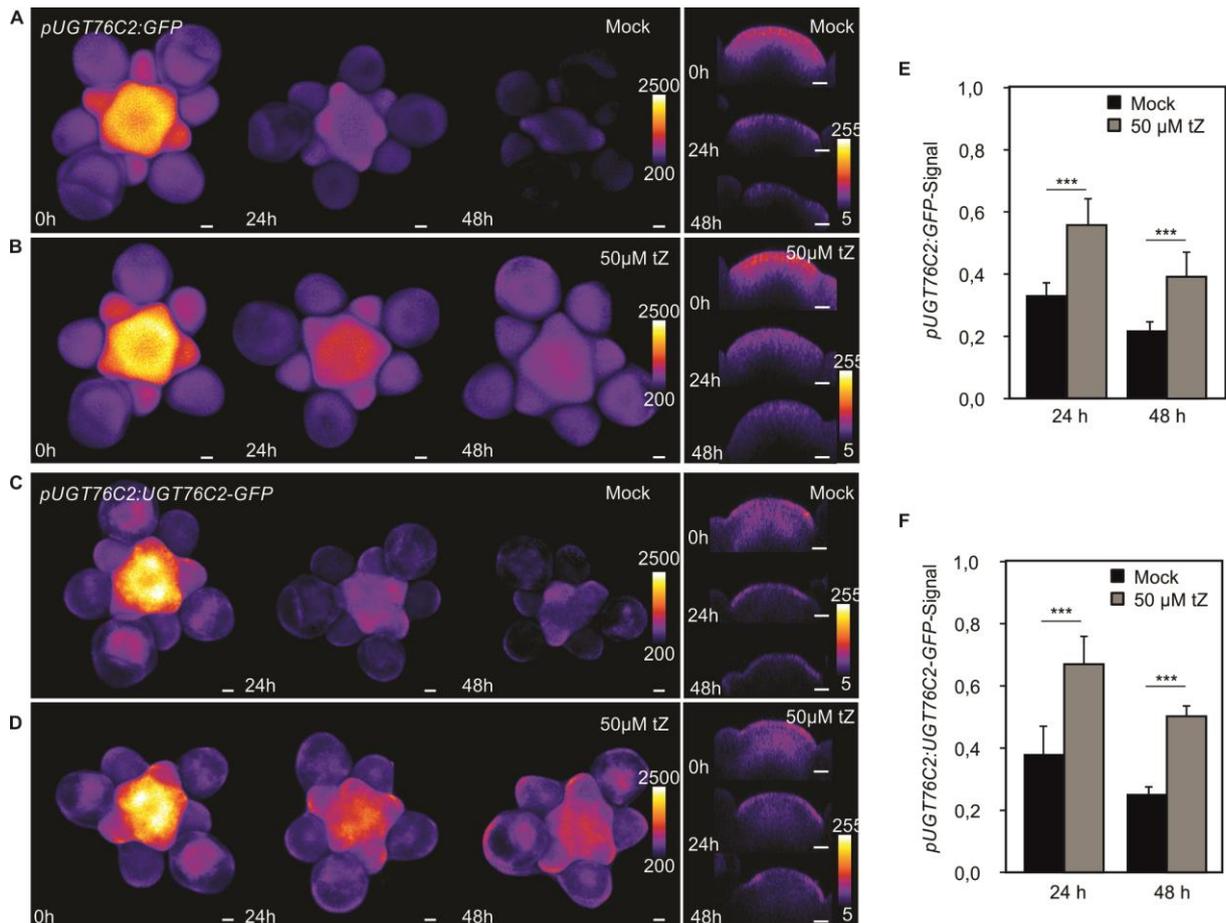


Abbildung 9. Auswirkung der Cytokininzugabe auf die *UGT76C2*-Reporteraktivität im Infloreszenzmeristem. **A bis D)** Expression der Reporterkonstrukte *pUGT76C2:GFP* (**A** und **B**) und *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* (**C** und **D**) 0, 24 und 48 Stunden nach der Mock- (**A** und **C**) oder Cytokinin-Behandlung (50 µM tZ, **B** und **D**). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen das Meristem von oben und von der Seite. Die Darstellung der GFP-Fluoreszenzintensität erfolgte als heat map. Der Maßstab entspricht 50 µm. **E und F)** Die GFP-Signale der Reporterkonstrukte *pUGT76C2:GFP* (**E**) und *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* (**F**) der verschiedenen Zeitpunkte und Behandlungen wurden quantifiziert und auf den Zeitpunkt 0 h bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n = 10). Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen Mock- und Cytokinin-behandelten Proben (***) = p < 0,001; ANOVA). Die Arbeiten erfolgten in Kooperation mit Dr. Benoit Landrein (*University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien*).

Für das *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* verhielt es sich ähnlich. 24 h nach der Induktion lag die Signalintensität der behandelten Proben ~56 % über der Referenzprobe und 48 h nach der Induktion ~47 % (Abbildung 9F). Bei Betrachtung der Morphologie der Meristeme fällt auf, dass diese mit der Zeit kleiner erschienen. Dies wird besonders deutlich bei den mit Cytokinin-unbehandelten Proben (Abbildung 9A und C). und könnte darauf hinweisen, dass die Inkubationsbedingungen bei der Behandlung nicht physiologisch waren. Daher könnte die Verlangsamung der Fluoreszenzabnahme in den mit Cytokinin-behandelten Proben dafürsprechen, dass eine cytokininbedingte Induktion der Expression von *UGT76C2-GFP* stattfand. Da in den mit Cytokinin-behandelten Proben die Expressionsmuster länger aufrechterhalten werden konnten. Die räumliche Verteilung der Reporter veränderte sich nach der Cytokinin-Zugabe bei beiden *UGT76C2*-Reporterkonstrukten nicht.

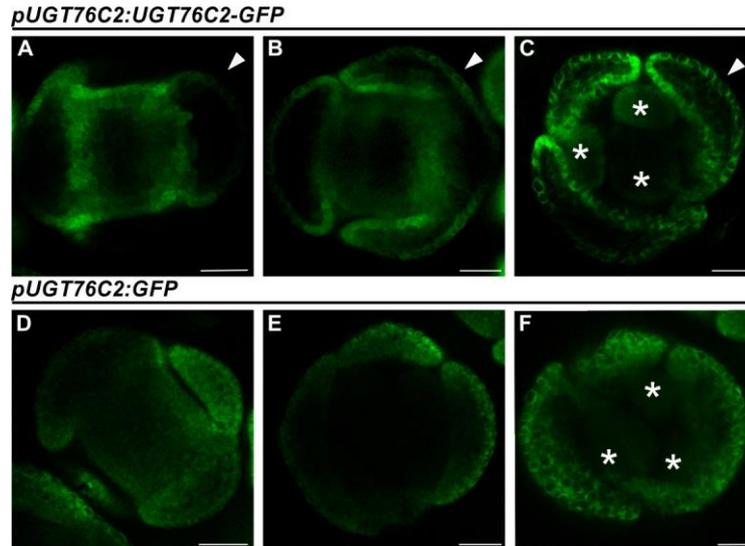


Abbildung 10. Nachweis der *UGT76C2*-Reporteraktivität in verschiedenen Blütenstadien von *Arabidopsis*. Die Untersuchung der Expression von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* und *pUGT76C2:GFP* erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Es wurden Blüten in den Entwicklungsstadien 3 (A und D), 5 (B und E) und 7 (C und F) untersucht. Die Einteilung der Blütenstadien erfolgte nach Smyth *et al.* (1990). Pfeilspitzen markieren die L1-Zellschicht. Das GFP-Signal ist in grün dargestellt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

Die Konstrukte *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* und *pUGT76C2:GFP* wurden im Verlauf der Blütenentwicklung in verschiedenen Blütenstadien exprimiert (Abbildung 10A-F). Die Signalintensität war in jungen Blüten-Primordien am stärksten und wurde in älteren Primordien zunehmend schwächer (Abbildung 10A-F). Die Signale waren für das *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukt allgemein am stärksten in der Epidermis (L1-Zellschicht) der Kelchblätter (Pfeilspitzen, Abbildung 10A-C). Dabei war das Signal stärker auf der adaxialen Seite. In späteren Blütenstadien war ein schwaches Signal auch in jungen Antheren zu verzeichnen (Stern, Abbildung 10C). Im Gegensatz dazu wies das GFP-Signal des *pUGT76C2:GFP*-Konstrukts eine deutlich schwächere Abgrenzung zwischen peripheren und inneren Zellschichten auf. In den späteren Blütenstadien 5 und 7 war das Signal für das *pUGT76C2:GFP*-Konstrukt eher abaxial lokalisiert und wurde nach innen graduell schwächer. Auf der inneren Seite der Kelchblätter und in den Antheren war das Signal kaum vorhanden (Abbildung 10D-F). Die beobachtete Gradientenbildung des Signals für das *pUGT76C2:GFP*-Konstrukt könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass das freie GFP-Protein teilweise diffundiert. Auch in Bezug auf die Expression von *UGT76C2* in der Blütenentwicklung belegen die unterschiedlichen Expressionsmustern der zwei Reporterkonstrukte die physiologische Bedeutung der intragenischen, regulatorischen *cis*-Elemente.

Das Expressionsmuster der beiden Reporterkonstrukte wurde auch in Wurzelapizes 4 Tage nach der Keimung untersucht. Das Reporterkonstrukt *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* zeigte die stärkste Aktivität in den unteren Zellschichten der Columella und in den Zellen des *quiescent centers* (QCs, Pfeilspitzen, Abbildung 11A-C).

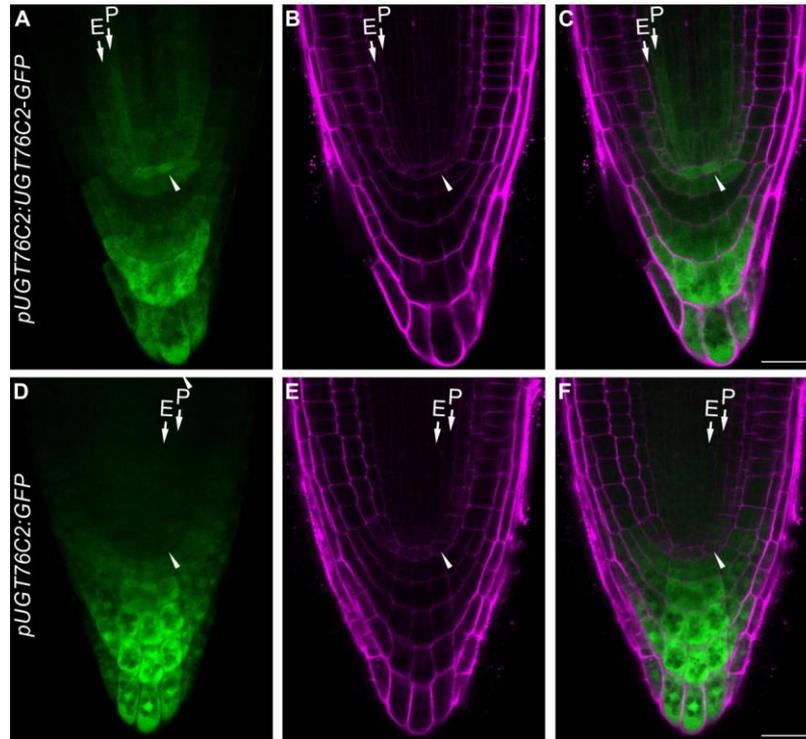


Abbildung 11. Nachweis der *UGT76C2*-Reporteraktivität im Hautp wurzelapex von *Arabidopsis*.

Die Untersuchung der Expression von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* (A bis C) bzw. *pUGT76C2:GFP* (D bis F) erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Das GFP-Signal ist in grün dargestellt, das Signal der Membranfärbung mittels Propidiumiodid in Magenta. Das *quiescent center* (QC) ist mit Pfeilspitzen, die Endodermis mit E, der Perizykel mit P markiert. Der Maßstab entspricht 25 µm. Die Untersuchung erfolgte 4 TNK.

Ein schwächeres Signal konnte auch in den Stammzellen um das QC, in der Epidermis, der Cortextendodermis und dem Perizykel beobachtet werden (Abbildung 11A-C). Wie auch schon im Infloreszenzmeristem, in jungen Primordien und in Blüten zeigte das *pUGT76C2:GFP*-Konstrukt ein abweichendes Expressionsmuster. Für dieses Konstrukt beschränkte sich das Signal auf den zentralen und unteren Bereich der Columella. In den Zellen des QCs, der Stammzellen und des Zentralzylinders konnte hingegen kein Signal beobachtet werden (Abbildung 11D-F). Die Untersuchungen in der Wurzelspitze weisen ebenfalls auf die Wichtigkeit der intragenischen *cis*-Elemente hin, da diese für die Expression des Reportergens im Wurzelmeristem notwendig sind.

Die Expressionsmuster wurden für beide Reporterkonstrukte auch in der Lateralwurzelentwicklung untersucht. Das Reporterkonstrukt *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* wurde in Lateralwurzel-Primordien (LWP) ab Stadium IV exprimiert. Die Expression beschränkte sich dabei zunächst auf die äußerste Zellschicht (Abbildung 12A und B). Neuere Studien zeigen, dass im Stadium IV/V das QC gebildet wird (Goh *et al.* 2016). In dieser Entwicklungsphase etablierte sich auch für das *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukt ein starkes Signal im QC (Abbildung 12C und D, Pfeilspitzen). Daneben war ein schwächeres Signal in der Epidermis des LWP zu verzeichnen. In LWP des Stadium VI beschränkte sich das Signal fast ausschließlich auf das QC (Abbildung 12E und F). Ab dem Stadium IV/V war

auch ein deutliches Signal in den basalen Zellen am Übergang zu den Perizykelzellen der Hauptwurzel (Abbildung 12; Stern) zu erkennen.

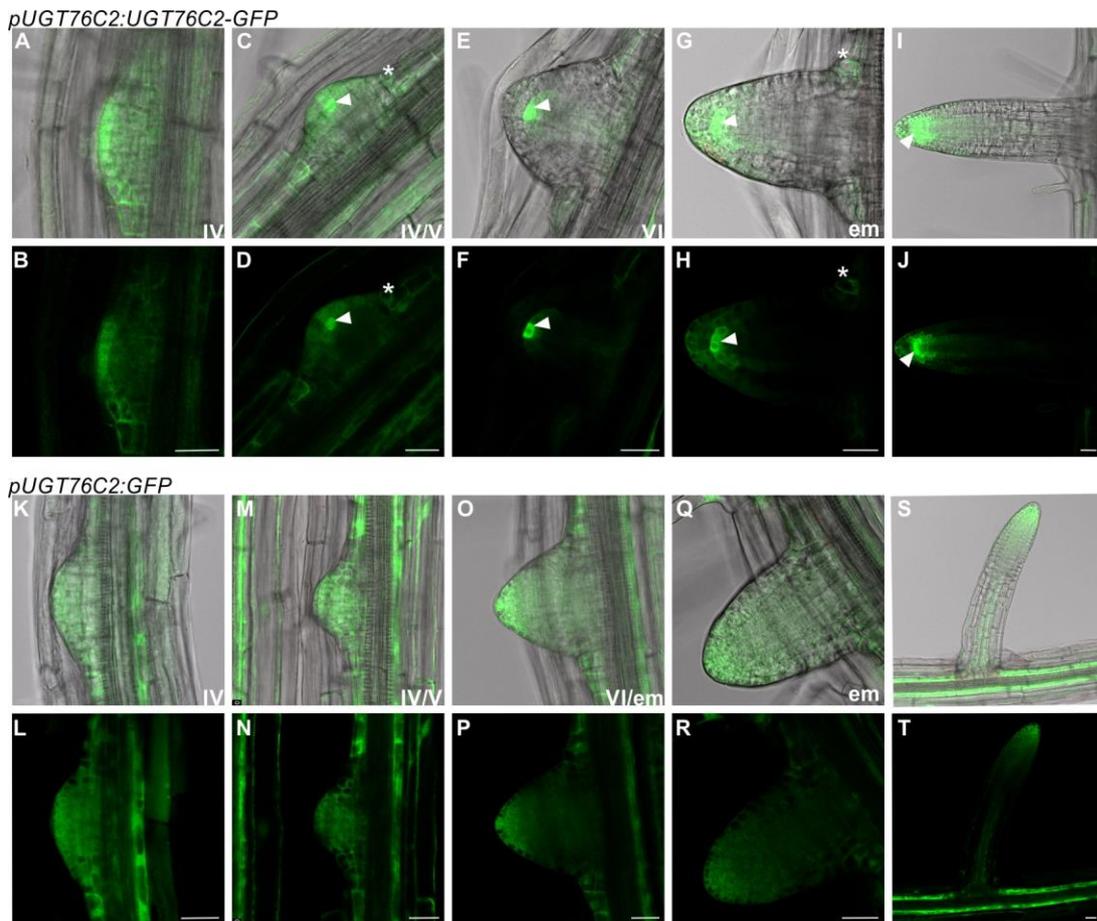


Abbildung 12. Nachweis der *UGT76C2*-Reporteraktivität während der Lateralwurzelentwicklung von *Arabidopsis*.

Die Untersuchung der Expression von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* (A bis J) bzw. *pUGT76C2:GFP* (K bis T) erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Gezeigt werden verschiedene Stadien der Lateralwurzelentwicklung. Die Abbildungen des grünen GFP-Signals allein und der Überlagerung des GFP-Signals mit dem Durchlichtkanal sind dabei jeweils übereinander dargestellt. Die Einteilung der Entwicklungsstadien der LWP erfolgte nach Malamy und Benfey (1997) und ist mit römischen Ziffern bzw. *em* (*emerged*) angegeben. Pfeilspitzen markieren das QC. Sternchen markieren die Expression in basalen Zellen am Übergang zum Perizykel der Hauptwurzel. Der Maßstab entspricht 25 µm

In der weiteren Entwicklung tritt das LWP durch die Endodermis hervor (Stadium *emerged*; *em*) und die Gewebe der Leitbündel, Perizykel, Endodermis und Cortex und Epidermis differenzieren sich (Malamy und Benfey 1997, Péret *et al.* 2009, Vermeer und Geldner 2015). In diesem Stadium war das Signal am stärksten im QC und in den umliegenden Stammzellen. Schwächere Signale konnten daneben in der äußeren Schicht der Columella, im Perizykel und in der Endodermis detektiert werden (Abbildung 12G-J). In diesem Stadium entsprach das beobachtete Expressionsmuster des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukts damit weitgehend dem im Hauptwurzelsapex, mit dem Unterschied, dass das Signal im LWP in der Columella schwächer war.

Im Vergleich wurde auch das Expressionsmuster des *pUGT76C2:GFP*-Konstrukts untersucht. Die räumliche Verteilung der Signale war unterschiedlich. In den LWP-Stadien IV/V war das Signal des *pUGT76C2;GFP*-Konstrukt in alle Zellschichten des LWP detektierbar. Dabei konnte, wie schon in anderen Geweben, beobachtet werden, dass die Intensität des Signals in den äußeren Zellschichten am stärksten war und basiswärts, graduell schwächer wurde (Abbildung 12K-N). In den Stadien VI und *em* wurde der graduelle Charakter des Signals noch ausgeprägter (Abbildung 12O-T). Im Bereich des QCs und der Stammzellen war das Signal des *pUGT76C2-GFP*-Konstrukts nur sehr schwach exprimiert. Es ist sogar fragwürdig, ob das GFP-Reporterprotein in diesem Bereich überhaupt exprimiert wurde oder ob das Signal in diesem Bereich nur auf die Diffusion des GFP-Proteins aus den äußeren Zellschichten zurückzuführen war. In späteren Stadien war auch an der Basis der Lateralwurzel im Zentralzylinder ein deutliches Signal sichtbar (Abbildung 12S und T).

Die Reporteranalysen der beiden Konstrukte in der Wurzelentwicklung sind ein weiterer Beleg für die physiologische Relevanz der mit Cytokinin assoziierten *cis*-Elemente in der *UGT76C2*-Sequenz.

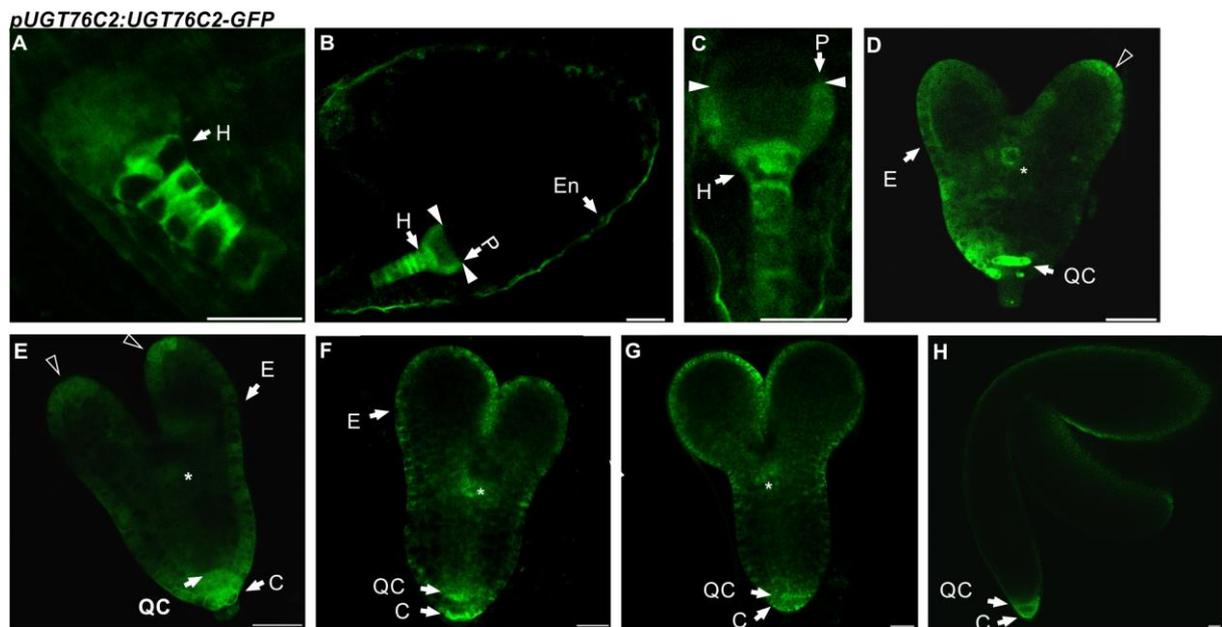


Abbildung 13. Aktivität des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Reporters während der Embryogenese von *Arabidopsis*.

Die Analyse der Expression von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Die Untersuchung erfolgte in verschiedenen Entwicklungsstufen: Octant-Stadium (A), 16-Zellstadium (B), Herzstadium (C), frühes bis spätes Torpedostadium (D bis F), reifer Embryo (G und H). Pfeilspitzen markieren die Abgrenzung zwischen unterem und oberem Protoderm in (B und C). Ungefüllte Pfeilspitzen kennzeichnen ein Expressionsmaximum in den Spitzenspitzen der Kotyledonenprimordien in (D). Weitere Kennzeichnungen: Hypophyse: H, Protoderm: P, En: inneres Endothel, Epidermis/ L1-Zellschicht: E, *quiescent center*: QC, Columella: C. Der Maßstab entspricht 25 µm.

Die Untersuchungen in den verschiedenen Pflanzenorganen haben die Wichtigkeit der regulatorischen, intragenischen *cis*-Elemente belegt. Bei den Untersuchungen des Expressionsmusters im Verlauf der Embryogenese wurde der Fokus daher auf das

pUGT76C2:UGT76C2-GFP-Konstrukt gelegt.

Im Samen wurde in der inneren Schicht des Endothel ein Signal detektiert (Abbildung 13B). Im Verlauf der Embryoentwicklung war das Signal im Octant-Stadium in den Zellen des Suspensors, der Hypophyse und etwas schwächer im globulären Embryo zu beobachten (Abbildung 13A).

Im 16-Zellstadium war das Signal weiterhin im Suspensor und der Hypophyse, aber nur noch im basalen Teil des Protoderms detektierbar (Abbildung 13B; Abgrenzung weiße Pfeilspitzen). Im Herzstadium war das Signal in den Zellen des QCs am stärksten. Das Signal war auch in der Endodermis deutlich sichtbar, dabei war es in den apikalen Bereichen der Kotyledonenprimordien etwas stärker (Abbildung 13E). Teilweise war das Reporterkonstrukt auch in der Domäne unterhalb des SAMs aktiv (Abbildung 13D-G). In jungen und späten Torpedostadien war das beobachtete Expressionsmuster des Reporterkonstrukts dem des Herzstadiums sehr ähnlich. Im Wurzelapex konnte neben dem Signal im QC auch in der Columella ein Signal beobachtet werden (Abbildung 13E-F). Dieser Trend war bereits beim Übergang vom Herz- zum Torpedostadium erkennbar (Abbildung 13D). Insgesamt wurde die Expression des Reporterkonstrukts in der weiteren Entwicklung schwächer und beschränkte sich im reifem Embryo auf die Wurzelspitze (Abbildung 13G). In diesem Stadium sind alle Entwicklungsvorgänge weitgehend abgeschlossen und der Embryo geht in die Samenruhe über.

Die Reporterstudie hat eindeutig gezeigt, dass die Reporterkonstrukte von *UGT76C2* gewebs- und entwicklungspezifisch exprimiert wurden. Daher ist anzunehmen, dass *UGT76C2* und damit der Stoffwechselweg der Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Regulation und Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase in der Entwicklung und in den verschiedenen Geweben von physiologischer Bedeutung ist.

Der Vergleich der verschiedenen Reporterkonstrukte belegt die Wichtigkeit und die physiologische Relevanz der intragenischen, regulatorischen *cis*-Elemente der Cytokininantwort. Insbesondere die Expression in der zentralen Domäne des Meristems, im QC sowie den Stammzellen des Wurzelmeristems scheint ausschließlich von den intragenischen *ARR*- und *WUS*-Bindemotiven vermittelt zu werden.

3.3 Die Überexpression von *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* beeinflusst die pflanzliche Entwicklung und die Cytokinin-Sensitivität

Die Überexpression eines Gens kann Hinweise auf die biochemische Aktivität und physiologische Relevanz des Genprodukts geben und inwieweit dieses an der Regulation bestimmter Stoffwechselwege beteiligt ist. Erfolgt die Expression unter einem starken, konstitutiven Promotor können allerdings nur bedingt Aussagen über die Beteiligung des Gens an Entwicklungsprozessen getroffen werden.

3.3.1 Herstellung von *UGT76C1*- und *UGT76C2*-Überexpressionslinien

Im Zuge meiner Masterarbeit wurden stabile, transgene *Arabidopsis*-Linien erzeugt, bei denen die cDNA von *UGT76C2* als Fusionsprotein mit *GFP* unter der Kontrolle des konstitutiven *Cauliflower Mosaic Virus 35S (35S)*-Promotors überexprimiert wurde. Die Pflanzen der T1-Generation zeigten phänotypische Veränderungen. Im Vergleich zum WT wiesen diese verkleinerte Rosetten, eine verzögerte Entwicklung und Blühinduktion sowie dünnere Blütensprosse und eine insgesamt verringerte Wuchshöhe auf (Brock 2012). Von diesen Pflanzen wurden für die weitere Charakterisierung homozygote Linien isoliert. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Linien p35S:*UGT76C2-GFP* #5-5 und p35S:*UGT76C2-GFP* #50-5 verwendet, die im Folgenden als *UGTC2ox-5* und *UGTC2ox-50* bezeichnet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch von *UGT76C1* p35S-Überexpressionslinien hergestellt. Für die Klonierung der Konstrukte wurde *UGT76C1*-cDNA verwendet und C-terminal mit *GFP* fusioniert. Das p35S:*UGT76C1-GFP*-Konstrukt wurde in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert und es wurden 50 Primärtransformanten isoliert. Um die Linien mit der stärksten Expression des Transgens zu identifizieren, wurde in den Blütenblättern das *GFP*-Fluoreszenzsignal mikroskopisch untersucht. 10 T1-Linien zeigten ein *GFP*-Signal in den Blütenblättern (p35S:*UGT76C1-GFP* #4, #5, #8, #10, #25, #30, #39, #40, #43 und #46, Daten nicht gezeigt). Anders als bei den *UGTC2ox*-Linien konnten bei den selektierten Pflanzen nur geringfügige morphologische Veränderungen beobachtet werden (Abbildung S1A). In der T2-Generation wurde anhand der Segregation des Selektionsmarkers untersucht, ob es sich bei den Linien um Einzelinsertionen handelte. Dies war bei allen Linien außer der Linie #8 der Fall. Zur Auswahl der zwei Linien mit der stärksten Expression des Transgens wurden Protein-Immunoblot-Analysen durchgeführt. Die höchste Abundanz des *UGT76C1-GFP* Proteins wiesen die p35S:*UGT76C1-GFP*-Linien #5 und #10, nachfolgend bezeichnet als *UGTC1ox-5* und *UGTC1ox-10*, auf (Abbildung S1B). Der Immunoblot zeigte weiterhin, dass die Signalintensität des Transgens in den *UGTC1ox*-Linien insgesamt schwächer war als in den *UGTC2ox*-Linien (Abbildung S1B).

In homozygoten Überexpressionslinien von *UGT76C1* und *UGT76C2* wurden die Transkriptlevel der Transgene mittels qPCR quantifiziert. In den *UGTC1ox-5-* und *UGTC1ox-10-*Linien war das Expressionslevel von *UGT76C1* im Vergleich zum WT 239-fach bzw. 208-fach erhöht (Abbildung 14A). Die Expression von *UGT76C2* war in den Linien *UGTC2ox-5* und *UGT76C2-50* im Vergleich zum WT hingegen 735-fach bzw. 720-fach erhöht (Abbildung 14B). Immunoblot-Analysen zeigten, dass auf Proteinebene die Abundanz des *UGT76C2-GFP*-Fusionsproteins deutlich höher war als die von *UGT76C1-GFP* (Abbildung 14A). Messung der Cytokinin-*N*-Glucosid-Konzentrationen (*iP7G*, *iP9G*, *tZ7G*, *tZ9G*, *cZ9G*) zeigte, dass diese in den *UGTC1ox-* und *UGTC2ox-*Linien stark erhöht waren (Abbildung 14C). Dies belegt, dass die Fusionsproteine *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* *in planta* aktiv waren und dass der Stoffwechselweg der Cytokinin-*N*-Glucosylierung durch die Überexpression verstärkt wurde. Sowohl das relative Transkriptlevel des Transgens als auch die Abundanz des Genprodukts sowie der Gehalt der Cytokinin-*N*-Glucoside war in den *UGTC2ox-*Linien deutlich höher als in den *UGTC1ox-*Linien (Abbildung 14).

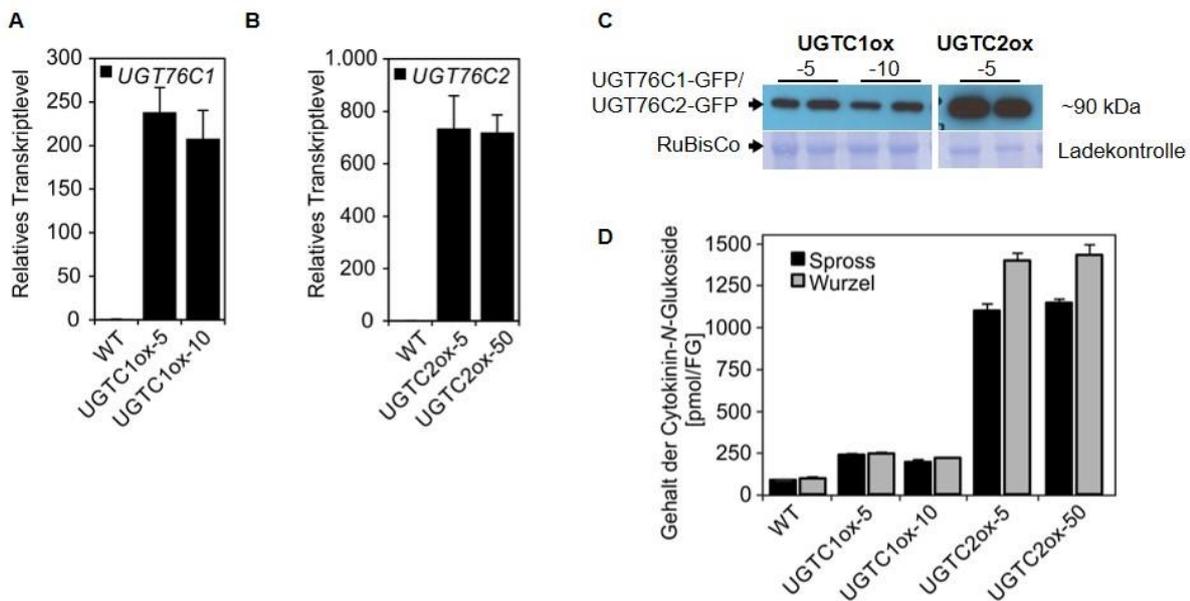


Abbildung 14. Die Expression der Transgene und die Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität ist in homozygoten *UGTC1ox-* und *UGTC2ox-*Linien stark erhöht.

A) und **B)** qPCR-Analyse der Expressionsniveaus von *UGT76C1* und *UGT76C2* in elf Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen der Linien *UGTC1ox-5* und *-10* sowie *UGT76C2ox-5* und *-50*. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel mit Standardfehlern. Das Expressionslevel des WTs wurde auf 1 gesetzt ($n = 4$).

C) Immunoblotanalyse der Proteinabundanz von *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* in Keimlingen der Überexpressionslinien von *UGTC1ox* und *UGTC2ox* (10 TNK). Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtproteinextrakt verwendet. Als Beladungskontrolle diente die Abundanz der mit Coomassie gefärbten Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCo)-Bande.

D) Gesamtgehalt der Cytokinin-*N*-Glucoside (*iP7G*, *iP9G*, *tZ7G*, *tZ9G*, *cZ9G*) in Spross- und Wurzeln von *in vitro*-angezogenen Keimlingen der Überexpressionslinien *UGTC1ox* und *UGT76C2ox* (11 TNK). Angegeben sind die relativen Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$).

3.3.2 Charakterisierung der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien

3.3.2.1 Molekulare Charakterisierung der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien

Die Expression von A-Typ *ARRs* wird durch Cytokinin induziert und bei cytokinindefizienten Pflanzen korreliert deren Transkriptlevel oft mit dem Cytokinin-Status (Stolz *et al.* 2011, Werner *et al.* 2003). In den Überexpressionslinien waren die Expressionslevel von der A-typ *ARR*-Gene *ARR7* und *ARR15* im Vergleich zum WT signifikant verringert (Abbildung 15). In der Linie *UGTC2ox-5* waren zusätzlich die Transkriptlevel der *ARR*-Gene *ARR5* und *ARR6* geringer als im WT. Nur bei der Linie *UGTC1ox-5* entsprach die Expression von *ARR15* dem WT-Niveau. Die Messungen weisen darauf hin, dass der Cytokinin-Status in den Überexpressions-Linien verringert war.

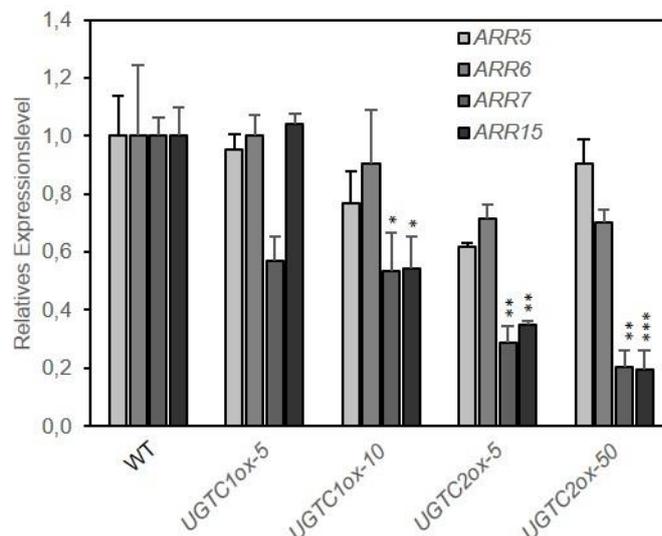


Abbildung 15. Die Expression von Cytokininantwortgenen ist in den Überexpressionslinien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* verringert.

qPCR-Analyse der Transkriptlevel von A-Typ *ARRs* von *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Linien im Vergleich zum WT, elf TNK. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel mit Standardfehlern. Das Transkriptlevel des WTs wurde auf 1 gesetzt (n = 3; * = p < 0,05; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001; ANOVA Tukey-Kramer).

In Kollaboration mit Dr. Ondrej Novák (Palacky Universität, Olomouc, Tschechien) wurden die Cytokinin-Metabolite in den Überexpressionslinien gemessen. In den *UGTC1ox*-Linien war die Konzentration des Gesamtcytokinins im Vergleich zum WT etwa verdoppelt und in den *UGTC2-GFP*-Linien etwa verzehnfacht (Tabelle 17). Diese Erhöhung resultierte vor allem aus der Akkumulation von Cytokinin-N-Glucosiden und Cytokinin-Nukleotiden (Tabelle 17).

Tabelle 17. Cytokinin-Gehalt in *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien im Vergleich zum WT.

	Gesamt-Cytokinin	Cytokinin-Basen	Cytokinin-Riboside	Cytokinin-Nukleotide	Cytokinin- <i>N</i> -Glucoside	Cytokinin- <i>O</i> -Glucoside
WT						
Spross	116,06 ± 6,84	1,73 ± 0,16	3,44 ± 0,64	17,36 ± 1,01	85,71 ± 6,94	7,83 ± 0,80
Wurzel	150,89 ± 21,33	8,82 ± 1,68	17,66 ± 4,06	8,44 ± 0,50	95,44 ± 14,92	20,53 ± 0,38
<i>UGTC1ox-5</i>						
Spross	274,71 ± 12,37 *	1,95 ± 0,09	3,62 ± 0,77	22,41 ± 0,31	236,09 ± 10,83 **	10,65 ± 0,84 **
Wurzel	316,80 ± 14,85	6,50 ± 0,86	16,55 ± 1,47	30,65 ± 4,05 ***	243,67 ± 11,14	19,42 ± 2,09
<i>UGTC1ox-10</i>						
Spross	218,84 ± 20,70	1,39 ± 0,26	2,91 ± 0,45	12,06 ± 0,94	193,10 ± 21,55 *	9,37 ± 0,57
Wurzel	288,61 ± 12,34	6,88 ± 0,52	13,71 ± 1,07	30,07 ± 4,47 ***	217,53 ± 7,90	20,42 ± 1,75
<i>UGTC2ox-5</i>						
Spross	1174,09 ± 59,39 ***	4,39 ± 0,68 ***	12,33 ± 2,48 **	56,26 ± 3,37 ***	1096,51 ± 59,88 ***	4,61 ± 0,32 **
Wurzel	1440,02 ± 67,32 ***	4,35 ± 0,29 **	12,52 ± 1,75	25,48 ± 0,84 ***	1395,65 ± 64,38 ***	2,03 ± 0,16 ***
<i>UGTC2ox-50</i>						
Spross	1191,85 ± 32,79 ***	3,60 ± 0,17 **	7,32 ± 1,15	32,78 ± 2,28 ***	1143,67 ± 31,92 ***	4,48 ± 0,27 **
Wurzel	1479,22 ± 87,67 ***	5,77 ± 0,34 *	14,35 ± 2,02	28,56 ± 2,40 ***	1428,99 ± 87,87 ***	1,57 ± 0,13 ***

Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung des absoluten Cytokinin-Gehalts in pmol/g Frischgewicht ($n = 3$). Die Keimlinge wurden *in vitro* angezogen und elf TNK analysiert. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ANOVA Tukey-Kramer).

Wie bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben war die Konzentration der Cytokinin-*N*-Glucoside stark erhöht, was die Aktivität der Transgene belegte. Dabei waren die Konzentrationen in den *UGTC2ox*-Linien deutlich höher als in den *UGTC1ox*-Linien (Tabelle 17, Abbildung 14). In allen Überexpressionslinien waren die Konzentrationen von iP7G weniger stark erhöht als die von iP9G. Bei *tZ* war die *tZ9G*-Form gegenüber der *tZ7G* nur in den *UGTC2ox*-Linien erhöht (Abbildung 16A).

Die Gesamtkonzentration der Cytokininbasen war in den Wurzeln bei allen Linien im Vergleich zum WT tendenziell verringert und in den Sprossen der *UGTC2ox*-Linien signifikant erhöht (Tabelle 17). Die Betrachtung der verschiedenen, freien Cytokinin-Basen zeigte, dass signifikante Änderungen nur in den *UGTC2ox*-Linien auftraten. Die Konzentration von iP war in den Sprossen der *UGTC2ox*-Linien drei bis vier Mal höher als im WT, in den *UGTC1ox*-Pflanzen waren diese unverändert. Die *tZ*-Konzentration betrug in den Wurzeln der *UGTC2ox*-Linien nur 30 % bzw. 37 % des WTs. Die *UGTC1ox*-Linien zeigten in dieser Hinsicht denselben Trend (Abbildung 16B).

Die Gesamtkonzentration der Cytokinin-Nukleotide war in den *UGTC1ox*-Linien in den Wurzeln und in den *UGTC2ox*-Linien sowohl in den Wurzeln und Sprossen signifikant erhöht (Tabelle 17). In den *UGTC2ox*-Linien war außerdem die Konzentration von iPRMP- und *tZRMP*-Konzentrationen in den Wurzeln und größtenteils auch in den Sprossen signifikant erhöht (Abbildung 16D). Die Cytokinin-Nukleotide stellen in der Cytokinin-Biosynthese eine Vorstufe der aktiven Cytokininbasen dar. Zusammen mit der Beobachtung, dass die iP-Konzentrationen erhöht waren, könnten die Beobachtungen darauf hinweisen, dass in den Überexpressionslinien die Cytokinin-Biosynthese verstärkt ablief.

Die Konzentration der Cytokinin-Riboside war kaum verändert. Lediglich in den *UGTC2ox*-Linien war die iPR-Konzentration in den Sprossen signifikant erhöht (Abbildung 16D).

Die Cytokinin-*O*-Glucosylierung dient der Inaktivierung von überschüssigem Cytokinin. Die Gesamtkonzentration der Cytokinin-*O*-Glucoside war im Vergleich zum WT in den UGTC2ox-Linien in beiden Geweben signifikant verringert und in den Sprossen der UGTC1ox-5-Linie signifikant erhöht (Tabelle 17). Interessanterweise war in den UGTC1ox-Pflanzen und in den Sprossen der UGTC2ox-Pflanzen die *t*ZROG-Konzentration stark erhöht (Abbildung 16C). Die Konzentrationen von *t*ZOG war im Vergleich zum WT in den UGTC1-Pflanzen eher unverändert oder tendenziell verringert und in den UGTC2ox-Pflanzen größtenteils signifikant verringert (Abbildung 16C).

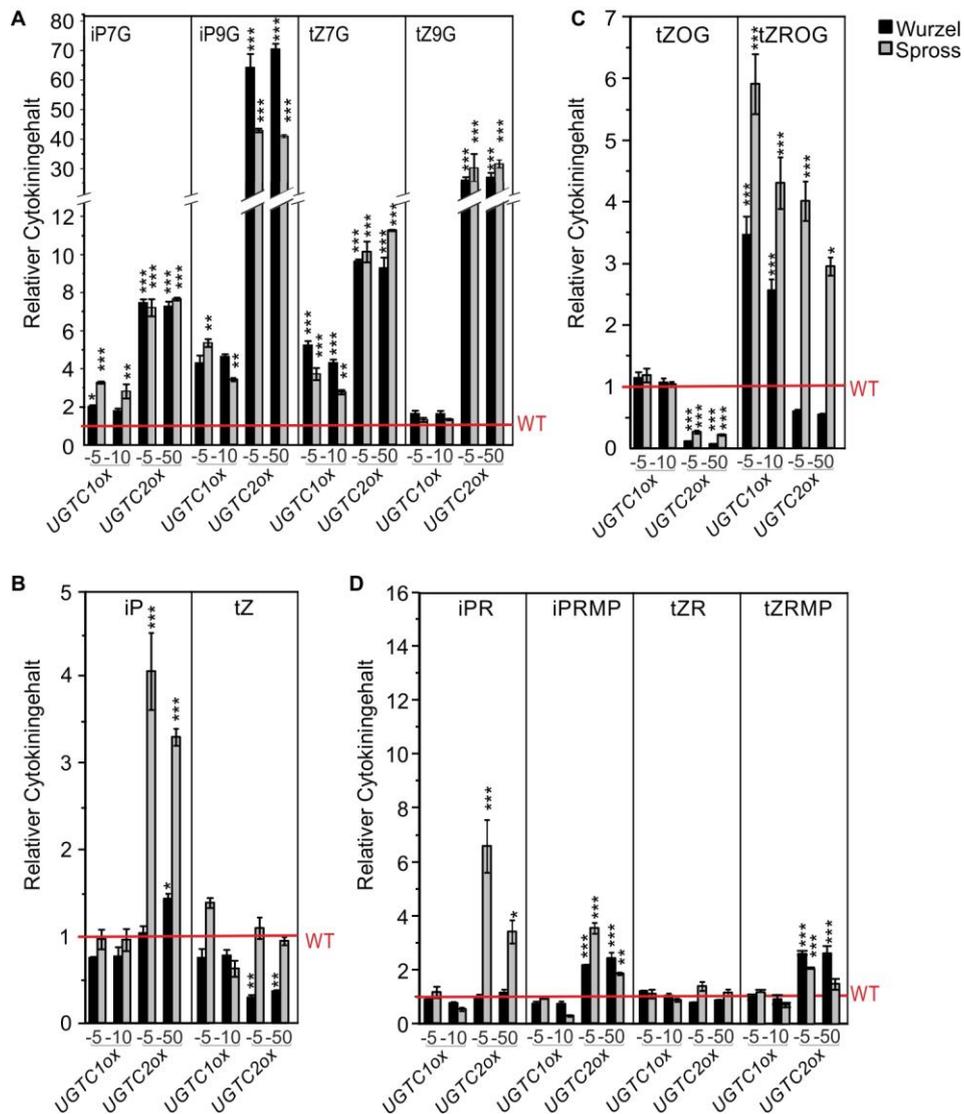


Abbildung 16. Auswirkung der Überexpression von *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* auf den Cytokinin-Gehalt.

A) bis D) Relativer Gehalt der Cytokinin-*N*-Glucoside (**A**), der Cytokinin-Basen (**B**), der Cytokinin-*O*-Glucoside (**C**) sowie der Cytokinin-Riboside und -Nucleotide (**D**) in UGTC1ox- UGTC2ox-Linien im Vergleich zum WT elf TNK. Angegeben sind relative Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3). Der Wildtyp wurde auf 1 gesetzt und in den Graphen als rote Linie dargestellt. Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (* = p < 0,05; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, ANOVA Tukey-Kramer).

Um zu untersuchen wie sich die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität in den *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien auf die Regulation des Cytokinin-Metabolismus auswirkte, wurden die endogenen Transkriptlevel von Genen des Cytokinin-Metabolismus bestimmt (Abbildung 17). Die Transkriptlevel von *UGT76C2* waren in Pflanzen der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Überexpressionslinien deutlich vermindert (Abbildung 17A). Dies zeigt, dass auf Transkriptionsebene eine negative Feedback-Regulation stattfindet. Das Transkriptlevel von *UGT76C1* war in den *UGTC2ox*-Linien hingegen kaum verändert, obwohl in den *UGTC2ox*-Linien Expression des Transgens *UGT76C2-GFP* sehr viel stärker war als in den *UGTC1ox*-Linien (Abbildung 14C). Die negative-Feedback-Regulation existiert somit nur für *UGT76C2*, nicht aber für *UGT76C1*.

Die Cytokinin-Messungen zeigten, dass in den *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Pflanzen die Vorstufen der Cytokinine deutlich erhöht waren (Abbildung 16). Aus diesem Grund wurden die Transkriptlevel von der Biosynthese-Gene (*IPT1*, *IPT3*, *IPT5*, *IPT7*) und von *CYP735A1* untersucht. In den *UGTC2ox*-Linien waren die Transkriptlevel von *IPT1*, *IPT5* stark und von *IPT7* moderat erhöht. Die gleichen Tendenzen zeigten für *IPT1* beide *UGTC1ox*-Linien und für *IPT5* die Linie *UGTC1ox-10*. Bei den *UGTC2ox*-Linien war zudem das Expressionslevel von *CYP735A1* im Vergleich zum WT erhöht. Der Unterschied war aber nur für die Linie *UGTC2ox-50* signifikant (Abbildung 17B).

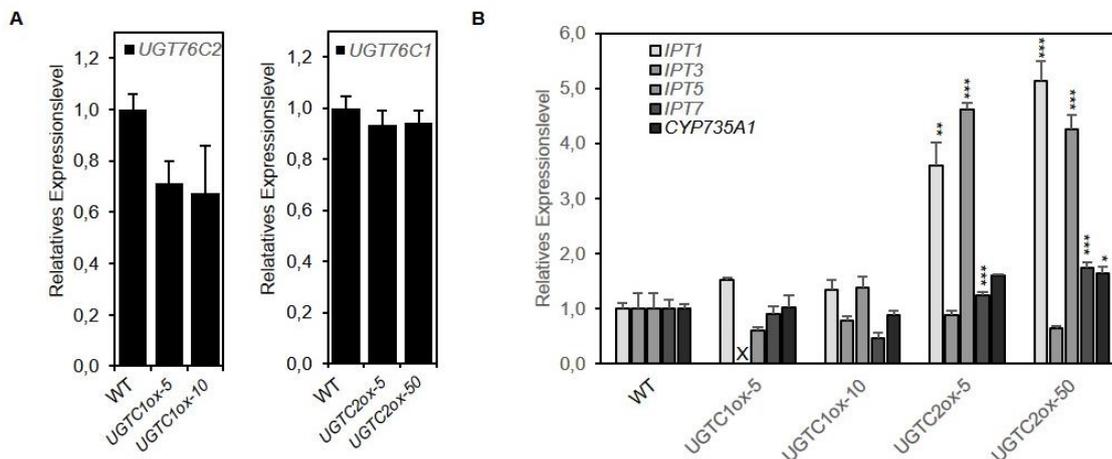


Abbildung 17. In *UGTC1ox*- und *UGT76C2ox*-Überexpressions-Linien ist der Cytokinin-Metabolismus verändert.

A) und **B)** qPCR-Analyse der Expressionsniveaus von *UGT76C1* und *UGT76C2* (**A**) und Genen der Cytokinin-Biosynthese (**B**) in *Arabidopsis*-Keimlingen von *UGTC1ox*- und *UGT76C2ox*-Linien im Vergleich zum WT, elf TNK. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel mit Standardfehlern. Das Expressionslevel des WT wurde auf 1 gesetzt. Ausgefallene Messungen wurden mit einem X markiert. (n = 3; * = p < 0,05; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001; ANOVA Tukey-Kramer).

Als nächstes wurde untersucht, ob die Cytokinin-Sensitivität durch die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierung verändert war. Die Cytokinin-Sensitivität von Pflanzen kann unter anderem durch den Vergleich der Reaktion des Wurzelwachstums auf die exogene Zugabe von Cytokinin untersucht werden. Cytokinin hemmt die Elongation der Hauptwurzel und

unterdrückt die Entstehung von Seitenwurzeln (Werner *et al.* 2001). Für die Untersuchung wurden *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Pflanzen auf cytokininhaltigen Medien verschiedener Konzentrationen angezogen und die Seitenwurzelbildung und die Länge der Hauptwurzeln bestimmt (Abbildung 18A). Pflanzen des WT's zeigten die typische Reaktion auf die exogene Cytokinin-Zugabe und bildeten mit steigenden Cytokinin-Konzentrationen im Medium zunehmend kürzere Hauptwurzeln mit weniger Seitenwurzeln. Ab einer Konzentration von 50 nM iP wurden von den WT-Pflanzen keine Lateralwurzeln mehr gebildet (Abbildung 18B). Im Gegensatz hierzu war bei den Pflanzen der *UGTC2ox*-Linien auch bei hohen Cytokinin-Konzentrationen die Hauptwurzel nur leicht verkürzt und bildete weiterhin Lateralwurzeln (Abbildung 18A und B). Das Wurzelwachstum der *UGTC2ox*-Linien war somit fast resistent gegen die exogene Zugabe von Cytokinin. Die *UGTC1ox*-Linien zeigten nur eine leicht verringerte Sensitivität (Abbildung 18A und B). Die gewonnenen Daten bestätigen die Hypothese, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung die Inaktivierung des Pflanzenhormons bewirkt.

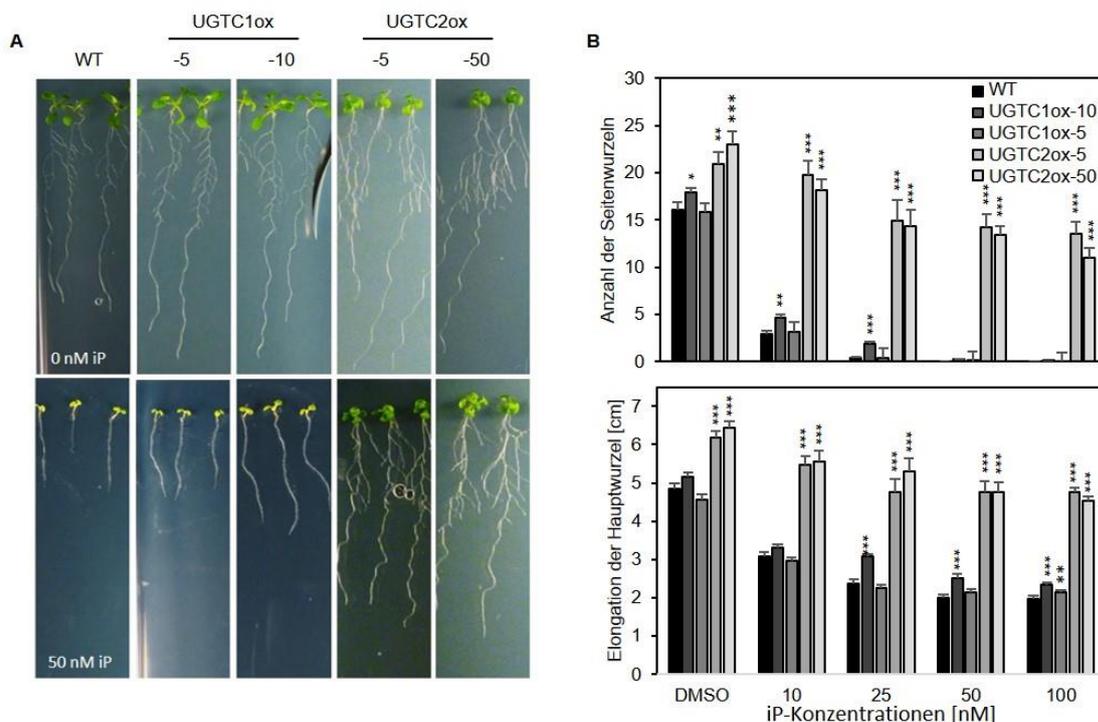


Abbildung 18. Die Überexpression von *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* führt zu einer verminderten Cytokinin-Sensitivität.

A) Cytokinin-Sensitivität des Wurzelwachstums von *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Pflanzen im Vergleich zum WT. Die Anzucht erfolgte *in vitro* auf Medium mit und ohne 50 nM iP.

B) Effekt der Cytokininzugabe auf die Elongation der Hauptwurzel zwischen Tag 2 und Tag 9 und auf die Seitenwurzelbildung von *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien im Vergleich zum WT. Dargestellt sind relative Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 6-37$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest).

Der chemische Inhibitor INCYDE hemmt die CKX-Aktivität (Zatloukal *et al.* 2008). Es wurde untersucht, ob der Cytokinindefizienz-Phänotyp der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Überexpressionslinien durch die Behandlung mit INCYDE abgeschwächt werden konnte. Das Ziel des Experiments bestand darin zu untersuchen, inwieweit die Cytokinin-

Inaktivierungsmechanismen der Cytokinin-*N*-Glucosylierung und der Degradation durch CKX-Enzyme zusammenwirken. Als Kontrollen wurden dabei *35S:CKX1*- und WT-Pflanzen verwendet. Der Phänotyp der *35S:CKX1*-Pflanzen wurde durch die INCYDE-Behandlung deutlich revertiert (Abbildung 19). Der WT zeigte hingegen kaum eine Reaktion auf die Inhibitorbehandlung. Bei Pflanzen beider *UGTC2ox*-Linien nahm der Rosettendurchmesser durch die INCYDE-Behandlung signifikant zu. Die große Varianz der Messwerte der unbehandelten *UGTC2ox-50*-Stichprobe resultierte aus der unvollständigen Penetranz des Phänotyps (siehe Abschnitt 3.3.2.2.3). Die *UGTC1ox*-Linien zeigten die gleiche Tendenz, wobei der Unterschied nur für *UGTC1ox-5* signifikant war (Abbildung 19). Bemerkenswert hierbei war die Beobachtung, dass der auffällige Cytokinindefizienz-Phänotyp der *UGTC2ox*-Pflanzen durch die Behandlung mit INCYDE abgeschwächt werden konnte. Dies belegt, dass zumindest ein Teil der CKX-Aktivität in den *UGTC2ox*-Linien trotz der starken Cytokinindefizienz erhalten bleibt und von den Pflanzen anscheinend nicht weiter runterreguliert wird.

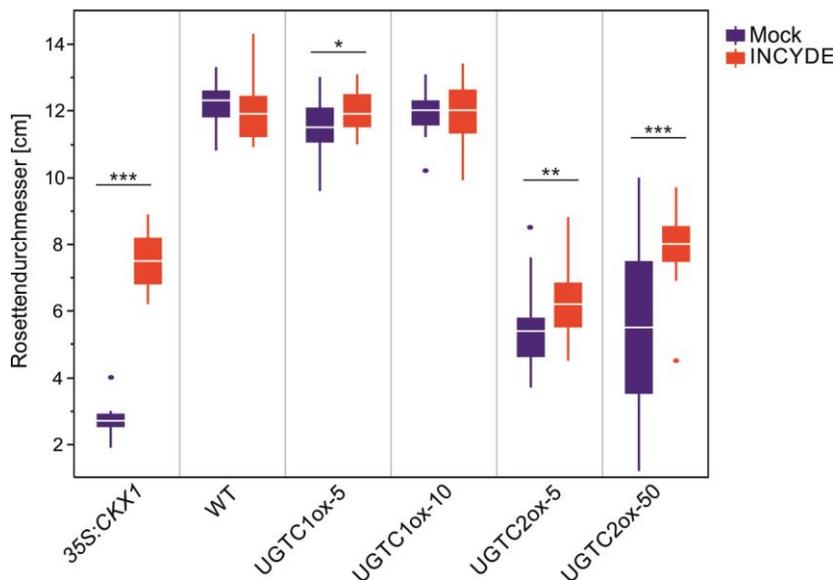


Abbildung 19. Behandlung der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien mit dem CKX-Inhibitor INCYDE.

Untersuchung der Auswirkung des chemischen Inhibitors der CKX-Aktivität, INCYDE, auf das Rosettenwachstum von Pflanzen der Überexpressionslinien *UGTC1ox*-, *UGTC2ox*- und *35:CKX1* im Vergleich zum WT. Die Pflanzen wurden ab dem fünften TNK alle zwei Tage mit 10 μ M INCYDE behandelt, die Auswertung erfolgte 32 TNK ($n = 15-27$). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest).

3.3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Überexpressionslinien

Um zu untersuchen, wie sich die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf die pflanzliche Entwicklung auswirkte, wurde das Spross- und Wurzelwachstum homozygoter *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Pflanzen charakterisiert.

3.3.2.2.1 Die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierung führt zu einer Reduktion des Sprosswachstums

Die *UGTC2ox*-Pflanzen bildeten im Vergleich zum WT bereits im Keimlingsstadium deutlich kleinere Sprosse mit nach innen eingerollten Blatträndern. Dahingegen zeigten die *UGTC1ox*-Pflanzen in diesem Stadium keine morphologischen Auffälligkeiten (Abbildung 20A). Abbildung 20A zeigt die Pflanzen der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien im juvenilen, vegetativen und im reproduktiven Entwicklungsstadium. In späteren Entwicklungsstadien bildeten die *UGTC2ox*-Linien auch kleinere Rosettenblätter und verstärkt axilläre Rosetten.

Mit Ausnahme von *UGTC1ox*-10 traten unter Kurztagbedingungen alle untersuchten Überexpressionslinien später in die reproduktive Wachstumsphase ein als der WT (Abbildung 20C). Bei Pflanzen der *UGTC2ox*-Linien war der Effekt stärker als bei Pflanzen der Linie *UGTC1ox*-5. Die größte Verzögerung der Blühinduktion zeigte mit etwa zehn Tagen nach dem WT die Linie *UGTC2ox*-5 (Abbildung 20C). Die Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt des Blühens war nur bei der Linie *UGTC2ox*-50 signifikant verringert (Abbildung 20B).

Die *UGTC2ox*-Pflanzen bildeten Infloreszenzen mit einer verringerten Wuchshöhe, dünneren Stängeln und weniger Blüten aus (Abbildung 20A und D). Die *UGTC1ox*-Linien zeigten teilweise ähnliche Tendenzen. Bei den Blüten der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien waren die Kronblätter und Gynoeceen im Vergleich zum WT verkleinert (Abbildung 20C). Bei den *UGTC2ox*-Linien war zudem die Pollenentwicklung beeinträchtigt, pro Blüte wurde weniger Pollen produziert. Ob die Vitalität und die Fertilität der Pollen beeinträchtigt war, muss noch untersucht werden.

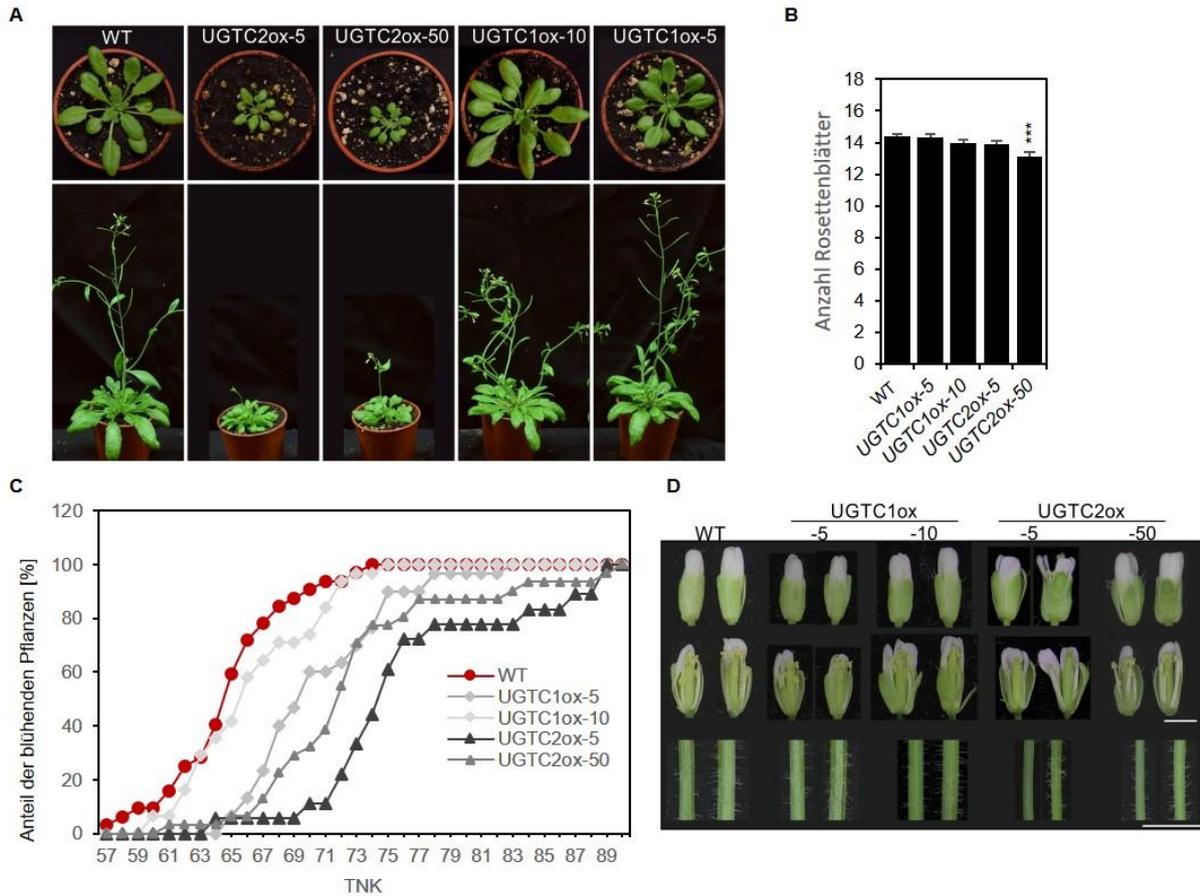


Abbildung 20. Veränderung des Sprosswachstums von *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Pflanzen.

A) Sprossphänotypen von homozygoten Pflanzen der Überexpressionslinien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* im Vergleich zum WT 28 (oben) und 33 (unten) TNK.

B) Anzahl der Rosettenblätter zum Blühzeitpunkt von Pflanzen der Linien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* im Vergleich zum WT, unter Kurztagbedingungen. Der Blühzeitpunkt wurde definiert als Zeitpunkt, an dem der Infloreszenzstängel 0,5 cm lang war. Dargestellt sind relative Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 17-31$). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (***) = $p < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest).

C) Blühzeitpunkte von den Pflanzen der Überexpressionslinien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* im Vergleich zum WT unter Kurztagbedingungen. Der Blühzeitpunkt wurde definiert als Zeitpunkt, an dem der Infloreszenzstängel 0,5 cm lang war. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der blühenden Pflanzen über die Zeit (TNK).

D) Blüten der Stadien 14 und 15 nach Smyth *et al.* (1990) und Stängel der Infloreszenzen, 1 cm über dem ersten Sprossknoten von Pflanzen der *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Linien im Vergleich zum WT. Der Maßstab entspricht 0,5 cm.

3.3.2.2.2 Die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierung wirkt sich förderlich auf das Wurzelwachstum aus

Um zu untersuchen, wie sich die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf das Wurzelwachstum auswirkte, wurde die Elongation der Hauptwurzel und die Anzahl der Seitenwurzeln von 14 Tage alten Keimlingen quantifiziert. Die *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Pflanzen bildeten sichtbar längere Hauptwurzeln als der WT (Abbildung 21A). Die Hauptwurzeln waren bei den Pflanzen der *UGTC1ox*-Linien 6 %, bzw. 12 % länger als beim WT und bei den Pflanzen der *UGTC2ox*-Linien 13 % bzw. 17 % (Abbildung 21B). An den Hauptwurzeln bildeten die Pflanzen der *UGTC1ox*-Linien 16 % bzw. 18 % und die Pflanzen der *UGTC2ox*-Linien 21 % bzw. 43 % mehr Seitenwurzeln als der WT. Bei auf Erde

angezogenen Pflanzen der *UGTC2ox*-Linien konnte auch in späteren Entwicklungsphasen die Bildung von stark vergrößerten Wurzelballen beobachtet werden (Abbildung 21C).

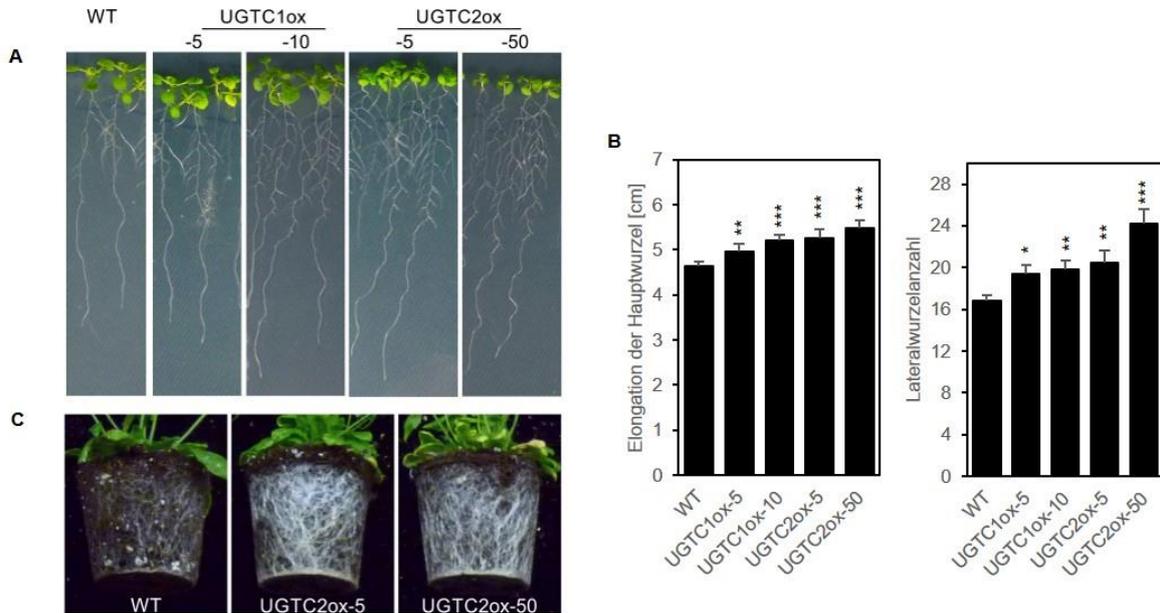


Abbildung 21. Das Wurzelwachstum von Pflanzen der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien ist verstärkt.

A) *in vitro*-Wachstum von Keimlingen der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien im Vergleich zum WT elf TNK.

B) Quantifizierung der Hauptwurzel-Elongation und der Anzahl der Seitenwurzeln von Pflanzen der Linien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* im Vergleich zum WT (n = 21-49). Dargestellt sind relative Mittelwerte mit Standardfehler. Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT. (* = p < 0,05; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, Wilcoxon-Rangsummentest).

C) Wurzelballen von auf Erde angezogenen Pflanzen der Linien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* im Vergleich zum WT.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass fast alle der beschriebenen phänotypischen Veränderungen in den Abschnitten 3.3.2.2.1 und 3.3.2.2.2 auch bei cytokinindefizienten Pflanzen beobachtet werden können (Werner *et al.* 2003). Demnach stehen die phänotypischen Veränderungen der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien im Einklang mit dem verringerten A-Typ *ARR*-Level, der teilweise verringerten Konzentration der freien Cytokinin-Basen und der verringerten Cytokinin-Sensitivität.

3.3.2.2.3 Die Ausprägung des *UGTC2ox*-Phänotyps variiert und wird nicht vererbt

Die phänotypische Penetranz war insbesondere bei den *UGTC2ox*-Linien unvollständig und lag bei 60 - 80 %. Abbildung 22A zeigt die Variation der phänotypischen Ausprägung unter Pflanzen der Linie *UGTC2ox-50* innerhalb einer Anzucht. Der Ausprägungsgrad der Phänotypen wurde in die Gruppen: „sehr stark“, „stark“, „intermediär“ und „schwach“ eingeteilt. Zur Untersuchung, ob der Ausprägungsgrad des Phänotyps vererbt wird, wurde der Ausprägungsgrad der Phänotypen und dessen Verteilung in Nachkommen von jeweils drei Pflanzen mit „sehr stark“ und „schwach“ ausgeprägten Phänotyp untersucht. Unabhängig davon, ob die Elternpflanzen einen „sehr stark“ oder einen „schwach“ ausgeprägten Phänotyp aufwiesen, traten unter den Nachkommen wieder Pflanzen mit „sehr starken“ und „schwachen“

schwächeren Expression von *35S:UGT76C2-GFP* einen cytokinindefizienten Phänotyp aufweisen. Abbildung 23A zeigt die Quantifizierung der Transgenprodukte in neu isolierten *UGTC2ox*-T2-Linien im Vergleich zu den Linien *UGTC1ox-5* und *UGTC1ox-10*. Die Proteinabundanz von *UGT76C2-GFP* war bei den Linien #4 und #53 schwächer und bei den Linien #39 und #42 stärker als die von *UGT76C1-GFP*. Die Betrachtung der Ausprägung des Cytokinindefizienz-Phänotyps in diesen Linien (Abbildung 23B) zeigte, dass nur die Linien #39 und #42 den cytokinindefizienten Phänotyp aufwiesen. Demnach war eine schwächere Expression von *35S:UGT76C2-GFP* nicht ausreichend, um einen cytokinindefizienten Phänotyp zu bewirken. Daher ist die Expression des *35S:UGT76C1-GFP*-Konstrukts in den isolierten *UGTC1*-Linien #5 und #10 wahrscheinlich nicht stark genug, um den Cytokinindefizienzphänotyp zu verursachen. Es ist jedoch interessant, dass für *35S:UGT76C1-GFP* nicht das Expressionsniveau von *UGT76C2-GFP* erreicht werden konnte, zumal die Überexpression beider Glucosyltransferasen unter dem gleichen Promotor erfolgte und von *35S:UGT76C1-GFP* deutlich mehr Primärtransformanten untersucht wurden. Eine unterschiedliche biologische Relevanz oder enzymatische Aktivität der Glucosyltransferasen kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden.

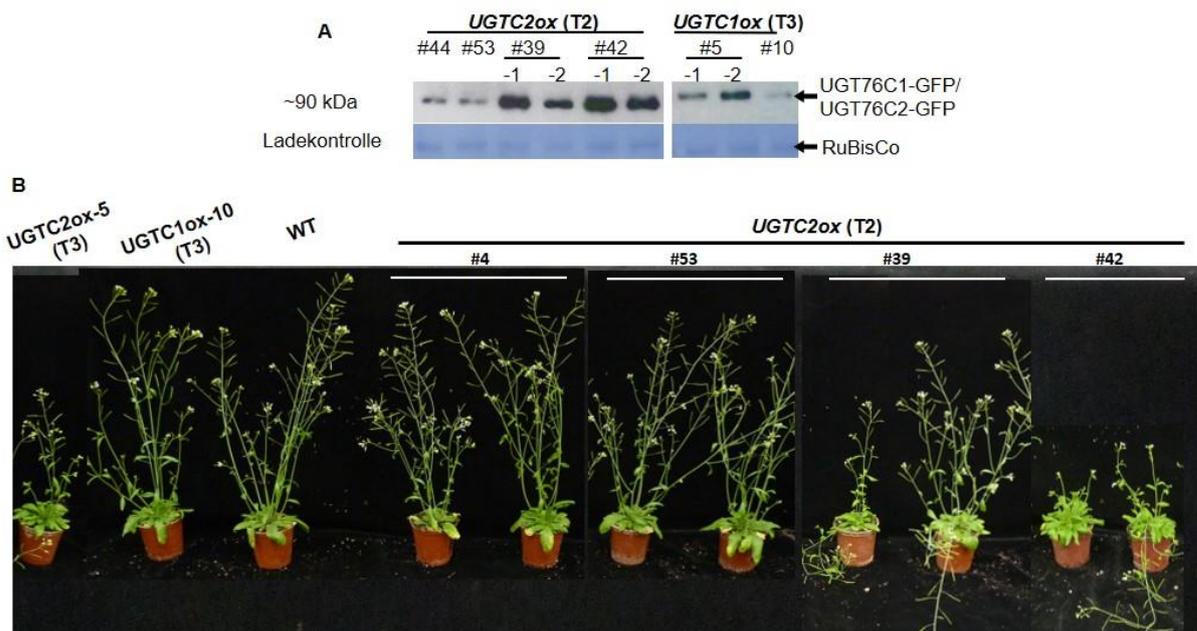


Abbildung 23. Der Phänotyp von *UGTC2ox*-Pflanzen ist abhängig von der Expressionsstärke.

A) Immunoblot-Analysen zum Vergleich der Proteinabundanz von UGT76C1-GFP und UGT76C2-GFP von Keimling-Pools der *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Überexpressionslinien in der T2- und T3-Generation (14 TNK). Pro Linie wurden ein bis zwei biologische Replikate und jeweils 5 µg Gesamtproteinextrakt verwendet. Als Beladungskontrolle diente die Abundanz der mit Coomassie gefärbten RuBisCo-Bande.

B) Vergleich der Ausprägung der Phänotypen von Pflanzen der Linien *UGTC1ox*- und *UGTC2ox* in der T2- und T3-Generation im Vergleich zum WT (40 TNK).

3.4 Herstellung von Linien, bei denen *UGT76C2-myc* gezielt in spezifischen Domänen des Meristems exprimiert wird

Die Reporterstudie zeigte, dass das *UGT76C2*-Reporter-Konstrukt spezifisch in der L1-Schicht und unter den Stammzellen in einem Bereich aktiv war, der das OZ und die obere Zone des RZs umfasste (3.2.3). Um weiter aufzuklären, inwieweit die Cytokinin-*N*-Glucosylierung die Regulation des Cytokinin-Metabolismus im Meristem und somit auch die Aktivität des SAM beeinflussen kann, wurden transgene Linien hergestellt, bei denen die Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität durch die gezielte Expression von *UGT76C2* in spezifischen Domänen des SAMs verstärkt war. Um das *UGT76C2*-Protein nachweisen zu können, wurde C-Terminal ein *myc*-Tag fusioniert. Die domänenspezifische Expression erfolgte durch die Verwendung von Promotoren, die in unterschiedlichen Regionen des SAM aktiv sind. Bei den dafür ausgewählten Promotoren handelte es sich zum einen um den *STM*-Promotor (Long *et al.* 1996), der im gesamten Meristem aktiv ist und zum anderen, um den *WUS*-Promotor (Mayer *et al.* 1998), der eine spezifische Expression im OZ bewirkt. Die hergestellten *STM:UGT76C2-myc*- und *WUS:UGT76C2-myc*-Konstrukte wurden in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert und es wurden jeweils ~ 60 Primärtransformanten selektioniert. In der nachfolgenden Generation wurde in den *STM:UGT76C2-GFP*-Linien die Expression des Transgens in den Infloreszenzen durch Immunoblot-Analysen überprüft. Das *UGT76C2-myc*-Protein konnte in 10 Linien nachgewiesen werden (Abbildung 24A). Durch die Bestimmung der Segregationsverhältnisse des Selektionsmarkers wurden Einzel-Insertionslinien identifiziert und von den ausgewählten Linien *STM:UGT76C2-myc* #1 und *STM:UGT76C2-myc* #3 homozygote Linien isoliert. Diese zeigten keine starken Veränderungen der Phänotypen (Abbildung 24B). Um zu überprüfen ob sich die Überexpression der Cytokinin-*N*-Glucosyltransferase in der *STM*-Domäne auf die Aktivität des Infloreszenzmeristems auswirkte, wurde die Blütenbildungsrate der Schoten bestimmt (Abbildung 24C). Die *STM:UGT76C2-myc*-Linien zeigten im Vergleich zum WT keine signifikanten Unterschiede. Die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität in der *STM*-Domäne scheint zumindest in den hier analysierten Linien die Cytokininhomöostase nicht zu beeinflussen. Allerdings ist unklar, ob die Expressionsstärke physiologisch relevant war, um genauere Aussagen zu treffen, sollten stärkere Linien analysiert werden und weitere Arbeiten zur Charakterisierung des SAM durchgeführt werden. Aus zeitlichen Gründen wurden die *WUS:UGT76C2-myc*-Linien nicht weiter analysiert.

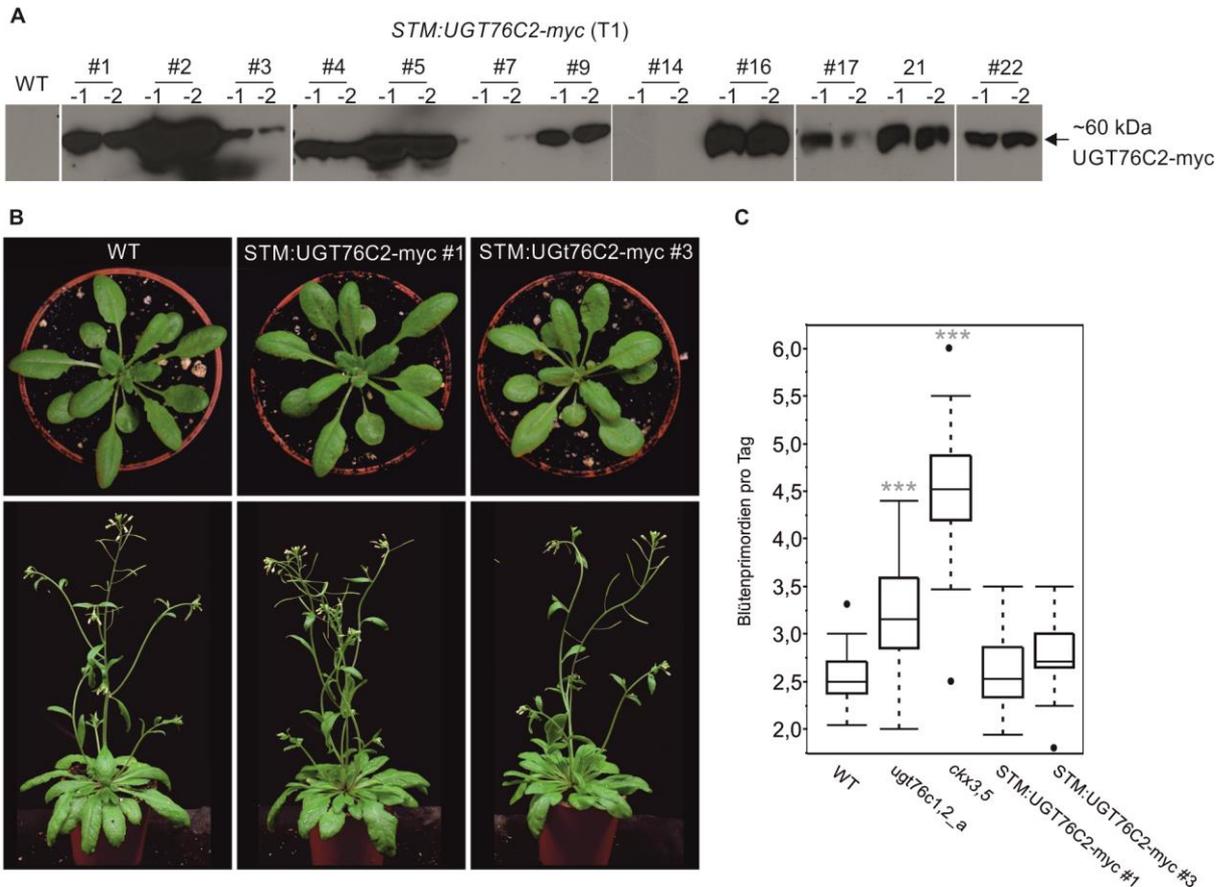


Abbildung 24. Herstellung von *STM:UGT76C2-myc-Arabidopsis*-Linien.

A) Immunologischer Nachweis des UGT76C2-myc Proteins in Infloreszenzen von stabil transformierten *STM:UGT76C2-myc* T1-Pflanzen. Pro Linie wurden zwei Replikate untersucht. Es wurden jeweils 10 µl des Proteinrohextrakts aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten Proteinextrakte von WT-Pflanzen.

B) Sprossphänotyp von homozygoten Pflanzen der *STM:UGT76C2-myc* Linien #1 und #3 (28 und 33 TNK).

C) Blütenbildungsrate von Pflanzen der Linien *STM:UGT76C2-myc* #1 und #3 im Vergleich zu Pflanzen des WT, sowie der Mutanten *ugt76c1,2_a* sowie *cks3,5*. Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; Wilcoxon-Rangsummentest).

3.5 Herstellung von *ugt76c1 ugt76c2* Doppel-Knockout-Mutanten

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit bestand in der Herstellung einer Doppel-Knockout-Mutante der funktional redundanten Gene *UGT76C1* und *UGT76C2*. Durch die Untersuchung dieser Linien sollten die bisherigen Ergebnisse der *amiUGT76C1/2*-Linien bestätigt werden und die physiologische Relevanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung weiter aufgeklärt werden. Die beiden Gene liegen auf dem Chromosom in gleicher Orientierung direkt hintereinander und sind gekoppelt. Die zur Verfügung stehenden Methoden zur Mutagenese von benachbarten Genen in *Arabidopsis* sind limitiert. Als erstes wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Transposon-basierter Ansatz verwendet, der von Nishal *et al.* (2005) publiziert wurde. Im Laufe dieser Arbeit wurde erstmals das CRISPR/Cas-System als eine sehr vielversprechende Methode der Genom-Editierung in *Arabidopsis* beschrieben (Feng *et al.* 2013). Da sich der Transposon-basierte Ansatz als problematisch erwies, wurde die Herstellung der *UGT76C1,2*-Doppel-Knockout-Mutante mit dem CRISPR/Cas9-Systems parallel begonnen.

3.5.1 *Ds*-Transposon-basierter Ansatz zur Herstellung einer *ugt76c1 ugt76c2* Doppelmutante

3.5.1.1 Beschreibung und Optimierung des Systems

Als Ausgangspunkt für die Herstellung der *ugt76c1 ugt76c2* Doppel-Knockout-mutante dient in dem Transposon-basiertem System eine *Arabidopsis*-Mutante, die im *UGT76C1*-Gen eine T-DNA-Insertion enthält, in der ein aktivierbares *Ds*-Element und eine durch Hitze induzierbare Activator (*Ac*)-Transposase integriert ist. In der generativen Wachstumsphase wird durch eine Hitzebehandlung, in den sich entwickelnden Embryonen, die Expression der *Ac*-Transposase induziert und dadurch die Transposition des *Ds*-Elements bewirkt. *Ds*-Elemente transponieren über einen *cut-and-paste*-Mechanismus und neigen dazu, sich in der Nähe ihrer Ursprungsposition in das Genom zu reintegrieren (Machida *et al.* 1997). In der zweiten Filialgeneration (HS2-Generation) werden unter den Individuen mit germinalen Transpositions-Ereignissen mittels PCR jene Mutanten identifiziert, bei denen sich das *Ds*-Element in das *UGT76C2*-Gen reintegriert hat (Jander und Barth 2007) (Abbildung 25B). Das *UGT76C1*-Gen bleibt durch die Insertion der T-DNA weiterhin funktional ausgeschaltet und der Funktionsverlust von *UGT76C2* wird durch Insertion des Transposons in die kodierende Sequenz erzielt.

Als erstes wurde im Rahmen dieser Arbeit die *Arabidopsis*-Ausgangslinie WiscDsLoxHs114_05B (*ugt76c1-2*) der Wisconsin WiscDsLoxHs-*Arabidopsis* Mutantenkollektion (Woody *et al.* 2007) identifiziert. Die *ugt76c1,2*-Linie konnten aufgrund der Segregation des Selektionsmarkers (Kanamycinresistenzgen; 1:2,7) als Einfach-Insertionslinie charakterisiert werden, somit ist die Wahrscheinlichkeit ungewollter Hintergrundmutationen in anderen Loci gering.

Um die genaue Position der T-DNA durch Sequenzierung zu überprüfen, wurden PCRs mit einem aus der T-DNA auswärts gerichteten Primer (L4) jeweils in Kombination mit einem *UGT76C1*-genspezifischen Primern vor und hinter der T-DNA (RT6 und RT7, Abbildung 25A) durchgeführt. Mit beiden Primerkombinationen wurde ein spezifisches Produkt gebildet, das bei der Sequenzierung jeweils den Übergang von der genomischen DNA zur T-DNA enthielten (Anhang Abbildung S2A und B). Es ist daher anzunehmen, dass an dem Insertionsort die T-DNA mindestens zweimal und als *inverted repeat* inseriert wurde. Anschließend wurden homozygote *ugt76c1-2* Pflanzen isoliert. Wie die bereits beschriebene *ugt76c1-1* Mutante (Brock 2012, Wang *et al.* 2013), zeigten auch die homozygoten *ugt76c1-2* Mutanten keine morphologischen Auffälligkeiten.

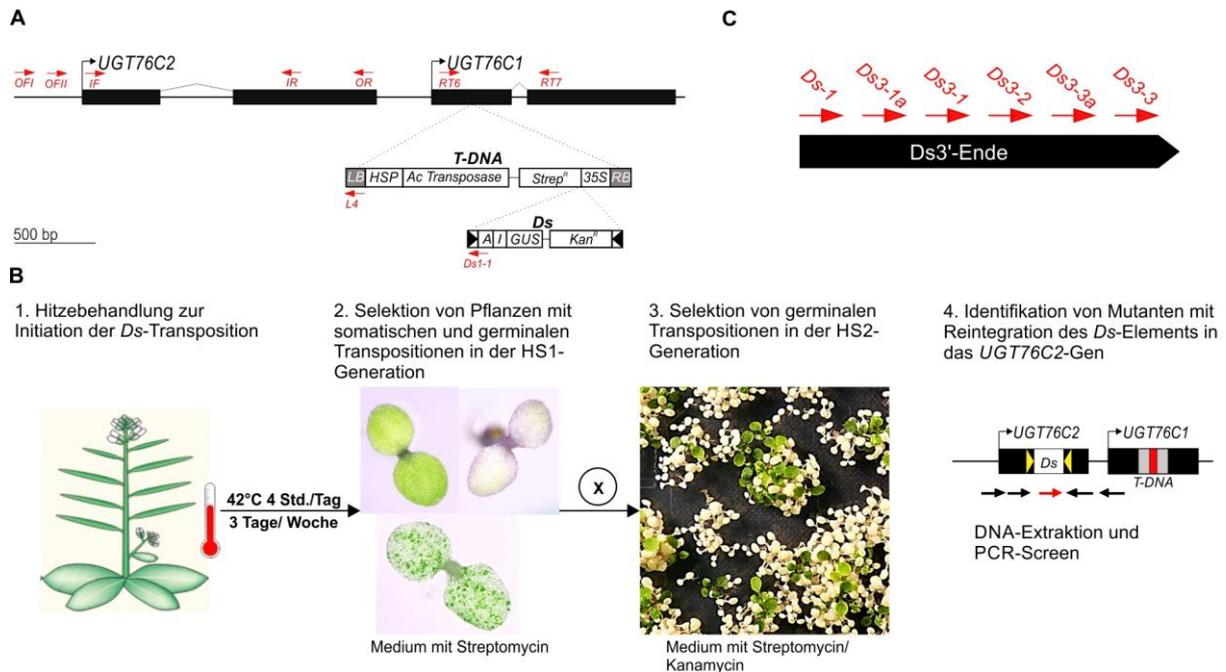


Abbildung 25. Übersicht über das WiscDsLoxHs Transposon-basierte Mutagenesesystem zur Herstellung von *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutanten und über den Ablauf des Screens.

A) Schematische Darstellung des *UGT76C1-UGT76C2*-Locus und der Position und des Aufbaus der T-DNA der WiscDsLoxHs114_05B-Linie (*ugt76c1-2*). Schwarze Balken: Exons; Weiße Balken: T-DNA; Graue Balken: linke- und rechte T-DNA-Grenze (LB bzw. RB); Schwarze Dreiecke: *Ds*-Grenzen; Rote Pfeile: Primer-Positionen; HSP: Hitzeschock-Promotor; Ac: Activator-Transposase; StrepR: Streptomycin-Resistenzgen; 35S: Promotor; *GUS*: β -Glucuronidase; *A*: alternative splicing site; *I*: künstliches Intron; *Ds*: Dissociation-Element; Die Darstellung der T-DNA und des Transposons sind nicht maßstabsgetreu.

B) Arbeitsschritte zur Herstellung von *ugt76c1 ugt76c2*-Doppelmutanten. In drei Runden wurden etwa 40 homozygote Pflanzen der Ausgangslinie WiscDsLoxHs114_05B, die sich in der reproduktiven Wachstumsphase befanden einem Hitzeschock unterzogen (1). Unter den Nachkommen der mit Hitze behandelten Pflanzen (HS1-Generation) werden durch die Anzucht auf antibiotikahaltigen Medium die Individuen isoliert, bei denen die Transposition erfolgt ist (variierte oder grüne Keimlinge). Es wurden etwa 3000 Keimlinge mit somatischen oder germinalen Transpositionen isoliert, geselbstet und in Pools zu jeweils 5 Pflanzen geerntet (2). Die Anzucht der HS2-Pools erfolgte auf Streptomycin- und Kanamycin-haltigem Medium. Die Keimlinge mit germinalen Transpositionen (hier resistente, grüne Keimlinge) wurden für die DNA-Extraktion geerntet (3). Im letzten Schritt erfolgen PCRs mit verschiedenen genspezifischen Primern (schwarz) die jeweils mit einem Transposon-spezifischem Primer kombiniert wurden. Abbildung modifiziert nach Nishal *et al.* (2005) und Page und Grossniklaus (2002).

C) Position der *Ds*-Primer innerhalb der 3'-Grenze des Transposons.

Zur Induktion der Expression der *Ac*-Transposase und damit der Transposition des *Ds*-Elements in den sich entwickelnden Embryonen wurden 40 homozygote *ugt76c1-2*-Pflanzen in der generativen Wachstumsphase einer Hitzebehandlung unterzogen (Abbildung 25B). Die von Nishal *et al.* (2005) publizierte Hitzebehandlung (4 Stunden pro Tag; 3 Tage pro Woche) führte bei den Pflanzen jedoch zu einer starken Wachstumsbeeinträchtigung. Die Blütenstände waren stark gestaucht und die Samenproduktion war unzureichend. Folgende Optimierungen führten zu einer ausreichenden Samenproduktion: 1) Die Luftfeuchtigkeit wurde während der Hitzebehandlung erhöht. 2) Es wurde auf das Aracon-Kultivierungssystem umgestellt und 3) die Behandlungstemperatur und Frequenz wurden verringert (39 °C, 3 Mal am Tag eine Stunde, alle 2 Tage).

Als Exzisionsmarker für des Transposon dient ein Streptomycin-Resistenzgen. Nur wenn die Transposition erfolgt, kann das Streptomycin-Resistenzgen abgelesen werden. Die Nachkommen der hitzebehandelten Pflanzen (HS1-Generation) sind dann Streptomycin-resistent und können durch die Anzucht auf Streptomycin-haltigem Medium identifiziert werden. Nicht resistente Keimlinge können kein Chlorophyll bilden und bleiben weiß. Erfolgt die Transposition sehr früh in der Entwicklung oder in den Keimzellen, so ist der gesamte Keimling resistent und vollständig grün. Erfolgt die Transposition in somatischen Zellpopulationen, sind die Keimlinge variiert und bilden Kotyledonen mit grünen Sektoren (Abbildung 25B). Das Transposon enthält als Reinsertionsmarker auch ein Kanamycin-Resistenzgen.

Die Anzucht der HS1-Generation auf Streptomycin-haltigem Medium zeigte, dass die Transposition erfolgreich induziert wurde. Es konnten sowohl Keimlinge mit somatischen Transpositionen und einem variierten Phänotyp als auch vollständig grüne Keimlinge mit potenziell germinalen Transpositions-Ereignissen beobachtet werden. Die resistenten bzw. teilresistenten Pflanzen wurden auf nicht-selektives Medium umgesetzt. Ein hoher Prozentsatz der umgesetzten Keimlinge konnte jedoch nicht regeneriert werden und erreichte nicht die generative Wachstumsphase. Um die Regeneration der Keimlinge zu verbessern, wurde die Streptomycin-Konzentration optimiert.

Bei einer Konzentration von 125 mg/l waren die variierten Keimlinge noch gut identifizierbar und etwa 80 % der Keimlinge konnten durch die Anzucht auf nichtselektivem Medium und später auf Erde regeneriert werden. Insgesamt wiesen etwa 60 % der HS1-Keimlinge einen variierten Phänotyp auf.

Dabei variierte die Frequenz sowie die Größe der grünen (bzw. resistenten) Sektoren pro Pflanze. Es ist anzunehmen, dass in den variierten Pflanzen nur bei einer hohen Frequenz von somatischen Transpositions-Ereignissen (hohe Anzahl von grünen Sektoren) auch die erwünschte Transposition in den Keimbahnzellen auftritt. Deshalb wurde nur mit stark variierten und vollständig grünen Keimlingen weitergearbeitet. Etwa 30 % der Keimlinge waren stark variiert und 0,03 % waren vollständig grün. Unter ~120.000 Keimlingen, wurden ~3000 stark-variierte und ~30 vollständig-grüne Keimlinge ausgewählt und in die nächste Generation gebracht. Von den 3000 transferierten Pflanzen konnten etwa 70 % regeneriert werden. Um die Anzahl der DNA-Extraktionen und PCR-Reaktionen, zur Identifikation von *Ds*-Reinsertionen in das *UGT76C2*-Gen, zu reduzieren, wurden Pools von vier bis fünf HS1-Pflanzen gebildet (insgesamt etwa 400 Pools). Die Pflanzen waren nach der Streptomycin-Selektion und anschließender Regeneration in ihrem Entwicklungsstand sehr ungleichmäßig. Dies war insofern problematisch für die Samengewinnung, als dass die einzelnen Individuen in den Pools nicht gleichstark vertreten waren.

In der zweiten Filialgeneration (HS2-Generation) wurden die Individuen mit germinalen Transpositions-Ereignissen durch die Anzucht auf Streptomycin/Kanamycin-haltigem Medium identifiziert (Abbildung 25B). Etwa 75% der 400 getesteten HS2-Pools (~1500 HS1-Pflanzen) enthielten neben weißen, sensitiven Keimlingen auch resistente, vollständig grüne Keimlinge und nur 2% der HS2-Pools enthielten nur vollständig-grüne Keimlinge. Vollständig grüne Keimlinge in der T2-Generation sind die Konsequenz von germinal-vererbten Transpositions-Ereignissen. Von diesen Pools wurden die vollständig-grünen, resistenten Keimlinge geerntet und die DNA extrahiert.

3.5.1.2 Identifikation von Pools mit Transposon Reintegrationen im *UGT76C2*-Gen

Bei der in der Publikation von Nishal *et al.* (2005) beschriebenen Screening-Strategie zur Identifizierung der Reinsertionen des Transposons im *GOI*, erfolgten die PCRs in einem Schritt, durch die Kombination des Ds1-1 Primers jeweils in Kombination mit einem genspezifischen forward und reverse Primer (Abbildung 25B). Diese Vorgehensweise war hier nicht erfolgreich. Das Hauptproblem war, dass in den Screening-PCRs keine PCR-Produkte entstanden oder als PCR-Produkt nur ein breiter „Schmier“ detektiert werden konnte (siehe beispielhaft Abbildung 26A). Die Transposongrenzen enthalten viele repetitive Sequenzen, dies kann zur Folge haben, dass unterschiedlich lange PCR-Produkte entstehen, die sich möglicherweise in der PCR-Reaktion auch untereinander weiterverketten. Die prinzipielle Integrität der genomische-Template-DNA wurde zuvor durch Kontroll-PCRs mit Primern für beispielsweise *Actin* oder dem *forward*- und *reverse-UGT76C2*-Screen überprüft. Problematisch für die Optimierungsarbeiten war auch, dass keine Positivkontrolle zur Verfügung stand und diese direkt in den HS2-Pools durchgeführt werden mussten.

Es wurden umfangreiche Optimierungsarbeiten durchgeführt. Beginnend bei der DNA-Extraktion. Am geeignetsten erwies sich das CTAB-Protokoll Murray und Thompson (1980). Es wurden verschiedene selbst erstellte und publizierte Primer-Paare mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen getestet. Die Positionen der Primer in der *Ds*'3-Grenze sind in (Abbildung 25B) dargestellt. Neben dem Austesten verschiedener Polymerasen wurden auch die Konzentrationen der einzelnen PCR-Komponenten (Polymerase, dNTPs, MgCl₂, Primer und Template) optimiert. Um die Spezifikation und Amplifikation zu verbessern, wurden verschiedene, beschriebene PCR-Zusätze ausgetestet: DMSO, TBT-PAR (Samarakoon *et al.* 2013), Trehalose, BSA und Tween20). Da Transposonsequenzen stark methyliert sein können, wurden spezielle dNTPs (d7GTP - dGTP Nukleotidmix; NEB) ausprobiert, welche die Amplifikation dieser Bereiche erleichtern sollen (Jung *et al.* 2002).

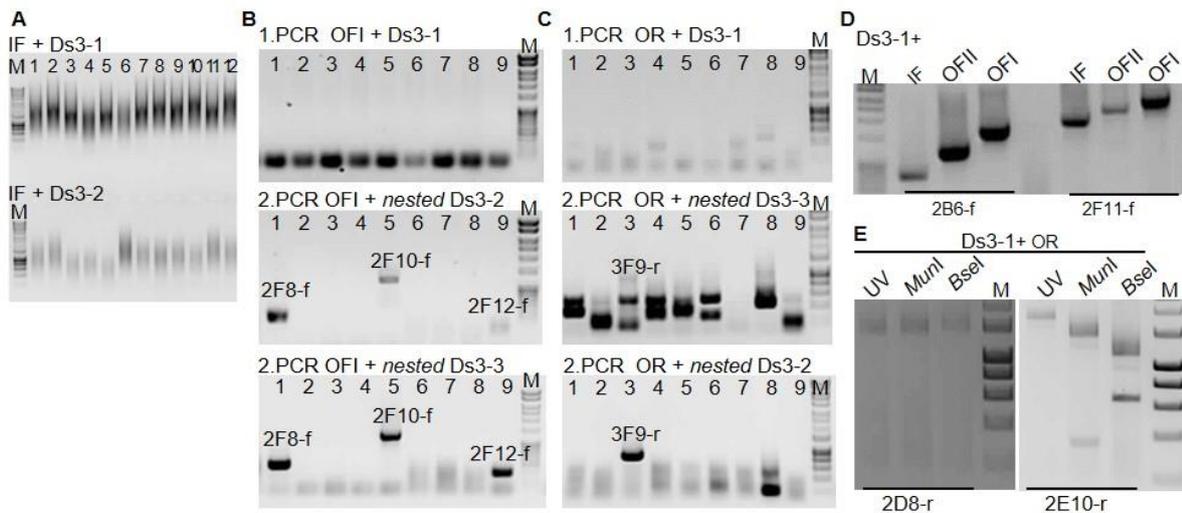


Abbildung 26. Identifikation der HS2-Pools mit *Ds*-Transposon-Insertionen in den *UGT76C2*-Locus und Verifikation der Kandidaten durch *nested*-PCRs und Restriktionsverdaue.

A) Unspezifische Amplifikationsprodukte der PCRs zur Identifikation von *Ds*-Reinsertionen in das *UGT76C2*-Gen mit individueller HS2-Pool-DNA als Template (1-12) und den Primern IF und Ds3-1.

B) und C) Optimierte PCRs zur Identifikation der *Ds*-Reintegration in das *UGT76C2*-Gen. Es wurden zwei aufeinanderfolgende PCRs durchgeführt. Beide PCRs erfolgten mit den *UGT76C2*-genspezifischem Primer OF1 (**B**) bzw. OR (**C**) jeweils in Kombination mit dem *Ds*-spezifischen Primer Ds3-1 in der ersten und dem *nested* Ds3-3-Primer in der zweiten PCR. Als Templates diente individuelle HS2-Pool-DNA (1-9). Spezifische Banden konnten erst in der zweiten PCR detektiert werden. Banden, die mit verschiedenen Primerkombinationen auftraten und den erwarteten Größenunterschied der *nested* Primer zeigten, wurden ausgeschnitten und für die Sequenzierung aufgereinigt. Die Kandidaten wurden benannt nach ihrer Pool-ID und je nach der Orientierung der 3'-Grenze des *Ds*-Transposons mit „f“ oder „r“.

D) Bestätigung der Kandidaten (2B6-f und 2F11-f) durch die Verwendung von drei verschiedenen, genspezifischen *nested* Primern und dem *Ds*-spezifischen Primer Ds3-1.

E) Überprüfung der Kandidaten 2D8-r und 2E10-r durch einen RE-Verdau mit *MunI* und *BseI*, der PCR-Produkte mit genspezifischen und transposonspezifischen Primern, im Vergleich zum unverdauten PCR-Produkt (UV). Nach dem Verdau konnten die erwarteten Fragmente für den *BseI*- (1630 bp + 364 bp) und *MunI*-Verdau (1333 bp + 661 bp) detektiert werden. Für 2D8-r betrug die Größe des unverdauten PCR-Produkts ~1500. Die erwarteten Fragmente konnten nach dem Verdau nicht detektiert werden (*MunI* 661 + 590; *BseI* 887+364). Bei 2D8-r handelte es sich daher um ein unspezifisches Amplifikationsprodukt.

Die Positionen der verwendeten Primer (**A** bis **E**) ist in Abbildung 25 dargestellt. Der verwendete Größenstandard (M) war der Hyperladder I.

Parameter, die zum Optimieren des PCR-Programms variiert wurden, waren die *Annealing*-Temperatur und Zeit, die Elongationszeit sowie die Zyklenanzahl. Es wurden auch spezielle Programmtypen wie *touchdown*-, *Tail*- (Liu et al. 1995) und *onestep*-PCRs ausgetestet.

Trotz der umfangreicher Optimierungsarbeiten funktionierten die PCRs zur Identifikation der Linien, bei denen das *Ds*-Element in das *UGT76C2*-Gen inseriert wurde, nicht zuverlässig. Die besten Ergebnisse wurden am Ende erzielt mit der Ex-Taq Polymerase (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) nach Herstellerangaben, mit etwa 40 ng Template. Am zuverlässigsten erwiesen sich zwei aufeinanderfolgende PCRs mit *nested* Primern. Als PCR-Programm wurde ein *Touchdown*-Ansatz verwendet, bei dem die *Annealing*-Temperatur bei 61°C begann und bis 55°C um ein Grad pro Zyklus verringert wurde. Die Elongationszeit betrug 3 min und es wurden 30 Zyklen gefahren. Dabei konnten letztendlich distinkte PCR-Produkte erzielt werden (Abbildung 26B und C).

Um die *Ds*-Insertionen zuverlässig nachzuweisen und von falsch-positiven Ergebnissen zu unterscheiden, wurden die PCR-Produkte durch die Verwendung weiterer *nested* Primerkombinationen und oder durch einen Verdau verifiziert (Abbildung 26D). Es konnten unter den 225 untersuchten Pools (~1012 HS1-Pflanzen) etwa 20 Kandidaten mit einer putativen *Ds*-Insertion im *UGT76C2*-Locus identifiziert werden. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert, um die genaue Position der Transposon-Insertion zu bestimmen.

Die Position konnte von 13 der putativen Transposon-Insertionen im *UGT76C2*-Gen durch Sequenzierungen bestätigt werden, eine Übersicht zeigt Abbildung 27. Eine Insertion befand sich im Promotor-Bereich, vier in einem der beiden Exons, drei im Intron, drei im 5'-*UTR* und zwei im intergenischen Bereich zwischen *UGT76C2* und *UGT76C1*. Das Ziel bestand darin, durch die Insertion des Transposons, einen funktionellen Gen-Knockout zu bewirken. Daher waren nur die Insertionen in den kodierenden Sequenzen und so nah am Startcodon wie möglich von Interesse. Diese Kriterien erfüllten die Kandidaten: 3H1, 3F9, 2B6 und 3C12. Die anderen wurden nicht weiterverfolgt. Die Sequenzen der Übergänge zwischen dem *UGT76C2*-Gen und des *Ds*-Transposons sind für die relevanten Kandidaten in Tabelle S2 aufgeführt.

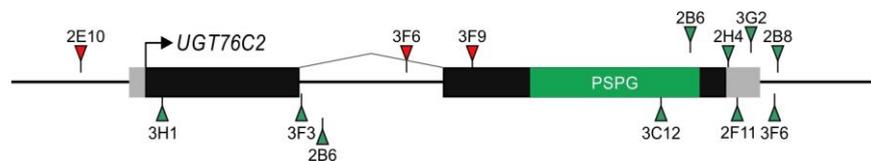


Abbildung 27. Übersicht der verifizierten *Ds*-Transposon-Insertionen im *UGT76C2*-Locus.

Schematische Darstellung des *UGT76C2*-Genlocus. Dreiecke markieren die Position der identifizierten Transposon-Insertionen im *UGT76C2*-Locus. Die rotmarkierten Transposon-Insertionen wurden durch die Verwendung eines Primers gegen die 3'-*Ds*-Grenze mit einem *UGT76C2*-genspezifischem vorwärtsgerichteten und die grün markierten mit einem *UGT76C2*-spezifischem rückwärtsgerichteten Primer identifiziert. Schwarzer Pfeil: Startcodon; graue Balken: *UTRs*; schwarze Balken: Exons, grüne Balken: kodierende Sequenz für die *plant secondary product glycosyltransferase* (PSPG)-Domäne. Die Sequenzen der *UGT76C2*-*Ds* Übergänge der relevanten Transposon Insertionen sind dem Anhang (Tabelle S2) zu entnehmen.

Die Samen der entsprechenden Pools wurden erneut auf selektivem Medium ausgebracht. Streptomycin-resistente Einzelpflanzen wurden mittels PCR auf die jeweilige Insertion überprüft. Die PCRs zur Identifikation der *Ds*-Insertionen in den *UGT76C2*-Locus funktionierten nicht zuverlässig und konnten nicht optimiert werden, obwohl mit den positiv getesteten HS2-Pool-DNAs Positivkontrollen zur Verfügung standen. Aus dem 3H1-Pool, nicht jedoch für die anderen Pools, konnten unter 24 Streptomycin-resistenten Pflanzen drei heterozygote Einzelpflanzen isoliert werden.

In der darauffolgenden T3-Generation haben die PCRs zum Nachweis der *Ds*-Transposon-Insertion in das *UGT76C2*-Gen in der Linie 3H1 nicht mehr funktioniert. Daher konnten keine homozygoten Individuen identifiziert werden. Um die PCRs zum Nachweis der *Ds*-Insertion zu umgehen, wurde zur Identifikation homozygoter *ugt76c1 ugt76c2*-Pflanzen die Segregation des Streptomycin-Markers im *UGT76C1*-Gen und des *UGT76C2*-WT-Allels untersucht. Der

Streptomycin-Marker segregierte für alle drei Kandidaten wie erwartet etwa 1:3. Das *UGT76C2*-WT-Allel hingegen segregierte nicht wie erwartet, unter 24 T3-Nachkommen konnte eine Pflanze identifiziert werden, in der kein *UGT76C2*-WT-Gen nachweisbar war. Ohne eine erneute Genotypisierung der putativen *ugt76c1 ugt76c2*- Doppelmutante konnte mit der Linie nicht weitergearbeitet werden. Es wurden verschiedene alternative Methoden in Betracht gezogen, aber zu diesem Zeitpunkt waren die parallel durchgeführten Arbeiten zur Herstellung der Doppelmutante mit dem CRISPR/Cas9-System (Fauser *et al.* 2014) bereits so weit vorangeschritten, dass der Transposon-basierte Ansatz nicht weiterverfolgt wurde.

3.5.2 Anwendung des CRISPR/Cas9-Ansatzes zur Herstellung von *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutanten

Das CRISPR/Cas9-System wurde bereits 2013, ein Jahr nach der Aufklärung des Mechanismus, in zahlreichen Organismen erfolgreich zur Genomeditierung verwendet (Gasiunas *et al.* 2012, Jinek *et al.* 2012). 2014 wurde auch die erfolgreiche Anwendung dieser Technik zur Erzeugung von gezielten, vererbaren Genomveränderungen in *Arabidopsis*-Pflanzen gleich von mehreren Gruppen beschrieben (Fauser *et al.* 2014, Li *et al.* 2014), (Puchta). Diese Publikationen stellen einen entscheidenden Durchbruch in der Pflanzenforschung und insbesondere der reversen Genetik dar.

Da sich mit dem Transposon-basierten Ansatz (Kapitel 3.5.1) zur Herstellung der *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutante Probleme abzeichneten und die publizierten Arbeiten mit dem CRISPR/Cas9-Ansätzen vielversprechend waren, wurde parallel begonnen, das von (Fauser *et al.* 2014)beschriebene CRISPR/Cas9-System für die Herstellung der *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutante zu verwenden.

3.5.2.1 Design der *UGT76C1*-guide-RNAs, Herstellung der Vektoren und genereller Ablauf der CRISPR/Cas9-Mutagenese des *UGT76C1*-Locus

Das CRISPR/Cas9-System besteht aus zwei Komponenten: einer Endonuklease Cas9 und einer sgRNA. Diese bilden, in den Zielorganismus eingebracht und unter geeigneten Promotoren exprimiert, einen Komplex. Die sgRNA ist selbst teilweise komplementär zum Ziellocus und steuert die Cas9-Endonuklease zum Ziellocus, wo diese einen DSB einfügt. Der DSB wird durch zelleigene Reparatursysteme wieder zusammengefügt. Erfolgt die Reparatur über den fehleranfälligen *non-homologous end joining* (NHEJ)-Prozess kommt es häufig zu kurzen Insertions- und Deletions-Mutationen (INDELS), die zu einem Funktionsverlust des Gens führen können. Die größte Herausforderung besteht darin Mutationen einzuführen bzw. zu identifizieren, die nicht nur somatische Zellen, sondern auch die Keimzellen betreffen und somit an die nächsten Generationen weitervererbt werden. Wovon die Aktivität des CRISPR/Cas9-Komplexes genau abhängt ist noch nicht bekannt.

Um die *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutante herzustellen sollte das *UGT76C1*-Gen, im Hintergrund der Einzel-T-DNA-Knockout-Linien *ugt76c2-1* und *ugt76c2-2*, mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Ansatzes mutagenisiert werden (Abbildung 28). Es wurde sich für diese Vorgehensweise entschieden, da in den *ugt76c2*-Einzel-knockout-Linien die Hinweise für einen funktionellen Gen-Knockout überzeugender sind (Šmehilová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011).

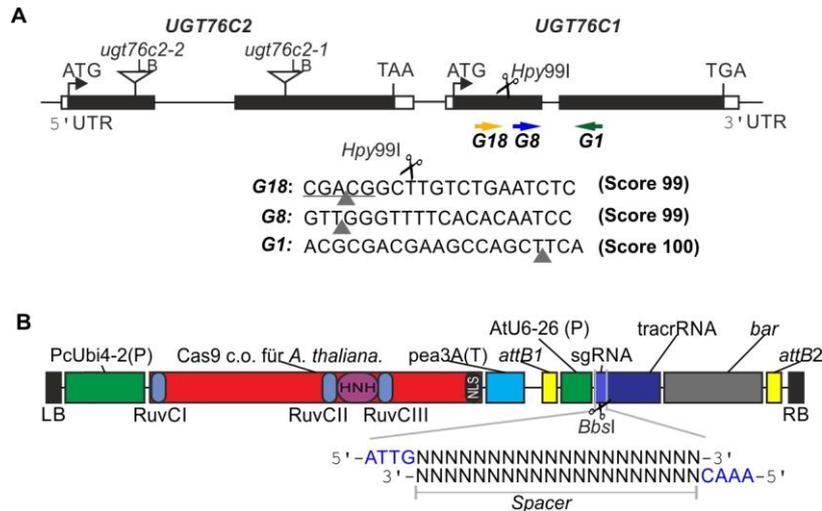


Abbildung 28. Design der guide RNAs, verwendetes CRISPR/Cas9-System und Klonierungsstrategie.

A) Schematische Darstellung des *UGT76C2-UGT76C1*-Locus mit Zielpositionen, Sequenzen und Score-Werten der drei *Spacer*-Sequenzen *G18*, *G1* und *G8* zur Mutagenese von *UGT76C1*. Das Design der *Spacer* erfolgte mit dem Programm CRISPR-P (Lei *et al.* 2014). Das Programm berechnet einen *Score*-Wert, der die Spezifität bewertet (1-100; 100: höchste Spezifität). Die *G18*-Zielssequenz enthält eine RE-Schnittstelle für *Hpy99I* (unterstrichene Sequenz; Schere: Schnittstelle), die für die Identifikation der erfolgreichen Mutationen verwendet wird. Dreiecke markieren die Positionen der T-DNAs im *UGT76C2*-Gen der Linien *ugt76c2-1* und *ugt76c2-2*, die als Hintergrund für die CRISPR/Cas9-Mutagenese verwendet werden. Ausgefüllte graue Dreiecke markieren die Position an der die Cas9-Endonuklease schneidet. Schwarze Balken: Exons; weiße Balken: UTRs; Pfeile: Zielpositionen der designierten sgRNAs.

B) Schematische Darstellung des Aufbaus der T-DNA des CRISPR/Cas9-Systems (Fauser *et al.* 2014). Die Expression der für *Arabidopsis* codonoptimierten Cas9-Endonuklease wird durch einen *Ubiquitin4-2*-Promotor aus *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.* 1993) gesteuert. Die sgRNA steht unter der Kontrolle des *U6-26*-Promotors aus *Arabidopsis*.

(Schematische Darstellung modifiziert nach Fauser *et al.* (2014).

Die in der sgRNA enthaltene komplementäre Sequenz zum Ziellocus wird *Spacer* genannt und ist 20 bp lang. Der *Spacer* kann theoretisch frei gewählt werden, muss am Ziellocus aber an eine PAM-Sequenz angrenzen. Letztere dient als Erkennungssequenz für die Cas9, ist selbst aber nicht Teil der sgRNA. Die PAM-Sequenz für das hier verwendete System aus *Streptococcus pyogenes* ist „NGG“.

Zum Designen der sgRNAs mit *UGT76C1* als Zielgen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Vorhersageprogramme CRISPR-P (Lei *et al.* 2014) und CRISPR-PLANT (Yadav *et al.* 2014) verwendet, um die Gefahr von unspezifischen Hintergrundmutationen (*Off-targets*) zu minimieren. Es wurden drei *Spacer*, *G18*, *G8* und *G1*, ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren: 1) Position im Gen möglichst nah am Startcodon. 2) Hohe Spezifität: Eine Aussage über die Spezifität liefert der *Score*-Wert des Vorhersageprogramms. Der ausgegebene Wert liegt zwischen 1-100, desto höher der *Score*-Wert, als desto höher wird die Spezifität bewertet (Lei *et al.* 2014). 3) Das Vorhandensein einer RE-Schnittstelle innerhalb der Schnittstelle der Cas9-Endonuklease (Abbildung 28).

Die Klonierung der ausgewählten *Spacer* (*G1*, *G8* und *G18*) in die sgRNA erfolgt in zwei Schritten. Als Ausgangspunkt diente der Gateway® *EntryVector* pEn-Chimera, der die

Kassette mit dem *U6*-Promotor und der sgRNA-Sequenz enthält (Abbildung 28B; zwischen den *attB1* und *attB2*-sites).

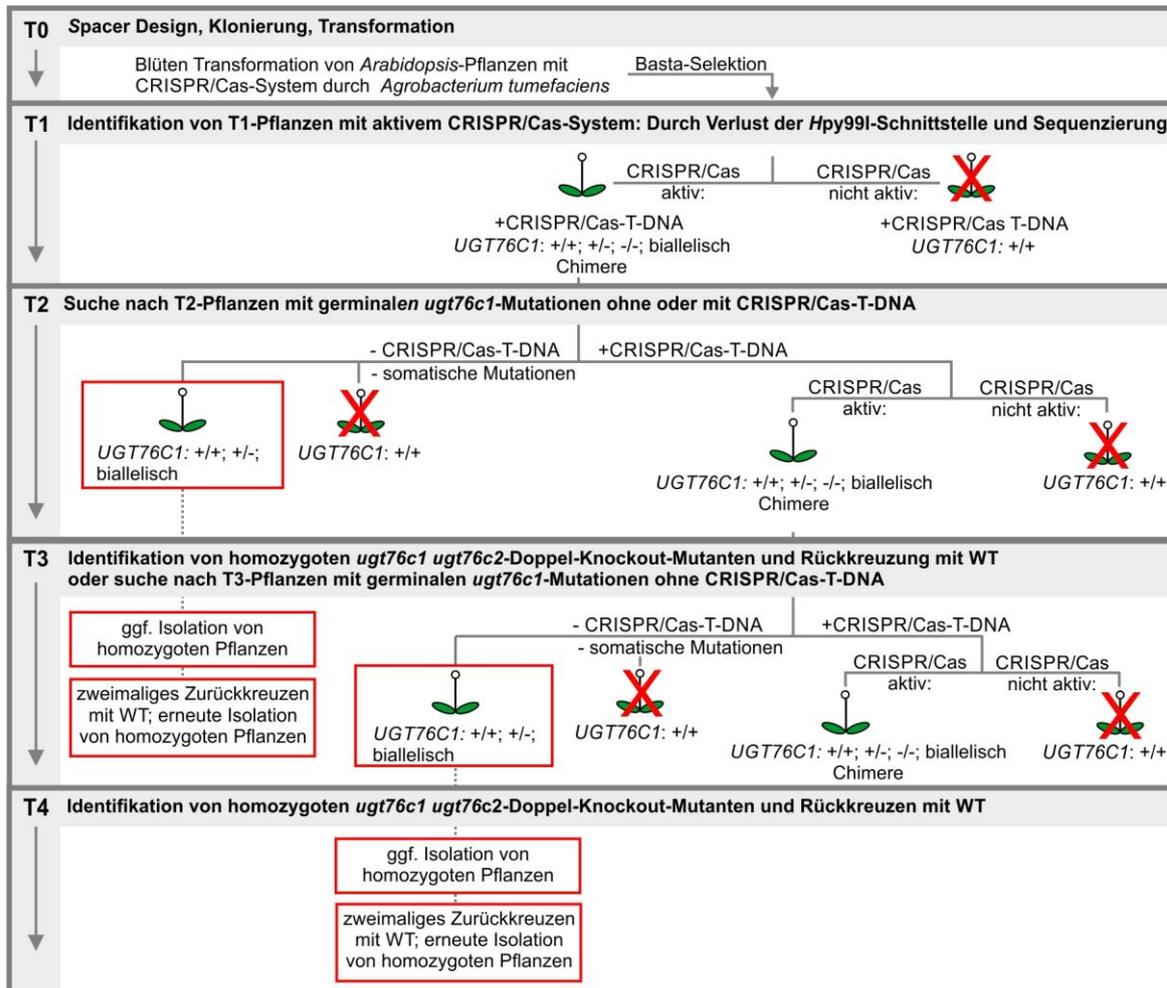


Abbildung 29. Generalisierter Ablauf zur Herstellung und Identifikation von *ugt76c1-ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutanten.

Die zuvor designten *Spacer*-Sequenzen werden kloniert (Abbildung 28) und in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Die Primärpflanzen werden durch eine Basta-Behandlung selektiert. In der T1-Generation wird nur mit Primärtransformanten weitergearbeitet, in denen die Aktivität des CRISPR/Cas9-Komplexes nachgewiesen werden kann. Ab der T2-Generation wird nach Linien gesucht, in denen die *ugt76c1*-Mutationen fixiert sind (d.h. auch die Keimzellen betreffen). Deshalb wird nach Pflanzen gesucht, bei denen die CRISPR/Cas9-T-DNA ausgesegregiert, das *UGT76C1*-Gen aber mutiert ist (roter Rahmen). Sollten diese nicht identifiziert werden können, wird unter Pflanzen die noch die CRISPR/Cas9-T-DNA tragen nach Kandidaten gesucht, in denen die *UGT76C1*-Mutationen fixiert ist oder der CRISPR/Cas9-Komplex aktiv ist. Unter den Nachkommen dieser Kandidaten wird von neuem nach Pflanzen mit fixierten Mutationen ohne CRISPR/Cas9-T-DNA gesucht (roter Rahmen). Sollten die identifizierten *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Mutanten noch heterozygot sein, werden in der nächsten Generation homozygote Pflanzen identifiziert. Die homozygoten Doppel-Knockout-Mutanten werden zweimal mit dem WT zurückgekreuzt, geselbstet und anschließend werden erneut homozygote Pflanzen identifiziert.

Hinter dem *U6*-Promotor und vor der sgRNA-Sequenz befinden sich zwei gegeneinander gerichtete *BbsI*-Schnittstellen. Durch den Verdau des Vektors mit *BbsI* entstanden *sticky ends*, die nicht miteinander kompatibel waren. Die Sequenzen, die für die *Spacer* (G1, G8 und G18) kodieren, wurden als komplementäre Oligonukleotide synthetisiert und dabei mit Überhängen versehen, die zu der *BbsI*-Schnittstelle komplementär sind (Abbildung 28B). Die komplementären Oligonukleotide wurden miteinander hybridisiert und anschließend gerichtet

in die *BbsI*-Schnittstelle des pEnChimera-Vektors kloniert. In einem zweiten Schritt wurde die Kasette mit der sgRNA in den *Destination*-Vektor pDe-CAS9 durch eine Gateway® LR-Reaktion übertragen (Abbildung 28). Die drei fertiggestellten Vektoren zur Mutagenese von *UGT76C1* U6:G1sgRNA, U6:G8sgRNA und U6:G18sgRNA werden im folgenden G1, G8 und G18 genannt und wurden jeweils via *floral dip* in *Arabidopsis*-Pflanzen der Linien *ugt76c2-1* und *ugt76c2-2* transformiert. Anschließend wurden mittels Basta-Selektion Primärtransformanten isoliert. Ein Schema der Vorgehensweise zur Isolation von homozygoten Doppel-Knockout-Mutanten ist in Abbildung 29 dargestellt.

3.5.2.2 In T1-Pflanzen ist der CRISPR/Cas9-Komplex aktiv

Das Ziel in der T1-Generation war es Pflanzen zu isolieren, in denen der CRISPR/Cas9-Komplex aktiv ist. Für G18 war in der *UGT76C1*-Zielsequenz an der Schnittstelle der Endonuklease Cas9 die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Hpy99I* enthalten. Daher konnte die Aktivität des CRISPR/Cas9-Komplexes durch den Verlust der *Hpy99I*-Schnittstelle überprüft werden. Dafür wurde der *UGT76C1*-Locus durch PCR amplifiziert, verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. War die Mutagenese des *UGT76C1*-Gens erfolgreich, entstanden durch den Verdau zwei Fragmente (34 bp, 580 bp), für die wildtypische Sequenz entstanden drei Fragmente (302 bp, 278 bp und 34 bp; Abbildung 30A).

Unter den 27 Primärtransformanten von G18 konnten elf Kandidaten identifiziert werden, bei denen das PCR-Produkt zumindest teilweise resistent gegen den Verdau war (G18: #1; #3; #4; #18; #22; #23; #33; #36; #37; #52 und #53; Abbildung 30B). In einer zweiten, unabhängigen DNA-Analyse konnten acht der T1-Kandidatenlinien verifiziert werden (G18: #1; #4; #18; #23; #36; #22; #52 und #53; Abbildung 30C).

Die Kandidaten wurden zusätzlich durch Sequenzierungen überprüft. Die Chromatogramme der Sequenzierungsreaktionen zeigten, dass bei den T1-Kandidaten im *UGT76C1*-Locus die Mutationen nicht fixiert (germinal) waren. Bei einigen Linien konnten hinter der Cas9-Schnittstelle (Abbildung 30D, Dreiecke) multiple, sich überlagernde Sequenzierungssignale beobachtet werden (z.B. Abbildung 30D G18 #23), die auf verschiedene somatische Mutationen hindeuten. Fünf der elf T1-Kandidaten konnten bestätigt werden (G18: #4; #18; #22; #23 und #52; Tabelle 18, Abbildung 30D).

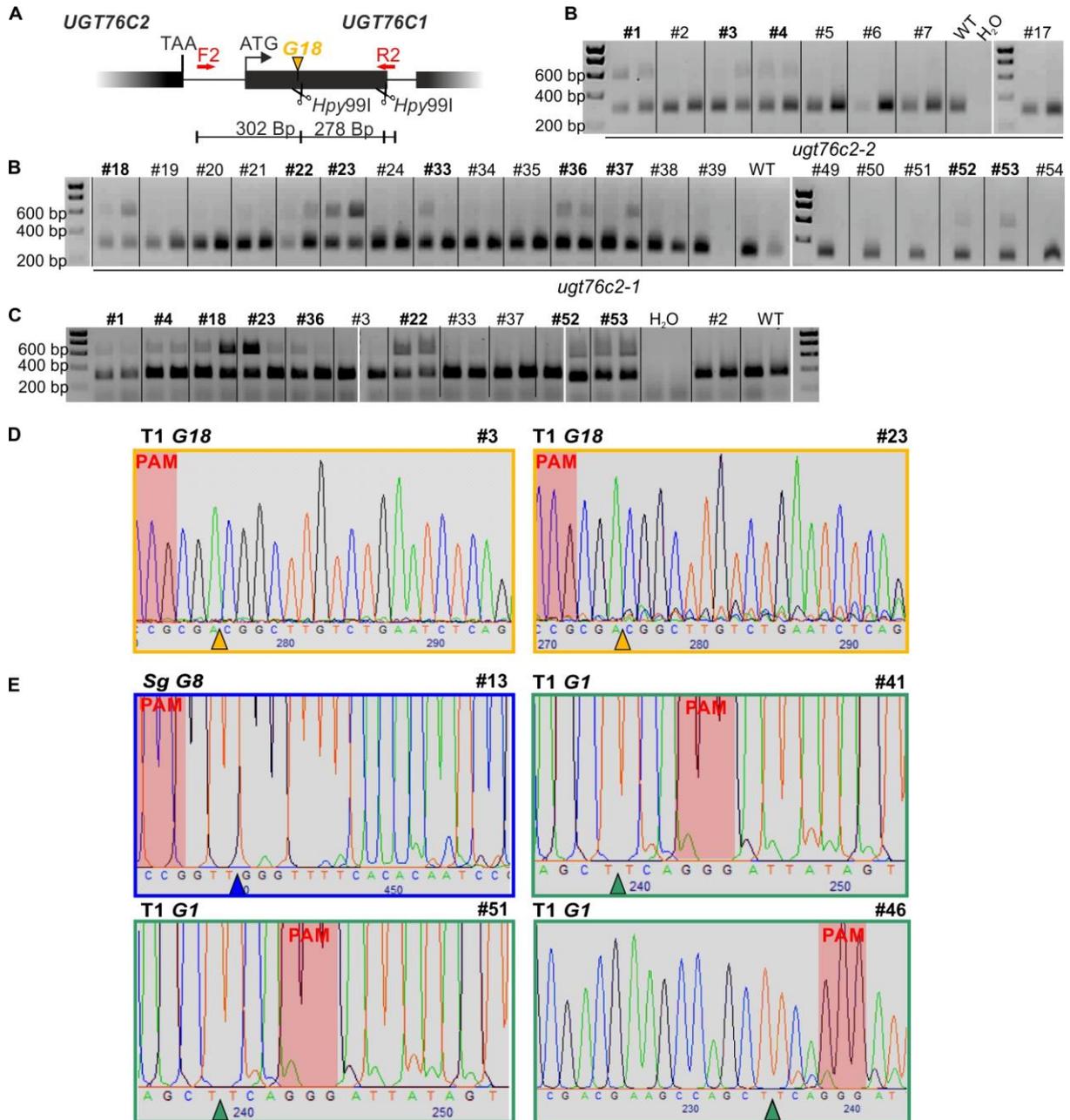


Abbildung 30. Identifikation von G18, G8 oder G1 exprimierenden T1-Pflanzen in denen der CRISPR/Cas9-Komplex aktiv ist.

A) Schematische Darstellung des *UGT76C1*-Locus mit Primerbindestellen (F2 und R2) und der *Hpy99I*-Schnittstelle. Die PCR Produktgröße beträgt 614 bp, wurde der *UGT76C1*-Locus mutiert, entstehen zwei Fragmente (34 bp und 580 bp) und für die WT-Sequenz entstehen drei Fragmente (302 bp, 278 bp, 34 bp).

B) Unter 27 Primärmutanten des G18-Konstruktes konnten elf Kandidaten mit einem partiellen Verlust der *Hpy99I*-Schnittstelle identifiziert werden (fett gedruckt). Für jede Pflanze wurden zwei unabhängige DNA-Proben untersucht.

C) Die unter **(B)** identifizierten Kandidaten wurden in einem unabhängigen Experiment erneut auf den Verlust der *Hpy99I*-Schnittstelle untersucht. Für acht Kandidaten konnten die Ergebnisse bestätigt werden.

D) Exemplarische Sequenzierungs-Chromatogramme des *UGT76C1*-Locus von T1-Pflanzen des G18-Konstrukts. Dass der CRISPR/Cas9-Komplexes aktiv ist, ist an zusätzlichen Kurven ab der Cas-Schnittstelle erkennbar (Dreiecke; drei bp hinter der PAM-Sequenz). Für G18 konnten unter den zuvor identifizierten Kandidaten 5 durch die Sequenzierungen bestätigt werden.

E) Sequenzierungs-Chromatogramme der T1-Kandidaten von G1 und G8. Es konnten unter jeweils zehn getesteten Primärtransformatanten durch die Sequenzierungen des *UGT76C2*-Gens drei Kandidaten für G1 und ein Kandidat für G8 identifiziert werden.

Da in den *Spacern* der Konstrukte G8 und G1 keine RE-Schnittstellen enthalten waren, wurde versucht einen *Surveyor nuclease assay* (Oleykowski *et al.* 1998) zu etablieren. Auch für diesen Ansatz wird der Ziellocus zunächst durch PCR amplifiziert. Anschließend wird das PCR-Produkt dem Verdau mit einer T7-Endonuklease unterzogen. Das Enzym erkennt in doppelsträngiger DNA-Basenfehlpaarungen und schneidet diese. Die verdauten Fragmente können gelelektrophoretisch identifiziert werden. Damit auch homozygote Mutationen detektiert werden können, wird das PCR-Produkt mit dem von WT gemischt. Trotz umfangreicher Optimierungsarbeiten lieferte dieser Assay keine zufriedenstellenden Ergebnisse und funktionierte zuverlässig nur bei größeren Deletionen (ab 3 bp, Daten nicht gezeigt).

Da die reale Aktivität des CRISPR/Cas9-Komplexes mit diesem Assay unterschätzt werden würde, wurde dieser Ansatz verworfen und die *UGT76C1*-Loci direkt sequenziert.

Von den Primärtransformanten der Konstrukte G1 und G8 wurden jeweils zehn Pflanzen durch Sequenzierung des *UGT76C1*-Locus analysiert. Für das G1-Konstrukt zeigten drei Pflanzen (G1: #51; #48; #41) und für das Konstrukt G8 eine (G8#13) aus zehn Pflanzen im Chromatogramm ab der Cas9-Schnittstelle schwache zusätzliche Signale (Abbildung 30E). Es wurde nur mit den vier Kandidatenlinien der T2-Generation weitergearbeitet (Tabelle 18).

Eine Übersicht über die Linien der verschiedenen Konstrukte G1, G8 und G18 und die experimentellen Arbeitsschritte, die zur Identifikation der *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-knockout-Mutante führten zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18. Übersicht der Linien und Arbeitsschritte zur Identifikation der *ugt76c1 ugt76c2*-Doppelmutante.

Konstrukt	T1-Generation			T2-Generation						T3-Generation			T4-Generation
	Hintergrundlinie	Pflanzen mit <i>Hpy991</i> -Verlust ¹ / analysierte Pflanzen	Pflanzen mit veränderten <i>UGT76C1</i> -Chromatogramm ² / analysierte Pflanzen	Linien Nummer	Pflanzen mit <i>Hpy991</i> -Verlust ¹ / analysierte Pflanzen	Pflanzen mit putativer <i>UGT76C1</i> -Mutation ² / analysierte Pflanzen	Anzahl und ID der durch Sequenzierung verifizierten <i>ugt76c1</i> -Mutationen ^{2,3}	Ohne CRISPR/Cas9 T-DNA mit <i>ugt76c1</i> -Mutation ^{2,4}	Anzahl der CRISPR/Cas9-T-DNA Insertionen ⁵	Ausprägung des <i>UGT76C1</i> -Locus ²	Analyse CRISPR/Cas9-Transgen ⁵	Anzahl der identifizierten Pflanzen ohne CRISPR/Cas9-T-DNA mit <i>ugt76c1</i> -Mutation und dessen Ausprägung ^{2,4,5}	Anzahl der identifizierten Pflanzen ohne CRISPR/Cas9-T-DNA mit <i>ugt76c1</i> -Mutation und dessen Ausprägung ^{2,4,5}
G18	<i>ugt76c2-2</i>	2/8	1/1	#4	13/15	3/10	1(#4-2)	0	1	seg	seg	1 He	4 Ho
		6/21	4	#18	11/19	1/5	1(#18-4)	0	1	seg	seg	3xHo	
	#22			3/16		1(#22-1)	0	2	seg	Ho			
	#23			11/18	5/9	1(#23-3)	0	2	seg	Ho			
#52	14/17	5/7		0		1							
G1	<i>ugt76c2-2</i>	X	2/5	#41	X	0/10			1				
				#46	X	1/10	0		1				
	<i>ugt76c2-2</i>	X	1/5	#51	X	0/10			2				
G8	<i>ugt76c2-2</i>	X	1/5	#13	X	1/10	0		1				

¹ Die Untersuchung des *Hpy991*-Verlustes erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.11 und Abbildung 30A beschrieben.

² Der *UGT76C1*-Locus wurde durch PCR amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend sequenziert (Kapitel 2.2.3.10).

³ Die zweite Probe, die durch Sequenzierung des *UGT76C1*-Locus überprüft wurde, stammte aus Kaulinblättern.

⁴ Der Nachweis der CRISPR/Cas9-T-DNA erfolgte durch PCR (Kapitel 2.2.3.14).

⁵ Die Anzahl der CRISPR/Cas9-T-DNA-Insertionen sowie die Überprüfung der Ausprägung des Ziel-Locus wurde bestimmt, durch die Segregationsanalyse des Basta-Resistenzmarkers (Kapitel 2.2.2.1).

seg: segregiert; Ho: homozygot; He: heterozygot. X: Analyse wurde für die entsprechende Linie nicht durchgeführt.

3.5.2.3 Isolation von Pflanzen mit germinalen *ugt76c1*-Mutationen

In der T2-Generation wurde nach Linien gesucht, in denen das *UGT76C1*-Gen mutiert war, die CRISPR/Cas9-T-DNA aber aussegregiert war. Bei *ugt76c1*-Mutanten, die keine

CRISPR/Cas9-T-DNA mehr tragen, sind gefundene Mutationen fixiert. Von den G18-Kandidatenlinien (G18: #4; #18; #22; #22 und #52) wurden jeweils 10-19 Nachkommen auf den Verlust der RE-Schnittstelle und parallel auf das Vorhandensein der CRISPR/Cas-T-DNA mittels PCR überprüft. Alle Linien, deren PCR-Produkt resistent gegen den RE-Verdau war, besaßen auch eine CRISPR/Cas9-T-DNA (Tabelle 18).

So lange die Pflanzen eine CRISPR/Cas9-T-DNA tragen und der *UGT76C1*-Locus nicht homozygot für die Mutation ist, kann es durch die Aktivität des CRISPR/Cas9-Komplexes weiterhin zu somatischen Hintergrundmutationen kommen. Um unter den Nachkommen mit einer CRISPR/Cas9-T-DNA, die aber zumindest einen starken Verlust der *Hpy99I*-Schnittstelle zeigten, Pflanzen mit germinalen Mutationen zu identifizieren, wurden PCR-Fragmente des *UGT76C1*-Locus sequenziert. Bei 14 Pflanzen zeigte das Chromatogramm Sequenzveränderungen, die auf germinale Mutationen hinwiesen. Exemplarische Chromatogramme der Kandidaten G18: #4-2, #4-9, #4-10 und #18-4 zeigt Abbildung 31. Es war zu beobachten, dass die Intensität der zusätzlichen Signale ab der Cas9-Schnittstelle (Abbildung 30, farbige Dreiecke) zwischen den Kandidaten stark variierte.

Unter den Nachkommen der T1-Kandidaten der Konstrukte G1 und G8 wurden die PCR-Produkte des *UGT76C1*-Locus direkt sequenziert. Unter den Nachkommen der Linien: G1: #46 und G8: #13 konnte jeweils eine Pflanze identifiziert werden, deren Chromatogramm auf germinale *ugt76c1*-Mutation hinwies (Tabelle 18).

Zur Unterscheidung von Pflanzen mit germinalen und somatischen Mutationen wurde von den 16 Kandidaten der drei Konstrukte G1, G8 und G18 jeweils von einer zweiten Probe (aus Kaulinblättern) das PCR-Produkt des *UGT76C1*-Locus sequenziert. Unter der Annahme, dass nur Pflanzen mit germinalen Mutationen die gleichen Sequenzveränderungen in beiden Proben zeigen, konnten vier Pflanzen mit putativen, germinalen Mutationen identifiziert werden: G18:#4-2; #18-4; #22-1 und #23-3 (Abbildung 31).

Um Rückschlüsse auf die Anzahl der T-DNA-Insertionsereignisse und die Wahrscheinlichkeit mit der die T-DNA in der nächsten Generation aussegregiert zu erhalten, wurden die Aufspaltungsverhältnisse des Basta-Resistenzmarkers der T-DNAs bestimmt. Bis auf die Linien G18#22; G18#23 und G1#51, deren Segregationsverhältnisse auf die Insertion von zwei T-DNAs hinweisen, handelte es sich bei den anderen Linien um Einzelinsertionslinien (Tabelle 18).

In der T3-Generation konnte durch eine erneute Sequenzierung des *UGT76C1*-Locus bestätigt werden, dass die *ugt76c1*-Mutationen der Kandidaten G18: #4-2; #18-4; #22-1 und #23-3 fixiert waren und weitervererbt wurden. Anschließend wurde unter den T3-Pflanzen mit den fixierten *ugt76c1*-Mutationen nach Individuen gesucht, die keine CRISPR/Cas9-T-DNA mehr trugen. Die Linien G18#22-1 und #23-3 waren homozygot für die CRISPR/Cas9-T-DNA. Diese

Linien hätten mit dem WT zurückgekreuzt werden müssen. Aus zeitlichen Gründen wurde mit diesen Linien daher nicht weitergearbeitet (Tabelle 18).

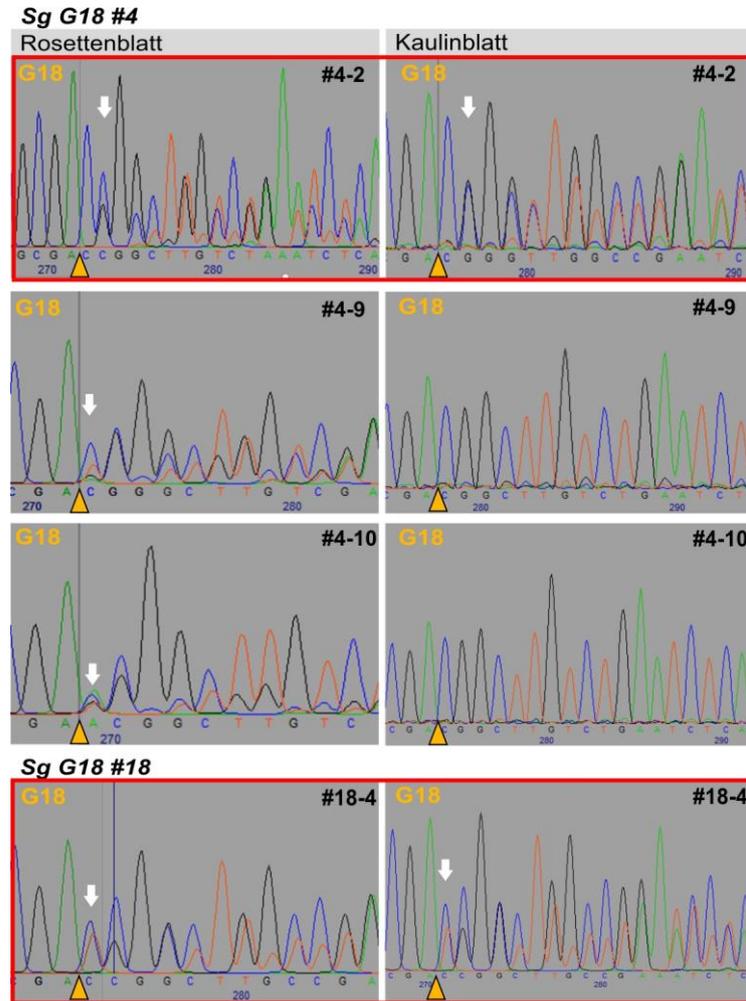


Abbildung 31. Identifikation von Linien mit germinalen *ugt76c1*-Mutationen.

Exemplarische Sequenzierungs-Chromatogramme von Rosettenblättern und Kaulinblättern von Nachkommen der T1-Kandidaten G18 #4 und #18 in der T2-Generation (Tabelle 18). Die Chromatogramme zeigten multiple Signale ab der Cas9-Schnittstelle (weißer Pfeil). Nur die Kandidaten #4-2 und #18-4 zeigten in beiden Chromatogrammen dieselbe Mutation und betrafen daher wahrscheinlich auch die Keimzellen (rote Rahmen). Dreiecke markieren die Cas9-Schnittstelle.

Unter den Nachkommen der G18:#18-4 Linie konnten in der T3-Generation drei homozygote *ugt76c1* Pflanzen ohne eine CRISPR/Cas9-T-DNA identifiziert werden. Unter den T3-Pflanzen der Linie G18:#4-2 konnte nur eine Pflanze identifiziert werden, die keine CRISPR/Cas9-T-DNA-trug, diese war heterozygot für die *ugt76c1*-Mutation und wurde geselbstet. In der T4-Generation wurden homozygote *ugt76c1*-Pflanzen identifiziert (Tabelle 18; Abbildung 32A). Durch die Sequenzierung des *UGT76C1*-Locus in den homozygoten *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Konckout-Mutanten wurde die genaue Art der entstandenen Mutationen bestimmt. Bei den Doppel-Knockout-Linien G18:#4-2(T4) und G18:#18-4(T3) wurden an der Cas9-Schnittstelle jeweils ein zusätzliches Thymin bzw. Cytosin eingefügt (Abbildung 32B). Beide Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserasters, das die Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons, drei Aminosäuren hinter der Mutationsstelle, zur Folge hat (Abbildung 32C).

Die neuen Allele wurden *ugt76c1-2* und *ugt76c1-3* genannt. Dabei befindet sich *ugt76c1-2* im Hintergrund von *ugt76c2-2* und wird im folgendem als *ugt76c1,2_a* bezeichnet und *ugt76c1-3* befindet sich im Hintergrund von *ugt76c2-1* und wird nachfolgend *ugt76c1,2_b* genannt (Abbildung 32C)

Beide *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten wurden, um eventuelle Hintergrundmutationen auszukreuzen, zweimal mit dem WT zurückgekreuzt, geselbstet und anschließend wurden wieder homozygote Individuen isoliert. Mit den nicht-zurückgekreuzten *ugt76c1,2*-Mutanten wurden aus zeitlichen Gründen bereits vorläufige Experimente durchgeführt und mit den doppelt-zurückgekreuzten Linien wiederholt.

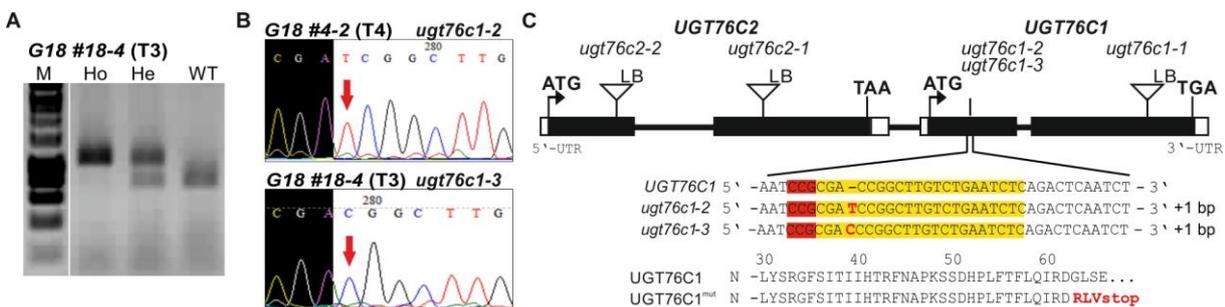


Abbildung 32. Identifizierung und molekulare Charakterisierung homozygoter *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten.

A) *Hpy99I*-Verdau von PCR-Produkten des *UGT76C1*-Locus zur Identifikation homozygoter *ugt76c1*-Mutationen durch den Verlust der *Hpy99I*-Schnittstelle in DNA von segregierenden T3-Pflanzen der Linie *G18 #18-4*. M: Marker Hyperladder I; Ho: homozygot für *ugt76c1*-Mutation; He: heterozygot für *ugt76c1*-Mutation.

B) Chromatogramme des *UGT76C1*-Locus der Kandidaten *G18 #4-2 (T4)* und *G18 #18-4 (T3)*, ohne CRISPR/Cas9-T-DNA, belegen das die jeweiligen Mutationen (Insertion von T bzw. C) homozygot waren.

C) *UGT76C2-UGT76C1*-Locus mit den Positionen der T-DNA-Insertionen *ugt76c2-1*, *ugt76c2-2* und *ugt76c1-1* (Dreiecke) und den Mutationen, die durch das CRISPR/Cas9-System erzeugt wurden, die generierten Allele werden im Folgenden als *ugt76c1-2* und *ugt76c1-3* bezeichnet. Es erfolgte dabei die Insertion eines T bzw. C (rot markiert). Beide Insertionen führen zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stopp-Codon. Unausgefüllte Balken: UTRs; schwarze Balken: Exons; Das *Protospacer adjacent motif* (PAM, NGG) ist rot und die sgRNA G18 Sequenz gelb hinterlegt.

3.5.2.4 Die putativen *Off-targets* zeigten keine Mutationen

Ein Problem bei der Verwendung von steuerbaren Nukleasen besteht in deren Spezifität. Erfolgt eine Bindung an anderen Stellen im Genom, können unbeabsichtigte Hintergrundmutationen entstehen. Durch die Verwendung von Vorhersageprogrammen zum Design der *Spacer*-Sequenzen wird bioinformatisch versucht, *Spacer*-Sequenzen, die eine hohe Homologie zu alternativen Sequenzen im Genom aufweisen, zu vermeiden. Das hier zum Design der *Spacer* verwendete Programm CRISP-P (Lei *et al.* 2014) gibt für jeden *Spacer* eine Liste mit möglichen *Off-targets* an (Abbildung 33A). Für die sgRNA G18 wurden sieben mögliche *Off-target*-Sequenzen mit einer hohen Sequenzhomologie zur *UGT76C1*-Zielsequenz angegeben (Abbildung 33A)

Von den sieben angegebenen *Off-target*-Sequenzen wurden in der *ugt76c1,2_a* Mutante zur Überprüfung der *Off-target*-Aktivität sechs durch PCR amplifiziert und sequenziert (Abbildung

33B). Alle sequenzierten Loci zeigten keine Sequenzabweichungen vom WT. Um das Risiko von Hintergrundmutationen zu minimieren, wurden die identifizierten Doppelmutanten zweimal mit WT-Pflanzen zurückgekreuzt und in der zweiten Filialgeneration wieder homozygote Linien isoliert.

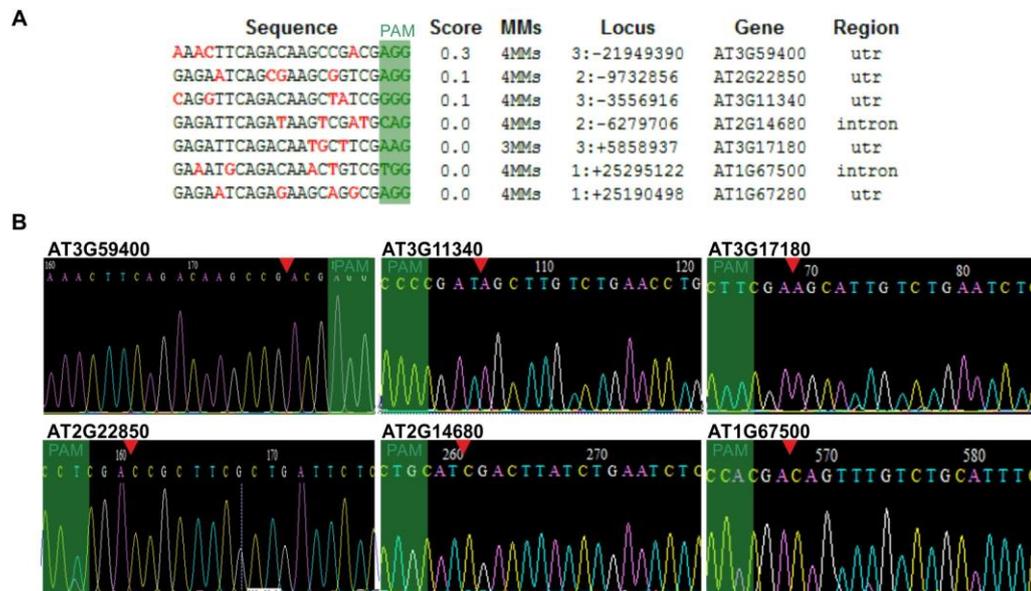


Abbildung 33. Untersuchung der Off-target-Aktivität des zur Mutagenese von *UGT76C1* verwendeten G18-Spacers.

A) Gezeigt sind die von dem Design-Programm CRISPR-P ausgegebenen Daten der vorhergesagten Off-targets für den G18-Spacer. Die Ausgabe umfasst: 1) die Sequenzen möglicher Off-targets, wobei von der *UGT76C1*-Ausgangssequenz abweichende Basen rotmarkiert und die PAM-Sequenzen in Grün hinterlegt sind. 2) Einen Score-Wert der die Wahrscheinlichkeit des Auftretens als Off-target bewertet. 3) Angabe der Anzahl der Sequenzabweichungen (mismatches MMs) zum Ziellocus. 4) Die genaue Position des Off-targets im *Arabidopsis*-Genom (Locus). 5) Die Gen-Identifikationsnummer (Gene). 6) Die Region innerhalb des Gens in dem die sgRNA bindet.

B) Chromatogramme der sequenzierten Off-targets zur Überprüfung der Hintergrundmutationen. Die PAM-Sequenzen sind grün hinterlegt und die Schnittstelle des Cas9-Enzyms ist jeweils mit einem roten Dreieck gekennzeichnet. Die sechs getesteten Off-targets wiesen keine Hintergrundmutationen auf.

3.6 Molekulare und phänotypische Charakterisierung der *ugt76c1,2* Doppel-Knockout-Mutanten

Wie bereits beschrieben sind bisher nur zwei Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen bekannt (Hou *et al.* 2004). Für eine funktionelle Redundanz der beiden Gene spricht, dass Einzelmutanten von *UGT76C1* und *UGT76C2* noch Cytokinin-*N*-Glucoside bilden und keine auffälligen Phänotypen aufweisen (Hou *et al.* 2004, Šmehilová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011). Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob es noch weitere Glucosyltransferasen mit einer Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität gibt. Dafür wurde das Cytokinin-Metabolitspektrum sowie die Expression von Cytokinin-Antwortgenen in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzel-Knockout-Linien *ugt76c1-1*, *ugt76c2-1* und *ugt76c2-2* bestimmt.

3.6.1 Der Doppel-Knockout von *UGT76C1* und *UGT76C2* führt zum Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität

Um zu überprüfen, wie sich der gleichzeitige Knockout von *UGT76C1* und *UGT76C2* auf das Cytokinin-Metabolitspektrum auswirkte, wurden Cytokinin-Messungen in elf Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen durchgeführt. Die Messungen des Cytokinin-Gehalts erfolgte in Kollaboration mit Dr. Ondrej Novák (Palacky Universität, Olomouc, Tschechien). Eine Übersicht über den Cytokinin-Gesamtgehalt und im Einzelnen über die Menge an freien Basen, Ribosiden, Nukleotiden und Zuckerkonjugaten ist in Tabelle 19 dargestellt. Eine umfassendere Übersicht zeigt die Tabelle S3 im Anhang.

Tabelle 19. Cytokinin-Gehalt in *UGT76C1* und *UGT76C2* Einzel- und *ugt76c1,2*-Doppelmutanten im Vergleich zum WT.

Genotype	Gesamt-Cytokinin	Cytokinin-Basen	Cytokinin-Riboside	Cytokinin-Nukleotide	Cytokinin-O-Glucoside	Cytokinin-N-Glucoside
WT	110,35 ± 9,93	0,76 ± 0,24	3,23 ± 0,80	35,77 ± 5,74	14,30 ± 2,96	56,28 ± 6,47
<i>ugt76c1-1</i>	107,81 ± 12,90	2,75 ± 0,74*	3,72 ± 0,81	34,77 ± 8,86	14,01 ± 2,77	52,56 ± 3,35
<i>ugt76c2-1</i>	50,26 ± 3,39*	1,84 ± 0,51*	2,64 ± 0,30	31,28 ± 2,07	12,77 ± 1,64	1,74 ± 0,18*
<i>ugt76c2-2</i>	50,06 ± 4,59*	0,87 ± 0,25	3,88 ± 0,91	27,86 ± 4,59	16,05 ± 1,52	1,41 ± 0,13*
<i>ugt76c1,2 a</i>	47,85 ± 4,00*	1,98 ± 0,52*	3,05 ± 0,59	26,25 ± 2,02*	16,24 ± 1,93	0,33 ± 0,07*
<i>ugt76c1,2 b</i>	52,73 ± 5,43*	1,24 ± 0,39	3,72 ± 0,87	30,51 ± 3,74	16,97 ± 1,68	0,29 ± 0,02*

Die Proben stammten von elf Tage alten, *in vitro*-angezogenen Keimlingen. Für die Messungen wurden jeweils ~ 20 mg Pflanzenmaterial verwendet. Angegeben ist der absolute Gehalt in pmol/g Frischgewicht mit Standardabweichung (n = 5). Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (* = p < 0,05, Wilcoxon-Rangsummentest).

In der *ugt76c1-1*-Einzelmutante waren die Cytokinin-*N*-Glucoside nur leicht reduziert, die Konzentration entsprach ~ 92 % des WTs. Der Knockout von *UGT76C2* führte hingegen zu einer sehr starken Reduktion der Cytokinin-*N*-Glucoside. In den Einzel-Knockout-Linien *ugt76c2-1* und *ugt76c2-2* entsprach der Gesamtgehalt der Cytokinin-*N*-Glucoside nur etwa 3 % bzw. 2,5 % des WTs (Tabelle 19). Die Ergebnisse für die Mutanten *ugt76c1-1* und *ugt76c2-1* stehen im Einklang mit publizierten Daten (Hou *et al.* 2004, Šmehilová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Demnach scheint *UGT76C2* die Hauptkomponente der Cytokinin-*N*-Glucosylierung zu sein. Die Messwerte der Cytokinin-Metabolite der Knockout-Allele

ugt76c2-1 und *ugt76c2-2* ähneln sich stark, wobei in der letzterem die Cytokinin-*N*-Glucoside tendenziell stärker reduziert waren (Tabelle 19).

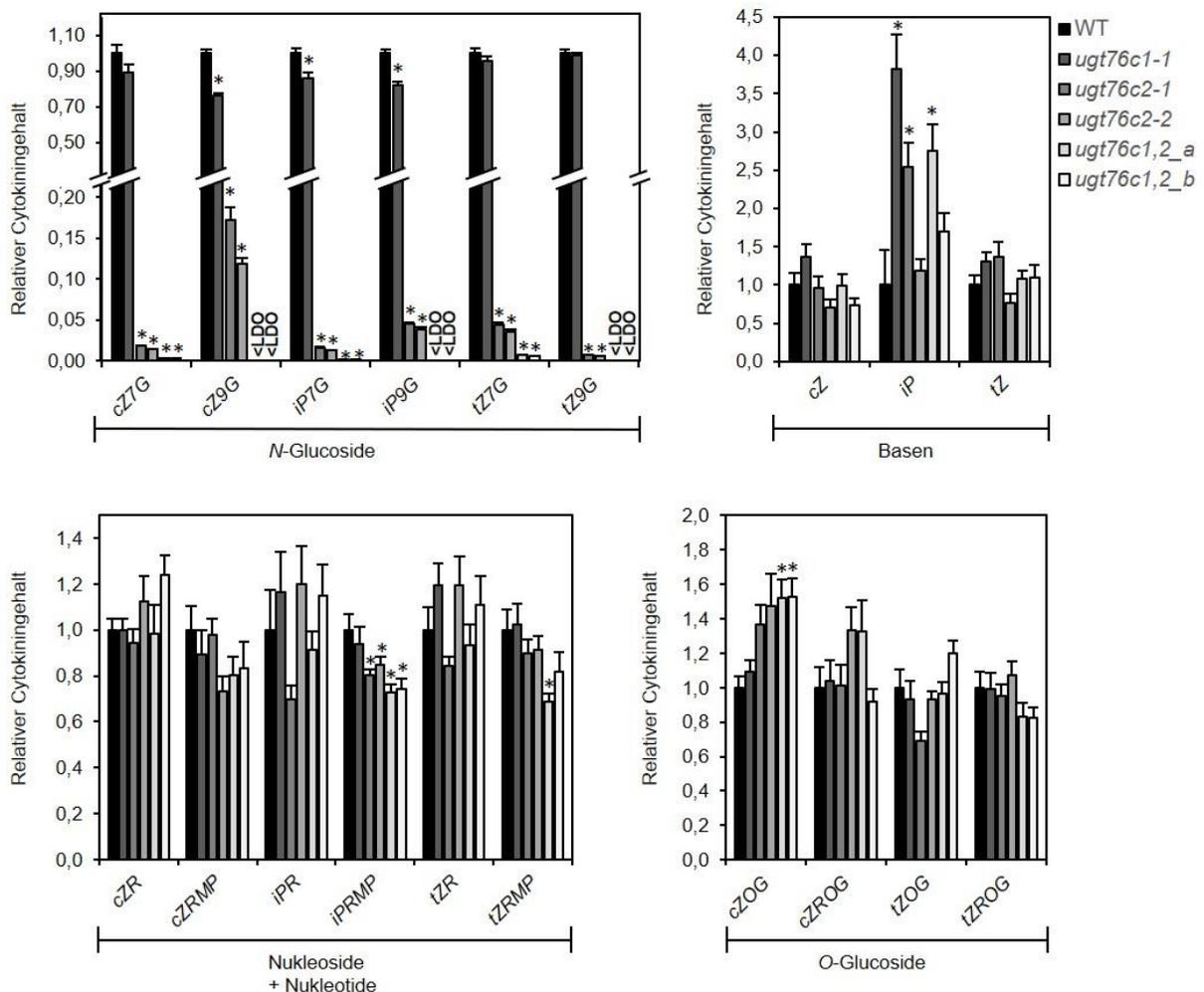


Abbildung 34. *Ugt76c1,2*-Mutanten bilden keine Cytokinin-*N*-Glucoside.

Dargestellt ist der relative Cytokinin-Gehalt in *UGT76C1*- und *UGT76C2*- Einzel- und Doppelmutanten im Vergleich zum WT. Die Proben für die Messungen stammten von elf Tage alten Keimlingen, die unter LT-Bedingungen *in vitro* angezogen wurden. Pro Messungen wurden jeweils ~ 20 mg Pflanzenmaterial verwendet. Angegeben sind die relativen Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 5). Der Wildtyp wurde auf 1 gesetzt. *iP*: *N*⁶-Isopentenyladenin, *tZ*: *trans*-Zeatin, *cZ*: *cis*-Zeatin, *N*-Glucoside (*iP7G*, *iP9G*, *tZ7G*, *tZ9G*, *cZ9G*), *O*-Glucoside (*tZOG*, *tZROG*, *cZOG*, *cZROG*), Nukleoside (*cZR*, *iPR*, *tZR*), Nukleotide (*cZRMP*, *iPRMP*, *tZRMP*). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (p < 0,05, Wilcoxon-Rangsummentest).

Bei den beiden Doppelmutanten *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* lag die Konzentration der Cytokinin-*N*-Glucoside unterhalb (*iP9G*, *tZ9G* und *cZ9G*) oder nah an (*cZ7G*, *iP7G* und *tZ7G*) der Detektionsgrenze (Abbildung 34, Tabelle 19). Demnach führte der gleichzeitige Knockout von *UGT76C1* und *UGT76C2* zu einem vollständigen Verlust von Cytokinin-*N*-Glucosiden. Folglich sind *UGT76C1* und *UGT76C2* die einzigen Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen in *Arabidopsis*

Die Cytokinin-*N*-Glucoside sind die Cytokinin-Metabolite mit der größten Abundanz in *Arabidopsis*. Die Reduktion der Cytokinin-*N*-Glucoside, in den Einzelmutanten von *UGT76C2*

und in den beiden *ugt76c1,2*-Doppelmutanten wirkt sich stark auf den Gesamt-Cytokinin-Gehalt aus. Mit ~47,8 bzw. ~52,7 pmol/g Frischgewicht war der Cytokiningehalt im Vergleich zum WT (~110,35 pmol/g Frischgewicht) in den Mutanten mehr als halbiert (Tabelle 19, Abbildung 34).

3.6.2 Der Verlust der Cytokinin-N-Glucosylierung kann weitgehend kompensiert werden

Die Messungen der freien Cytokinin-Basen, die die aktiven Formen des Cytokinins darstellen, waren sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelmutanten von *UGT76C1* und *UGT76C2* leicht erhöht. Signifikant war der Unterschied für *ugt76c1-1*, *ugt76c2-1* und *ugt76c1,2_a* (Tabelle 19). Dies ist in erster Linie auf eine deutliche Erhöhung der iP-Konzentration zurückzuführen (Abbildung 34, Tabelle S3). Demnach kann die Cytokinin-Homöostase trotz des Verlusts der Cytokinin-N-Glucosylierung in den Mutanten weitgehend aufrechterhalten werden. Weitere Hinweise über die möglichen Kompensationsmechanismen kann die Betrachtung der anderen Cytokinin-Metabolite geben.

Die Vorstufen der aktiven Cytokininbasen sind die Cytokinin-Nukleoside und Cytokinin-Nukleotide. Die Konzentrationen der Cytokinin-Nukleoside waren kaum verändert. Bei den *ugt76c2*-Einzelmutanten und den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten war der Gehalt der Cytokinin-Nukleotide im Vergleich zum WT hingegen etwas verringert. Signifikant war der Unterschied für iPRMP (Abbildung 34). Eine Verringerung der Cytokinin-Nukleotide kann auf eine verminderte Cytokinin-Biosynthese zur Aufrechterhaltung der Cytokinin-Homöostase hindeuten.

Die Konzentrationen der Cytokinin-O-Glucoside von cZ, nicht aber von tZ, waren in den Einzelmutanten von *UGT76C2* und den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten im Vergleich zum WT um ~30 % bis ~50 % erhöht. Bei beiden *ugt76c1,2*-Doppelmutanten war der Unterschied für cZOG signifikant (Abbildung 34, Tabelle S3). Da es sich bei der Cytokinin-O-Glucosylierung ebenfalls um eine Cytokinin-Inaktivierung handelt, könnte eine verstärkte O-Glucosylierungsaktivität ebenfalls der Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase dienen.

Um zu untersuchen, ob sich der Verlust der Cytokinin-N-Glucosylierung auf den Cytokinistatus der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten auswirkte, wurde die Expression von Cytokininreportergenen, den A-Typ-*ARR*-Genen (*ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR15* und *ARR16*), mittels qPCR bestimmt. Deren Expression wird durch Cytokinin induziert und korreliert zumindest bei cytokinindefizienten Pflanzen oft mit dem Cytokinin-Status. Für *ugt76c1,2_a* waren die Expressionslevel von *ARR5*, *ARR6* und *ARR16* kaum verändert (Abbildung 35). Die Expression von *ARR7* und *ARR15* waren im Vergleich zum WT um ~43 % und ~53 % im erhöht. Für *ARR7* war der Unterschied zum WT signifikant (Abbildung 35). Die leicht erhöhten Expressionslevel von *ARR7* könnten auf einen schwach erhöhten Cytokinin-Status der

ugt76c1,2_a-Mutante hinweisen, was im Einklang mit den leicht erhöhten iP-Konzentrationen steht (Abbildung 34, Tabelle S3).

A-Typ ARR	WT	<i>ugt76c1,2 a</i>
<i>ARR5</i>	1,00 ± 0,03	1,06 ± 0,02
<i>ARR6</i>	1,00 ± 0,08	1,08 ± 0,08
<i>ARR7</i>	1,00 ± 0,19	1,53 ± 0,09 *
<i>ARR15</i>	1,00 ± 0,17	1,43 ± 0,23
<i>ARR16</i>	1,00 ± 0,07	1,16 ± 0,08
CK-Perzeption		
<i>AHK2</i>	1,00 ± 0,06	1,22 ± 0,15
<i>AHK3</i>	1,00 ± 0,09	0,86 ± 0,14
<i>AHK4</i>	1,00 ± 0,08	0,69 ± 0,14
CK-Biosynthese & Aktivierung		
<i>IPT3</i>	1,00 ± 0,05	0,83 ± 0,02 *
<i>IPT5</i>	1,00 ± 0,22	0,72 ± 0,13
<i>IPT7</i>	1,00 ± 0,16	0,86 ± 0,11
<i>LOG3</i>	1,00 ± 0,08	0,96 ± 0,10
<i>LOG4</i>	1,00 ± 0,10	1,11 ± 0,15
<i>LOG5</i>	1,00 ± 0,12	0,96 ± 0,14
<i>LOG7</i>	1,00 ± 0,24	1,09 ± 0,20
<i>CYP735A2</i>	1,00 ± 0,23	0,70 ± 0,15
CK-Degradation		
<i>CKX1</i>	1,00 ± 0,05	0,87 ± 0,16
<i>CKX2</i>	1,00 ± 0,25	0,98 ± 0,16
<i>CKX3</i>	1,00 ± 0,24	2,08 ± 0,40
<i>CKX4</i>	1,00 ± 0,19	1,10 ± 0,30
<i>CKX5</i>	1,00 ± 0,37	2,68 ± 0,56 *
<i>CKX6</i>	1,00 ± 0,14	1,43 ± 0,21
CK-Glucosylierung		
<i>UGT85A1</i>	1,00 ± 0,09	1,54 ± 0,07 *
<i>UGT73C1</i>	1,00 ± 0,27	0,98 ± 0,27

Abbildung 35. Bestimmung des Cytokinin-Status und der Regulation zur Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase in *ugt76c1,2*-Mutanten.

qPCR-Analyse der Expressionsniveaus von A-Typ-ARR-Genen sowie von Genen der Cytokininrezeptoren und einiger Komponenten des Cytokinin-Metabolismus in elf Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel ± Standardfehler von *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zum WT, der auf 1 gesetzt wurde (n = 5). Als Referenzgene dienten *TAFII15* und *PP2A*. Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (Wilcoxon-Rangsummentest, p < 0,05). Das Experiment wurde bis zu viermal wiederholt, repräsentative Ergebnisse wurden ausgewählt.

Um zu verstehen, wie die *ugt76c1,2*-Mutanten den Verlust der Cytokinin-N-Glucosylierung kompensieren, wurden mittels qPCR die Expressionslevel der Gene der Cytokininrezeptoren und der wichtigsten Enzyme, welche die Cytokininhomöostase regulieren, für die *ugt76c1,2_a*-Mutante bestimmt. Die Transkriptlevel der Cytokininrezeptorgene waren nicht signifikant verändert. Das Transkriptlevel von *AHK4* war im Vergleich zum WT um etwa 20 % erhöht, wohingegen die von *AHK3* und *AHK4* um 14 % bzw. 31 % verringert waren (Abbildung 35). Die Cytokinin-Biosynthese *IPT3*, *IPT5* und *IPT7* waren in der *ugt76c1,2_a*-Mutante tendenziell schwächer exprimiert als im WT (14-28 %), wobei der Unterschied zum WT nur für *IPT3* signifikant war (Abbildung 35). Die Expressionslevel der *LOG*-Gene unterschieden sich in der *ugt76c1,2_a*-Mutante kaum vom WT (Abbildung 35). Das Expressionslevel von *CYP735A2* war in beiden *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zum WT um 30 % verringert (Abbildung 35).

Die Expressionslevel der für die Degradation des Cytokinins verantwortlichen *CKX*-Gene waren in den Mutanten teilweise unverändert (*CKX2* und *CKX4*), leicht verringert im Fall von *CKX1* (13 %) oder erhöht (*CKX3*, *CKX5* und *CKX6*). Für *CKX3* war der Unterschied signifikant (Abbildung 35).

Die O-Glucosylierung des Cytokinins stellt einen weiteren Mechanismus der Cytokinin-Inaktivierung dar. Es wurden bisher drei vermeintliche Cytokinin-O-Glucosyltransferasen identifiziert (*UGT85A1*, *UGT73C1* und *UGT73C5*). In der *ugt76c1,2_a*-Mutante war das Expressionslevel von *UGT85A1* im Vergleich zum WT signifikant um ~46 % erhöht. Das Expressionslevel von *UGT73C1* war in der *ugt76c1,2_a*-Mutante unverändert.

Die leichten Veränderungen des Cytokinin-Metabolitspektrums in *ugt76c1,2* korrelierte mit den veränderten Expressionslevels der Gene, die für die Aufrechterhaltung der Cytokinin-Homöostase und Signalperzeption verantwortlich sind. Auch wenn die beobachteten Veränderungen relativ mild waren sind diese ein Hinweis dafür, dass Mechanismen aktiv sind, um dem Verlust der Cytokinin-N-Glucosylierung entgegenzuwirken.

Um zu untersuchen, ob die Cytokinin-Sensitivität in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten verändert ist, wurde die Reaktion des Wurzelwachstums auf cytokininhaltigem Medium untersucht. Cytokinin führt bei *Arabidopsis* zu einer Reduktion des Primärwurzelwachstums und einer verringerten Lateralwurzelbildung (Werner *et al.* 2001). Die Untersuchungen zeigten, dass die Hemmung der Primärwurzelelongation und des Seitenwurzelwachstums bei *ugt76c1,2* im gleichen Maß erfolgte wie beim WT (Abbildung 36). Die Cytokinin-Sensitivität des Wurzelwachstums auf das exogen zugegebene Cytokinin wurde durch den Verlust der Cytokinin-N-Glucosylierung nicht beeinträchtigt. Dieses Ergebnis war unerwartet, da Cytokinin nach exogener Zugabe neben dem Abbau in Adenin und Adenosin vor allem durch N7- und -N9-Glucosylierungen inaktiviert wird (Letham *et al.* 1983, Mcgaw *et al.* 1984, Niemann *et al.* 2015, Parker *et al.* 1973).

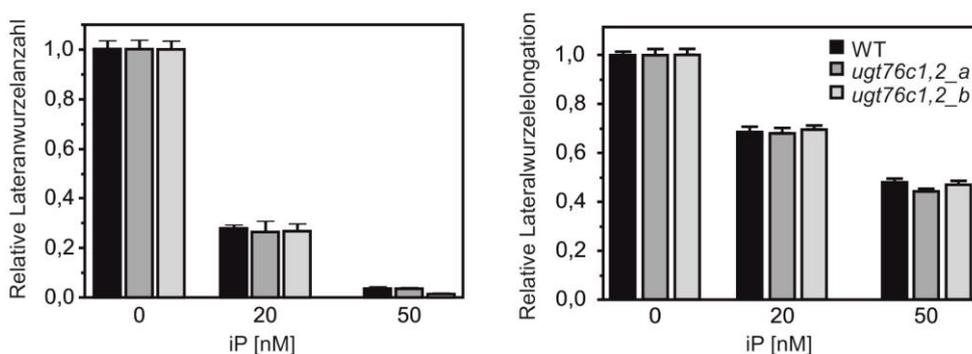


Abbildung 36. Cytokinin-Sensitivität des Wurzelwachstums von *ugt76c1,2*-Mutanten ist nicht verändert.

Reaktion des Wurzelwachstums auf exogene iP-Zugabe. Untersucht wurde der Effekt der Cytokininzugabe auf die Elongation der Hauptwurzel zwischen Tag 2 und Tag 9 nach der Keimung und auf die Seitenwurzelbildung. Dargestellt sind relative Mittelwerte mit Standardfehler der relativen Wurzelelongation und der relativen Seitenwurzelanzahl von *ugt76c1,2_a*- und *ugt76c1,2_b*-Mutanten im Vergleich zum WT (n = 9-24).

Um besser zu verstehen, wie die Pflanzen den Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung kompensieren, wurden mittels qPCR die Expressionslevel von Cytokininantwortgenen und Komponenten der Cytokininhomöostase unmittelbar nach der Cytokininzugabe untersucht. Um sicherzustellen, dass die Reaktion nicht gesättigt ist, erfolgte die Induktion mit zwei verschiedenen BA-Konzentrationen 1 nM und 100 nM. Die Probenahme für die Analyse erfolgte 20 min und 120 min nach der Induktion. Um den Effekt des Cytokinins auf den WT und auf die *ugt76c1,2*-Doppelmutante bewerten zu können, wurden die Daten jeweils auf die unbehandelte Kontrollprobe bezogen. Die Cytokinin-Induktion war erfolgreich. Das zeigten die Expressionslevel der A-Typ-*ARR*-Gene *ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR15* und *ARR16*, die bereits 20 min nach der BA-Behandlung deutlich erhöht waren, dabei war die Induktion dosisabhängig. Nach 120 min gingen die *ARR*-Expressionslevel wieder zurück, waren aber immer noch erhöht (Abbildung 37).

Ein Ziel der Untersuchung war zu testen, ob die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten eine veränderte Cytokinin-Sensitivität aufwiesen. In der Mutante zeigten die Transkriptmengen der A-Typ *ARR*-Gene unterschiedliche Reaktionen auf die Cytokiningabe. Für *ARR5* und *ARR6* war die Induktion der Transkription für alle gemessenen Zeitpunkte und Cytokinin-Konzentrationen für beide Genotypen signifikant und die Expressionszunahme war jeweils in der *ugt76c1,2_a*-Mutante stärker als im WT (Abbildung 37). Bei *ARR7* und *ARR15* hingegen war für alle signifikanten Expressionsveränderungen die Reaktion auf das exogen applizierte Cytokinin in der *ugt76c1,2_a*-Mutante schwächer, was sich durch eine geringere Transkriptzunahme als im WT äußerte (Abbildung 37). Bei *ARR16* konnten signifikante Expressionsänderungen nur bei der Induktion mit 100 nM beobachtet werden (Abbildung 37). Die Reaktion der Mutante war dabei nach 20 min etwas stärker und nach 120 min etwas schwächer als im WT. In Bezug auf die Cytokinin-Sensitivität weist die stärkere Induktion von *ARR5* und *ARR6* auf eine erhöhte und die schwächere Induktion von *ARR7* und *ARR15* auf eine verminderte Cytokinin-Sensitivität der *ugt76c1,2_a*-Mutante hin.

Die Expression des *CYP735A2*-Gens wird ebenfalls durch Cytokinin induziert (Bhargava *et al.* 2013). Allerdings konnte eine Induktion der Expression nur bei der Behandlung mit 100 nM BA beobachtet werden. Die Zunahme der Expression in der *ugt76c1,2_a*-Mutante war dabei für den ersten Zeitpunkt stärker und für den zweiten schwächer. Bei der Induktion mit 1 nM BA wurde hingegen eine Abnahme der Expression gemessen, für den WT war der Unterschied für den zweiten Zeitpunkt signifikant und die Reaktion im Vergleich zur *ugt76c1,2_a*-Mutante stärker. Aus diesen Beobachtungen können hinsichtlich der Cytokinin-Sensitivität keine Rückschlüsse gezogen werden.

		Mock		1 nM				100 nM							
		WT		<i>ugt76c1,2_a</i>		WT		<i>ugt76c1,2_a</i>		WT		<i>ugt76c1,2_a</i>			
		RQ	± SE	RQ	± SE	RQ	± SE	RQ	± SE	RQ	± SE	RQ	± SE		
<i>ARR5</i>	20'	1,00	± 0,09	1,00	± 0,08	3,35	± 0,53 *	<	3,77	± 0,37 *	45,48	± 1,62 *	<	54,25	± 5,57 *
	120'	1,00	± 0,02	1,00	± 0,04	1,45	± 0,01 *	<	1,78	± 0,11 *	13,06	± 1,38 *	<	14,26	± 0,93 *
<i>ARR6</i>	20'	1,00	± 0,10	1,00	± 0,07	4,72	± 0,58 *	<	5,19	± 0,91 *	27,56	± 0,73 *	<	32,42	± 2,09 *
	120'	1,00	± 0,05	1,00	± 0,07	1,13	± 0,04	<<	2,02	± 0,22 *	8,86	± 0,72 *	<	9,85	± 0,75 *
<i>ARR7</i>	20'	1,00	± 0,08	1,00	± 0,08	2,29	± 0,28 *	>>	1,31	± 0,51	23,63	± 2,79 *	>	18,04	± 3,53 *
	120'	1,00	± 0,09	1,00	± 0,10	1,45	± 0,31		0,95	± 0,08	12,40	± 1,35 *	>>	8,09	± 1,61 *
<i>ARR15</i>	20'	1,00	± 0,09	1,00	± 0,01	0,77	± 0,11		1,14	± 0,17	56,79	± 3,67 *	>	50,32	± 3,02 *
	120'	1,00	± 0,22	1,00	± 0,04	0,92	± 0,16		0,90	± 0,07	26,86	± 5,05 *	>	21,38	± 1,31 *
<i>ARR16</i>	20'	1,00	± 0,07	1,00	± 0,07	1,06	± 0,26		0,96	± 0,07	2,66	± 0,20 *	>	2,51	± 0,25 *
	120'	1,00	± 0,16	1,00	± 0,06	1,02	± 0,07		1,08	± 0,15	3,06	± 0,13 *	<	3,55	± 0,50 *
<i>CKX3</i>	20'	1,00	± 0,15	1,00	± 0,03	1,57	± 0,34		0,93	± 0,18	2,55	± 0,49 *	>	2,00	± 0,32 *
	120'	1,00	± 0,13	1,00	± 0,14	0,91	± 0,11		0,88	± 0,24	4,03	± 0,42 *	<	4,10	± 1,13 *
<i>CKX4</i>	20'	1,00	± 0,15	1,00	± 0,28	2,14	± 0,31 *	>	1,69	± 0,88	4,72	± 1,09 *	>	4,10	± 0,51 *
	120'	1,00	± 0,28	1,00	± 0,04	1,37	± 0,27		1,47	± 0,22	12,46	± 1,66 *	>	11,44	± 3,89 *
<i>CKX5</i>	20'	1,00	± 0,12	1,00	± 0,17	1,45	± 0,29		2,34	± 1,40	4,33	± 0,69 *	>>	2,11	± 0,26 *
	120'	1,00	± 0,48	1,00	± 0,08	1,28	± 0,11		0,93	± 0,23	2,76	± 0,53		2,72	± 0,85
<i>CYP735A2</i>	20'	1,00	± 0,18	1,00	± 0,19	0,94	± 0,15		1,13	± 0,15	2,08	± 0,36 *	>	1,63	± 0,16
	120'	1,00	± 0,13	1,00	± 0,13	0,45	± 0,10 *	>>	0,59	± 0,08	6,63	± 1,02 *	<	8,87	± 2,58 *
<i>IPT3</i>	20'	1,00	± 0,08	1,00	± 0,16	0,94	± 0,09		0,81	± 0,34	0,93	± 0,09		0,78	± 0,11
	120'	1,00	± 0,13	1,00	± 0,05	0,60	± 0,05	<<	0,41	± 0,06 *	0,48	± 0,10	<	0,45	± 0,12 *
<i>IPT5</i>	20'	1,00	± 0,11	1,00	± 0,11	0,87	± 0,14 *	<<	0,57	± 0,09 *	0,31	± 0,07 *	<	0,22	± 0,02 *
	120'	1,00	± 0,27	1,00	± 0,07	0,96	± 0,17		0,37	± 0,06	0,10	± 0,01 *	>>	0,15	± 0,05 *
<i>UGT85A1</i>	20'	1,00	± 0,09	1,00	± 0,05	1,23	± 0,09	<<	1,66	± 1,02 *	1,39	± 0,19		0,82	± 0,10
	120'	1,00	± 0,09	1,00	± 0,11	1,29	± 0,28		0,55	± 0,08	0,74	± 0,07	<<	0,47	± 0,13 *

Abbildung 37. Cytokinin-Sensitivität der *ugt76c1,2*-Mutanten und Aktivierung der Cytokininhomöostase nach exogener Cytokininzugabe.

qPCR-Analyse der Expressionsniveaus von A-Typ-ARR-Genen sowie von Genen einiger Komponenten des Cytokinin-Metabolismus in elf Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen von *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zum WT. Die Messungen erfolgten 20 und 120 min nach der Induktion mit 1 nM und 100 nM BA. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel mit Standardfehlern (n = 5). Die Daten wurden jeweils auf den Wert der Mock-Kontrolle bezogen. Als Referenzgene dienten *TAF115* und *PP2A*. Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen der Mock-behandelten und der mit cytokinininduzierten Probe (p < 0,05, Wilcoxon-Rangsummentest). Größer- und Kleiner-als-Zeichen geben an, ob signifikante Expressionsänderung der *ugt76c1,2_a*-Mutante im Vergleich zum WT stärker (>) oder schwächer (<) waren. Für prozentuale Veränderungen, die größer als 30 % und zumindest für einen Genotyp signifikant waren, erfolgte die Angabe durch „>>“ bzw. „<<“.

Zu den bekannten Cytokininantwortgenen gehören auch die Cytokininoxidasen *CKX3*, *CKX4* und *CKX5* (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012). Der WT zeigte für die untersuchten *CKX*-Gene für beide Cytokinin-Konzentrationen und für beide Zeitpunkte eine moderate Zunahme der Expressionslevel. Dabei stellte die *CKX3*-Expression nach 120-minütiger Inkubation mit 1 nM BA eine Ausnahme dar, hier wurde eine leichte Abnahme der Transkriptlevel beobachtet. Bei der *ugt76c1,2_a*-Mutante wurde ebenfalls eine Zunahme der *CKX*-Transkripte gemessen, diese war bei den Messwerten der Induktion mit 100 nM BA für alle *CKX*-Gene signifikant. Im Vergleich

zum WT war die Expressionszunahme in der *ugt76c1,2*-Mutante schwächer, dabei stellte einzig das *CKX3*-Transkriptlevel nach 120-minütiger Inkubation mit 100 nM BA eine Ausnahme dar. Diese Beobachtungen waren unerwartet, da in der Mutante ein wichtiger Inaktivierungsweg für Cytokinin fehlte. Der Erwartung nach sollte die Expression der *CKX*-Gene in der Doppelmutante stärker induziert werden als im WT, um dem Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung entgegen zu wirken.

Die Expression des Cytokinin-*O*-Glucosyltransferase-Gens *UGT85A1* wurde im WT durch die Cytokininbehandlung nicht signifikant verändert. In der *ugt76c1,2_a*-Mutante war hingegen eine signifikante Zunahme des Transkriptlevels nach 20-minütiger Inkubation mit 1 nM BA und eine signifikante Abnahme nach 120-minütiger Inkubation mit 100 nM BA zu beobachten. Letzteres war unerwartet, da die *O*-Glucosylierung von Cytokinins dessen Inaktivierung bewirkt. Dennoch, in beiden Fällen reagierte die Mutante sensitiver auf die Cytokininzugabe (Abbildung 37).

Die Expressionsniveaus der Cytokinin-Biosynthesegene *IPT3* und *IPT5* wurden durch die Cytokinin-Zugabe deutlich reduziert. Einzig bei *IPT5* war nach 120-minütiger Inkubation mit 100 nM BA die Abnahme des Transkriptlevels im WT stärker als in der *ugt76c1,2_a*-Mutante. Bei allen anderen Veränderungen der Expressionslevel, die zumindest für einen Genotyp signifikant waren, zeigte die *ugt76c1,2_a*-Mutante eine sensitivere Reaktion als der WT. Eine stärkere Hemmung der Biosynthese könnte dem Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung entgegenwirken.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass in den *ugt76c1,2*-Mutanten die Reaktionen auf das exogen applizierte Cytokinin verändert war. In Bezug auf die Cytokinin-Sensitivität kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine klare Aussage getroffen werden. Die Untersuchungen belegen aber die erstaunliche Kapazität der Pflanzen den Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung zu kompensieren.

3.6.3 Phänotypische Charakterisierung der *ugt76c1,2*-Mutanten

Die phänotypische und molekulare Charakterisierung von Knockout-Mutanten kann weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung der ausgeschalteten Gene geben und inwieweit sich dies auf die Cytokininhomöostase auswirkt. Veränderungen des Cytokinin-Status oder der Cytokininlevel in Pflanzen können pleiotrope Veränderungen des Pflanzenwachstums und der Pflanzenentwicklung zur Folge haben (Bartrina *et al.* 2011, Miyawaki *et al.* 2006). Die *UGT76C2*-Reporterstudie zeigte, dass die *UGT76C2*-Reporter in allen untersuchten Entwicklungsphasen gewebespezifisch exprimiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.3). Es ist daher anzunehmen, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung an der Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase in den untersuchten Entwicklungsphasen und Geweben beteiligt ist.

3.6.3.1 Wachstum der *ugt76c1,2*-Mutanten in der vegetativen Phase

In der vegetativen Wachstumsphase wirkten die *ugt76c1,2*-Mutanten teilweise größer und kräftiger als der WT. Das Frischgewicht der Rosetten war im Vergleich zum WT allerdings nicht verändert (Abbildung 38A und B).

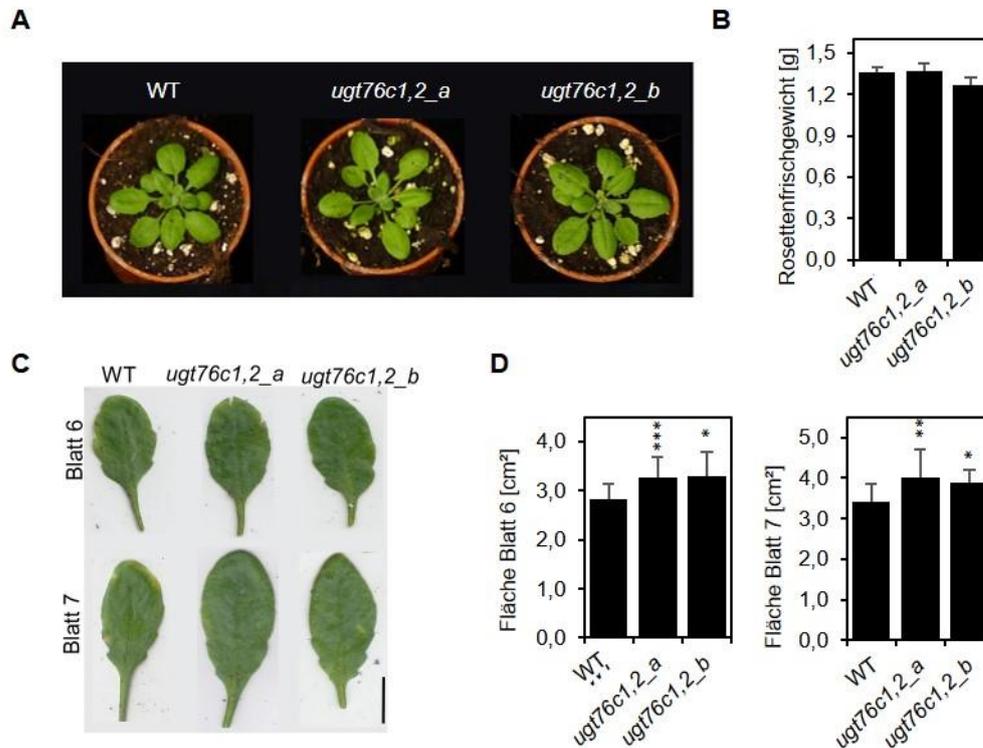


Abbildung 38. Auswirkung des Verlusts der Cytokinin-N-Glucosylierung auf das vegetative Sprosswachstum.

A) Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen Pflanzen des WT und der Linien *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* (21 TNK).

B) Bestimmung des Frischgewichtes der Rosetten von auf Erde und unter im Langtag angezogenen Pflanzen des WTs und der Linien *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* (32 TNK). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 15-40).

C) Vergleich des sechsten und siebten Blattes des WTs und der Linien *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* (32 TNK).

D) Quantifizierung der Blattflächen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 9-22). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (* = p < 0,05; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, Wilcoxon-Rangsummentest).

Die Untersuchungen der Blattflächen zeigten, dass das sechste und siebte Blatt bei den *ugt76c1,2*-Mutanten im Vergleich zum WT jeweils signifikant um ~15,6 % bzw. ~17,0 % und für *ugt76c1,2_b* um ~17,4 % bzw. ~13,41 % vergrößert war (Abbildung 38C und D). Teilweise bildeten die *ugt76c1,2*-Mutanten auch deutlich vergrößerte Rosetten (siehe Anhang, Abbildung S3). Interessanterweise scheint der Einfluss der Cytokinin-N-Glucosylierung auf die Regulation der Blatt- und Rosettengröße konditional zu sein, da diese Merkmale nicht immer zu beobachten war.

3.6.3.2 Einfluss der Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf Entwicklungsübergänge

Es wurde gezeigt, dass Cytokinin auch Entwicklungsübergänge beeinflusst (Werner 2016). Zur Beurteilung, ob die Cytokinin-*N*-Glucosylierung einen Einfluss auf den Übergang von der juvenilen zur adulten vegetativen Wachstumsphase hat, bzw. ob der Cytokininstatus in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten verändert ist, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sören Werner (Freie Universität Berlin, Berlin) die Anzahl der juvenilen Blätter untersucht, welche sich unter anderem durch die Abwesenheit abaxialer Trichome auszeichnen (Telfer *et al.* 1997).

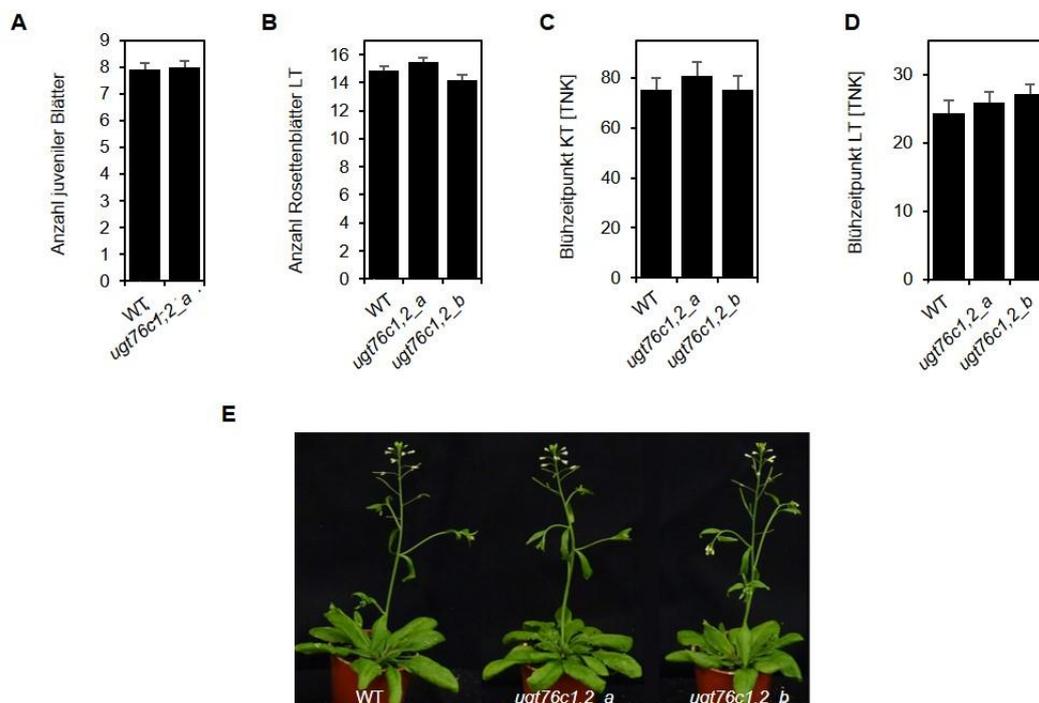


Abbildung 39. Bei den *ugt76c1,2*-Mutanten sind die Übergänge von der juvenilen zur adulten vegetativen Phase und von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase unverändert.

A) Anzahl juveniler Rosettenblätter (Blätter ohne abaxiale Trichome) der Mutantenlinien *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* im Vergleich zum WT, unter Kurztagbedingungen (KT). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n > 22$). Diese Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Sören Werner (Freie Universität Berlin, Berlin).

B) Anzahl der Rosettenblätter zum Blühzeitpunkt der Linien *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* im Vergleich zum WT, unter Langtagbedingungen. Der Blühzeitpunkt wurde definiert als Zeitpunkt, an dem der Infloreszenzstängel 0,5 cm lang war. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 15-22$).

C) und **D)** Blühzeitpunkt (TNK) unter Kurz- (C) und Langtagbedingungen (D). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardfehler ($n > 21$).

E) Sprossphänotyp von auf Erde und unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen des WTs und der Linien *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* (33 TNK).

Deren Anzahl war im Vergleich zum WT nicht verändert (Abbildung 39A). Der Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase kann durch die Anzahl der Blätter zum Zeitpunkt des Blühens sowie durch die Anzahl der Tage bis zum Blühbeginn charakterisiert werden. Die Anzahl der Blätter zum Blühbeginn unter Langtagbedingungen, als auch die Anzahl der Tage bis zum Blühbeginn unter Kurz- und unter Langtagbedingungen waren im Vergleich zum WT bei den *ugt76c1,2*-Mutanten nicht signifikant verändert (Abbildung 39A-E).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung Entwicklungsübergänge nicht beeinflusst oder dass der Verlust dieses Stoffwechselweges kompensiert werden kann.

Für die Beurteilung einer Veränderung der Induktion der natürlichen Blattseneszenz in den *ugt76c1,2*-Mutanten wurde im Verlauf der Entwicklung zwischen Tag 32 und 41 nach der Keimung jeweils von Blatt 6 und 7 die photochemische Effizienz des Photosystems II (Fv/Fm) bestimmt. Der Fv/Fm-Wert nimmt im Verlauf der natürlichen Seneszenz ab. Bei beiden *ugt76c1,2*-Mutanten war die Abnahme der Fv/Fm-Werte ab Tag 37 etwas verzögert, was auf eine spätere Initiation der Blattseneszenz hindeutet (Abbildung 40A und B).

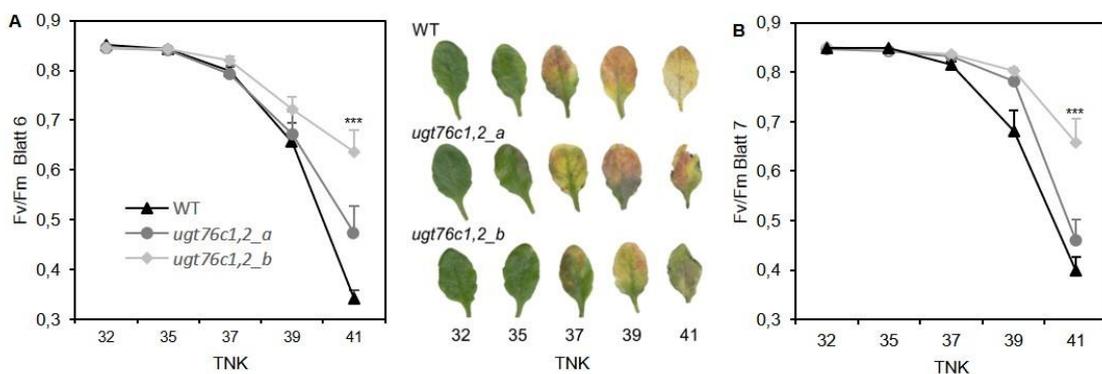


Abbildung 40. Die natürliche Blattseneszenz ist in *ugt76c1,2*-Mutanten verzögert.

Untersuchung der photochemischen Effizienz des Photosystems II (Fv/Fm) in Blatt 6 (A) und 7 (B) im Laufe der Entwicklung von Pflanzen des WTs im Vergleich zu *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b*-Mutanten über die Zeit. Die Anzucht erfolgte unter Langtagbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern ($n \geq 9$). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (***) ($p < 0,001$; Wilcoxon-Rangsummentest).

3.6.3.3 Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung reguliert die Größe und Aktivität des apikalen Sprossmeristems

Es ist bekannt, dass Cytokininüberschuss-Mutanten wie *ckx3,5* größere Infloreszenzmeristeme mit einer erhöhten meristematischen Aktivität besitzen, insgesamt mehr Blüten produzieren und längere und dickere Infloreszenzstängel aufweisen (Bartrina *et al.* 2011). Das Plastochron der Blüten war bei den *ugt76c1,2*-Mutanten signifikant verkürzt (Abbildung 41A). Dies weist auf eine erhöhte Aktivität des Infloreszenzmeristems hin. Die *ugt76c1,2*-Mutanten bildeten am Hauptstängel mehr Schoten als der WT. Die Unterschiede zum WT waren signifikant (Abbildung 41B und C). In Bezug auf die Schotendichte (Abbildung 41D), die Anzahl der Seitensprosse (Abbildung 41F) und die Verzweigung des Hauptstängels (Abbildung 41G) zeigten die *ugt76c1,2*-Mutanten im Vergleich zum WT keine signifikanten Unterschiede. Die Infloreszenzstängel wirkten im Vergleich zum WT etwas kräftiger (Abbildung 41E).

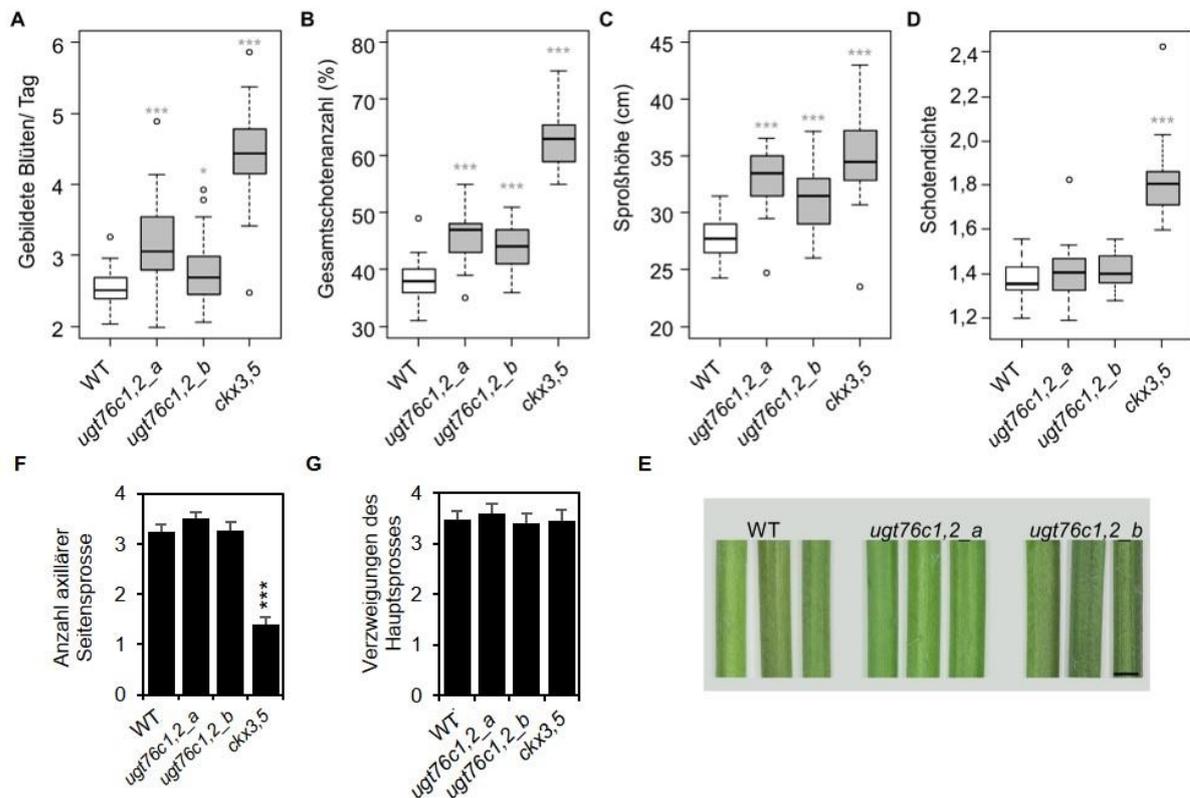


Abbildung 41. Die *ugt76c1,2*-Mutanten weisen eine erhöhte Blütenbildungsrate auf und produzieren mehr Schoten.

A) bis **D)** Blütenbildungsrate (**A**), Gesamtschotenanzahl am Hauptspross (**B**), Sprosshöhe (**C**) und Schotendichte (**D**) von *ugt76c1,2*- und *ckk3,5*-Mutanten sowie von Pflanzen des WT. Die Quantifizierung wurde dreimal in unabhängigen Experimenten wiederholt.

F) und **G)** Anzahl der axillären Seitensprosse (**F**) und der Verzweigung des Hauptsprosses (**G**) von Pflanzen des WT und von *ckk3,5* sowie *ugt76c1,2*-Mutanten. Dargestellt sind relative Mittelwerte mit Standardfehler.

E) Stängel der Infloreszenzen, 2 cm über der Rosette, von Pflanzen des WT und von *ugt76c1,2*-Mutanten. Der Maßstab entspricht 1 mm.

Die Anzucht der verwendeten Pflanzen erfolgte auf Erde ($n > 20$). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; Wilcoxon-Rangsummentest).

Aufgrund der erhöhten Aktivität des SAM und dem Fund, dass *UGT76C2* im Meristem domänenspezifisch exprimiert war (Abschnitt 3.2.3, Abbildung 41A), wurde untersucht, ob sich der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung auch auf die Größe des Meristems auswirkt. In Zusammenarbeit mit Dr. Benoit Landrein (*University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien*) wurde der Plastochronwert und die Größe des Infloreszenzmeristems mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt. Aus zeitlichen Gründen wurden die nachfolgenden Arbeiten nur mit der *ugt76c1,2_a*-Mutante durchgeführt. Die Meristeme der *ugt76c1,2_a*-Mutanten waren im Vergleich zum WT sichtbar vergrößert (Abbildung 42A). Die Quantifizierung der Meristemgröße bestätigte diese Beobachtung, der Größenunterschied zum WT war signifikant (Abbildung 42B).

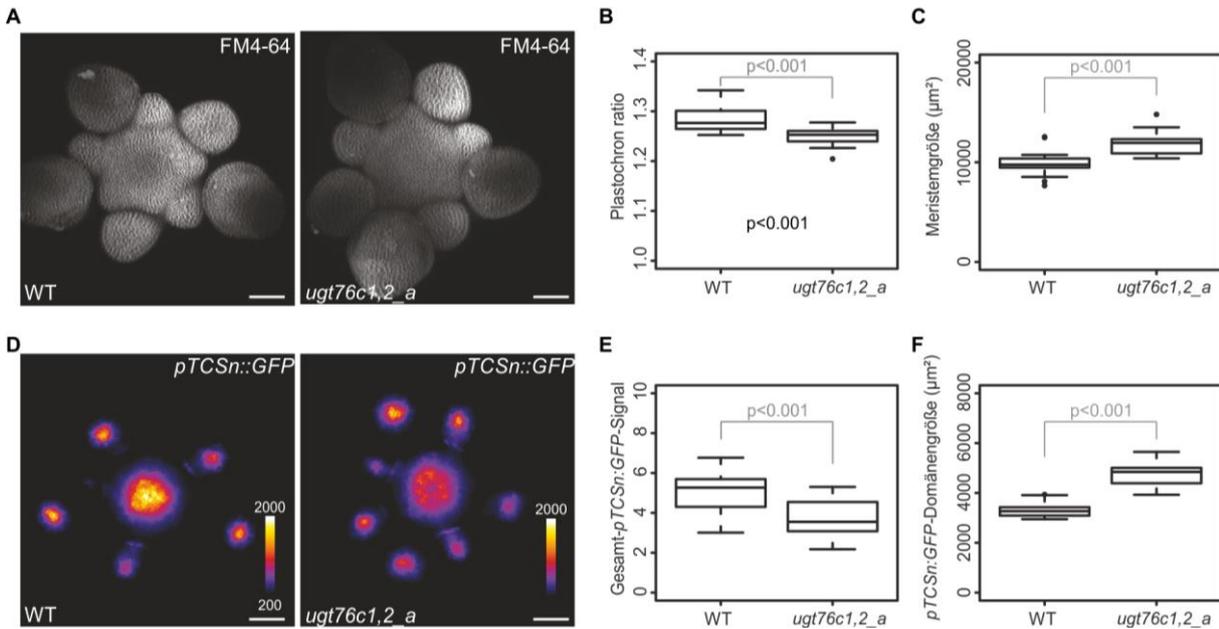


Abbildung 42. Die *ugt76c1,2_a*-Mutante bilden vergrößerte und aktivere Sprossmeristeme mit einer veränderten Cytokininantwort.

A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Infloreszenzmeristemen von *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zum WT. Der Maßstab entspricht 50 µm. Die Plasmamembranen wurden mit FM4-64 gefärbt.

B) Meristemgröße von Pflanzen des WT und der Linie *ugt76c1,2_a*.

C) Plastochronwert von Blütenprimordien von Pflanzen des WT und der Linie *ugt76c1,2_a*. Der Plastochronwert ist invers proportional zu der Entwicklungsrate von Blütenprimordien (Landrein *et al.* 2015).

D) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Infloreszenzmeristemen des WT und *ugt76c1,2_a*-Mutanten, die den Cytokinin-Reporter *pTCSn::GFP* exprimierten.

E) und F) Gesamt-*pTCSn::GFP*-Signal (**E**) und Größe der *pTCSn::GFP*-Domäne (**F**).

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen ($n \geq 21$). Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Benoit Landrein (*University of Cambridge*, Cambridge, Großbritannien) durchgeführt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT. (***) = $p < 0,001$.

Um die Aktivität der Infloreszenzmeristeme zu beurteilen, wurde der Plastochronwert bestimmt. Dabei wird die Bildungsrate der Blütenprimordien aus der Fläche zwischen den Primordien ermittelt. Der berechnete Plastochronwert ist invers proportional zur Entwicklungsrate (Landrein *et al.* 2015). Bei *ugt76c1,2_a* war der Plastochronwert signifikant kleiner als beim WT, damit war die Entwicklungsrate der Primordien größer (Abbildung 42C). Die bisherigen Ergebnisse konnten somit bestätigt werden und es konnte gezeigt werden, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Regulation der Aktivität und der Größe des SAM funktionell relevant ist und diese negativ reguliert.

Um zu untersuchen, ob der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung Auswirkungen auf die Cytokinin-Antwort im SAM hat, wurde in den Infloreszenzmeristemen von *ugt76c1,2_a* die Aktivität des synthetischen Cytokinin-Reporterkonstrukts *pTCSn::GFP* (Zürcher *et al.* 2013) untersucht. Überraschenderweise war das Gesamt-GFP-Signal des *pTCSn::GFP*-Reporters in *ugt76c1,2_a* schwächer als im WT (Abbildung 42D und E). Die Expressionsdomäne von *pTCSn::GFP* war in der *ugt76c1,2_a*-Mutante allerdings deutlich größer als im WT (Abbildung 42D). Die Quantifizierung ergab, dass der Unterschied zum WT in beiden Fällen signifikant war

(Abbildung 42E und F). Der veränderte Cytokinin-Output im Meristem belegt die Relevanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase im Meristem.

3.6.3.4 Der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung hat keine Auswirkungen auf die Blüten- und Schotenentwicklung oder die Embryogenese

Cytokininüberschuss-Mutanten wie beispielsweise *ckx3,5* weisen eine veränderte Blütenmorphologie auf. Die Blüten sind größer und die Gynoeceen sind verlängert und ragen bereits über die geschlossenen Blüten hinaus (Bartrina *et al.* 2011). Da die Reporterstrukture von *UGT76C2* auch in den Blüten aktiv waren (Abschnitt 3.2.3), wurden die Blüten der *ugt76c1,2*-Mutanten näher untersucht. Es konnten keine morphologischen Auffälligkeiten festgestellt werden (Abbildung 43A). Die Schotenlänge und die Samenanzahl pro Schote war bei den Mutanten unverändert (Abbildung 43B bis D). Der *UGT76C2*-Reporter zeigte auch sehr spezifische Expressionsmuster im Verlauf der Embryogenese. Daher wurde überprüft, ob der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung Auswirkungen auf diesen Prozess hat. Dafür wurden die Schoten geöffnet und es wurde die Vitalität der Samen überprüft. Es konnte im Vergleich zum WT keine erhöhte Letalität festgestellt werden (Abbildung 43B). In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bruno Müller (ETH Zürich, Zürich, Schweiz) wurden die Embryonen von *ugt76c1,2_a*-Mutanten nach morphologischen Auffälligkeiten untersucht. Es konnten keine Unregelmäßigkeiten während der Embryogenese festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach kann der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung wahrscheinlich durch die Aktivität anderer Komponenten des Cytokinin-Metabolismus ausreichend kompensiert werden oder ist für die Embryogenese nicht relevant.

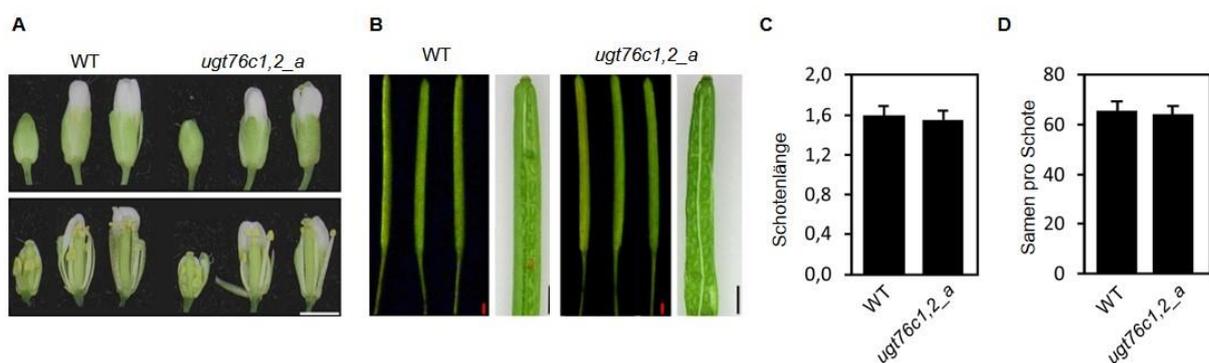


Abbildung 43. Die Blüten- und Schotenentwicklung ist in *ugt76c1,2_a*-Mutanten unverändert.

A) Blüten der Stadien 12, 14 und 15 (Smyth *et al.* 1990) von *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen. Der Maßstab entspricht 0,5 cm.

B) Ausgewachsene und geöffnete Schoten. Der Maßstab entspricht 0,5 cm.

C) und **D)** Quantifizierung der Schotenlänge und der Anzahl der Samen pro Schote. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern ($n > 12$)

3.6.3.5 Der Einfluss der Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf das Wurzelwachstum

Auch in den Wurzelspitzen der Haupt- und Seitenwurzeln zeigte das Reporterkonstrukt *UGT76C2:UGT76C2-GFP* sehr spezifische Expressionsmuster (Abschnitt 3.2.3). Zur Charakterisierung des Wurzelwachstums wurde von *in vitro* angezogenen Keimlingen die Elongation der Hauptwurzel und die Anzahl der Seitenwurzeln untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass das Wurzelwachstum im Vergleich zum WT unverändert war (Abbildung 44A und B).

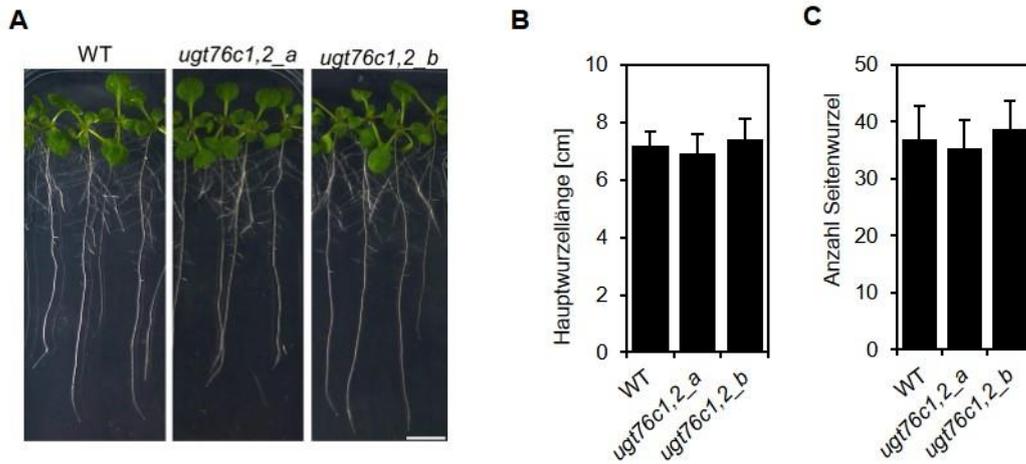


Abbildung 44. Der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung hat keinen Einfluss auf die Wurzelelongation und die Anzahl der Seitenwurzeln.

A) Phänotyp von *in vitro* angezogenen *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zu WT (14 TNK). Der Maßstab entspricht einem cm.

B) Elongation der Primärwurzel von *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zum WT zwischen Tag 3 und Tag 14 nach der Keimung. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n > 14$).

C) Anzahl der Seitenwurzeln von *ugt76c1,2_a*-Mutanten im Vergleich zum WT (14 TNK). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler ($n > 14$).

3.6.4 Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen *UGT76C1* und *UGT76C2* und bekannten Komponenten des Cytokininsignalwegs sowie des Cytokinin-Metabolismus

Cytokinine werden durch die *N7*- und *N9*-Glucosylierung inaktiviert. Um zu untersuchen, wie diese Stoffwechselreaktion zur Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase beiträgt, wurde die *ugt76c1,2_a*-Mutante in einem genetischen Ansatz mit verschiedenen Mutanten, die mit dem Cytokinin-Metabolismus im Zusammenhang stehen, gekreuzt.

Die irreversible Degradation des Cytokinins durch CKX-Enzyme ist ein Hauptmechanismus zur Regulation der aktiven Cytokinin-Konzentration. In *Arabidopsis* existieren sieben Isoformen der CKX-Enzyme, die sich in ihrer gewebespezifischen Expression, subzellulärer Lokalisation und ihren Substratspezifitäten unterscheiden. Die meisten CKX-Enzyme zeigen die höchste Aktivität gegenüber den freien Basen und den Nukleosid-Formen von iP und tZ, während einige, wie beispielsweise CKX1, eine hohe Affinität zu Cytokinin-*N*-Glucosiden als Substrat haben (Galuszka *et al.* 2007, Kowalska *et al.* 2010, Werner *et al.* 2003).

CKX3 und CKX5 werden in spezifischen Domänen des Meristems exprimiert. *ckx3,5*-Mutanten weisen neben einem erhöhten Cytokinin-Gehalt auch vergrößerte und aktivere Meristeme auf (Bartrina *et al.* 2011). Auch der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung beeinflusst die Aktivität und Größe des Meristems (siehe Abschnitt 3.6.3.3). Um zu untersuchen, ob die Cytokinin-*N*-Glucosylierung und die Cytokinindegradation durch CKX3 und CKX5 im Meristem den gleichen Cytokininpool regulieren, wurden die Quadrupelmутanten *ckx3,5 ugt76c1,2_a* hergestellt. Von den homozygoten Mutanten wurden anschließend mittels konfokaler Mikroskopie die Meristemgröße und der Plastochronwert bestimmt, welcher mit der Aktivität des Meristems und der Blütenbildungsrate korreliert (Landrein *et al.* 2015).

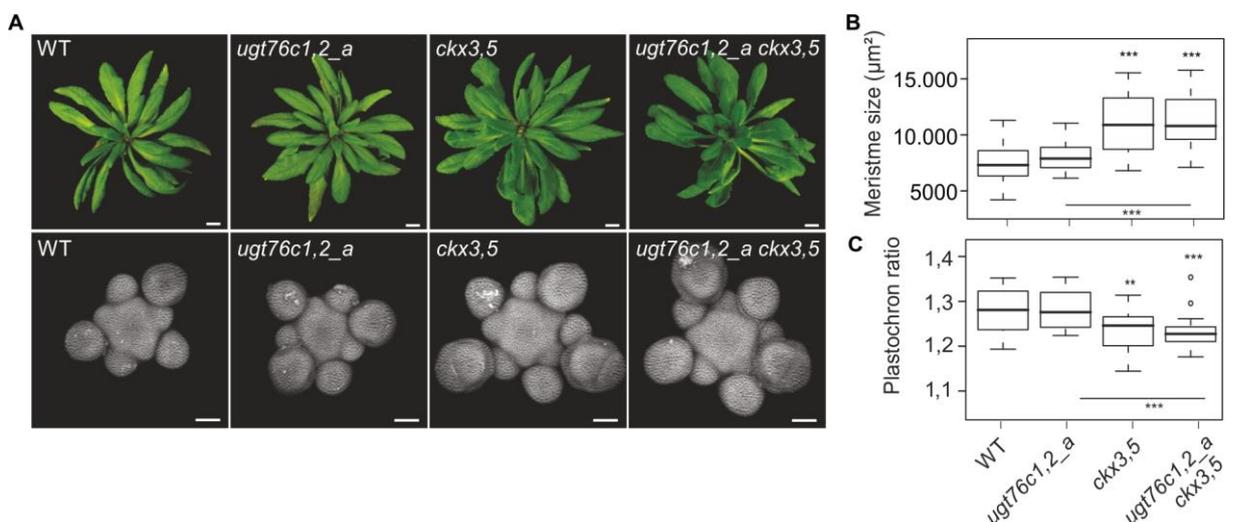


Abbildung 45. *ugt76c1,2_a* und *ckx3,5* haben keinen additiven Effekt auf die Meristemaktivität und -größe.
A) Sprossphänotyp von *ugt76c1,2_a ckx3,5*-Quadrupelmутanten im Vergleich zu Pflanzen des WT und zu *ckx3,5* und *ugt76c1,2_a*-Mutanten. Der Maßstab entspricht 50 μm .
B) Meristemgröße von den Quadrupelmутanten *ugt76c1,2_a ckx3,5* im Vergleich zu Pflanzen des WTs und der Linien *ugt76c1,2_a* und *ckx3,5*.
C) Plastochronwert von Blütenprimordien von den Quadrupelmутanten *ugt76c1,2_a ckx3,5* im Vergleich zu Pflanzen des WTs und der Linien *ugt76c1,2_a* und *ckx3,5*. Das Plastochronratio ist invers proportional zu der Entwicklungsrate von Blütenprimordien (Landrein *et al.* 2015)
 Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen ($n \geq 24$). Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Benoit Landrein (*University of Cambridge*, Cambridge, Großbritannien) durchgeführt. Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT. (***) = $p < 0,001$, ANOVA).

Die *ckx3,5*-Doppelmutanten zeigten wie erwartet vergrößerte Meristeme und einen verringerten Plastochronwert. Obwohl die *ugt76c1,2_a*-Doppelmutanten in vorangegangenen Experimenten einen ähnlichen Effekt zeigten (siehe Abschnitt 3.6.3.3), war das in diesem Experiment nicht der Fall (Abbildung 45A und B). Die *ugt76c1,2_a ckx3,5*-Quadrupelmутanten entsprachen in Bezug auf die Meristemgröße und die meristematische Aktivität den *ckx3,5*-Doppelmutanten. Demnach regulieren CKX3, CKX5, UGT76C1 und UGT76C2 entweder den gleichen Cytokininpool und der maximale Effekt wurde bereits in den *ckx3,5*-Doppelmutanten erreicht, oder die Cytokinin-*N*-Glucosylierung spielte in diesem Experiment für die Regulation der Cytokininhomöostase keine Rolle. Um eine genauere Aussage treffen zu können, sollte das Experiment wiederholt werden.

Eine weitere Cytokininüberschussmutante ist *rock4*. Diese trägt eine Mutation im *IPT3*-Gen, welches für eine Isopentenyltransferase kodiert, die den ersten Schritt in der Cytokinin-Biosynthese katalysiert. Die *rock4*-Mutation bewirkt eine verstärkte Aktivität des Enzyms. *rock4*-Mutanten haben unter anderem leicht verkleinerte Rosetten (Jensen 2013) (Abbildung 46). Der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität konnte in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten weitgehend kompensiert werden und führte zu moderaten phänotypischen Veränderungen (Abschnitt 3.6.3.1). Um zu untersuchen, ob dies auch der Fall ist, wenn durch die *rock4*-Mutation mehr aktives Cytokinin gebildet wird, wurden die *ugt76c1,2_a*- und die *rock4*-Mutanten miteinander gekreuzt. Die homozygoten *rock4 ugt76c1,2*-Mutanten bildeten im Vergleich zu *rock4*- und *ugt76c1,2_a*-Mutanten noch kleinere Rosetten (Abbildung 46). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die verstärkte Cytokininbildung durch *rock4* bei gleichzeitigem Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität nicht kompensiert werden kann. Weiterhin bestätigt es, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung zur Inaktivierung von überschüssigen Cytokinin beiträgt.



Abbildung 46. UGT76C1 und UGT76C2 sind für die Inaktivierung von Cytokinin relevant.

Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen *rock4 ugt76c1, 2_a*-Tripelmutanten im Vergleich zu Pflanzen des WT und zu *rock4*- und *ugt76c1,2_a*-Mutanten (45 TNK).

Neben der Cytokinin-*N*-Glucosylierung können die tZ-, cZ- und DHZ-Cytokinintypen auch durch die Konjugation mit Zuckerresten, an der terminalen Hydroxylgruppe der Seitenkette, inaktiviert werden. Die bisher bekannten Cytokinin-*O*-Glucosyltransferasen sind UGT73C1, UGT73C5 und UGT85A1 (Hou *et al.* 2004). Es wird angenommen, dass die Cytokinin-*O*-Glucosylierung reversibel ist und Cytokinin-*O*-Glucoside wieder in aktive Basen umgewandelt werden können (Brzobohaty *et al.* 1993). Von diesen drei Glucosyltransferasen wurde UGT85A1 bisher am besten charakterisiert (Jin *et al.* 2012, Šmehilová *et al.* 2016). Die *ugt85a1*-T-DNA-Insertionsmutante *zgt1-1* zeigt unter Standardwachstumsbedingungen keinen veränderten Phänotypen (Šmehilová *et al.* 2016) (persönliche Mitteilung Dr. C. Rausch, AG Kunze). Um zu untersuchen, ob der Verlust der Cytokinin-*N*- und -*O*-Glucosylierung additive Effekte hat und zu veränderten Phänotypen führt, wurde das *ugt76c1,2_a*- Allel in den *zgt1-1*-Hintergrund eingekreuzt. Abbildung 47 zeigt die homozygoten Tripelmutanten im Vergleich zum WT und zu den Elternpflanzen *ugt76c1,2_a* und *zgt1-1*. Erstaunlicherweise

bildeten die *zgt1-1* unter den verwendeten Anzuchtbedingungen einen deutlich veränderten Blattphänotyp, mit nach innen gerollten Blatträndern. Dieses phänotypische Merkmal wurden für *zgt1-1*-Mutanten bisher noch nicht beschrieben. Die homozygoten *ugt76c1,2_a zgt1-1*-Tripelmutanten zeigten identische phänotypische Veränderungen zu den neuidentifizierten Phänotypen der *zgt1-1*-Einzelmutanten. Daher ist anzunehmen, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung an der Regulation des Entwicklungsschrittes, die zu der Ausprägung des beschriebenen Blattphänotyps führt, nicht beteiligt ist. Die Tripelmutanten wiesen keine offensichtlichen additiven Effekte auf (Abbildung 47). Demnach können die Pflanzen den Cytokinin-Metabolismus anscheinend soweit anpassen, dass der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung und die Reduktion der Cytokinin-*O*-Glucosylierung kompensiert werden kann.



Abbildung 47. Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung ist nicht an der *zgt1-1*-vermittelten Regulation der Blatentwicklung beteiligt.

Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen *zgt1-1 ugt76c1,2_a*-Tripelmutanten im Vergleich zu Pflanzen des WT und zu *zgt1-1*- und *ugt76c1,2_a*-Mutanten (37 TNK; n).

Cytokinin wird sowohl im Spross als auch in der Wurzel produziert und wirkt als lokales Signal, wird aber auch transportiert und vermittelt so die Kommunikation zwischen Wurzel und Spross (Hirose *et al.* 2008, Miyawaki *et al.* 2004). Von Ko und Zhang *et al.* (2014) wurde erstmalig der Cytokinintransporter ABCG14 beschrieben, der Cytokinin von der Wurzel in den Spross transportiert. Vor allem tZR aber auch tZ werden über das Xylem aus den Wurzeln in den Spross transportiert. Dabei ist das transportierte tZ an der Regulation der Blattgröße, aber nicht der Meristemaktivität beteiligt (Osugi *et al.* 2017). Die *abcg14*-Knockout-Mutanten weisen einen starken Cytokinindefizienz-Phänotyp auf (Ko *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2014). Um zu testen, ob der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung der Cytokinindefizienz des Sprosses entgegenwirkt, wurde *ugt76c1,2_a* mit *rio1.3* gekreuzt. Bei *rio1.3* handelt es sich um ein weiteres *loss-of-function*-Allel von ABCG14, das von Niemann (2013) beschrieben wurde. Die *ugt76c1,2_a rio1.3*-Tripelmutanten zeigten den gleichen cytotkinindefizienz-Phänotyp wie die *rio1.3*-Einzelmutanten (Abbildung 48). Demnach sind beide Gene epistatisch und der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität kann den Cytokininmangel im Spross, der durch das fehlende Cytokinin aus den Wurzeln entsteht, weder abmildern noch kompensieren.



Abbildung 48. Dem Cytokininmangel des Sprosses in *rio1.3*-Mutanten wird durch den Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität nicht entgegengewirkt.

Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen *rio1.3 ugt76c1,2_a*-Tripelmutanten im Vergleich zu Pflanzen des WT und zu *rio1.3*- und *ugt76c1,2_a*-Mutanten (37 TNK, n > 15).

3.7 Die Knockout- und Knockdown-Mutanten von *UGT76C1* und *UGT76C2* haben unterschiedliche Phänotypen

Bevor die CRISPR/Cas-Technologie erstmalig als Werkzeug zur Genomedition in *Arabidopsis* von Feng *et al.* (2013) beschrieben wurde, gab es nur wenige Methoden zur Herstellung von Mehrfach-Knockout-Mutanten gekoppelter Gene. Eine dieser Methoden ist die von Schwab *et al.* (2006) etablierte amiRNA-Technologie, welche die Suppression der Zielgene bewirkt. Mit Hilfe dieser Methode wurden in der AG Werner (Karl-Franzens-Universität Graz, Graz, Österreich) Mutanten etabliert, bei denen die Expression von *UGT76C1* und *UGT76C2* vermindert ist (*35S:amiUGTC*-Linien). Im Rahmen meiner Masterarbeit wurden diese Linien charakterisiert. In den *amiUGT*-Linien waren die Transkriptlevel von beiden Zielgenen herunterreguliert und die Konzentration der *N*-Glucoside waren stark reduziert. Entgegen den Erwartungen war in den *35S:amiUGTC1/2*-Linien der Cytokinin-Status verringert und das Wurzel- und Sprosswachstum stark insensitiv gegenüber extern zugegebenem Cytokinin. Die Pflanzen wiesen zudem phänotypische Veränderungen auf, die denen von cytokinindefizienten Pflanzen ähnelten, mit: verkleinerten Rosetten, dünneren Stängeln und einer verzögerten Blühinduktion (Brock 2012). Diese Veränderungen konnten bei den, im Rahmen dieser Arbeit, mit der CRISPR/Cas-Technologie hergestellten, *ugt76c1,2*-Knockout-Linien nicht beobachtet werden. Abbildung 49A zeigt die *ugt76c1,2*-Pflanzen im Vergleich zu den zuvor etablierten *35S:amiUGT*-Linien (*35SamiUGT-1* und *35SamiUGT-3*).

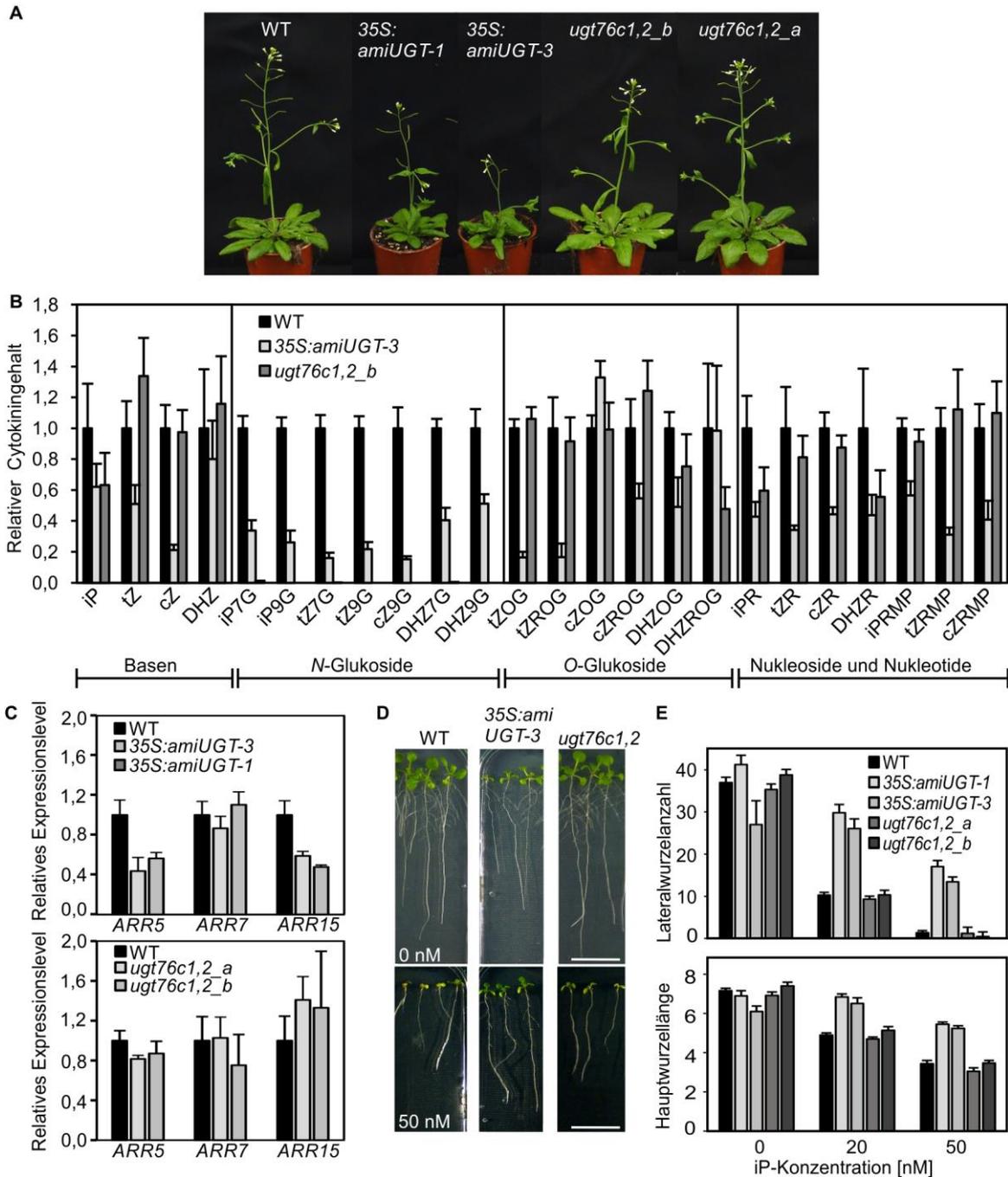


Abbildung 49. 35S:amiUGT76C-Linien im Vergleich zu ugt76c1,2-Doppel-Knockout-Linien.

A) Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen Pflanzen des WTs, der 35S:amiUGT- und der ugt76c1,2-Linien (33 TNK).

B) Relativer Cytokininhalt in 35S:amiUGT-Linien und ugt76c1,2-Mutanten im Vergleich zum WT. Pro Messung wurden jeweils ~ 20 mg Pflanzenmaterial von *in vitro*-angezogenen Keimlingen (elf TNK) verwendet. Angegeben sind die relativen Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 5). Der Cytokininhalt des Wildtyps wurde auf 1 gesetzt.

C) qPCR Analyse der Expressionsniveaus von A-Typ ARR-Genen in elf Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen von 35S:amiUGT- und ugt76c1,2-Mutanten im Vergleich zum WT. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel mit Standardfehler. Das Expressionslevel des WTs wurde auf 1 gesetzt (n = 5).

D und E) Cytokininsensitivität des Wurzelwachstums 35S:amiUGT- und ugt76c1,2-Mutanten im Vergleich zum WT. Die Anzucht erfolgte *in vitro* auf Medium mit und ohne 50 nM iP (**D**). Effekt der Cytokininzugabe auf die Elongation der Hauptwurzel zwischen Tag 3 und Tag 10 nach der Keimung und auf die Seitenwurzelbildung von 35S:amiUGT- und ugt76c1,2-Mutanten im Vergleich zum WT (**E**). Dargestellt sind relative Mittelwerte mit Standardfehler (n = 8-24).

Erneute Cytokinin-Messungen bestätigten die stark verringerte Cytokinin-N-Glucosylierungsaktivität in den *35S:amiUGT*-Linien und den Verlust der Stoffwechselreaktion in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten (Abbildung 49B). Bei Betrachtung der anderen Cytokinin-Metabolite fällt auf, dass die *35S:amiUGT*-Linien im Vergleich zu den *ugt76c1,2*-Knockout-Linien insgesamt geringere Cytokinin-Konzentrationen aufwiesen. So sind beispielsweise die Konzentrationen der freien Cytokinin-Basen, der Cytokinin-O-Glucoside und aller Cytokininnukleoside und -nukleotide (Abbildung 49B) bei den *35S:amiUGT*-Linien stärker verringert als bei den Doppel-Knockout-Linien. Die Transkriptmenge der A-Typ *ARR*-Gene, deren Expressionslevel oft mit dem Cytokinin-Status korrelieren, waren in den *35S:amiUGT*-Linien reduziert, nicht aber in den Doppel-Knockout-Linien (Abbildung 49C). Das auffälligste Merkmal der *35S:amiUGT*-Linien war deren stark verringerte Cytokinin-Sensitivität. Exogen appliziertes Cytokinin hemmt die Ausbildung von Seitenwurzeln und die Elongation der Hauptwurzel (Cary *et al.* 1995, Laplaze *et al.* 2007). Die *35S:amiUGT*-Linien bildeten auf cytokininhaltigem Medium längere Primärwurzeln und mehr Seitenwurzeln als der WT und die *ugt76c1,2*-Pflanzen (Abbildung 49D und E). Diese Vergleiche legen die Vermutung nahe, dass der Phänotyp der *35S:amiUGT*-Linien wahrscheinlich nicht aus der Suppression der Zielgene *UGT76C1* und *UGT76C2* resultiert.

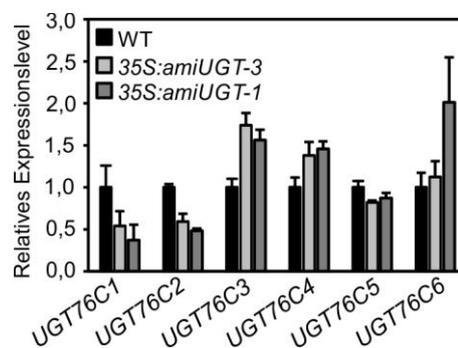


Abbildung 50. Transkriptlevels des *UGT76C*-Genclusters in *35S:amiUGT*-Linien.

qPCR Analyse der Expressionsniveaus der sechs Gene des *UGT76C*-Genclusters in elf Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen von *35S:amiUGT*-Mutanten im Vergleich zum WT. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel mit Standardfehlern. Das Expressionslevel des WTs wurde auf 1 gesetzt (n = 5).

Ein Problem der amiRNA-Technologie ist die Gewährleistung der Spezifität der amiRNA. Werden neben den Zielgen-Transkripten auch andere gebunden, wird deren Transkript ebenfalls herunterreguliert. Die Vorhersage solcher *Off-targets* gestaltet sich als schwierig. Das Programm, welches für das Design der amiRNAs verwendet wurde, enthält einen Algorithmus zur Vorhersage von *Off-targets*. Für die verwendeten amiRNAs wurden keine putativen *Off-targets* identifiziert. *UGT76C1* und *UGT76C2* sind Bestandteil eines Genclusters der aus sechs Genen mit einer hohen Sequenzhomologie besteht. Von diesen homologen Genen wurden in den *35S:amiUGT*-Linien die Transkriptlevel bestimmt. Nur *UGT76C1* und *UGT76C2* zeigten reduzierte Transkriptlevel (Abbildung 50).

3.7.1 Die *ugt76c1,2*-Knockdown-Mutanten können nicht komplementiert werden

Zur Überprüfung, ob der Phänotyp der *35S:amiUGT*-Linien durch die spezifische Suppression der Zielgene *UGT76C1* und *UGT76C2* hervorgerufen wird, wurden diese komplementiert. Einzel-Knockout-Mutanten der Zielgene weisen keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum WT auf, somit ist die Komplementation der *35S:amiUGT*-Linien mit einem der beiden Zielgene ausreichend. Um die Cytokinin-*cis*-Elemente des Introns mit einzuschließen, wurde für das *pUGT76C2:UGT76C2*-Komplementationskonstrukt die genomische *UGT76C2*-Sequenz verwendet. Abbildung 51A zeigt die Sequenz der in den *35S:amiRNA*-Linien verwendeten UGT-amiRNA. Um die Bindung der UGT-amiRNA an die komplementierenden Transkripte zu verhindern, wurden in die Komplementationskonstrukte stille Mutationen in die *amiUGT*-Erkennungssequenz eingefügt (Abbildung 51A).

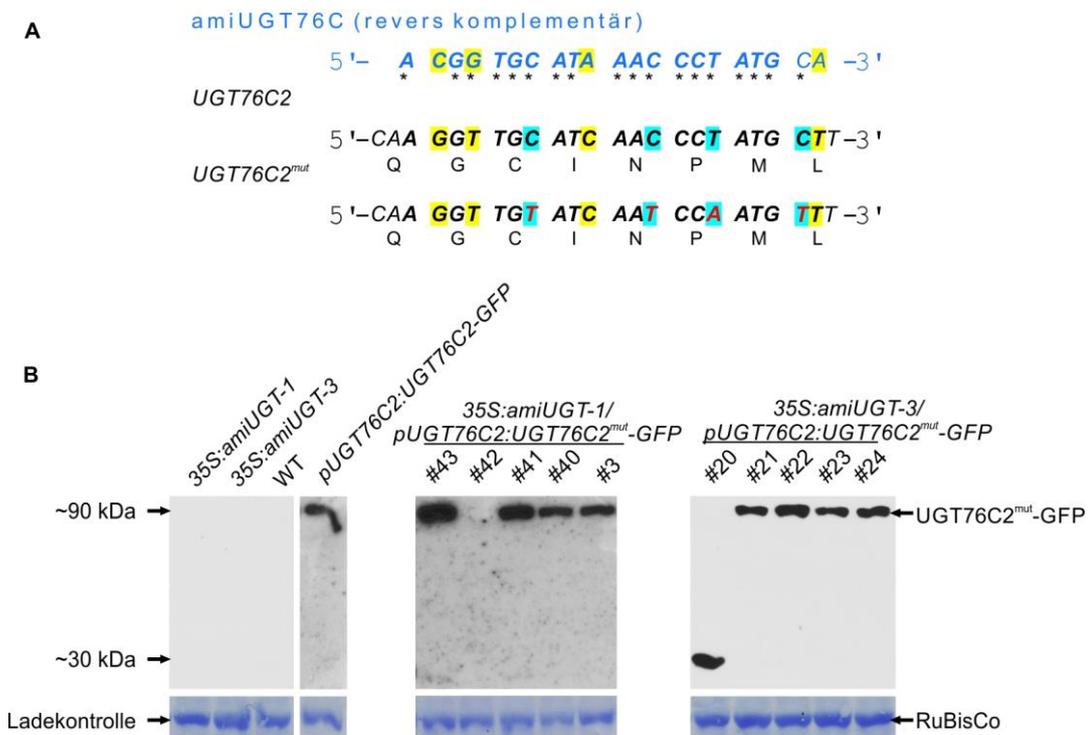


Abbildung 51. Herstellung des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukts für die Komplementation der *35S:amiUGT*-Linien.

A) Dargestellt ist die *amiUGT76C*-RNA-Sequenz gegen die Transkripte von *UGT76C1* und *UGT76C2* der *35S:amiUGT*-Linien (blaue Sequenz). Darunter ist die Zielsequenz der amiRNA innerhalb der *UGT76C2*-mRNA als Triplets angegeben jeweils mit den kodierenden Aminosäuren. Die Zielsequenz selbst ist fettgedruckt, Sternchen markieren die übereinstimmenden Basen zwischen Zielsequenz und amiRNA, nicht übereinstimmende Basen sind in Gelb hinterlegt. Darunter ist die mutagenisierte Sequenz *UGT76C2^{mut}* dargestellt. Es wurden so viele stille Mutationen wie möglich eingefügt. Ausgetauschte Nukleotide sind rot markiert und mit Cyan hinterlegt. Bei der Mutagenese wurde die Häufigkeit der verwendeten Codons von *Arabidopsis* berücksichtigt.

B) Immunologischer Nachweis des Komplementationsprodukts *UGT76C2^{mut}-GFP* in den transformierten *35S:amiUGT-1/pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP*- und *35S:amiUGT-3/Linien/pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP*- Linien. Als Negativkontrolle dienten Proteinextrakte des WTs und als Positivkontrolle von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* #13-Pflanzen. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtproteinextrakt verwendet. Als Belandungskontrolle wurde die Membran nach dem Blotting mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Bei der gezeigten Bande handelt es sich um Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCo).

Zum Nachweis des Komplementationsprodukts wurde die *UGT76C2*-Sequenz mit der *GFP*-Sequenz fusioniert. Als Promotor wurde die 1500 bp lange Sequenz vor dem Startcodon von *UGT76C2* kloniert. Beide Linien *35S:amiUGT-1* und *35S:amiUGT-3* wurden mit dem Komplementationskonstrukt transformiert. Es konnten elf Primärtransformanten im Hintergrund von *35S:amiUGT-1* und acht im Hintergrund von *35S:amiUGT-3* isoliert werden. In der T1-Generation wurde die Expression der Komplementationskonstrukte durch Western Blot-Analysen überprüft. Bei acht Linien konnten Signale detektiert werden, deren Größe, der des *UGT76C2*-GFP-Fusionsprotein der Positivkontrolle entsprach (Abbildung 51B).

Von allen aus der mit dem Komplementationskonstrukt transformierten *35S:amiUGT*-Linien erhaltenen Primärtransformanten wurden in der T3-Generation homozygote Linien isoliert. Zum Screen nach Linien mit einer Reversion der Cytokinin-Sensitivität wurde das Wurzelwachstum der homozygoten Linien *in vitro* auf cytokininhaltigem Medium untersucht. Es konnte bei keiner der 19 Linien eine funktionelle Komplementation beobachtet werden. Eine exemplarische Darstellung zeigt Abbildung 52. Zusammen mit der Tatsache, dass die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten und die *35S:amiUGT*-Mutanten völlig verschiedene phänotypische Veränderungen aufwiesen, spricht dieses Ergebnis dafür, dass der Phänotyp der *35S:amiUGT*-Linien nicht durch die Suppression der *UGT76C1*- und *UGT76C2*-Transkripte hervorgerufen wurde.

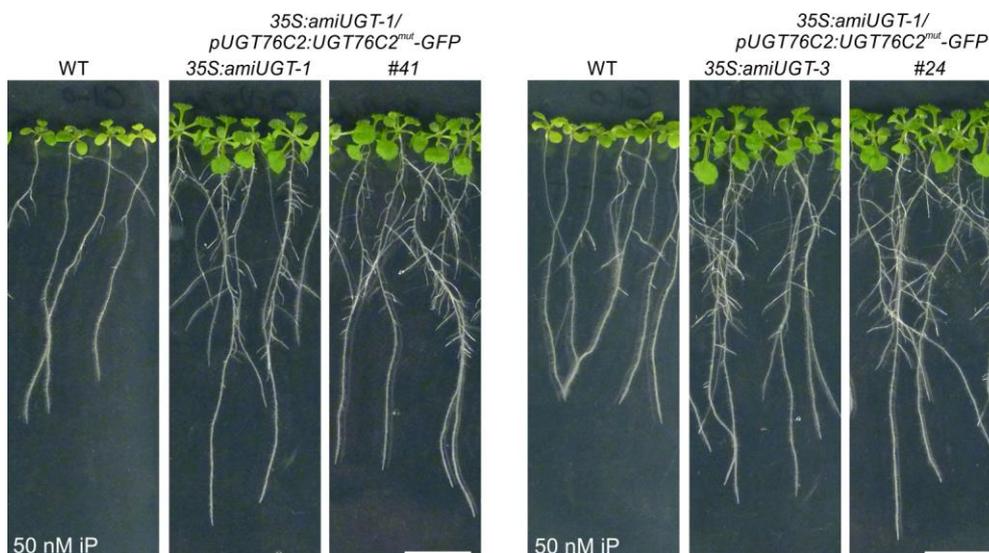


Abbildung 52. *35S:amiUGT/pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP*-Linien zeigen keine Reversion des Cytokinin-Insensitivitäts-Phänotyps.

Exemplarische Darstellung des Wachstums der Linien *35S:amiUGT-1/pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP-#41* und *35S:amiUGT-3/pUGT76C2:UGT76C2^{mut}-GFP-#24* im Vergleich zu den entsprechenden Elternlinien und WT auf cytokininhaltigem Medium (50 nM iP; Maßstab = 1 cm; 14 TNK; n=20).

3.8 Untersuchung der Toleranz von *ugt76c1,2*-Mutanten und *UGTC2ox*-Linien gegenüber Salzstress und osmotischem Stress

Cytokinin spielt eine Rolle bei der Reaktion auf Salzstress und osmotischen Stress. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass reduzierte Cytokininlevel die Resistenz gegenüber osmotischen Stress und Salzstressresistenz erhöhen (Nishiyama *et al.* 2011). Microarray-Daten zeigen außerdem, dass die Expression von *UGT76C1* und *UGT76C2* durch Mannitol und NaCl induziert wird (Kilian *et al.* 2007, Winter *et al.* 2007). Von Li *et al.* (2015b) wurde postuliert, dass *UGT76C2* an der Adaption an Trockenstress beteiligt ist. Daher wurde überprüft, ob die *UGTC2ox*- und *ugt76c1,2*-Mutantenlinien auf Mannitol- und NaCl-haltigem Medium ein verändertes Wurzelwachstum zeigten (Abbildung 53).

Bei beiden *UGTC2ox*-Linien wurde das Wurzelwachstum durch das Mannitol weniger beeinträchtigt (Abbildung 53A). Der Unterschied war bei 50 mM Mannitol für die Linie *UGTC2ox-50* und bei 150 mM und 300 mM Mannitol für beide Überexpressions-Linien signifikant. Das Wurzelwachstum der *ugt76c1,2*-Mutanten zeigte zwar tendenziell eine sensitivere Reaktion auf das Mannitol, die Unterschiede zum WT waren aber nicht signifikant. Bei NaCl waren die Effekte sehr viel schwächer und signifikante Änderungen konnten nur bei einer Konzentration von 150 mM NaCl und auch nur für die Überexpressionslinien und die *ugt76c2_b*-Mutante beobachtet werden. Dabei war das Wurzelwachstum der Überexpressionslinien weniger sensitiv und dass der *ugt76c1,2*-Mutanten tendenziell sensitiver für das NaCl (Abbildung 53B).

Um abzuschätzen, ob die Cytokinin-*N*-Glucosylierung im Zusammenhang mit osmotischem Stress und Salzstress eine Rolle spielt, sollten detailliertere Experimente durchgeführt werden.

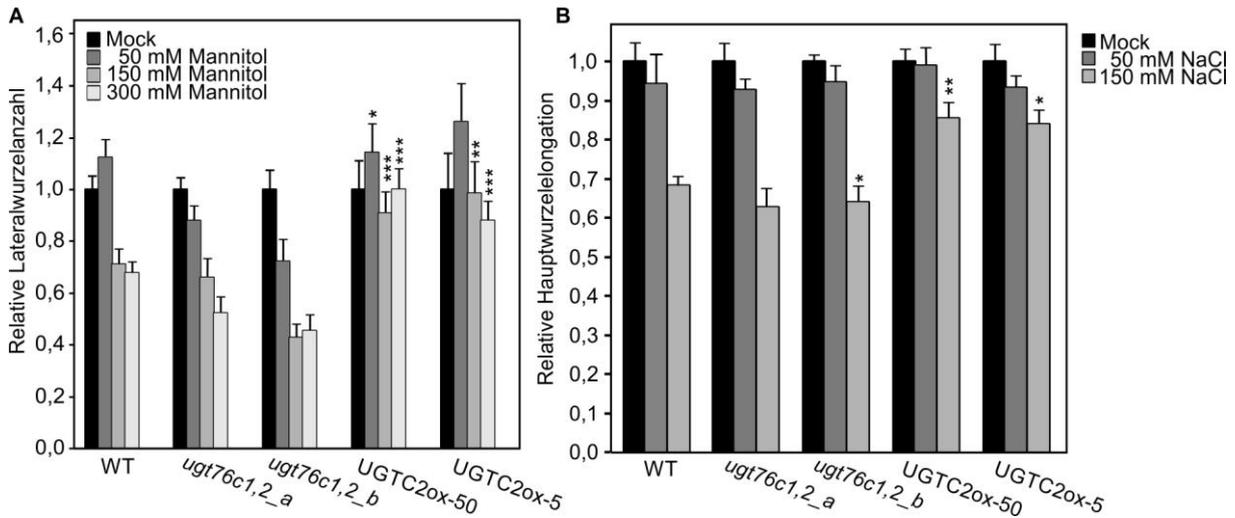


Abbildung 53. UGT76C2-Überexpressionslinien und *ugt76c1,2*-Knockout-Mutanten zeigen eine veränderte Toleranz gegenüber Salzstress und osmotischen Stress.

A) Wurzelwachstum auf mannitolhaltigem Medium von *ugt76c1,2*-Doppelknockout-Mutanten und UGT76C2-Überexpressionslinien im Vergleich zum WT.

B) Wurzelwachstum auf natriumchloridhaltigem Medium von *ugt76c1,2*-Doppelknockout-Mutanten und UGT76C2-Überexpressionslinien im Vergleich zum WT.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Lateralswurzelanzahl bzw. der relativen Elongation der Hauptwurzel mit Standardfehlern. Die Werte wurden für jeden Genotyp jeweils auf die unbehandelte Probe normalisiert (n = 16-40). Sterne markieren signifikante Unterschiede (* = p < 0,05; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, Wilcoxon-Rangsummentest).

4 Diskussion

Die Cytokininhomöostase wird unter anderem durch die Konjugation des Cytokinins mit Glucose an den *N*7- und *N*9-Stickstoffatomen des Purin-Rings reguliert. Bisher sind bei *Arabidopsis* die Glucosyltransferasen UGT76C1 und UGT76C2 (Hou *et al.* 2004) bekannt, von denen diese Reaktion katalysiert wird. Obwohl allgemein angenommen wird, dass es sich bei der Cytokinin-*N*-Glucosylierung um einen Inaktivierungsmechanismus handelt, zeigten Pflanzen, bei denen diese Reaktion durch die Verwendung des amiRNA-Ansatzes unterdrückt war, eine stark verringerte Sensitivität gegenüber Cytokinin. Die Linien waren außerdem tendenziell cytokinindefizient (Brock 2012). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung entgegen der geläufigen Annahme auch einen positiven Einfluss auf die Cytokininaktivität haben könnte. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Rolle der Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Pflanzenentwicklung und die Cytokininhomöostase weiter aufzuklären. Dazu sollten *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Linien sowie Überexpressionslinien hergestellt und untersucht werden. Durch die Untersuchung der Doppel-Knockout-Linien sollte auch geklärt werden, ob es noch weitere Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen in *Arabidopsis* gibt. Des Weiteren sollte durch Reporterstudien die Expression von *UGT76C2-GFP* analysiert werden.

4.1 *UGT76C1* und *UGT76C2* sind die einzigen Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen in *Arabidopsis*

Zur Untersuchung, ob UGT76C1 und UGT76C2 die einzigen Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen in *Arabidopsis* sind, war die Herstellung und Untersuchung von Doppel-Knockout-Linien notwendig. Vor der Entdeckung der CRISPR/Cas9-Technologie war es technisch sehr schwierig *ugt76c1 ugt76c2*-Doppel-Knockout-Linien herzustellen, da diese als Teil eines Genclusters auf dem *Arabidopsis* Chromosom V unmittelbar nebeneinander liegen (siehe Abschnitt 1.2.4.2). Zur Herstellung der Doppel-Knockout-Linien wurde, im Hintergrund der Einzel-T-DNA-Knockout-Linien *ugt76c2-1* und *ugt76c2-2* (Brock 2012, Wang *et al.* 2011), jeweils das *UGT76C1*-Gen mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems mutagenisiert. Cytokinin-Messungen der hergestellten Doppel-Knockout-Mutanten *ugt76c1,2_a* und *ugt76c1,2_b* zeigten, dass die Konzentrationen der Cytokinin-*N*-Glucoside unterhalb (cZ9G, iP9G und tZ9G) oder nah an der Detektionsgrenze (cZ7G, iP7G und tZ7G) lagen (Abbildung 34). Aus den durchgeführten Messungen ging somit hervor, dass der gleichzeitige Knockout beider Gene zu einem Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität führte. Das bedeutet, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in *Arabidopsis* einzig durch die beiden Glucosyltransferasen UGT76C1 und UGT6C2 katalysiert wird. In dem von Hou *et al.* (2004) durchgeführten *in vitro*-

Screen, aller zu dieser Zeit bekannten UGT-Glucosyltransferasen, wurden demnach alle existierenden Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen identifiziert.

Der Stoffwechselweg der Cytokinin-*N*-Glucosylierung wurde in den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten erstmalig komplett ausgeschaltet. Die generierten Linien stellten daher ein gutes Ausgangsmaterial dar, um die physiologische Rolle der Cytokinin-*N*-Glucosylierung untersuchen zu können.

Erstaunlicherweise entsprach der Phänotyp der hergestellten *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten nicht dem der *35S:amiUGT*-Linien (siehe Abschnitt 3.7). Aus der Untersuchung der *35S:amiUGT*-Linien, in denen die Expression von *UGT76C1* und *UGT76C2* reprimiert war, wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung einen positiven Effekt auf die Cytokinin-Aktivität hat (Brock 2012). Ein Hauptziel meiner Doktorarbeit war es, diese Hypothese durch die Untersuchung der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten zu überprüfen. Der Vergleich der Mutanten zeigte, dass die Annahme nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 49). Weiterhin konnte der Cytokinindefizienz-Phänotyp der *35S:amiUGT*-Linien mit dem Konstrukt *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* nicht komplementiert werden, obwohl dessen Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 52). Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass die starke Cytokinindefizienz der *35S:amiUGT*-Linien wahrscheinlich nicht aus der spezifischen Repression von *UGT76C1* und *UGT76C2* resultierte.

4.2 Veränderungen der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität haben Auswirkungen auf die Cytokininhomöostase und den Cytokinin-Status

Zur Untersuchung welchen Beitrag die Cytokinin-*N*-Glucosylierung zur Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase leistet und über welche Stoffwechselwege Veränderungen der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität kompensiert werden, wurde in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten sowie den Überexpressionslinien *UGTC1ox* und *UGTC2ox* das Cytokinin-Metabolitspektrum gemessen und die Transkriptlevel von Cytokininantwortgenen und Komponenten des Cytokinin-Metabolismus bestimmt.

Davon abgesehen, dass keine Cytokinin-*N*-Glucoside mehr messbar waren, zeigte das Metabolitspektrum der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten im Vergleich zum WT insgesamt relativ wenige Abweichungen. Signifikant verändert waren die Konzentrationen der freien iP-Basen und der Cytokininvorstufen iPRMP und tZRMP. Die iP-Konzentration waren signifikant erhöht und die Konzentrationen von iPRMP und tZRMP waren signifikant verringert (Abbildung 34). In Übereinstimmung mit den erhöhten Konzentrationen der freien Cytokininbasen waren in den Doppel-Knockout-Mutanten auch die Transkriptlevel der A-Typ *ARR*-Gene *ARR15* und *ARR7* und damit auch der Cytokinin-Status leicht erhöht (Abbildung 35).

Die Analyse der Transkriptlevel belegte außerdem, dass der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten zu einer Umstellung des Cytokinin-

Metabolismus führte, wahrscheinlich um den Verlust des Stoffwechselwegs zu kompensieren. Bei den Mutanten war die Cytokinin-Biosynthese herunterreguliert. Dies zeigten die verringerten Konzentrationen der Cytokininvorstufen (iPRMP und tZRMP) (Abbildung 34) sowie die verringerten Transkriptlevel der Cytokinin-Biosynthesegene *IPT3*, *IPT5* und *IPT7* (Abbildung 35). Prozesse zur Inaktivierung von Cytokinin liefen dahingegen forciert ab. Dafür sprechen die leicht erhöhten Transkriptlevel der *CKX*-Gene (*CKX3*, *CKX5* und *CKX6*) sowie des Cytokinin-*O*-Glucosyltransferase-Gens *UGT85A1* (Abbildung 35). Die Konzentrationen der Cytokinin-*O*-Glucoside selbst waren leicht, aber nicht signifikant, erhöht (Abbildung 34). Insgesamt waren die Veränderungen der Transkriptlevel und des Cytokinin-Metabolitspektrums in den *ugt76c1,2*-Doppelkonckoutlinien recht mild. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Cytokinin-Konzentrationen und auch die Expression der Gene des Cytokinin-Metabolismus gewebespezifisch reguliert werden. Für die hier durchgeführten Messungen wurden ganze Keimlinge verwendet. Es ist möglich, dass die Veränderungen der Cytokinin-Konzentrationen und der Transkriptlevel gewebespezifisch stärker waren. Daher wäre es sinnvoll Cytokinin-Messungen von isolierten, spezifischen Geweben durchzuführen. Dazu sollten Gewebe ausgewählt werden, in denen die *UGT76C2-GFP*-Reporter eine hohe Aktivität zeigten oder in denen der Phänotyp verändert war (siehe Abschnitt 3.2.3).

In den *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien waren die Konzentrationen der Cytokinin-*N*-Glucoside von iP und tZ dramatisch erhöht (Tabelle 17, Abbildung 15). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die GFP-Fusionsproteine *UGT76C1-GFP* und *UGT76C2-GFP* *in planta* aktiv sind, Cytokinin als Substrat nutzen und den Stoffwechselweg der Cytokinin-*N*-Glucosylierung regulieren. Auffällig war dabei, dass die Konzentrationen der Cytokinin-*N*-Glucoside in den *UGTC2ox*-Linien deutlich höher waren als in den *UGTC1ox*-Linien (Abbildung 16, Tabelle 17). Diese Beobachtung waren mit der größeren Abundanz des *UGT76C2-GFP*-Transkripts und des *UGT76C2*-Proteins im Einklang (Abbildung 14). Außerdem bildeten die *UGTC2ox*-Linien einen sehr viel stärkeren Cytokindefizienz-Phänotyp aus als die *UGTC1ox*-Linien. Da die *UGTC2ox*-Linien sehr viel stärkere Veränderungen zeigten, wurde der Schwerpunkt der Diskussion nachfolgend auf diese Linien gelegt. Die *UGT76C1ox*-Linien zeigten aber in fast allen Punkten ähnliche Tendenzen.

Die Messung der Transkriptlevel der A-Typ *ARR*-Gene *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* und *ARR15* in den *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien zeigte, dass diese im Vergleich zum WT verringert waren (Abbildung 15). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass der Cytokinin-Status dieser Pflanzen verringert war. Im Einklang mit diesem Ergebnis waren die Konzentrationen der freien Cytokininbasen in den Wurzeln der *UGTC2ox*-Pflanzen leicht verringert (Abbildung 16). Im Spross entsprach die Konzentration der freien Cytokininbase tZ hingegen eher der des WTs und die iP-Konzentration war erstaunlicherweise sogar stark erhöht (Abbildung 16). Dieses Ergebnis steht somit im Widerspruch zu dem beobachteten Cytokindefizienz-

Phänotyp des Sprosses (Abbildung 20) und dem verringerten Transkriptlevel der A-Typ *ARR*-Gene (Abbildung 15). Möglicherweise kann dies mit der Beobachtung erklärt werden, dass in den Überexpressionslinien Prozesse aktiv waren, um die Cytokininhomöostase aufrechtzuerhalten. Dies geht beispielsweise aus der Tatsache hervor, dass die Konzentrationen der Cytokininvorstufen und die Transkriptlevel von Genen, die mit der Cytokinin-Biosynthese assoziiert sind (*IPT1*, *IPT5*, *IPT7* und *CYP735A1*), erhöht waren (Abbildung 17). Wahrscheinlich ist in den *UGTC2ox*-Linien die Cytokinin-Biosynthese hochreguliert, um der verstärkt ablaufenden Cytokinin-*N*-Glucosylierung entgegenzuwirken. Das unerwartete Ergebnis, der erhöhten iP-Konzentration, trotz des cytokinindefizienten Sprossphänotyps und dem verringerten Cytokinin-Status, lässt sich eventuell durch die unterschiedliche, räumliche Verteilung der Cytokininrezeptoren und der freien Cytokininbasen erklären. Die Cytokinin-Biosynthese erfolgt in den Chloroplasten, Mitochondrien und im Zytosol (Galichet *et al.* 2008, Kasahara *et al.* 2004). Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung erfolgt ebenfalls im Zytosol (Abbildung 6). Es ist daher wahrscheinlich, dass die neusynthetisierten Cytokininbasen inaktiviert werden bevor diese die Cytokininbindedomänen der Rezeptoren im ER-Lumen oder im Apoplast erreichen.

Bei Betrachtung der weiteren Cytokinin-Metabolite war ersichtlich, dass die Konzentrationen der Cytokinin-*O*-Glucoside in den *UGTC2ox*-Linien im Vergleich zum WT deutlich verringert waren (Abbildung 16). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass der Stoffwechselweg der Cytokinin-*O*-Glucosylierung für die Regulierung der Cytokinin-Homöostase ein relevanter Mechanismus ist.

Sowohl die Ergebnisse der Untersuchungen der *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten als auch der Überexpressionslinien von *UGT76C1* und *UGT76C2* zeigten, dass der Cytokinin-Metabolismus in den Mutanten umgestellt wurde, wahrscheinlich um die Konzentration der aktiven Cytokininbasen konstant zu halten. Dies erfolgte indem die Expression von Komponenten der Cytokinin-Biosynthese (vor allem der IPTs) und der Cytokinin-Inaktivierung (CKX und Cytokinin-*O*-Gulcosyltransferasen) erhöht bzw. verringert wurde. Weiterhin verdeutlichen die Daten die enorme Kapazität des Cytokinin-Metabolismus Schwankungen auszugleichen und die Cytokininhomöostase aufrechtzuhalten. Die Daten sind auch ein Beleg für die starke Redundanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung mit anderen Cytokinin-Inaktivierungsmechanismen.

Um genauer zu untersuchen, wie die Cytokinin-*N*-Glucosylierung und die Degradation der Cytokinine durch CKX-Enzyme zusammenwirken, wurde untersucht, ob die Behandlung der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Mutanten mit dem chemischen CKX-Inhibitor INCYDE zu einer Reversion des cytokinindefizienten Sprossphänotyps führte. Der Cytokinindefizienz-Phänotyp der *UGTC2ox*-Linien konnte durch die Hemmung der CKX-Aktivität abgeschwächt werden (Abbildung 19). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beleg für die Redundanz der Cytokinin-

Inaktivierungsmechanismen. Außerdem zeigt es, dass in den *UGTC2ox*-Mutanten trotz der Cytokinindefizienz die Kapazität in der Anpassung der die CKX-Aktivität nicht vollständig ausgeschöpft wurde. Wahrscheinlich wird eine kritische CKX-Restaktivität für die Regulation spezifischer Entwicklungsvorgänge benötigt. Es ist bekannt, dass CKX-Enzyme an der Regulation von vielen Entwicklungsvorgängen beteiligt sind, wie beispielsweise der Regulation der Meristemaktivität (Bartrina *et al.* 2011) oder der Stomata-Entwicklung (Vaten *et al.* 2018). Um im Detail aufzuklären über welche Stoffwechselwege der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung genau kompensiert wird, wäre es sinnvoll Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem Cytokinin durchzuführen.

4.3 Veränderungen der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität wirken sich teilweise auf die Cytokinin-Sensitivität aus

Viele Studien haben gezeigt, dass nach der exogenen Zugabe von Cytokinin vor allem *N7*- und *N9*-Glucoside akkumulieren. Daher wurde postuliert, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung einen wichtigen Beitrag für die Inaktivierung von überschüssigem Cytokinin leistet (McGaw *et al.* 1984, McGaw und Horgan 1983, Parker *et al.* 1973). Aus diesem Grund wurden Studien zur Cytokinin-Sensitivität durchgeführt. Zuerst wurde die Cytokinin-Sensitivität des Wurzelwachstum der *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien sowie der *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten untersucht. Den größten Effekt zeigten die Pflanzen der *UGTC2ox*-Linie, deren Wurzelwachstum nahezu cytokinininsensitiv war (Abbildung 18). Die Reaktion der Pflanzen der *UGTC1ox*-Pflanzen auf exogen appliziertes Cytokinin war im Vergleich zum WT teilweise signifikant verringert (Abbildung 18). Es stellt sich dabei die Frage, wie dies mechanistisch zu erklären ist. Die Cytokininrezeptoren sind sowohl in der Plasmamembran als auch in der ER-Membran lokalisiert. Welche der beiden Rezeptorfractionen physiologisch bedeutsamer ist, ist noch unklar und wird diskutiert (Romanov *et al.* 2018). Beide Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen sind im Zytosol lokalisiert. Die Inaktivierung des exogen applizierten Cytokinins durch UGT76C1 und UGT76C2 kann daher erst nach der Aufnahme des exogen applizierten Cytokinins aus dem Apoplast in das Zellinnere erfolgen. Die Tatsache, dass die Überexpression von *UGT76C2* und *UGT76C2* zu einer starken Cytokinin-Sensitivität geführt hat, spricht somit dafür, dass die Cytokininrezeptoren in der ER-Membran physiologisch bedeutsamer sind.

Bei den *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten war die Cytokinin-Sensitivität des Wurzelwachstums im Vergleich zum WT hingegen nicht verändert (Abbildung 36). Folglich konnte der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung bei der exogenen Zugabe von Cytokinin in den Wurzeln kompensiert werden. Da der Cytokinin-*N*-Glucosylierung bisher eine Schlüsselrolle in diesem Prozess zugeschrieben wurde (McGaw *et al.* 1984, McGaw und Horgan 1983, Parker *et al.* 1973) und die Relevanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die

Regulation der Cytokininhomöostase in anderen Geweben, beispielsweise bei der Blattentwicklung (siehe Abschnitt 4.4.1), nachgewiesen werden konnte, war das Ergebnis unerwartet. Es sollten daher weitere Cytokininrespons-Assays durchgeführt werden, um zu überprüfen, in welchem Kontext die Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Inaktivierung von überschüssigem Cytokinin relevant ist.

Für die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten wurden zur genaueren Untersuchung der Cytokinin-Sensitivität die Transkriptlevel von Cytokininantwortgenen und Komponenten des Cytokinin-Metabolismus nach der Induktion mit Cytokinin bestimmt (Abbildung 37). Die Erwartung war, dass die Mutanten sensitiver auf das applizierte Cytokinin reagieren als der WT. Unter den signifikant veränderten Transkriptleveln war dies der Fall für die A-Typ *ARR*-Gene *ARR5* und *ARR6* sowie die Gene der Cytokinin-Biosynthese *IPT3* und *IPT5*. Für die A-Typ *ARR*-Gene *ARR7*, *ARR15*, *ARR16* sowie die *CKX*-Gene *CKX4* und teilweise für *CKX3* und *CKX5* war die Reaktion hingegen weniger sensitiv als für den WT. Für die *CKX*-Gene kann diese Beobachtung eventuell dadurch erklärt werden, dass in dem hier durchgeführten Experiment nur die Veränderung der Expression und nicht das absolute Expressionsniveau untersucht wurde und für die *CKX*-Gene das Expressionsniveau aber bereits im Grundzustand erhöht war (Abbildung 35). Eine andere Möglichkeit ist, dass durch die grundsätzlich erhöhte Abundanz der *CKX*-Enzyme das Cytokinin in der Nähe der Rezeptoren bereits vor der Perzeption abgebaut wird und die Cytokininantwort daher schwächer ausfällt. Dennoch, aus den vorliegenden Daten lässt sich in Bezug auf die Cytokinin-Sensitivität der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten keine eindeutige Aussage ableiten. Einerseits waren die Unterschiede zum WT relativ gering und andererseits waren unter den signifikant veränderten Transkriptleveln die Trends zwischen den verschiedenen Zeitpunkten und Induktionskonzentrationen oft nicht konsistent.

In Anbetracht dessen, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung als ein Hauptinaktivierungs-Mechanismus von Cytokinin betrachtet wird, waren die Veränderungen der Cytokinin-Sensitivität im Vergleich zum WT relativ gering. Besonders überraschend war, dass das Wurzelwachstum der *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Linien auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT unverändert war. Belegt die ausgeprägte Cytokinin-Sensitivität der *UGTC2ox*-Überexpressionslinien doch, wie wirksam die Cytokinin-*N*-Glucosylierung bei der Inaktivierung von exogen applizierten Cytokinin sein kann. Der Beitrag, den die Cytokinin-*N*-Glucosylierung zu der homöostatischen Regulation von Cytokinin leistet, scheint demnach kleiner zu sein als bisher angenommen wurde.

4.4 Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung beeinflusst das Sprosswachstum

Die Expression von *35S:UGT76C2-GFP* führte zu umfangreichen Veränderungen der Sprossmorphologie (Abbildung 20), wie sie häufig bei cytokinindefizienten Pflanzen beobachtet werden. Diese werden allgemein unter dem Begriff Cytokinindefizienzsyndrom zusammengefasst (Werner *et al.* 2003). Der Cytokinindefizienz-Phänotyp korrelierte mit dem verringerten Cytokinin-Status (Abbildung 15) und ist ein weiterer Beleg dafür, dass es sich bei der Cytokinin-*N*-Glucosylierung um einen Inaktivierungsmechanismus handelt. Die phänotypischen Veränderungen der Pflanzen der *UGTC1ox*-Linien waren weniger stark, zeigten aber sehr ähnliche Tendenzen (Abbildung 20).

Die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten wiesen, entsprechend der nur moderat erhöhten Konzentrationen der freien Cytokininbasen (Abbildung 34), auch nur geringfügige morphologische Veränderungen im Vergleich zum WT auf. Dass die Einzel-Knockout-Mutanten unter Standardwachstumsbedingungen keine auffallenden phänotypischen Veränderungen zeigten, war nicht überraschend (Brock 2012, Šmehilová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Viele Komponenten des Cytokinin-Metabolismus und der Cytokinin-signaltransduktion werden durch Multigenfamilien kodiert und üben teilweise redundante Funktionen aus. Daher treten sichtbare Phänotypen oft erst bei Mehrfach-Knockout-Mutanten auf (Kieber und Schaller 2014, Zürcher und Müller 2016). Zum Beispiel weisen nur einige Kombinationen von *CKX*-Knockout-Mutanten sichtbare phänotypische Veränderungen auf. Der gleichzeitige Knockout von *CKX3* und *CKX5* führt beispielsweise zu einem Cytokinin-Überschuss-Phänotyp im SAM (Bartrina *et al.* 2011). Die Beobachtung, dass der vollständige Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung nur zu verhältnismäßig schwachen, phänotypischen Veränderungen führte, war unerwartet, da der Mehrfach-Knockout innerhalb anderer Familien von Cytokinin-Metabolismus-Genen teilweise sehr starke phänotypische Veränderungen zur Folge hat. *lpt1,3,5,7*-Quadrupelmutanten zeigen beispielsweise sehr starke Beeinträchtigungen des Spross- und Wurzelwachstums. Daher weist der Umstand, dass der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung nur einen geringfügigen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen ausübt darauf hin, dass die Rolle der Cytokinin-*N*-Glucosylierung bisher überschätzt wurde oder nur unter spezifischen Bedingungen oder in spezifischen Geweben von größerer Bedeutung ist.

Um Hinweise zu erhalten, auf welche Entwicklungsprozesse die Cytokinin-*N*-Glucosylierung Einfluss nimmt, wurden die *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Linien einer detaillierteren, phänotypischen Untersuchung unterzogen. Es wurden das Rosettenwachstum, die Übergänge der Entwicklungsphasen, die natürliche Blattseneszenz, die Morphologie der Blütenstängel, die Blüten- und Schotenentwicklung, die Wurzelmorphologie sowie die Embryogenese untersucht.

Am Auffälligsten war die Größe und Aktivität des Infloreszenzmeristems verändert. Die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten bildeten größere und aktiviere Meristeme mit mehr Blütenprimordien (Abbildung 41). Der Einfluss der Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf das Meristems wird im Abschnitt 4.4.2 im Detail diskutiert. Außerdem bildeten die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten größere Rosettenblätter und zeigten eine leicht verzögerte Initiation der Blattseneszenz. Diese Beobachtungen werden im Abschnitt 4.4.1 ausführlich diskutiert.

Weiterhin zeigte sich, dass sowohl bei den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten als auch bei den *UGTC1ox*- und *UGTC2ox*-Linien der Ausprägungsgrad der Phänotypen variierte. In unabhängigen Experimenten waren die Ergebnisse oft nicht beständig, dadurch wurden die Untersuchungen erschwert. Darüber hinaus unterschied sich bei den Überexpressionslinien die Expressivität des Cytokinindefizienz-Phänotyps auch innerhalb einer Anzucht und zwischen verschiedenen Samenpools (Abbildung 22A). Um auszuschließen, dass die Ursache in einem *Silencing* des Transgens lag, wurde für die *UGTC2ox*-Mutanten untersucht, ob der Ausprägungsgrad der Phänotypen vererbt wird. Dies war nicht der Fall (Abbildung 22B).

Für die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten konnten teilweise Pflanzen mit vergrößerten Rosetten, dickerem Rosettenstängel und deutlich vergrößerten Infloreszenzen beobachtet werden (Abbildung S3, Anhang). Der Phänotyp erinnerte an Cytokinin-Mutanten mit einem erhöhten Cytokinin-Status, wie beispielsweise *ckx3,5*, *IPT*-überexprimierende Pflanzen oder die Rezeptormutanten *rock2* und *rock3*, welche konstitutiv aktive AHK2- bzw. AHK3-Rezeptoren exprimieren (Bartrina *et al.* 2017, Bartrina *et al.* 2011, Rupp *et al.* 1999, Sun *et al.* 2003). Es ist anzunehmen, dass die Phänotypen von den vorhandenen Wachstumsbedingungen abhängig waren. Bekanntlich nimmt Cytokinin auch bei der Anpassung an biotische und abiotische Umweltfaktoren eine Schlüsselposition ein. In der Literatur wurde für Cytokinin eine Rolle bei der Reaktion auf Hochlichtstress, Temperatur, Salz- und Trockenstress und an die Nährstoffverfügbarkeit beschrieben (Cortleven *et al.* 2019). Dabei nehmen die jeweiligen Faktoren einen direkten Einfluss auf die Cytokininhomöostase. Daher ist es naheliegend, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung, als zentraler Stoffwechselweg der Cytokininhomöostase, an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sein könnte.

In der Literatur gab es mehrere Hinweise darauf, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung zumindest für die Salz- und Trockenstressadaption von Bedeutung ist. Zum einen ist bekannt, dass ein reduzierter Cytokinin-Gehalt im Allgemeinen die Trocken- und Salzstressresistenz erhöht (Nishiyama *et al.* 2011). Zum anderen wurde gezeigt, dass Trockenheit zu einer Absenkung des Cytokinin-Gehalts führt (Ghanem *et al.* 2008, Nishiyama *et al.* 2011, Todaka *et al.* 2017). Im Einklang damit stehen Microarray-Daten, die darauf hinweisen, dass die Expression von *UGT76C1* und *UGT76C2* durch Mannitol oder Natriumchlorid induziert wird (Kilian *et al.* 2007, Winter *et al.* 2007). Außerdem wurde bereits publiziert, dass *UGT76C2* direkt bei der Adaption an Trockenstress von physiologischer Bedeutung ist (Li *et al.* 2015b).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Reaktion des Wurzelwachstums der *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutante und der *UGTC2ox*-Überexpressionslinie auf Mannitol und Natriumchlorid überprüft. Das Wurzelwachstum der *UGTC2ox*-Linien war im Vergleich zum WT weniger sensitiv gegenüber Mannitol und die *ugt76c1,2*-Doppelmutanten waren tendenziell sensitiver als der WT (Abbildung 53). Die Ergebnisse der Untersuchungen stehen im Einklang mit dem in der Literatur postulierten Effekt, den ein erhöhter bzw. verringerter Cytokinin-Gehalt auf die Stressresistenz nimmt (Ghanem *et al.* 2008, Nishiyama *et al.* 2011, Todaka *et al.* 2017). Die Ergebnisse stehen aber teilweise im Widerspruch zu den Beobachtungen von Li *et al.* (2015b), denen zufolge die *UGT76C2*-Überexpressionslinien in jungen Entwicklungsstadien sensitiver und in späteren Entwicklungsstadien weniger sensitiv gegenüber Mannitol sind, wohingegen sich die *ugt76c2-1*-Mutante genau andersherum verhält (Li *et al.* 2015b). Ein Grund für die abweichenden Ergebnisse könnte darin liegen, dass in den Überexpressionslinien, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, die Expression des Transgens sehr viel stärker war (Brock 2012) als in den Überexpressionslinien, die von Wang *et al.* (2011) generiert und von Li *et al.* (2015b) untersucht wurden. Die hier durchgeführten Untersuchungen sind ein guter Beleg dafür, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung im Zusammenhang mit Salz- und Trockenstress von physiologischer Bedeutung ist. Es sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um genauere Erkenntnisse zu gewinnen. Beispielsweise sollte die Reaktion der Stomata auf Trockenheit oder die Expression von mit trocken und salzstressassoziierten Markergenen untersucht werden.

4.4.1 Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung ist an der Regulation des Blattwachstums beteiligt

Cytokinin beeinflusst die Größe der vom SAM gebildeten Organe (Bartrina *et al.* 2017, Bartrina *et al.* 2011, Higuchi *et al.* 2004, Miyawaki *et al.* 2006, Werner *et al.* 2003). Cytokinin kontrolliert außerdem den Beginn der Zelldifferenzierung und reguliert somit die Dauer der Zellproliferation (Holst *et al.* 2011). Eine verringerte Cytokinin-Aktivität hat eine reduzierte Blattgröße und eine verzögerte Entwicklung zur Folge (Werner *et al.* 2003). Dahingegen führt ein erhöhter Cytokinin-Status oft zu der Ausbildung von vergrößerten Sprossorganen. Beispielsweise bilden *rock2*- und *rock3*-Mutanten, die einen erhöhten Cytokinin-Status besitzen, größere Blätter aus (Bartrina *et al.* 2017).

Veränderungen der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität wirkten sich auch auf die Größe der gebildeten Blätter aus. Sowohl die ektopische Expression von *UGTC76C1* als auch von *UGT76C2* führte zur Bildung von kleineren Rosettenblättern (Abbildung 20A). Die verkleinerten Rosettenblätter der Überexpressionslinien waren wahrscheinlich eine Folge der Cytokinin-Defizienz, die aus der verstärkten Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität resultierte. Der Doppel-Knockout von *UGT76C1* und *UGT76C2* führte hingegen zu einer signifikanten

Vergrößerung der Blattfläche (Abbildung 38C und D). Ursächlich dafür ist wahrscheinlich, dass der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung in den Primordien und den jungen Blättern zu einer lokalen Erhöhung der Cytokinin-Konzentration führte. Die in den betreffenden Geweben eine vermehrte Zellteilungsaktivität oder Zellelongation zur Folge hatte. Eine verstärkte Cytokininaktivität kann aber auch den gegenteiligen Effekt bewirken und zu der Bildung von kleineren Blättern führen (Hewelt *et al.* 1994, Sun *et al.* 2003). Anscheinend wirkt sich eine sehr stark erhöhte Zellteilungsaktivität ab einem bestimmten Level negativ auf die Zellexpansion und die Blattgröße aus (Dewitte *et al.* 2003). Als Reaktion auf Cytokinin zeigt das Organwachstum eine glockenförmige Kurve (Bartrina *et al.* 2017, Efroni *et al.* 2013, Ferreira und Kieber 2005).

Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es sich bei der Cytokinin-*N*-Glucosylierung ausschließlich um einen Inaktivierungsmechanismus handelt. Untermuert wird dies auch durch die Untersuchungen zur genetischen Interaktion von *ugt76c1,2* mit *rock4*. Bei *rock4* handelt es sich um eine Cytokinin-Überschussmutante. Bei der Mutante führt eine Punktmutation im *IPT3*-Gen zu einer erhöhten Aktivität des Cytokinin-Biosynthese-Enzyms und es wird mehr Cytokinin gebildet. Die *rock4*-Mutante weist im Vergleich zum WT kleinere Blätter auf (Jensen 2013). Der Cytokinin-Überschuss, der durch die *rock4*-Mutation entsteht, ist demnach höher als die Konzentration, bei der Cytokinin einen förderlichen Effekt auf die Blattgröße hat. Bei *ugt76c1,2_a rock4*-Tripelmutanten waren die Rosetten im Vergleich zu den *rock4*-Pflanzen weiter verkleinert (Abbildung 46). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine intakte Cytokinin-*N*-Glucosylierung dem Cytokininüberschuss in der *rock4*-Mutante entgegenwirkt, während *ugt76c1,2_a rock4*-Pflanzen durch den Verlust des Inaktivierungsweges die Erhöhung des Cytokinin-Gehalts weniger kompensieren konnten. Das von *IPT3* gebildete Cytokinin wird demnach durch die Aktivität von *UGT76C1* und *UGT76C2* deaktiviert. Wahrscheinlich regulieren *IPT3* und die Cytokinin-*N*-Glucosylierung im Verlauf der Blattentwicklung denselben Cytokininpool.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Blattentwicklung ein limitierender Faktor ist. Um genauere Aussagen über den Einfluss der Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf die Blattentwicklung zu erhalten, sollten bei *ugt76c1,2* und den *UGTC1ox*- und den *UGTC2ox*-Linien die Zellgrößen und Zellanzahlen der Blätter untersucht werden.

Es wurde postuliert, dass die Blattgröße auch durch, aus den Wurzeln in den Spross, transportiertes tZ und tZR beeinflusst wird (Osugi *et al.* 2017). Der Transport der Cytokinine des tZ-Typs ist spezifisch und erfolgt durch *ABCG14*-Transporter. Der Knockout von *ABCG14* führt zu der Ausbildung von stark verkleinerten Rosetten und Rosettenblättern (Zhang *et al.* 2014). Um zu testen, inwieweit der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität die Cytokinindefizienz des Sprosses kompensieren kann, wurde das Blattwachstum von *ugt76c1,2 rio1.3*-Tripelmutanten untersucht. *rio1.3* ist ein *loss-of-function*-Allel von *ABCG14*,

dass von Niemann (2013) beschrieben wurde. Cytokinintransportmessungen mit radioaktiv-markiertem tZ in *abcg14-1*- und *abcg14-2*-Mutanten zeigen, dass in den Knockout-Mutanten der Transport von tZ und tZR nicht komplett unterbunden wurde (Ko *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2014). Daher könnte man erwarten, dass der zusätzliche Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung zu einer Abschwächung der Cytokinindefizienz führen kann, da in den Wurzeln für den Transport in den Spross mehr tZ und tZR zur Verfügung steht und weil in den Blättern durch die Cytokinin-*N*-Glucosylierung kein Cytokinin inaktiviert wird. Das Sprosswachstum der Tripelmutanten zeigte den gleichen Cytokinindefizienz-Phänotyp wie die *rio1.3*-Einzelmutanten (Abbildung 48). Demnach war der Wegfall der Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität nicht ausreichend, um die Konzentration der freien Cytokininbasen soweit zu erhöhen, dass der Cytokinindefizienz-Phänotyp der Blätter abgeschwächt wurde. Cytokinin-Gehaltsmessungen zufolge ist in den Sprossen von *abcg14*-Einzelmutanten die Konzentration von tZ und der tZ-*N*-Glucoside stark verringert (Ko *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2014). Die verringerten Konzentrationen der tZ-*N*-Glucoside deuten darauf hin, dass in den *abcg14*-Mutanten die Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität bereits stark herunterreguliert war, wahrscheinlich um eine metabolische Kompensation zu erzielen. Daher ist es möglich, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in *rio1.3* bereits so stark herunterreguliert war, dass der vollständige Verlust keine zusätzliche Kompensation bewirkte.

Cytokinin hat einen Einfluss auf die Blattseneszenz, dabei ist schon lange bekannt, dass die exogene Zugabe von Cytokinin die Blattseneszenz inhibiert (Richmond und Lang 1957). Cytokinin verzögert aber auch als endogener Faktor die natürliche Blattseneszenz (Gan und Amasino 1995, Lim *et al.* 2007). Um den Verlauf der natürlichen Blattseneszenz in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten zu untersuchen, wurden die Fv/Fm-Werte im zeitlichen Verlauf der Entwicklung bestimmt. Die Messwerte weisen darauf hin, dass die Initiation der Blattseneszenz bei den Mutanten im Vergleich zum WT leicht verzögert war (Abbildung 40). Demnach ist anzunehmen, dass die endogene Cytokinin-Konzentration in den Blättern durch den Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung erhöht war und dadurch die Verzögerung der Seneszenz bewirkte. Das Transkriptlevel von *UGT85A1* steigt im Verlauf der natürlichen Seneszenz an (Šmehilová *et al.* 2016, van der Graaff *et al.* 2006). Für *UGT76C1* und *UGT76C2* ist dies hingegen nicht der Fall. Allerdings steigt insbesondere in der letzten Entwicklungsphase die Konzentration der Cytokinin-*N*-Glucoside stark an (Šmehilová *et al.* 2016). Um die Rolle der Cytokinin-*N*-Glucosylierung im Zusammenhang mit der Seneszenzinitiation genauer zu untersuchen, könnten in den Doppel-Knockout-Mutanten die Transkriptlevel von Genen untersucht werden, die mit der Seneszenz assoziiert sind. Um zu überprüfen ob, die Cytokinin-*N*-Glucosylierung mit der Seneszenz auch in einem kausalen Zusammenhang steht, könnten in Mutanten mit einer veränderten Seneszenz untersucht werden, ob die Konzentrationen der Cytokinin-*N*-Glucoside verändert sind.

4.4.2 Die regulative Funktion der Cytokinin-*N*-Glucosylierung im apikalen Sprossmeristem

4.4.2.1 Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung ist ein Negativregulator der Sprossmeristemaktivität

Die Analyse der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten hatte gezeigt, dass diese im Vergleich zum WT vergrößerte Infloreszenzmeristeme ausbildeten. Das Meristem der Doppelmutanten war außerdem aktiver. Der Plastochronwert korreliert invers mit der Primordienbildungsrate und war bei den Doppel-Knockout-Mutanten im Vergleich zum WT verringert (Abbildung 41). Im Einklang mit der mikroskopischen Analyse wurde in *ugt76c1,2*, nicht aber in den Einzel-Knockout-Mutanten, mehr Schoten pro Tag gebildet (Abbildung 42, Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung die Aktivität und Größe des SAMs beschränkt und dass die Gene *UGT76C1* und *UGT76C2* funktionell redundant sind. Es ist bekannt, dass Cytokinin ein wichtiger Faktor für die Kontrolle der Meristemfunktion. Cytokinin ist ein positiver Regulator der Meristemfunktion (Bartrina *et al.* 2011, Chickarmane *et al.* 2012, Landrein *et al.* 2018, Otto 2013, Werner *et al.* 2003). Demnach wird die Konzentration des aktiven Cytokinins im Meristem durch die *N*-Glucosylierung negativ reguliert. Diese Beobachtung wird von den Phänotypen der *UGTC2ox*-Pflanzen untermauert. Die Infloreszenzen hatten dünnere Blütenstängel und bildeten deutlich weniger Blütenprimordien als der WT (Abbildung 20). Da das Plastochron der Blüten negativ mit der Meristemgröße korreliert (Landrein *et al.* 2015), ist anzunehmen, dass die Pflanzen der *UGT76C2*-Überexpressionslinien auch kleinere Meristeme ausbildeten. Die verstärkte Cytokinin-*N*-Glucosylierung führte wahrscheinlich zu einer Verringerung des aktiven Cytokininpools im Meristem. Ein ähnlicher Effekt kann bei *35S:CKX1*-exprimierenden Pflanzen beobachtet werden (Werner *et al.* 2003). Um diese Hypothesen weiter zu testen, sollten Cytokinin-Messungen in den Infloreszenzen der *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten und der *UGTC2ox*-Überexpressionslinien durchgeführt werden.

Interessanterweise hatte die Expression von *UGT76C2-myc* spezifisch in der STM-Domäne kaum Auswirkungen auf das Wachstum des Sprosses oder der Infloreszenzen (Abbildung 24B). Die einzige Auffälligkeit war, dass die Stängel der Infloreszenzen weniger aufrecht standen. Um Rückschlüsse auf die Auswirkungen der verstärkten Cytokinin-*N*-Glucosylierung in der STM-Domäne auf die Meristemfunktion zu erhalten, wurde das Plastochron der Blüten bestimmt. Dieses war bei den transgenen Linien tendenziell erhöht, signifikant war die Veränderung aber nur in einer Linie (Abbildung 24C). Dies entsprach nicht den Erwartungen, da die *UGTC2ox*-Linien deutlich weniger und *ugt76c1,2* deutlich mehr Primordien bildeten als der WT. Um den Effekt der verstärkten Cytokinin-*N*-Glucosylierung in der STM-Domäne besser zu verstehen, wäre es sinnvoll, die Meristemgrößen zu bestimmen und zu testen, welche Auswirkung die *UGT76C2*-Missregulation auf die Aktivität von Reporterkonstrukten der

Cytokininantwort, der Stammzelldomäne sowie der WUS-Domäne hat. Diese aufwendigen Untersuchungen wurden aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

Die Tatsache, dass der Phänotyp der *STM:UGT76C2-myc*-Linien deutlich schwächer war, kann ein Hinweis darauf sein, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in der STM-Domäne des Meristems weniger relevant ist oder auf einer schwächeren Expression des Transgens beruhen. Bei den 35S-Überexpressionlinien konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Transgenexpression mit dem Ausprägungsgrad des Phänotyps korrelierte (Abbildung 23). Der Vergleich der Expressionsstärken der Transgene in den *UGT76C2ox*- und den *STM:UGT76C2-myc*-Linien durch Westernblot-Analysen ist technisch schwierig, da unterschiedliche Tags verwendet wurden und kein UGT76C2 spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. Weiterhin ist nicht bekannt wie stark der 35S-Promotor im Meristem aktiv ist. Für die Meristemfunktion ist außerdem auch das importierte Cytokinin aus den Wurzeln, den Primordien und dem provaskulären Gewebe der Infloreszenzen von Bedeutung (Bartrina *et al.* 2011, Holst *et al.* 2011, Landrein *et al.* 2018). Aus diesem Grund kann die ubiquitäre Expression des Transgens in der gesamten Pflanze unter Umständen auch den Cytokinin-Gehalt im Meristem beeinflussen und so die stärkere Ausprägung des Phänotyps bewirken.

4.4.2.2 Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung beeinflusst die Cytokininantwort im Meristem

Die Perzeption von Cytokinin erfolgt im Meristem durch AHK-Rezeptoren, die im SAM nur in der Domäne des OZ exprimiert sind. In diesem Bereich ist auch die Aktivität des synthetischen Cytokinin-Signalreporters *pTCSn:GFP* am höchsten. Veränderungen des Cytokinin-Status haben Auswirkungen auf die Größe der funktionalen Domänen im Meristem (Gordon *et al.* 2009, Gruel *et al.* 2016, Pierre-Jerome *et al.* 2018). Untersuchungen von Landrein *et al.* (2018) zeigten beispielsweise, dass die Größe des Meristems und die Größe der Expressionsdomäne sowie die Signalstärke des *pTCSn:GFP*-Reporters miteinander korrelieren (Landrein *et al.* 2018). Um zu untersuchen, wie sich der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung auf den Cytokininoutput im Meristem auswirkt, wurde die Aktivität des *pTCSn:GFP*-Reporters in *ugt76c1,2* bestimmt (Abbildung 42). Die Expressionsdomäne des Reporters war vergrößert. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Hypothese, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung die Aktivität des Meristems einschränkt. Die Intensität des *pTCSn:GFP*-Signals war allerdings schwächer als im WT. Somit war die Zellpopulation, in der die Cytokininperzeption erfolgt, vergrößert, aber der Cytokininoutput in den einzelnen Zellen war vermindert. Diese Beobachtung war unerwartet, da eine Entkopplung von Signalintensität und Expressionsdomänengröße des *pTCSn:GFP*-Reporters in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde. Möglicherweise war in diesem Bereich die Cytokinin-Signalweiterleitung teilweise unterdrückt, um den Überschuss an Cytokinin zu kompensieren. Eventuell ist für die

Aufrechterhaltung der Meristemfunktion aber auch der Gesamtoutput der Domäne entscheidend und nicht die absolute Signalstärke der einzelnen Zellen. Bislang gibt es keine Daten über die Aktivität des *pTCSn:GFP*-Reporters in Meristemen von Mutanten mit einem erhöhten Cytokinin-Status.

Die Studie der physiologischen Funktion eines Gens erfolgt klassischerweise, indem die phänotypischen Auswirkungen des Funktionsverlusts untersucht werden. In manchen Zusammenhängen können die Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch schwer zu interpretieren sein, da es schwierig ist, zwischen direkten und indirekten Effekten zu unterscheiden. Gerade bei der Untersuchung von komplexen Netzwerken mit vielen Rückkopplungsmechanismen, wie sie im Meristem vorliegen, ist dies der Fall. Die enge, gegenseitige Kontrolle der vielen beteiligten Komponenten verhindert, dass das regulatorische Netzwerk durch den Verlust einer oder weniger Komponenten aus dem Gleichgewicht gerät. Fällt eine Komponente aus, so wird sich durch die Prozesse der Gegenregulation ein neues Gleichgewicht einstellen. Um direkte Effekte zu untersuchen, kann es sinnvoll sein, gezielt transiente Störungen zu generieren und die Auswirkungen auf entsprechende Reporter (z.B. *pTCSn:GFP*) zu untersuchen. In einer solchen Studie wurde erst kürzlich der Einfluss des Transkriptionsfaktors HECTATE auf den CLV/WUS-Regelkreislauf untersucht (Gaillochet *et al.* 2017). Um das ungewöhnliche Muster des *pTCSn:GFP*-Reporters in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten zu verstehen, könnte es sinnvoll sein, solche Untersuchungen durchzuführen. Dazu sollten induzierbare Überexpressionslinien und induzierbare Knockout-Linien hergestellt werden und nach der Induktion der Expression, sollten die Auswirkungen auf die Aktivität der folgenden Reporter untersucht werden: den Reporter der Cytokininantwort, den Reporter der Stammzellaktivität (z.B. *pCLV3:mCherry* [Gaillochet *et al.* 2017]) und den Reporter der WUS-Domäne (z.B. *pWUS:YFP* [Gaillochet *et al.* 2017]).

4.4.2.3 *UGT76C2* wird in spezifischen Domänen des Meristems exprimiert

Um zu verstehen, wie die Cytokinin-*N*-Glucosylierung den Cytokininpool im Meristem reguliert, ist es von Bedeutung zu studieren, in welchen Bereichen des Meristems die Cytokinin-*N*-Glucosylierung aktiv ist. Es gibt einige Hinweise dafür, dass *UGT76C2* bei der Cytokinin-*N*-Glucosylierung eine dominierende Rolle spielt. Zwar führte weder der Knockout von *UGT76C1* noch von *UGT76C2* zu einer sichtbaren Veränderung der Phänotypen, allerdings wirkt sich der Knockout von *UGT76C2* auf molekularer Ebene stärker aus (Šmehilová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Beispielsweise war in *ugt76c2*, nicht aber in *ugt76c1*-Mutanten die Konzentration der Cytokinin-*N*-Glucoside stark verringert (Abbildung 34). Zudem wird nur die Expression von *UGT76C2* durch Cytokinin induziert (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmuster von *UGT76C2*

untersucht. In der Promotorregion und innerhalb der kodierenden Sequenz von *UGT76C2* sind verschiedene *WUS* und *ARR*-Bindemotive enthalten (Abbildung 7). Um die Relevanz der intragenischen *cis*-Elemente zu untersuchen, wurden die Reporterkonstrukte *pUGT76C2:GFP* und *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* erstellt. Die Expressionsmuster der Konstrukte unterschieden sich stark voneinander (Abbildung 7B-E). Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass die intragenischen *cis*-Elemente für die Regulation der gewebespezifischen Expression von *UGT76C2* entscheidend sind. In allen untersuchten Geweben wurde die Aktivität der Reporter durch die intragenischen *cis*-Elemente eingeschränkt und spezifiziert. Im Meristem war das transkriptionelle Reporterkonstrukt *pUGT76C2:GFP*, abgesehen von einer zentralen Domäne im Meristem, welche das OZ und den oberen Teil des RZs umfasste, im gesamten Meristem aktiv (Abbildung 8E und F). Dabei wurde das Signal ausgehend von der L1-Schicht nach unten hin graduell schwächer. Im Gegensatz dazu zeigte der translationale Reporter *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* die stärkste Aktivität in zwei verschiedenen Bereichen: Ein Signalmaximum konnte in der L1-Schicht detektiert werden und ein zweites in der zentralen Domäne des Meristems, in welcher der transkriptionelle Reporter nicht aktiv war (Abbildung 8A-D). Ein deutlich schwächeres Signal konnte in den Zellschichten unterhalb der Epidermis beobachtet werden (Abbildung 8). Dieses Expressionsmuster wurde bereits sehr früh in der Embryogenese angelegt (Abbildung 13).

Die Zellen des SAMs sind durch Plasmodesmata miteinander verbunden. Dabei bildet sowohl das ER als auch das Zytoplasma benachbarter Zellen jeweils ein Kontinuum. Durch den Austausch von mobilen Signalfaktoren vermitteln die Plasmodesmata die Zell-Zellkommunikation und ermöglichen außerdem den Stoffaustausch. Der Transport erfolgt dabei sowohl passiv durch Diffusion als auch selektiv (Kitagawa und Jackson 2017). *UGT76C2-GFP* war im Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 6). Die unter der Kontrolle des *UGT76C2*-Promotors exprimierte Reporterproteine *UGT76C2-GFP* und *GFP* könnten im Meristem somit durch Diffusion oder auch durch den aktiven Transport über die Plasmodesmata erfolgen.

Der unselektive Transport über die Plasmodesmata ist von deren Struktur und Häufigkeit abhängig. Die Plasmodesmata sind außerdem größenselektiv. Die Steuerung der Permeabilität erfolgt dabei durch die Regulation des Durchmessers des Plasmodesmakanals. Zur Untersuchung der Diffusion im SAM wurde die Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen, von *GFP* und von *GFP*-Fusionsproteinen analysiert (Kitagawa und Jackson 2017). Aus diesen Studien geht hervor, dass die Plasmodesmata-Permeabilität im SAM räumlich und in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlich ist. Es wird vermutet, dass die Bildung symplastischer Domänen für die Erhaltung der Stammzellidentität und außerhalb der Stammzellnische für die Zelldifferenzierung wichtig ist (Kitagawa und Jackson 2017). Wu *et al.* (2003) zeigten, dass sich in der L1-Schicht exprimiertes, monomeres *GFP*

(27 kDa) im gesamten Meristem verteilt. In der L1-Schicht exprimierte GFP-Dimere (54 kDa) diffundieren hingegen nur in die L2- und L3-Schicht. Das Signal nimmt dabei in den unteren Schichten graduell ab (Wu *et al.* 2003). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Schuster *et al.* (2014) bei der Untersuchung von in der L1-Schicht exprimiertem ARR7-GFP. Neben der L1-Schicht konnte ein schwächeres Signal auch in der L2-Schicht detektiert werden. Die freie Diffusion im SAM unterliegt demnach einer Größenselektion und wird durch selektive Transportmechanismen reguliert. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Reporterproteine GFP und UGT76C2-GFP sind aufgrund des Größenunterschiedes in ihren Diffusionseigenschaften nicht vergleichbar. Das UGT76C2-GFP-Fusionsprotein wird in seinen Diffusionseigenschaften dem nativen UGT76C2-Protein eher entsprechen, welches mit 50 kDa in etwa der Größe des GFP-Dimers (54 kDa) entspricht. Es ist daher anzunehmen, dass beide *UGT76C2*-Reporterkonstrukte in der L1-Schicht exprimiert wurden und die Reporterproteine anschließend diffundierten. Aufgrund des Größenunterschieds diffundierte das UGT76C2-GFP-Fusionsprotein dabei wahrscheinlich nur in die darunterliegenden Schichten, wohingegen sich das GFP-Protein viel stärker über mehrere Schichten verteilte. Die Expression von *UGT76C2* in der L1-Schicht des Meristems wird vermutlich durch die *cis*-Elemente in der Promotorregion determiniert, da das Signal in diesem Bereich für alle Reporterkonstrukte detektiert wurde (Abbildung 8). Im Protoderm bzw. in dessen Nähe werden auch die Enzyme LOG4 und LOG7 zur Aktivierung der Cytokininvorstufen exprimiert. Es wird angenommen, dass das aktive Cytokinin in die darunterliegenden Zellschichten diffundiert und so ein Cytokiningradient etabliert wird (Chickarmane *et al.* 2012, Gruel *et al.* 2016). Im SAM von *Sinapis alba* L. konnte der Cytokiningradient tatsächlich immunhistologisch nachgewiesen werden (Jacqumard *et al.* 2002). Die Perzeption des Cytokininsignals erfolgt einige Zellschichten unterhalb der L1-Schicht, durch die dort lokalisierte AHK-Cytokininrezeptoren (Gordon *et al.* 2009, Gruel *et al.* 2016, Pierre-Jerome *et al.* 2018). Das Cytokininsignal aktiviert unter anderem den WUS/CLV-Regelkreislauf, der einen Hauptfaktor zur Aufrechterhaltung der SAM-Homöostase darstellt (Brand *et al.* 2001, Schoof *et al.* 2000). Die Cytokinin-Konzentration im Meristem hat einen direkten Einfluss auf die Größe der funktionellen Domänen und die Anzahl der Stammzellen im Meristem. Da die Zellen der L1-Schicht die Menge des aktiven Cytokinins kontrollieren, welches das OZ erreicht, übernimmt die L1-Schicht in diesem Zusammenhang eine regulatorische Funktion. Unter diesem Gesichtspunkt ist es denkbar, dass auch die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in den äußeren Meristemschichten an der Steuerung des aktiven Cytokininpools, welcher die Cytokininrezeptoren im OZ erreicht, beteiligt ist. Es wird angenommen, dass die von der L1-Schicht ausgehenden Signale für die Positionierung der funktionalen Domänen im Meristem entscheidend sind (Gaillochet *et al.* 2015).

Um die Etablierung und Aufrechterhaltung dieser Domänen im Meristem zu verstehen, wurden verschiedene Computermodellierungsansätze durchgeführt. Die verschiedenen Modelle berücksichtigen verschiedene Aspekte: die räumliche Verteilung der regulatorischen Komponenten und deren gegenseitige Wechselwirkungen, die Verteilung des Cytokinins und teilweise auch die Zellteilung und das Wachstum des Meristems. Auf der Grundlage des von Chickarmane *et al.* (2012) erstellten Computermodells wurde postuliert, dass WUS die epidermale Cytokinin-Biosynthese negativ reguliert. Zudem ist in *clv3*-Mutanten die Expression des *LOG4*-Reporters deutlich verringert (Chickarmane *et al.* 2012). Eventuell ist die Cytokinin-*N*-Glucosylierung ein Teil dieses regulatorischen Regelkreislaufs und inaktiviert die Cytokininbasen bei Bedarf bereits in der Peripherie. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der Cytokinin-*N*-Glucosylierung in der Epidermis indirekt durch WUS erfolgt, könnte die Aktivität des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Reporterkonstruktes im Hintergrund von *WUS*-Mutanten untersucht werden, bei denen die Expression von *WUS* induziert oder reprimiert werden kann.

Ein weiteres Computermodell von Adibi *et al.* (2016) lässt die Spekulation zu, dass von der L1-Schicht verschiedene morphogene Signale ausgehen. In der Simulation konnte das Auftreten von CLV3 im OZ nur erreicht werden, wenn diese Signale neben der L1-Schicht auch von der L2- und L3-Schicht ausgingen. Dies entspricht der Aktivität des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Reporterkonstruktes. Ein Beispiel für ein solches morphogenes Signal der L1-Schicht ist, die in der L1-Schicht exprimierte microRNA miR394. Diese ist in mehreren Zellschichten unterhalb der Epidermis aktiv, wo diese ihr Zielgen *LCR* reprimiert und so zu der Aufrechterhaltung der Stammzellaktivität beiträgt (Knauer *et al.* 2013, Tucker *et al.* 2008).

Für das Reporterkonstrukt *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* konnte ein zweites Signalmaximum im Zentrum des Meristems festgestellt werden, welches mit dem OZ überlappt. Die Aktivität des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Reporters in dieser Domäne war vermutlich auf die intragenischen *cis*-Elemente zurückzuführen. Die Daten bestätigen Microarray-Daten, denen zufolge *UGT76C1* und *UGT76C2* in der *WUS*-Domäne exprimiert sind (Winter *et al.* 2007, Yadav *et al.* 2009). Um zu prüfen, inwieweit die *UGT76C2*- und die *WUS*-Domäne genau überlappen, sollte eine Co-Lokalisationsstudie von *pUGT76C2:UGT76C2-GFP* und einem *WUS*-Reporter durchgeführt werden.

UGT76C2 enthält in der Promotorregion und im intragenischen Bereich *WUS*-Bindeelemente (Abbildung 7) (Busch *et al.* 2010, Lohmann *et al.* 2001). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression von *UGT76C2* durch die Bindung von *WUS*, an die im Intron liegenden *cis*-Elemente induziert wird. Um zu testen, ob *WUS* *in planta* an die *cis*-Elemente bindet, könnte in bereits vorhandenen ChIP-seq-Datensätzen mit *WUS* untersucht werden, ob die entsprechenden *UGT76C2*-Fragmente aufgetreten sind. Entsprechende Experimente wurden

beispielsweise von Leibfried *et al.* (2005) oder Ma *et al.* (2019) durchgeführt, deren Datensätze aber Online nicht komplett zur Verfügung stehen.

Falls WUS die *UGT76C2*-Expression steuert, stellt sich die Frage, warum die Expression nur in der WUS-Domäne induziert wird und nicht in der Stammzelldomäne. Bei WUS handelt es sich um einen mobilen Faktor. Dieser wird zwar im OZ exprimiert, migriert aber anschließend gerichtet in die Stammzelldomäne. WUS reguliert unter anderem die Expression seines eigenen Negativregulators *CLV3*. Neuere Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass WUS in Abhängigkeit von seiner Konzentration in den Zellen als Mono- oder Dimer vorliegt (Perales *et al.* 2016). An seinem Expressionsort, im OZ, liegt WUS als Dimer vor und reprimiert die *CLV3*-Expression. In den Stammzellen hingegen liegt es als Monomer vor und induziert die *CLV3*-Expression nicht-zellautonom (Perales *et al.* 2016, Rodriguez *et al.* 2016, Yadav *et al.* 2011). Möglicherweise wird die *UGT76C2*-Expression nur durch die Dimerform von WUS induziert oder es werden weitere Faktoren benötigt, um die Transkription zu initiieren.

4.4.2.4 Die Redundanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung mit *CKX3* und *CKX5* im Meristem

Zur Regulation der Zellidentität und Zellteilungsaktivität im Meristem wird die Cytokinin-Konzentration und Cytokininsignaltransduktion räumlich fein reguliert. Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass für diesen Prozess auch die Cytokinin-*N*-Glucosylierung von Bedeutung ist. Im Meristem werden, von den sieben *CKX*-Isoformen, *CKX3* und *CKX5* domänenspezifisch exprimiert (Bartrina *et al.* 2011). Dabei überlappt die *CKX3*-Expressionsdomäne mit der von *UGT76C2*. In der Domäne des OZ wird *CKX3* stark exprimiert (Bartrina *et al.* 2011). Daher wurde postuliert, dass *CKX3* in diesem Bereich den Cytokinin-Status und damit auch die Größe der WUS-Domäne beeinflusst. Allerdings führt nur der gleichzeitige Knockout von *CKX3* und *CKX5* zu einer Vergrößerung des Meristems. Da *CKX5* im gesamten Meristem bzw. vor allem in den tieferen Bereichen des RZs exprimiert ist, scheint für die Regulation auch der Cytokinin-Status außerhalb der zentralen Domäne eine Rolle zu spielen (Bartrina *et al.* 2011). Tatsächlich wurde gezeigt, dass für die Meristemfunktion auch externes, in das Meristem transportiertes, *tZR* von Bedeutung ist. Weiterhin wurde postuliert, dass die Cytokininvorstufen *tZRP* und *tZR* in der Epidermis des SAM durch *LOG4* und in den Primordien durch *LOG7* in aktives *tZ* umgewandelt werden (Landrein *et al.* 2018). Um das Gleichgewicht aufrechtzuerhalten, können die aktiven Cytokininbasen durch die Aktivität der *CKX*-Enzyme (*CKX3* und *CKX5*) und durch Glucosylierungen (*tZROG*, *tZ7G*, *tZ9G*) wieder inaktiviert werden.

Um zu untersuchen, ob *UGT76C1*, *UGT76C2*, *CKX3* und *CKX5* auch funktional zusammenwirken und um die Redundanz der beiden Cytokinin-Inaktivierungsmechanismen im Meristem zu untersuchen, wurden in einem genetischen Ansatz *ugt76c1,2 cxx3,5-*

Quadrupelmutanten hergestellt. Von den Mutanten wurde die Meristemgröße und der Plastochronwert bestimmt. Die *ckx3,5*-Doppelmutanten zeigten wie erwartet stark vergrößerte Meristeme und einen verringerten Plastochronwert. Die Quadrupelmutanten *ugt76c1,3_a ckx3,5* entsprachen in diesen Punkten *ckx3,5* (Abbildung 45). *ugt76c1,2_a* wies in diesem Experiment im Vergleich zum WT jedoch kein vergrößertes SAM oder einen veränderten Plastochronwert auf. Das Experiment sollte daher wiederholt werden. Eine Bestätigung des Ergebnisses der *ugt76c1,2_a ckx3,5*-Quadrupelmutante würde allerdings darauf hindeuten, dass der Abbau von Cytokinin durch *CKX3* und *CKX5* im Meristem den Hauptinaktivierungsweg zur Regulation der Cytokinin-Konzentration darstellt. Auch die Tatsache, dass der Meristemphänotyp von *ckx3,5* im Vergleich zu *ugt76c1,2* deutlich stärker war, bekräftigt die dominierende Rolle der Cytokinindegradation durch *CKX3* und *CKX5*.

Bezieht man in die Überlegungen die subzelluläre Lokalisation der beiden Stoffwechselwege mit ein, so erscheint dies auch plausibel: Die Cytokinin-*N*-Glucosylierung ist im Zytosol und eventuell auch im Zellkern angesiedelt, wohingegen *CKX3* und *CKX5* im ER und im Apoplast lokalisiert sind und damit in unmittelbarer Nähe zu der Cytokininbindedomäne der AHK-Rezeptoren. Die beiden *CKX*-Enzyme können somit das physiologisch wirksame Cytokinin an den Rezeptoren direkt inaktivieren. Durch die Cytokinin-*N*-Glucosylierung kann hingegen nur das neugebildete oder das aus dem Apoplast in das Zytosol importierte Cytokinin inaktiviert werden. Die Regulation durch die *CKX*-Enzyme stellt in diesem Fall den nachgeschalteten Regulationsmechanismus dar und wirkt viel unmittelbarer. Daher kann der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung wahrscheinlich auch verhältnismäßig gut kompensiert werden. Der Knockout der Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen müsste zur Folge haben, dass es im Zytosol zu einer Anreicherung von aktiven Cytokininbasen kommt, wodurch mehr aktives Cytokinin in das ER oder den Apoplast und damit zu den Bindedomänen der Cytokininrezeptoren, gelangt, wo es aber von den *CKX*-Enzymen effizient abgebaut werden kann. Diese Hypothese wird auch durch die qPCR-Messungen gestützt, die zeigten, dass in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten die Transkriptlevel von *CKX3* und *CKX5* erhöht waren (Abbildung 35).

Der Knockout von *CKX3* und *CKX5* müsste hingegen zur Folge haben, dass jegliches Cytokinin, welches in das ER oder den Apoplast gelangt, von den Cytokininrezeptoren gebunden wird. Eine Gegenregulation im Zytosol oder auch der Biosynthese selbst ist nur indirekt wirksam. Ein weiterer Interpretationsansatz der Ergebnisse der *ugt76c1,2 ckx3,5*-Quadrupelmutante ist daher, dass der maximal erreichbare Cytokinin-Überschussphänotyp im Meristem bei den *ckx3,5*-Doppelmutanten bereits erreicht wurde. Der zusätzliche Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung führte in diesem Fall lediglich dazu, dass noch mehr aktives Cytokinin zu den Rezeptoren transportiert wurde, was keine Auswirkungen hätte, wenn die maximale Signalwirkung in den *ckx3,5*-Mutanten bereits erreicht wurde.

Die Beobachtung, dass das Meristemwachstum der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten in dem Versuch mit *ckx3,5* dem des WT entsprach, war unerwartet (Abbildung 45), zumal der Meristemphänotyp der *ugt76c1,2*-Doppelmutanten in den vorangegangenen Untersuchungen eindeutig war und in mehreren unabhängigen Experimenten reproduziert werden konnte. Es ist bekannt, dass sich die Wachstumsbedingungen und insbesondere der Nitratgehalt auf die Meristemaktivität und -größe sowie auf die Ausprägung von Meristemphänotypen auswirken. Dies wurde auch für den Meristemphänotyp von *ckx3,5* beobachtet. Dabei ist die Plastizität zur Ausbildung von Meristemphänotypen bei einer geringeren Nährstoffversorgung größer (Landrein *et al.* 2018) (Landrein, persönliche Mitteilung). Die Experimente sollten daher unter anderen Wachstumsbedingungen wiederholt werden, um den *ugt76c1,2*-Meristemphänotyp zu reproduzieren und genauere Aussagen über die Redundanz der *N*-Glucosylierung und der Degradation von Cytokinin durch CKX3 und CKX5 treffen zu können.

Des Weiteren könnten Cytokinin-Messungen und die Bestimmung der CKX-Aktivitäten von Proben der Infloreszenzen der *ckx3,5*- und der *ugt76c1,2*-Doppel- bzw. der Quadrupelmutanten die Interpretation der Daten erleichtern.

4.4.2.5 Die Expression von *UGT76C2* wird im Meristem durch Cytokinin induziert

Es wurde in der Literatur mehrfach beschrieben, dass *UGT76C2* zu den Cytokininantwortgenen gehört (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012). Um zu prüfen, ob in den verwendeten Reporterkonstrukten die für die Induktion notwendigen *cis*-regulatorischen Elemente enthalten und ob für die Cytokinin-Induktion die intragenischen *cis*-Elemente von Bedeutung sind, wurde die Aktivität der Reporterkonstrukte mittels konfokaler Mikroskopie vor und nach der Cytokininbehandlung untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Cytokinin-Induktion im Meristem waren insgesamt nicht ganz eindeutig. Für alle Konstrukte nahm das Fluoreszenzsignal im zeitlichen Verlauf ab (Abbildung 9A-C). Dennoch war die globale Fluoreszenzabnahme in den mit Cytokinin behandelten Proben langsamer als in den Referenzproben (Abbildung 9B und D, bzw. A und C). Dies verdeutlichte auch die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals (Abbildung 9E und F). Diese Beobachtung kann daher als indirekte Expressionsinduktion von *UGT76C2* und dessen Reporterkonstrukte gewertet werden, die der Abschwächung des Fluoreszenzsignals entgegenwirkte. Die räumliche Verteilung des Fluoreszenzsignals selbst änderte sich durch die Cytokininbehandlung nicht. Die translationalen und transkriptionellen Reporter unterschieden sich in Bezug auf die Fluoreszenzabnahme kaum, daher schienen alle für die Cytokinin-Induktion notwendigen *cis*-Elemente in der Promotorregion von *UGT76C2* bereits enthalten zu sein.

Dabei ist zu beachten, dass auch die Meristeme selbst mit der Zeit kleiner erschienen. Diese beiden Punkte könnten darauf hinweisen, dass die Inkubationsbedingungen der präparierten

Meristeme in diesem Versuch nicht physiologisch waren. Zudem wurde postuliert, dass der Transport von Cytokinin in das Meristem für die Gewährleistung der Meristemfunktion notwendig ist (Landrein *et al.* 2018). In dem hier durchgeführten Experiment wurden die Infloreszenzen vor der Inkubation mit Cytokinin abgeschnitten und anschließend in Medium inkubiert. Demnach fehlte im Meristem das aus den Wurzeln transportierte Cytokinin. Ein Versuchsaufbau, bei dem die Infloreszenzen nicht abgeschnitten werden, wäre daher günstiger. *UGT76C2* gehört außerdem zu den frühen Cytokininantwortgenen. Die Induktion der Expression ist bereits nach zwei Stunden messbar (Bhargava *et al.* 2013, Brenner *et al.* 2012, Šmehilová *et al.* 2016), daher sollte der Untersuchungszeitpunkt nach der Cytokinin-Induktion optimiert werden.

Es ist anzunehmen, dass die Induktion der Expression von *UGT76C2* durch Cytokinin über die Bindung von ARR-Transkriptionsfaktoren an die in der Promotorregion enthaltenen ARR-Motive erfolgte (Abbildung 7). Die Cytokininrezeptoren sind allerdings nur in der zentralen Domäne des OZ exprimiert (Gordon *et al.* 2009, Gruel *et al.* 2016, Pierre-Jerome *et al.* 2018) und auch der synthetische Cytokininisignalreporter *pTCSn:GFP* ist nur in diesem Bereich aktiv (Zürcher *et al.* 2013). Daher stellt sich die Frage, wie die Cytokinin-Induktion in der Meristemperipherie durch Cytokinin erfolgt, wenn in diesen Zellen keine Rezeptoren für die Perzeption des Cytokininisignals vorhanden sind. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Weiterleitung des Cytokininisignals aus dem OZ in die L1-Schicht über mobile Faktoren und deren gerichteten Transport erfolgt. Es werden auch immer wieder weitere Komponenten des regulatorischen Netzwerks zur Steuerung der Meristemfunktion identifiziert oder neue Erkenntnisse über die Bewegungen der bereits bekannten Faktoren gewonnen. Beispielsweise wurde erst kürzlich postuliert, dass es sich auch bei ARR7 um einen mobilen Faktor handeln könnte (Schuster *et al.* 2014).

4.5 Der Einfluss der Cytokinin-N-Glucosylierung auf die Wurzelentwicklung

Um weitere Hinweise auf die physiologische Funktion der Cytokinin-N-Glucosylierung zu erhalten, wurde zunächst die Auswirkung der starken Überexpression von *UGT76C1* und *UGT76C2* auf das Wurzelwachstum untersucht. Pflanzen mit einem reduzierten Cytokinin-Gehalt oder Cytokinin-Status bilden längere Wurzeln mit mehr Lateralwurzeln und vergrößerten RAM. Cytokinin ist somit ein Negativregulator dieser Prozesse (Mason *et al.* 2005, Miyawaki *et al.* 2006, Werner *et al.* 2003). Die Hauptwurzeln der *UGTC1ox*- und der *UGTC2ox*-Linien waren im Vergleich zum WT länger und bildeten mehr Lateralwurzeln (Abbildung 21 und Abbildung 18). Bei der Überexpression von *UGT76C2* war der Effekt stärker als bei der von *UGT76C1*. Wie bei der Charakterisierung des Sprosswachstums bereits beobachtet werden konnte (Abbildung 23), scheint auch im Kontext des Wurzelwachstums der Ausprägungsgrad des Phänotyps mit der Proteinabundanz zu korrelieren. Der

Ausprägungsgrad des Wurzelphänotyps war in den *UGTC2ox*-Linien ähnlich stark wie bei *35S:CKX1*-Pflanzen. Das verstärkte Wurzelwachstum steht im Einklang mit dem verringerten Cytokinin-Status und der verringerten Cytokinin-Sensitivität dieser Mutanten (Abbildung 15 und Abbildung 18). Die Ursache für die Cytokinindefizienz in den Wurzeln der *UGTC1ox* und *UGTC2ox*-Pflanzen wird in der erhöhten Cytokinin-*N*-Glucosylierungsaktivität und dem daraus resultierenden Mangel an freien Cytokininbasen begründet sein.

Cytokinin und Auxin wirken bei der Regulation des Wurzelwachstums antagonistisch. Das Zusammenspiel zwischen Cytokinin und Auxin bestimmt die Größe des RAMs und die Wachstumsrate der Wurzeln (Kieber und Schaller 2014). Bei der Vermittlung der antagonistischen Regulation nimmt der Transkriptionsfaktor *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)* eine Schlüsselrolle ein (Dello Iorio *et al.* 2008, Růžička *et al.* 2009). In der Transitionszone wird die Expression von *SHY2* durch Cytokinin über *ARR1* aktiviert. *SHY2* ist ein Repressor der Auxinsignalwirkung und moduliert die Auxinverteilung indem es die Expression der Auxintransportergene *LAX2*, *AUX1* und *PIN* reprimiert (Růžička *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2013a). Die Etablierung eines Auxinminimums in der Transitionszone wird zusätzlich durch die *ARR1* bedingte Expression von *GRETCHEN HAGEN 3.17* gefördert. Durch die Aktivität dieses Enzyms wird Auxin durch die Konjugation mit Asparagin oder Glutamat inaktiviert (Di Mambro *et al.* 2017). Umgekehrt bewirkt Auxin in der meristematischen Zone durch die Degradation von *SHY2* die Expression der *PIN*-Proteine in diesem Bereich und es kommt zu der Bildung eines Auxinmaximums, welches das QC spezifiziert (Dello Iorio *et al.* 2008). Durch die Bildung von scharf abgegrenzten Cytokinin- und Auxindomänen wird in der Transitionszone durch Cytokinin die Zelldifferenzierung gefördert, während Auxin im proximalen Meristem die Zellteilung induziert (Dello Iorio *et al.* 2007, Dello Iorio *et al.* 2008, Schaller *et al.* 2015).

Die Charakterisierung des Wurzelwachstums offenbarte, dass der Verlust der Cytokinin-*N*-Glucosylierung in *ugt76c1,2* zumindest keine offensichtlichen Veränderungen des Wurzelwachstums bewirkte. Unter Standardbedingungen zeigten die Mutanten in Bezug auf die Primärwurzellänge und die Anzahl der gebildeten Lateralwurzeln im Vergleich zum WT keine Auffälligkeiten (Abbildung 44). Die Untersuchungen belegen somit auch im Zusammenhang mit dem Wurzelwachstum die erstaunliche, kompensatorische Kapazität des Cytokinin-Metabolismus oder sind ein Hinweis dafür, dass die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in diesem Kontext nicht relevant ist.

Die Reporterkonstrukte für *UGT76C2* waren im Wurzelapex und in den Lateralwurzeln in sehr spezifischen Domänen aktiv. Das stärkste Signal konnte für das *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukt in den Zellen des QCs und in der Columella detektiert werden. Daneben war auch ein schwächeres Signal in den Stammzellen detektierbar. Die beobachteten Expressionsmuster des *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Reporters wurden schon in sehr frühen Stadien der Embryogenese angelegt. Eine Expression in den Vorläuferzellen des QCs und

den Columella Zellen war bereits ab dem späten Herz- bzw. im frühem Torpedostadium deutlich erkennbar (Abbildung 13).

Die Promotorregion und die kodierende Sequenz von *UGT76C2* enthalten mehrere Bindemotive für B-Typ-ARRs (siehe Abschnitt 3.2.1). In der Transitionszone, der Bereich in dem Cytokinin vorherrschend ist, war kein Signal zu verzeichnen. Dabei ist allerdings anzumerken, dass auch der *pTCSn:GFP*-Reporter in diesem Bereich nicht aktiv ist (Artner und Benkova 2019). Wie schon für den Spross beobachtet werden konnte, wurde das Signal der *UGT76C2*-Reporter auch in der Wurzel durch die intragenischen *cis*-Elemente spezifiziert. Beispielsweise konnte in den Zellen des QCs nur für das *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Konstrukt eine Aktivität beobachtet werden (Abbildung 11). Die starke Expression in dieser Domäne konnte auch bereits in sehr frühen Stadien der LWP-Bildung beobachtet werden. Wie beschrieben hat Auxin im QC ein Konzentrationsmaximum. In der Promotorregion von *UGT76C2* sind Auxin-Response-Elemente enthalten, allerdings konnte das Signal im QC nur für die translationalen Reporterkonstrukte beobachtet werden. Es sollte untersucht werden, ob die Expression von *UGT76C2* im QC durch Auxin induziert wird. Das QC liegt im Zentrum des Wurzelmeristems und besteht aus vier bis acht mitotisch inaktiven Zellen. Es ist essenziell um die Stammzellidentität in den umliegenden Zellen aufrecht zu erhalten (van den Berg *et al.* 1997). Wichtige Faktoren für die Positionierung des QCs und die Regulation der Zellteilungsaktivität sind die bereits beschriebene Auxinverteilung und die Transkriptionsfaktoren *WOX5*, *PLETHORA (PLT)* und *SCARECROW (SCR)* (Aida *et al.* 2004, Sabatini *et al.* 2003, Sarkar *et al.* 2007). *SCR* ist für die QC-Spezifikation essenziell und induziert unter anderem die Expression von *WOX5*. *WOX5* ist wichtig, um in den umliegenden Stammzellen den undifferenzierten Zustand aufrechtzuhalten (Sarkar *et al.* 2007). Sowohl die exogene Zugabe von Cytokinin als auch die Erhöhung des endogenen Cytokinin-Gehaltes oder des Cytokinin-Status induzieren Zellteilungen im QC. Cytokinin ist ein Negativregulator der QC-Spezifikation und fördert die mitotische Aktivität in den Zellen des QCs (Zhang *et al.* 2013a, Zhang *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Cytokinin die Expression von *SCR*, *WOX5* und den Auxinimportern *LAX2* und *AUX1* reprimiert (Zhang *et al.* 2013a). Diese Regulation erfolgt vorwiegend durch *AHK4* in Verbindung mit *ARR1* und *ARR12* (Pernisova *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2013a). Die Beobachtung, dass auch bei *lax2*-Mutanten Zellteilungen im QC auftreten, legt die Vermutung nahe, dass für die Zellteilungen Modulationen der Auxinverteilung verantwortlich sind (Zhang *et al.* 2013a). Möglicherweise ist die Cytokinin-*N*-Glucosylierung daran beteiligt, die Cytokininaktivität im QC zu unterdrücken. Um zu untersuchen, ob die Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Aufrechterhaltung der QC-Funktion von Bedeutung ist sollte untersucht werden, ob bei den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten Zellteilungen im QC beobachtet werden können. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Expression von *WOX5*-, *SCR*- und *DR5*-Markern in den *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Linien

verändert ist. Weiterhin ist bekannt, dass AHK3 im QC, den umliegenden Stammzellen, der Columella und in der Stele exprimiert wird (Pernisova *et al.* 2016) und, dass in *ahk3*-Knockoutlinien der *DR5:GFP*-Reporter der Auxinantwort im QC nicht aktiv ist.

Die Untersuchung des Sprosswachstums hatte gezeigt, dass die durch die *ugt76c1,2*-Mutationen bewirkten, phänotypischen Veränderungen mitunter sehr subtil waren. Um die physiologische Funktion der Cytokinin-*N*-Glucosylierung für die Regulation des Wurzelwachstum weiter aufzuklären, sollten die *ugt76c1,2*-Mutanten detaillierter charakterisiert werden. Um zu untersuchen, ob die Cytokininantwort in der Wurzel verändert ist, könnte die Aktivität des *pTCSn:GFP*-Reporters im nativen Zustand als auch nach der exogenen Cytokininapplikation untersucht werden.

Außerdem sollten die Meristemgröße und die Initiation der LWP untersucht werden. Die Lateralwurzelbildung ist ein postembryonaler Prozess. Die Initiation der LWP erfolgt durch antikline Zellteilungen in sogenannten Gründerzellen des Perizykels und wird auch im Zusammenspiel von Cytokinin und Auxin reguliert (Laplaze *et al.* 2007, Marhavý *et al.* 2011). Im Verlauf der Lateralwurzelbildung war der *pUGT76C2:UGT76C2-GFP*-Reporter in sehr spezifischen Domänen aktiv. Im Stadium IV der LWP konnte zunächst ein flächiges Signal in den äußeren beiden Zellschichten beobachtet werden. Es ist bekannt, dass Cytokinin die LWP-Bildung inhibiert (Li *et al.* 2006) und dass die Anzahl von angelegten Lateralwurzeln nicht immer ein gutes Kriterium ist, um beurteilen zu können, ob die LR-Initiation beeinträchtigt ist (De Smet *et al.* 2012, Dubrovsky und Forde 2012). Daher sollte in den *ugt76c1,2*-Doppelmutanten der Prozess der LWP-Initiation genauer untersucht werden, um festzustellen, ob die Cytokinin-*N*-Glucosylierung in diesem eine regulatorische Funktion einnimmt.

Für alle *UGT76C2*-Reporterkonstrukte konnte ein sehr starkes Signal in der Columella beobachtet werden (Abbildung 11). In diesem Bereich sind auch andere Gene, die mit dem Cytokinin-Metabolismus assoziiert sind, (z.B. *IPT5*, *AHK3*, *CKX4*) exprimiert (Miyawaki *et al.* 2004, Pernisova *et al.* 2016, Werner *et al.* 2003). Außerdem zeigen in der Columella sowohl der Reporter der Cytokininantwort *pTCSn:GFP* (Zürcher *et al.* 2013) als auch der Reporter der Auxinantwort *DR5:GFP* (Hayashi *et al.* 2014) eine hohe Aktivität. Die Columella ist an der Regulation des Gravitropismus beteiligt (Aloni *et al.* 2004, Pernisova *et al.* 2016). Die Regulation erfolgt durch Auxin, wobei auch in diesem Kontext Cytokinin die Auxinverteilung moduliert, indem es die Expression und die Lokalisation von Auxintransportern (*PIN3*, *PIN7* und *AUX1*) beeinflusst (Pernisova *et al.* 2016). Welche weiteren Funktionen die Columella bei der Regulation des Wurzelwachstums ausüben, ist allerdings noch nicht genau bekannt.

4.6 Der Vergleich der verwendeten Ansätze der reversen Genetik

Diese Arbeit zeigte, dass es in *Arabidopsis* zwei funktionell redundante Cytokinin-*N*-Glucosyltransferasen gibt, UGT76C1 und UGT76C2. Um die Funktion von redundanten Genen zu studieren, ist die Herstellung von Mehrfach-Knockout-Mutanten notwendig. Die besondere technische Herausforderung für die Herstellung der *UGT76C1-UGT76C2-Arabidopsis*-Doppelmutante lag darin, dass die Gene eng gekoppelt sind. Um die physiologische Relevanz der Cytokinin-*N*-Glucosylierung aufzuklären, wurden daher zuerst Knockdown-Linien hergestellt, bei denen die Expression der beiden Gene mit Hilfe der amiRNA-Technologie unterdrückt wurde. Diese Linien waren tendenziell cytokinindefizient (Brock, 2012). Zur Verifikation der amiUGT-Linien und um mehr Erkenntnisse über den Stoffwechselweg der Cytokinin-*N*-Glucosylierung gewinnen zu können, sollten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Mutanten hergestellt werden. Das Methodenspektrum zur Herstellung solcher Mutanten war zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit limitiert. Abgesehen von der bereits aufkeimenden Technologie der programmierbaren Zinkfinger-Nukleasen basierten die vorhandenen Methoden hauptsächlich auf ungerichteten Mutationsprozessen (siehe Abschnitt 1.4).

Zuerst wurde für die Herstellung der Doppelmutante ein transposonbasiertes System ausgewählt. Als Ausgangspunkt diente dabei eine T-DNA-Insertionslinie, die ein durch Hitze aktivierbares *Ds*-Element enthält. Bei diesem System wird die Eigenschaft der *Ds*-Transposons ausgenutzt, sich nach der Exzision wieder in der Nähe ihrer ursprünglichen Position zu integrieren (Abschnitt 3.5.1.1) (Nishal *et al.* 2005). Im Jahr 2013 gelang mit der Entwicklung des CRISPR/Cas9-Systems ein Durchbruch in der gezielten Genomeditierung bei Pflanzen (Feng *et al.* 2013, Jiang *et al.* 2013, Mao *et al.* 2013). Da sich zu diesem Zeitpunkt mit dem transposonbasierten Ansatz bereits erste Schwierigkeiten eingestellt hatten, wurde parallel begonnen, die Doppelmutanten mit dem CRISPR/Cas9-System herzustellen. Im Folgenden werden das amiRNA-, das CRISPR/Cas9- und das transposonbasierte System zur Erzeugung von Knockdown- oder Knockout-Mutanten miteinander verglichen.

Die Voraussetzungen und Möglichkeiten zur Anwendung der verschiedenen Methoden sind unterschiedlich. Das amiRNA-System kann verwendet werden, um die Expression einzelner Gene oder ganzer Genfamilien herunterzuregulieren (Schwab *et al.* 2006). Von besonderem Interesse ist dieser Ansatz auch für die Herstellung von Mutanten, bei denen ein vollständiger Knockout letal wäre. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die Verwendung von geeigneten Promotoren der Genknockout induzierbar gestaltet werden kann. Dadurch können die direkten Auswirkungen des Genknockouts studiert werden. Die Auswahl geeigneter Zielsequenzen innerhalb der Zielgene erfolgt mit Hilfe von bioinformatischen Vorhersageprogrammen (Schwab *et al.* 2006). Die Verfügbarkeit kann aber ein limitierender Faktor des Systems sein.

Mit dem transposonbasierten System können Doppel-Knockout-Mutanten von nahegelegenen Genen hergestellt werden, vorausgesetzt es stehen entsprechende T-DNA-Insertionslinien für eines der Zielgene zur Verfügung (Nishal *et al.* 2005). In der Transposonsequenz ist ein *GUS*-Gen enthalten, daher besteht unter Umständen die Möglichkeit bei einer erfolgreichen Mutagenese die generierte Linie für das Zielgen auch als Reporterlinie nutzen zu können (Nishal *et al.* 2005). Ein großer Vorteil des CRISPR/Cas9-Systems besteht darin, mehrere Gene auf einmal mutagenisieren zu können (Li *et al.* 2013b, Mao *et al.* 2013). Dabei können allerdings nur Zielsequenzen ausgewählt werden, die vor PAM-Sequenzen liegen. Durch die Anpassung orthologer CRISPR/Cas-Systeme, die sich in ihren PAM-Sequenzen unterscheiden, stehen allerdings immer mehr Zielsequenzen zur Verfügung (Steinert *et al.* 2015).

Vom zeitlichen Aspekt her sind die Methoden der CRISPR/Cas9- und der amiRNA-Mutagenese am schnellsten durchführbar. Beide Methoden erfordern das Design, die Klonierung und die Transformation entsprechender Konstrukte in *Arabidopsis*. Mit beiden Methoden können gewünschte Linien innerhalb von ein bis zwei Generationen hergestellt werden. Bei dem CRISPR/Cas9-System ist der Aufwand des Screens stark von der Effizienz der sgRNAs abhängig. Inzwischen stehen aber auch CRISPR/Cas9-Systeme zur Verfügung, bei denen *Cas9* durch entsprechende Promotoren in den Keimbahnzellen exprimiert wird. Durch diese Anpassung wurde die Wahrscheinlichkeit germinaler Mutationen und damit die Effizienz des Systems deutlich verbessert. Bei einer ausreichenden Effizienz der sgRNAs ist es mit diesen Systemen möglich homozygote Mutationen in der T1-Generation zu erhalten (Mao *et al.* 2016, Wang *et al.* 2015). Bei der Verwendung des transposonbasierten Systems hingegen ist der Zeit- und Arbeitsaufwand immens. Zum einen erfolgt die Selektion der Pflanzen mit somatischen oder germinalen Transpositionen aus etwa 120.000 HS1-Keimlingen und die anschließende Selektion der HS2-Keimlinge mit germinalen Transpositionen in Sterilkultur. Zum anderen müssen die PCRs auf die ~400 Pools zum Screen nach Pflanzen mit Transposonreinsertionen im Zielgen jeweils mit mindestens vier Primer-Paaren durchgeführt werden.

Die verwendeten Systeme unterscheiden sich in ihrer Effizienz, welche methodenspezifisch von verschiedenen Faktoren abhängen. Die Effizienz des transposonbasierten Systems ist abhängig von der Abundanz der AC-Transposase in den sich entwickelnden *Arabidopsis*-Embryonen, nach der Hitzebehandlung und dem Abstand der T-DNA zum Zielgen (siehe Abschnitt 3.5.1.1; Nishal *et al.*, 2005). In der HS1-Generation konnten nach der Streptomycin-Selektion variierte oder vollständig grüne Keimlinge selektiert werden, daher war die Transposase in der Gametogenese aktiv. Die Effizienz des Systems entsprach in etwa den Beschreibungen von Nishal *et al.* (2005). In der HS2-Generation konnten aus den 225 getesteten Pools, die insgesamt etwa 1000 Pflanzen umfassten, vier Transposon-

Reinsertionen in die kodierende Sequenz des *UGT76C2*-Gens durch Sequenzierungen bestätigt werden. Das Hauptproblem bestand allerdings darin, dass die PCRs zum Screen nach den Transposon-Reintegrationen in das *UGT76C2*-Gen als Produkt meistens nur eine Schmierbande auf dem Agarosegel erzeugten. Eventuell war der „Schmier“ eine Folge von unspezifischen Primerbindungen an die repetitiven Sequenzen der Transposongrenzen. Außerdem zeigten Genotypisierung-PCRs und Sequenzierungen, dass die T-DNA in der Ausgangslinie WiscDsLoxHs114_05B mindestens zweimal als *inverted repeat* inseriert vorlag (Anhang Abbildung S2A und B). In einem HS1-Keimling kann es somit zu mehreren Transpositionereignissen gekommen sein. Daher ist es denkbar, dass sich die unterschiedlich langen PCR-Fragmente über die repetitiven Bereiche auch untereinander verkettet haben. Die PCRs konnten nicht erfolgreich optimiert werden und die vier putativen *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Linien konnten aus den positiv getesteten Pools nicht identifiziert werden.

Für den Erfolg des CRISPR/Cas9- und des amiRNA-Systems ist die Effizienz und die Spezifität der verwendeten sg- bzw. amiRNA-Sequenzen entscheidend. Trotz der ständigen Verbesserung der bioinformatischen Programme zur Auswahl geeigneter Sequenzen und der Vorhersage möglicher *Off-targets* ist es nach wie vor schwierig die Effizienz der Konstrukte vorherzusagen. Daher sollten sowohl für den amiRNA- als auch für den CRISPR/Cas9-Ansatz stets mehrere Zielsequenzen bzw. sgRNAs genutzt werden.

Die Effizienz der sgRNAs kann über den Verlust der Restriktionsschnittstellen in der T1-Generation überprüft werden. Da die amiRNAs hingegen sowohl den Abbau der Ziel-mRNA und auch die Repression der Translation bewirken kann (Li *et al.* 2013a, Li *et al.* 2014), ist eine genaue Überprüfung der Effizienz bei diesem System weitaus schwieriger. Um geeignete Linien auszuwählen, werden in der Regel die Transkriptlevel der Zielgene mittels qPCR bestimmt. Besser sind allerdings Vortests, in denen die amiRNA-Kandidaten zusammen mit der Ziel-mRNA in Protoplasten oder *Nicotiana benthamiana* koexprimiert werden. Die Ziel-mRNA kodiert dabei für die Zielproteine, die mit Epitopen versehen sind. Die Effizienz der individuellen amiRNAs wird anschließend durch die Quantifizierung der Proteinexpression bestimmt, beispielsweise mittels Immunodetektion (Li *et al.* 2013a, Li *et al.* 2014). Diese Vortests sind allerdings sehr aufwendig. In der vorliegenden Arbeit wurden Linien von zwei verschiedene amiRNAs für den gleichzeitigen Knockdown von *UGT76C1* und *UGT76C2* untersucht. Für diese wurden 60 bzw. 53 Primärtransformanten isoliert, von denen 20 % bzw. 15 % den beschriebenen Cytokinidefizienz-Phänotyp sowie verringerte Transkriptlevel der Zielgene zeigten (Brock 2012).

Im CRISPR/Cas9-Ansatz zeigte nur eine von drei genutzten sgRNAs eine ausreichend hohe Aktivität. Von 29 getesteten T1-Pflanzen zeigten acht einen potenziellen Verlust der Restriktionsschnittstelle. Bei der Sequenzierung zeigten wiederum fünf von diesen eine

veränderte Zielsequenz. In der T3- bzw. in der T4-Generation konnten schließlich zwei homozygote Linien isoliert werden. Der Vergleich mit Daten aus der Literatur zeigt, dass bei einer ausreichend hohen Aktivität der sgRNA bereits in der T2-Generation mit homozygoten, germinalen Mutationen hätte gerechnet werden können (Fauser *et al.* 2014). Mit den oben beschriebenen CRISPR/Cas9-Systemen, bei denen die Expression des Cas9-Gens unter der Kontrolle von keimbahnspezifischen Promotoren steht, ist die Erfolgsaussicht auf bereits in der T1-Generation auftretende germinale Mutationen deutlich besser (Mao *et al.* 2016, Wang *et al.* 2015).

Das größte Problem bei der Editierung oder Mutagenese des Genoms sind unspezifische Hintergrundmutationen. Der CRISPR/Cas9-Ansatz bietet im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden mehr Möglichkeiten zur Vermeidung von *Off-targets*. Zum einen werden von den sgRNA-Vorhersageprogrammen mögliche *Off-targets* mit angegeben und können überprüft werden. Für die hier durchgeführte Mutagenese wurden sechs mögliche *Off-target*-Sequenzen vorhergesagt. Sequenzierungen dieser Loci in den generierten *ugt76c1,2*-Doppelmutanten zeigten, dass die Sequenzen dem WT entsprachen (Abschnitt 3.5.2.4). Zum anderen kann das Risiko von *Off-target*-Effekten durch Rückkreuzungen mit dem WT minimiert werden. Die identifizierten *ugt76c1,2*-Doppelmutanten wurden zweimal mit dem WT zurückgekreuzt.

Für die amiRNAs gegen *UGT76C1* und *UGT76C2* wurden von dem genutzten Programm keine *Off-targets* vorhergesagt. Bei Verwendung des amiRNA-Systems kann für eventuelle *Off-targets* allerdings nur untersucht werden, ob die Transkription dieser Gene, nicht aber ob die Translation der mRNA beeinträchtigt ist (Li *et al.* 2013a, Li *et al.* 2014). Der Vergleich der *35SamiUGT*-Linien mit den *ugt76c1,2*-Doppel-Knockout-Linien sowie die Tatsache, dass die *35SamiUGT*-Linien nicht komplementiert werden konnten, zeigten, dass die starke Cytokinindefizienz der *35SamiUGT*-Linien nicht aus der spezifischen Repression von *UGT76C1* und *UGT76C2* resultierte. Die Ergebnisse verdeutlichen somit, dass *Off-target*-Effekte teilweise nicht kalkulierbar sind und unterstreichen die Wichtigkeit der Bestätigung von beobachteten Phänotypen. Dies gilt allgemein für Methoden der Genomeditierung. Die generierten Linien können dafür entweder komplementiert werden oder es werden jeweils Linien von mindestens zwei verschiedenen amiRNAs oder sgRNAs gegen dasselbe Zielgen untersucht. Für die Komplementation von amiRNA-Linien müssen die Erkennungssequenzen der amiRNA in den Komplementationskonstrukten durch das Einfügen von stillen Mutationen verändert werden (Schwab *et al.* 2006).

Insgesamt ist festzuhalten, dass das transposonbasierte System prinzipiell gut funktioniert hat. Aus welchem Grund die Genotypisierungs-PCRs nicht funktioniert haben, konnte nicht aufgeklärt werden und derartige Probleme wurden in der Literatur auch nicht beschrieben. Der Zeitaufwand, der benötigt wird, um mit diesem System Mutanten herzustellen, ist allerdings

sehr groß. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund, warum die erfolgreiche Anwendung des Systems zur Herstellung einer Doppelmutante bisher nur einmal publiziert wurde (Tao *et al.* 2013). Ein weiteres Problem der mit dem transposonbasierten System generierten Linien ist, dass diese nur bedingt stabil sind, da die hitzeinduzierbare Transposase in der T-DNA enthalten bleibt. Es besteht also die Gefahr, dass bei erhöhten Temperaturen erneut eine Transposition induziert wird. Zudem können ungewollte Transpositionereignisse nur schlecht durch das Zurückkreuzen mit dem WT entfernt werden, da die Transposons vorrangig in benachbarte Regionen springen.

Die Entdeckung und Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems hat die gezielte Genomeditierung von Pflanzen revolutioniert und ist für die Herstellung von gezielten Knockout-Mutanten das Mittel der Wahl. Die Anwendung ist einfach und schnell und bietet den Vorteil, dass auch mehrere Gene auf einmal ausgeschaltet werden können (Li *et al.* 2013b, Mao *et al.* 2013). Seit der ersten Anwendung in Pflanzen 2013 wurde das CRISPR/Cas9-System ständig weiterentwickelt und es werden immer neue Anwendungsmöglichkeiten publiziert. Beispielsweise wurden die Cas-Enzyme mit anderen Enzymfunktionen fusioniert. Dadurch können diese beispielsweise als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren fungieren (Bortesi und Fischer 2015). Erst kürzlich gelang ein weiterer Meilenstein. Durch die Weiterentwicklung des Systems konnte in *Arabidopsis* die homologe Rekombination erfolgreich durchgeführt werden. Dieser Fortschritt wird die molekulare Pflanzenwissenschaft revolutionieren, da es fortan möglich sein wird, die genomische Sequenz gezielt zu verändern. Es können beispielsweise von Proteinen funktionale Domänen ausgetauscht oder Reportergene eingebaut werden (Miki *et al.* 2018). Das CRISPR/Cas9-System wird mittlerweile auch erfolgreich in vielen Nutzpflanzen angewendet. Dennoch sind die auf RNAi basierten Methoden auch weiterhin interessant, da sie für bestimmte Anwendungen, wie beispielsweise für die Untersuchung von Genen, deren Knockout letal ist, weiterhin von Bedeutung sind.

5 Literaturverzeichnis

- Adibi M, Yoshida S, Weijers D, Fleck C** (2016) Centering the organizing center in the *Arabidopsis thaliana* shoot apical meristem by a combination of cytokinin signaling and self-organization, *PLoS One*, **11**, e0147830.
- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T** (2012) Plant stem cell niches, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 615-636.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B** (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche, *Cell*, **119**, 109-120.
- Albrecht T, Argueso CT** (2016) Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth-defence trade-off, *Ann. Bot.*, **119**, 725-735.
- Allen M, Qin W, Moreau F, Moffatt B** (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism, *Physiol. Plant.*, **115**, 56-68.
- Aloni R, Langhans M, Aloni E, Ullrich CI** (2004) Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism, *Planta*, **220**, 177-182.
- Alonso JM, Ecker JR** (2006) Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*, *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 524-536.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, **301**, 653-657.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Artner C, Benkova E** (2019) Ethylene and cytokinin: partners in root growth regulation, *Mol. Plant*, **12**, 1312-1314.
- Åstot C, Dolezal K, Nordström A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua N-H, Sandberg G** (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14778-14783.
- Bajguz A, Piotrowska A** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin, *Phytochemistry*, **70**, 957-969.
- Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 89-113.
- Bartrina I** (2006). Molekulare Charakterisierung von *ckx* Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokinindefizienzsyndroms in *Arabidopsis thaliana*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**
- Bartrina I, Jensen H, Novák O, Strnad M, Werner T, Schmölling 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, Schmölling 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.
- Bäurle I, Laux T** (2003) Apical meristems: the plant's fountain of youth, *Bioessays*, **25**, 961-970.
- Bernard P, Couturier M** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes, *J. Mol. Biol.*, **226**, 735-745.
- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **62**, 293-300.

- Besnard F, Refahi Y, Morin V, Marteaux B, Brunoud G, Chambrier P, Rozier F, Mirabet V, Legrand J, Laine S, Thevenon E, Farcot E, Cellier C, Das P, Bishopp A, Dumas R, Parcy F, Helariutta Y, Boudaoud A, Godin C, Traas J, Guedon Y, Vernoux T** (2014) Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis, *Nature*, **505**, 417-421.
- Bhargava A, Clabaugh I, To JP, Maxwell BB, Chiang Y-H, Schaller GE, Loraine A, Kieber JJ** (2013) Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-seq in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **162**, 272-294.
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize, *Plant Physiol.*, **125**, 378-386.
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bishopp A, Help H, El-Showk S, Weijers D, Scheres B, Friml J, Benková E, Mähönen A P, Helariutta Y** (2011a) A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots, *Curr. Biol.*, **21**, 917-926.
- Bishopp A, Lehesranta S, Vatén A, Help H, El-Showk S, Scheres B, Helariutta K, Mähönen A P, Sakakibara H, Helariutta Y** (2011b) Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem, *Curr. Biol.*, **21**, 927-932.
- Bortesi L, Fischer R** (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond, *Biotechnol. Adv.*, **33**, 41-52.
- Bouche N, Bouchez D** (2001) *Arabidopsis* gene knockout: Phenotypes wanted, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 111-117.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B** (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 254-263.
- Bowles D, Lim EK, Poppenberger B, Vaistij FE** (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 567-597.
- Brand U, Grünewald M, Hobe M, Simon R** (2002) Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **129**, 565-575.
- Brand U, Hobe M, Simon R** (2001) Functional domains in plant shoot meristems, *Bioessays*, **23**, 134-141.
- Brenner WG, Ramireddy E, Heyl A, Schmülling T** (2012) Gene regulation by cytokinin in *Arabidopsis*, *Front. Plant Sci.*, **3**, 1-22.
- Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, 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, *Plant J.*, **44**, 314-333.
- Brock L** (2012). Untersuchung der Rolle der Cytokinin-N-Glucosylierung in *Arabidopsis thaliana*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Masterarbeit**
- Bromley JR, Warnes BJ, Newell CA, Thomson JC, James CM, Turnbull CG, Hanke DE** (2014) A purine nucleoside phosphorylase in *Solanum tuberosum* L. (potato) with specificity for cytokinins contributes to the duration of tuber endodormancy, *Biochem. J.*, **458**, 225-237.
- Brownlee BG, Hall RH, Whitty CD** (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine, *Can. J. Biochem.*, **53**, 37-41.
- Brzobohaty B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K** (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem, *Science*, **262**, 1051-1054.
- Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*, *Plant J.*, **34**, 13-26.

- Busch W, Miotk A, Ariel FD, Zhao Z, Forner J, Daum G, Suzaki T, Schuster C, Schultheiss SJ, Leibfried A, Haubeiss S, Ha N, Chan RL, Lohmann JU** (2010) Transcriptional control of a plant stem cell niche, *Dev. Cell*, **18**, 849-861.
- Caesar K, Thamm AMK, Witthöft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, Horak J, 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.
- Carmell MA, Hannon GJ** (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 214-218.
- Carthew RW, Sontheimer EJ** (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell*, **136**, 642-655.
- Cary AJ, Liu W, Howell SH** (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.
- Cedzich A, Stransky H, Schulz B, Frommer WB** (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures, *Plant Physiol.*, **148**, 1857-1867.
- Chen CM, Kristopeit SM** (1981) Metabolism of cytokinin - deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat-germ cells, *Plant Physiol.*, **68**, 1020-1023.
- Chickarmane VS, Gordon SP, Tarr PT, Heisler MG, Meyerowitz EM** (2012) Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4002-4007.
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, **16**, 735-743.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F** (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819-823.
- Cortleven A, Leuendorf JE, Frank M, Pezzetta D, Bolt S, Schmölling T** (2019) Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants, *Plant Cell Environ.*, **42**, 998-1018.
- Cucinotta M, Manrique S, Cuesta C, Benkova E, Novak O, Colombo L** (2018) CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.*, **69**, 5169-5176.
- Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM** (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.
- De Smet I, White PJ, Bengough AG, Dupuy L, Parizot B, Casimiro I, Heidstra R, Laskowski M, Lepetit M, Hochholdinger F, Draye X, Zhang HM, Broadley MR, Peret B, Hammond JP, Fukaki H, Mooney S, Lynch JP, Nacry P, Schurr U, Laplaze L, Benfey P, Beeckman T, Bennett M** (2012) Analyzing lateral root development: how to move forward, *Plant Cell*, **24**, 15-20.
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation, *Curr. Biol.*, **17**, 678-682.
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S** (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem, *Science*, **322**, 1380-1384.
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquemard A, Kilby NJ, Murray JAH** (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-Type cyclin CYCD3, *Plant Cell*, **15**, 79-92.
- Di Mambro R, De Ruvo M, Pacifici E, Salvi E, Sozzani R, Benfey PN, Busch W, Novak O, Ljung K, Di Paola L, Maree AFM, Costantino P, Grieneisen VA, Sabatini S** (2017) Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E7641-E7649.

- Ding Y, Li H, Chen L-L, Xie K (2016) Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9, *Front. Plant Sci.*, **7**, 1-12.
- Dubrovsky JG, Forde BG (2012) Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them, *Plant Cell*, **24**, 4-14.
- Durán-Medina Y, Díaz-Ramírez D, Marsch-Martínez N (2017) Cytokinins on the move, *Front. Plant Sci.*, **8**, 1-7.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, *Nucl. Acids Res.*, **19**, 1349.
- Efroni I, Han S-K, Kim Hye J, Wu M-F, Steiner E, Birnbaum Kenneth D, Hong Jong C, Eshed Y, Wagner D (2013) Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses, *Dev. Cell*, **24**, 438-445.
- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk, *Development*, **140**, 1373-1383.
- Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*, *Plant J.*, **10**, 967-979.
- Entsch B, Letham DS (1979) Enzymic glucosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine, *Plant Sci. Lett.*, **14**, 205-212.
- Falk A, Rask L (1995) Expression of a zeatin-*O*-glucoside-degrading beta-glucosidase in *Brassica napus*, *Plant Physiol.*, **108**, 1369-1377.
- Fausser F, Schiml S, Puchta H (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, **79**, 348-359.
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, *Cell Res.*, **23**, 1229-1232.
- Ferreira FJ, Kieber JJ (2005) Cytokinin signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 518-525.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **391**, 806-811.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999) Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems, *Science*, **283**, 1911-1914.
- Forner J, Pfeiffer A, Langenecker T, Manavella P, Lohmann JU (2015) Germline-transmitted genome editing in *Arabidopsis thaliana* using TAL-effector-nucleases, *Plos One*, **10**, e0121056.
- Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiacovo MP, Church GM, Calarco JA (2013) Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system, *Nat. Methods*, **10**, 741-743.
- Gaillochet C, Daum G, Lohmann JU (2015) O cell, where art thou? The mechanisms of shoot meristem patterning, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **23**, 91-97.
- Gaillochet C, Stiehl T, Wenzl C, Ripoll JJ, Bailey-Steinitz LJ, Li LX, Pfeiffer A, Miotk A, Hakenjos JP, Forner J, Yanofsky MF, Marciniak-Czochra A, Lohmann JU (2017) Control of plant cell fate transitions by transcriptional and hormonal signals, *Elife*, **6**, 1-30.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnol.*, **31**, 397-405.
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants, *J. Exp. Bot.*, **62**, 2827-2840.
- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **146**, 1155-1164.

- Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortová J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmölling T, Frébort I** (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L., *J. Plant Growth Regul.*, **26**, 255-267.
- Gan S, Amasino RM** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin, *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gandia-Herrero F, Lorenz A, Larson T, Graham IA, Bowles DJ, Rylott EL, Bruce NC** (2008) Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in *Arabidopsis*: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases, *Plant J.*, **56**, 963-974.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnyš V** (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2579-E2586.
- Gattolin S, Alandete-Saez M, Elliott K, Gonzalez-Carranza Z, Naomab E, Powell C, Roberts JA** (2006) Spatial and temporal expression of the response regulators *ARR22* and *ARR24* in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.*, **57**, 4225-4233.
- Ghanem ME, Albacete A, Martinez-Andujar C, Acosta M, Romero-Aranda R, Dodd IC, Lutts S, Perez-Alfocea F** (2008) Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.), *J. Exp. Bot.*, **59**, 3039-3050.
- Gillissen B, Bürkle L, Andre B, Kühn C, Rentsch D, Brandl B, Frommer WB** (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **12**, 291-300.
- Goh T, Toyokura K, Wells DM, Swarup K, Yamamoto M, Mimura T, Weijers D, Fukaki H, Laplaze L, Bennett MJ, Guyomarc'h S** (2016) Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor, *Development*, **143**, 3363-3371.
- Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM** (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16529-16534.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R** (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI, *Nucl. Acids Res.*, **38**, W695-W699.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4645-4549.
- Gruel J, Landrein B, Tarr P, Schuster C, Refahi Y, Sampathkumar A, Hamant O, Meyerowitz EM, Jönsson H** (2016) An epidermis-driven mechanism positions and scales stem cell niches in plants, *Sci. Adv.*, **2**, 1-13.
- Guan P** (2017) Dancing with hormones: a current perspective of nitrate signaling and regulation in *Arabidopsis*, *Front. Plant Sci.*, **8**, 1-30.
- Gultekin H, Heermann KH** (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix, *Anal. Biochem.*, **172**, 320-329.
- Haberlandt G** (1913) Zur Physiologie der Zellteilung, *Sitzber. K. Preuss. Akad. Wiss.*, **318**,
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Havlová M, Dobrev PI, Motyka V, Storchová H, Libus J, Dobrá J, Malbeck J, Gaudinová A, Vanková R** (2008) The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing *trans*-zeatin O-glucosyltransferase gene under *35S* or *SAG12* promoters, *Plant Cell Environ.*, **31**, 341-353.
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M** (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans, *Curr. Biol.*, **12**, 1557-1565.

- Hayashi KI, Nakamura S, Fukunaga S, Nishimura T, Jenness MK, Murphy AS, Motose H, Nozaki H, Furutani M, Aoyama T (2014) Auxin transport sites are visualized in planta using fluorescent auxin analogs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11557-11562.
- Hejátko J, Pernisová M, Eneva T, Palme K, Brzobohatý B (2003) The putative sensor histidine kinase CK11 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*, *Mol. Genet. Genomics*, **269**, 443-453.
- Hewelt A, Prinsen E, Schell J, Vanonckelen H, Schmülling T (1994) Promoter tagging with a promoterless *ipt* gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects, *Plant J.*, **6**, 879-891.
- Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmülling T (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors, *Eur. J. Cell Biol.*, **91**, 246-256.
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T (2004) *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8821-8826.
- Hirose N, Makita N, Yamaya T, 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, Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation, *J. Exp. Bot.*, **59**, 75-83.
- Holst K, Schmülling T, Werner T (2011) Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic *Arabidopsis* plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation, *J. Plant Physiol.*, **168**, 1328-1334.
- Hosoda K, Imamura A, Katoh E, Hatta T, Tachiki M, Yamada H, Mizuno T, 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.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 766-768.
- Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ (2004) *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 47822-47832.
- Houba-Hérin N, Pethe C, d'Alayer J, Laloue M (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts, *Plant J.*, **17**, 615-626.
- Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant, *Nucl. Acids Res.*, **29**, 102-105.
- Hughes J, Hughes MA (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons, *DNA Seq.*, **5**, 41-49.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling, *Plant Cell*, **18**, 3073-3087.
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction, *Nature*, **413**, 383-389.
- Hwang I, Sheen J, Müller B (2012) Cytokinin signaling networks, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 353-380.
- Imamura A, Kiba T, Tajima Y, Yamashino T, 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 Cell Physiol.*, **44**, 122-131.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*, *Nature*, **409**, 1060-1063.

- Jacqumard A, Detry N, Dewitte W, Van Onckelen H, Bernier G** (2002) *In situ* localisation of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition, *Planta*, **214**, 970-973.
- Jander G, Barth C** (2007) Tandem gene arrays: a challenge for functional genomics, *Trends Plant Sci.*, **12**, 203-210.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M** (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities, *Curr. Biol.*, **15**, 1560-1565.
- Jensen H** (2013). Molecular characterisation of dominant repressors of the cytokinin deficiency syndrome *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE** (1999) The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase, *Plant Cell*, **11**, 1925-1933.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP** (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice, *Nucl. Acids Res.*, **41**, e188.
- Jin S-H, Ma X-M, Kojima M, Sakakibara H, Wang Y-W, Hou B-K** (2012) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through *O*-glucosylation, *Planta*,
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E** (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816-821.
- Jiskrová E, Novák O, Pospíšilová H, Holubová K, Karády M, Galuszka P, Robert S, Frébort I** (2016) Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots, *New Biotech.*, **33**, 735-742.
- Jung A, Ruckert S, Frank P, Brabletz T, Kirchner T** (2002) 7-deaza-2'-deoxyguanosine allows PCR and sequencing reactions from CpG islands, *J. Clin. Pathol.-Mol. Pa.*, **55**, 55-57.
- Kakimoto T** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 677-685.
- Kamada-Nobusada T, Sakakibara H** (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis, *Phytochemistry*, **70**, 444-449.
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H** (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 14049-14054.
- Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon LJ, Feldblyum T, Nierman W, Benito MI, Lin XY, Town CD, Venter JC, Fraser CM, Tabata S, Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Asamizu E, Kato T, Kotani H, Sasamoto S, Ecker JR, Theologis A, Federspiel NA, Palm CJ, Osborne BI, Shinn P, Conway AB, Vysotskaia VS, Dewar K, Conn L, Lenz CA, Kim CJ, Hansen NF, Liu SX, Buehler E, Altafi H, Sakano H, Dunn P, Lam B, Pham PK, Chao Q, Nguyen M, Yu GX, Chen HM, Southwick A, Lee JM, Miranda M, Toriumi MJ, Davis RW, Wambutt R, Murphy G, Dusterhoft A, Stiekema W, Pohl T, Entian KD, Terryn N, Volckaert G, Salanoubat M, Choisine N, Rieger M, Ansoerge W, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Artiguenave F, Weissenbach J, Quetier F, Wilson RK, de la Bastide M, Sekhon M, Huang E, Spiegel L, Gnoj L, Pepin K, Murray J, Johnson D, Habermann K, Dedhia N, Parnell L, Preston R, Hillier L, Chen E, Marra M, Martienssen R, McCombie WR, Mayer K, White O, Bevan M, Lemcke K, Creasy TH, Bielke C, Haas B, Haase D, Maiti R, Rudd S, Peterson J, Schoof H, Frishman D, Morgenstern B, Zaccaria P, Ermolaeva M, Perteau M, Quackenbush J, Volfovsky N, Wu DY, Lowe TM, Salzberg SL, Mewes HW, Rounsley S, Bush D, Subramaniam S, Levin I, Norris S, Schmidt R, Acarkan A, Bancroft I, Quetier F, Brennicke A, Eisen JA, Bureau T, Legault BA, Le QH, Agrawal N, Yu Z, Martienssen R, Copenhaver GP, Luo S, Pikaard CS, Preuss D, Paulsen IT, Sussman M, Britt AB, Selinger DA, Pandey R, Mount DW, Chandler VL, Jorgensen RA, Pikaard C, Juergens G, Meyerowitz EM, Theologis A, Dangl J, Jones JDG, Chen M, Chory J, Somerville MC, In AG** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, **408**, 796-815.

- Kawalleck P, Somssich IE, Feldbrugge M, Hahlbrock K, Weisshaar B** (1993) Polyubiquitin gene expression and structural properties of the *ubi4-2* gene in *Petroselinum crispum*, *Plant Mol. Biol.*, **21**, 673-684.
- Kiba T, Aoki K, Sakakibara H, Mizuno T** (2004) *Arabidopsis* response regulator, *ARR22*, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant, *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1063-1077.
- Kiba T, Takei K, Kojima M, Sakakibara H** (2013) Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*, *Dev. Cell*, **27**, 452-461.
- Kieber JJ, Schaller GE** (2014) Cytokinins, *Arabidopsis Book*, **12**, 1-44.
- Kieber JJ, Schaller GE** (2018) Cytokinin signaling in plant development, *Development*, **145**, 1-7.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weini S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The *AtGenExpress* global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses, *Plant J.*, **50**, 347-363.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by *AHK3* through phosphorylation of *ARR2* in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 814-819.
- Kinoshita-Tsujimura K, Kakimoto T** (2011) Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Signal. Behav.*, **6**, 66-71.
- Kinoshita A, Betsuyaku S, Osakabe Y, Mizuno S, Nagawa S, Stahl Y, Simon R, Yamaguchi-Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S** (2010) *RPK2* is an essential receptor-like kinase that transmits the *CLV3* signal in *Arabidopsis*, *Development*, **137**, 3911-3920.
- Kiran NS, Benková E, Reková A, Dubová J, Malbeck J, Palme K, Brzobohatý B** (2012) Retargeting a maize β -glucosidase to the vacuole – Evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole, *Phytochemistry*, **79**, 67-77.
- Kitagawa M, Jackson D** (2017) Plasmodesmata-mediated cell-to-cell communication in the shoot apical meristem: how stem cells talk, *Plants*, **6**, 1-28.
- Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans MC, Tucker MR, Laux T** (2013) A protodermal *miR394* signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem, *Dev. Cell*, **24**, 125-132.
- Ko D, Kang J, Kiba T, Park J, Kojima M, Do J, Kim KY, Kwon M, Endler A, Song W-Y, Martinoia E, Sakakibara H, Lee Y** (2014) *Arabidopsis* *ABCG14* is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 7150-7155.
- Köllmer I** (2009). Funktionelle Charakterisierung von *CKX7* und cytokininregulierten Transkriptionsfaktorgenen in *Arabidopsis thaliana*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit**.
- Köllmer I, Novák O, Strnad M, Schmülling T, Werner T** (2014) Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (*CKX7*) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation, *Plant J.*, **78**, 359-371.
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector, *Mol. Genet. Genomics*, **204**, 383-396.
- Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H, Sakagami Y** (2006) A plant peptide encoded by *CLV3* identified by in situ MALDI-TOF MS analysis, *Science*, **313**, 845-848.
- Kopecna M, Blaschke H, Kopecny D, Vigouroux A, Koncitikova R, Novak O, Kotland O, Strnad M, Morera S, von Schwartzberg K** (2013) Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides, *Plant Physiol.*, **163**, 1568-1583.
- Kowalska M, Galuszka P, Frébortová J, Šebela M, Béres T, Hluska T, Šmehilová M, Bilyeu KD, Frébort I** (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: Heterologous expression, purification and properties, *Phytochemistry*, **71**, 1970-1978.

- Kudo T, Kiba T, Sakakibara H** (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins, *J. Integr. Plant Biol.*, **52**, 53-60.
- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, 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.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuzuka 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, 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.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-675.
- Landrein B, Formosa-Jordan P, Malivert A, Schuster C, Melnyk CW, Yang W, Turnbull C, Meyerowitz EM, Locke JCW, Jonsson H** (2018) Nitrate modulates stem cell dynamics in *Arabidopsis* shoot meristems through cytokinins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 1382-1387.
- Landrein B, Refahi Y, Besnard F, Hervieux N, Mirabet V, Boudaoud A, Vernoux T, Hamant O** (2015) Meristem size contributes to the robustness of phyllotaxis in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.*, **66**, 1317-1324.
- Laplaze L, Benková E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T, Bennett M** (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation, *Plant Cell*, **19**, 3889-3900.
- Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J** (1998) Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **10**, 1375-1390.
- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jurgens G** (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*, *Development*, **122**, 87-96.
- Lee S, Doxey AC, McConkey BJ, Moffatt BA** (2012) Nuclear targeting of methyl-recycling enzymes in *Arabidopsis thaliana* is mediated by specific protein interactions, *Mol. Plant*, **5**, 231-248.
- Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL** (2014) CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants, *Mol. Plant*, **7**, 1494-1496.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU** (2005) *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators, *Nature*, **438**, 1172-1175.
- Lenhard M, Laux T** (2003) Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1*, *Development*, **130**, 3163-3173.
- Letham DS, Palni LMS** (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **34**, 163-197.
- Letham DS, Palni LMS, Tao G, Gollnow B, Bates C** (1983) Regulators of cell division in plant tissues XXIX. The activities of cytokinin glucosides and alanine conjugates in cytokinin bioassays, *J. Plant Growth Regul.*, **2**, 103-115.
- Letham DS, Wilson MM, Parker CW, Jenkins ID, Macleod JK, Summons RE** (1975) Regulators of cell division in plant tissue. XXIII. The identity of an unusual metabolite of 6-benzylaminopurine, *Biochim. Biophys. Acta*, **399**, 61-70.
- Leuendorf JE, Mooney SL, Chen L, Hellmann HA** (2014) *Arabidopsis thaliana* PDX1.2 is critical for embryo development and heat shock tolerance, *Planta*, **240**, 137-146.
- Li JF, Chung HS, Niu Y, Bush J, McCormack M, Sheen J** (2013a) Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants, *Plant Cell*, **25**, 1507-1522.

- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013b) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 688-691.
- Li JF, Zhang D, Sheen J (2014) Epitope-tagged protein-based artificial miRNA screens for optimized gene silencing in plants, *Nat. Protoc.*, **9**, 939-949.
- Li W, Herrera-Estrella L, Tran LP (2016) The yin-yang of cytokinin homeostasis and drought acclimation/adaptation, *Trends Plant Sci.*, **21**, 548-550.
- Li W, Zhang F, Chang Y, Zhao T, Schranz ME, Wang G (2015a) Nicotinate O-glucosylation is an evolutionarily metabolic trait important for seed germination under stress conditions in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell*, **27**, 1907-1924.
- Li X, Mo X, Shou H, Wu P (2006) Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, **47**, 1112-1123.
- Li YJ, Wang B, Dong RR, Hou BK (2015b) *AtUGT76C2*, an *Arabidopsis* cytokinin glycosyltransferase is involved in drought stress adaptation, *Plant Sci.*, **236**, 157-167.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**, 115-136.
- Liu J, Moore S, Chen C, Lindsey K (2017) Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in *Arabidopsis* root development: from experiments to systems modeling, and back again, *Mol. Plant*, **10**, 1480-1496.
- Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR, *Plant J.*, **8**, 457-463.
- Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch MA, Parcy F, Simon R, Weigel D (2001) A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*, *Cell*, **105**, 793-803.
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MY, Arkhipov DV, Osolodkin DI, Schmülling T, Romanov GA (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.
- Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors, *J. Exp. Bot.*, **62**, 5149-5159.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*, *Nature*, **379**, 66-69.
- Ma YF, Miotk A, Sutikovic Z, Ermakova O, Wenzl C, Medzihradzsky A, Gaillochot C, Forner J, Utan G, Brackmann K, Galvan-Ampudia CS, Vernoux T, Greb T, Lohmann JU (2019) WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in *Arabidopsis*, *Nat. Commun.*, **10**, 1-4.
- Machida C, Onouchi H, Koizumi J, Hamada S, Semiarti E, Torikai S, Machida Y (1997) Characterization of the transposition pattern of the *Ac* element in *Arabidopsis thaliana* using endonuclease I-SceI, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8675-8680.
- MacKenzie KR, Prestegard JH, Engelman DM (1997a) A transmembrane helix dimer: structure and implications, *Science*, **276**, 131-133.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW (1997b) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence, *Pharmacogenetics*, **7**, 255-269.
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Tormakangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y (2006a) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development, *Science*, **311**, 94-98.
- Mähönen AP, Higuchi M, Tormakangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman MR, Helariutta Y, Kakimoto T (2006b) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*, *Curr. Biol.*, **16**, 1116-1122.
- Malamy J, Benfey P (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*, *Development*, **124**, 33-44.

- Mao YF, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK** (2013) Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants, *Mol. Plant*, **6**, 2008-2011.
- Mao YF, Zhang ZJ, Feng ZY, Wei PL, Zhang H, Botella JR, Zhu JK** (2016) Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol. J.*, **14**, 519-532.
- Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Pařezová M, Petrášek J, Friml J, Kleine-Vehn J, Benková E** (2011) Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis, *Dev. Cell*, **21**, 796-804.
- Martin RC, Mok DW, Smets R, Van Onckelen H, Mok MC** (2001a) Development of transgenic tobacco harboring a zeatin O-glucosyltransferase gene from *Phaseolus*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **37**, 354-360.
- Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DW** (2001b) A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5922-5926.
- Martin RC, Mok MC, Mok DW** (1999) Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 284-289.
- Martin RC, Mok MC, Shaw G, Mok DW** (1989) An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos, *Plant Physiol.*, **90**, 1630-1635.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **17**, 3007-3018.
- Matzke MA, Birchler JA** (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 24-35.
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T** (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem, *Cell*, **95**, 805-815.
- McGaw BA, Heald JK, Horgan R** (1984) Dihydrozeatin metabolism in radish seedlings, *Phytochemistry*, **23**, 1373-1377.
- McGaw BA, Horgan R** (1983) Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase, *Phytochemistry*, **22**, 1103-1105.
- Meek L, Martin RC, Shan X, Karplus PA, Mok DWS, Mok MC** (2008) Isolation of legume glycosyltransferases and active site mapping of the *Phaseolus lunatus* zeatin O-glucosyltransferase *ZOG1*, *J. Plant Growth Regul.*, **27**, 192-201.
- Meng WJ, Cheng ZJ, Sang YL, Zhang MM, Rong XF, Wang ZW, Tang YY, Zhang XS** (2017) Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL, *Plant Cell*, **29**, 1357-1372.
- Miki D, Zhang W, Zeng W, Feng Z, Zhu JK** (2018) CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation, *Nat. Commun.*, **9**, 1-20.
- Miller CO, Skoog F, von Saltza MH, Strong FM** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1392-1392.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate, *Plant J.*, **37**, 128-138.
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16598-16603.
- Moffatt B, Pethe C, Laloue M** (1991) Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis-thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity, *Plant Physiol.*, **95**, 900-908.
- Moffatt BA, Wang L, Allen MS, Stevens YY, Qin W, Snider J, von Schwartzberg K** (2000) Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression, *Plant Physiol.*, **124**, 1775-1785.

- Mok DW, Mok MC** (2001) Cytokinin metabolism and action, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 89-118.
- Mok MC, Martin RC, Dobrev PI, Vankova R, Ho PS, Yonekura-Sakakibara K, Sakakibara H, Mok DWS** (2005) Topolins and hydroxylated are substrates of cytokinin thiazuron derivatives O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition, *Plant Physiol.*, **137**, 1057-1066.
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 328-333.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ** (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology, *Cell*, **88**, 287-298.
- Motyka V, Vankova R, Capkova V, Petrusek J, Kaminek M, Schmülling T** (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion, *Physiol. Plant.*, **117**, 11-21.
- Müller B, Sheen J** (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis, *Nature*, **453**, 1094-1097.
- Muller R, Bleckmann A, Simon R** (2008) The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1, *Plant Cell*, **20**, 934-946.
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction., *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321-4325.
- Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE** (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics, *Plant J.*, **14**, 387-392.
- Nemhauser JL, Maloof JN, Chory J** (2003) Building integrated models of plant growth and development, *Plant Physiol.*, **132**, 436-439.
- Niemann MCE** (2013). Molekulare Charakterisierung des ROCK1 Gens von *Arabidopsis thaliana*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit**.
- Niemann MCE, Bartrina I, Ashikov A, Weber H, Novák O, Spíchal L, Strnad M, Strasser R, Bakker H, Schmülling T, Werner T** (2015) *Arabidopsis* ROCK1 transports UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc and regulates ER protein quality control and cytokinin activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 291-296.
- Niemann MCE, Weber H, Hluska T, Leonte G, Anderson SM, Novak O, Senes A, 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.
- Nishal B, Tantikanjana T, Sundaresan V** (2005) An inducible targeted tagging system for localized saturation mutagenesis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **137**, 3-12.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, 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, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmülling T, Tran L-SP** (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.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M** (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Phytochemistry*, **69**, 2214-2224.

- Ohashi-Ito K, Saegusa M, Iwamoto K, Oda Y, Katayama H, Kojima M, Sakakibara H, Fukuda H** (2014) A bHLH complex activates vascular cell division via cytokinin action in root apical meristem, *Curr. Biol.*, **24**, 2053-2058.
- Oleykowski CA, Mullins CRB, Godwin AK, Yeung AT** (1998) Mutation detection using a novel plant endonuclease, *Nucl. Acids Res.*, **26**, 4597-4602.
- Osmani SA, Bak S, Moller BL** (2009) Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling, *Phytochemistry*, **70**, 325-347.
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D** (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs, *Plant J.*, **53**, 674-690.
- Osugi A, Kojima M, Takebayashi Y, Ueda N, Kiba T, Sakakibara H** (2017) Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots, *Nat. Plants*, **3**, 1-6.
- Osugi A, Sakakibara H** (2015) Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?, *BMC Plant Biol.*, **13**, 1-20.
- Otto EM** (2013). Der Einfluss von Cytokinin auf die Entwicklung des Sprossmeristems und auf den Ertrag von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**
- Page DR, Grossniklaus U** (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*, *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 124-136.
- Paquette SM, Jensen K, Bak S** (2009) A web-based resource for the *Arabidopsis* P450, cytochromes b5, NADPH-cytochrome P450 reductases, and family 1 glycosyltransferases (<http://www.P450.kvl.dk>), *Phytochemistry*, **70**, 1940-1947.
- Parker CW, Wilson MM, Letham DS, Cowley DE, Macleod JK** (1973) Glucosylation of cytokinins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1370-1376.
- Perales M, Reddy GV** (2012) Stem cell maintenance in shoot apical meristems, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 10-16.
- Perales M, Rodriguez K, Snipes S, Yadav RK, Diaz-Mendoza M, Reddy GV** (2016) Threshold-dependent transcriptional discrimination underlies stem cell homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E6298-E6306.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story, *Trends Plant Sci.*, **14**, 399-408.
- Pernisova M, Grochova M, Konecny T, Plackova L, Harustiakova D, Kakimoto T, Heisler MG, Novak O, Hejatko J** (2018) Cytokinin signalling regulates organ identity via the AHK4 receptor in *Arabidopsis*, *Development*, **145**, 1-11.
- Pernisova M, Prat T, Gronos P, Harustiakova D, Matonohova M, Spichal L, Nodzynski T, Friml J, Hejatko J** (2016) Cytokinin influence root gravitropism via differential regulation of auxin transporter expression and localization in *Arabidopsis*, *New Phytol.*, **212**, 497-509.
- Pfeiffer A, Wenzl C, Lohmann JU** (2017) Beyond flexibility: controlling stem cells in an ever changing environment, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **35**, 117-123.
- Pierre-Jerome E, Drapek C, Benfey PN** (2018) Regulation of division and differentiation of plant stem cells, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**, 289-310.
- Pils B, Heyl A** (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling, *Plant Physiol.*, **151**, 782-791.
- Pineda Rodó A, Brugière N, Vanková R, Malbeck J, Olson JM, Haines SC, Martin RC, Habben JE, Mok DW, Mok MC** (2008) Over-expression of a zeatin O-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation, *J. Exp. Bot.*, **59**, 2673-2686.
- Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FnE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S, Bowles D** (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15253-15258.

- Punwani JA, Hutchison CE, Schaller GE, Kieber JJ** (2010) The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling, *Plant J.*, **62**, 473-482.
- Rahayu YS, Walch-Liu P, Neumann G, Romheld V, von Wiren N, Bangerth F** (2005) Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃-induced stimulation of leaf growth, *J. Exp. Bot.*, **56**, 1143-1152.
- Raines T, Shanks C, Cheng CY, McPherson D, Argueso CT, Kim HJ, Franco-Zorrilla JM, Lopez-Vidriero I, Solano R, Vankova R, Schaller GE, Kieber JJ** (2016) The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis*, *Plant J.*, **85**, 134-147.
- Ramireddy E, Brenner WG, Pfeifer A, Heyl A, Schmülling T** (2013) In planta analysis of a *cis*-regulatory cytokinin response motif in *Arabidopsis* and identification of a novel enhancer sequence, *Plant Cell Physiol.*, **54**, 1079-1092.
- Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ** (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **132**, 1998-2011.
- Rashotte AM, Goertzen LR** (2010) The CRF domain defines cytokinin response factor proteins in plants, *BMC Plant Biol.*, **10**, 1-21.
- Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11081-11085.
- Richmond AE, Lang A** (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves, *Science*, **125**, 650-651.
- Rodriguez K, Perales M, Snipes S, Yadav RK, Diaz-Mendoza M, Reddy GV** (2016) DNA-dependent homodimerization, sub-cellular partitioning, and protein destabilization control WUSCHEL levels and spatial patterning, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E6307-E6315.
- Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV, Fletcher JC** (2002) CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway, *Plant Cell*, **14**, 969-977.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T** (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question!, *New Phytol.*, **218**, 41-53.
- Ross J, Li Y, Lim E, Bowles DJ** (2001) Higher plant glycosyltransferases, *Genome Biol.*, **2**, 1-12.
- Rozen S, Skaletsky H** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Totowa, NJ: Humana Press*. **365-386**
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T** (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem, *Plant J.*, **18**, 557-563.
- Růžička K, Simásková M, Duclercq J, Petrásek J, Zazimalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu MCE, Benková E** (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4284-4289.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B** (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem, *Genes Dev.*, **17**, 354-358.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A** (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators, *Plant J.*, **24**, 703-711.
- Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A** (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins, *Science*, **294**, 1519-1521.
- Sakakibara H** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 431-449.
- Samarakoon T, Wang SY, Alford MH** (2013) Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive, *Appl. Plant Sci.*, **1200236**, 1-3.

- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers, *Nature*, **446**, 811-814.
- Satheesh V, Zhang H, Wang X, Lei M** (2019) Precise editing of plant genomes - Prospects and challenges, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **96**, 115-123.
- Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ** (2015) The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development, *Plant Cell*, **27**, 44-63.
- Scheres B** (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 345-354.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development, *Nat. Genet.*, **37**, 501-506.
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species, *J. Plant Res.*, **116**, 241-252.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T** (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes, *Cell*, **100**, 635-644.
- Schoor S, Farrow S, Blaschke H, Lee S, Perry G, von Schwartzberg K, Emery N, Moffatt B** (2011) Adenosine kinase contributes to cytokinin interconversion in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **157**, 659-672.
- Schuster C, Gaillochet C, Medzihradszky A, Busch W, Daum G, Krebs M, Kehle A, Lohmann JU** (2014) A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals, *Dev. Cell*, **28**, 438-449.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D** (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **18**, 1121-1133.
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA** (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system, *Plant Cell*, **14**, 2985-2994.
- Shani E, Yanai O, Ori N** (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 484-489.
- Shanks CM, Hecker A, Cheng CY, Brand L, Collani S, Schmid M, Schaller GE, Wanke D, Harter K, Kieber JJ** (2018) Role of BASIC PENTACYSTEINE transcription factors in a subset of cytokinin signaling responses, *Plant J.*, **95**, 458-473.
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H** (2009) Auxin–cytokinin interactions in the control of shoot branching, *Plant Mol. Biol.*, **69**, 429-435.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 1-6.
- Skoog F, Strong FM, Miller CO** (1965) Cytokinins, *Science*, **148**, 532-533.
- Small I** (2007) RNAi for revealing and engineering plant gene functions, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 148-153.
- Šmečilová M, Dobrušková J, Novák O, Takáč T, Galuszka P** (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance, *Front. Plant Sci.*, **7**,
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **2**, 755-767.
- Somssich M, Je B, Simon R, Jackson D** (2016) CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem, *Development*, **143**, 3238-3248.

- Spíchal L** (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules, *Funct. Plant Biol.*, **39**, 267-284.
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T** (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay, *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1299-1305.
- Steinert J, Schiml S, Fauser F, Puchta H** (2015) Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*, *Plant J.*, **84**, 1295-1305.
- Steklov MY, Lomin SN, Osolodkin DI, Romanov GA** (2013) Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach, *Plant Cell Rep.*, **32**, 781-793.
- Stochaj WR, Berkelman T, Laird N** (2006) Staining membrane-bound proteins with Ponceau S, *CSH Protoc.*, **4543**, 1-22.
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, Schmülling T** (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors, *Plant J.*, **67**, 157-168.
- Strnad M** (1997) The aromatic cytokinins, *Physiol. Plant.*, **101**, 674-688.
- Sun J, Hirose N, Wang X, Wen P, Xue L, Sakakibara H, Zuo J** (2005) *Arabidopsis* *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta, *J. Integr. Plant Biol.*, **47**, 588-603.
- Sun J, Niu QW, Tarkowski P, Zheng B, Tarkowska D, Sandberg G, Chua NH, Zuo J** (2003) The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis, *Plant Physiol.*, **131**, 167-176.
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T** (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 107-113.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T** (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 26405-26410.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, 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 Cell Physiol.*, **42**, 85-93.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H** (2004a) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1053-1062.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H** (2004b) *Arabidopsis* *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin, *J. Biol. Chem.*, **279**, 41866-41872.
- Taniguchi M, Sasaki N, Tsuge T, Aoyama T, Oka A** (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions, *Plant Cell Physiol.*, **48**, 263-277.
- Tao Q, Guo D, Wei B, Zhang F, Pang C, Jiang H, Zhang J, Wei T, Gu H, Qu LJ, Qin G** (2013) The TIE1 transcriptional repressor links TCP transcription factors with TOPLESS/TOPLESS-RELATED corepressors and modulates leaf development in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **25**, 421-437.
- Telfer A, Bollman KM, Poethig RS** (1997) Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*, *Development*, **124**, 645-654.
- To JP, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay, *Plant Cell*, **19**, 3901-3914.
- To JP, Kieber JJ** (2008) Cytokinin signaling: two-components and more, *Trends Plant Sci.*, **13**, 85-92.

- Todaka D, Zhao Y, Yoshida T, Kudo M, Kidokoro S, Mizoi J, Kodaira KS, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Toyooka K, Sato M, Fernie AR, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2017) Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions, *Plant J.*, **90**, 61-78.
- Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, Ishida T, Sugimoto K, Kiba T, Sakakibara H** (2012) *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation, *Plant J.*, **69**, 355-365.
- Tucker MR, Hinze A, Tucker EJ, Takada S, Jurgens G, Laux T** (2008) Vascular signalling mediated by ZWILLE potentiates WUSCHEL function during shoot meristem stem cell development in the *Arabidopsis* embryo, *Development*, **135**, 2839-2843.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements, *Science*, **276**, 1865-1868.
- Ulmasov T, Liu ZB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1995) Composite structure of auxin response elements, *Plant Cell*, **7**, 1611-1623.
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem, *Nature*, **390**, 287-289.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI, Kunze R** (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence, *Plant Physiol.*, **141**, 776-792.
- van Overbeek J, Conklin ME, Blakeslee AF** (1941) Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos, *Science*, **94**, 350-351.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, 1-12.
- Vanstaden J, Drewes FE** (1992) The stability and metabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus, *J. Plant Physiol.*, **140**, 92-95.
- Vanstraelen M, Benkova E** (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 463-587.
- Vaten A, Soyars CL, Tarr PT, Nimchuk ZL, Bergmann DC** (2018) Modulation of asymmetric division diversity through cytokinin and SPEECHLESS regulatory interactions in the *Arabidopsis* stomatal lineage, *Dev. Cell*, **47**, 53-66.
- Veach YK, Martin RC, Mok DW, Malbeck J, Vankova R, Mok MC** (2003) O-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins, *Plant Physiol.*, **131**, 1374-1380.
- Vermeer JE, Geldner N** (2015) Lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: a force awakens, *F1000Prime Rep.*, **7**, 7-32.
- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J** (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*, *J. Gen. Virol.*, **26**, 33-48.
- Walbot V** (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 49-78.
- Wang J, Ma X-M, Kojima M, Sakakibara H, Hou B-K** (2011) N-Glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, **52**, 2200-2213.
- Wang J, Ma X-M, Kojima M, Sakakibara H, Hou B-K** (2013) Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol. Biochem.*, **65**, 9-16.
- Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ** (2015) Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation, *Genome Biol.*, **16**, 1-27.

- Weigel D, Glazebrook J** (2002). *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Werner S** (2016). Einfluss von Cytokinin auf die Organgröße und auf Entwicklungsübergänge in *Arabidopsis thaliana*. Institut für Biologie/Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität Berlin.
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T** (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation, *Plant Biol.*, **8**, 1-12.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling 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, Schmülling T** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10487-10492.
- Werner T, Schmülling T** (2009) Cytokinin action in plant development, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 527-538.
- Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, Dicuccio M, Edgar R, Federhen S, Feolo M, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Khovayko O, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Miller V, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Shumway M, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusov RL, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E** (2008) Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucl. Acids Res.*, **36**, D13-21.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets, *PLoS One*, **2**, e718.
- Woo H-H, Jeong BR, Hirsch AM, Hawes MC** (2007) Characterization of *Arabidopsis AtUGT85A* and *AtGUS* gene families and their expression in rapidly dividing tissues, *Genomics*, **90**, 143-153.
- Woody ST, Austin-Phillips S, Amasino RM, Krysan PJ** (2007) The WiscDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline, *J. Plant Res.*, **120**, 157-165.
- Wormit A, Traub M, Florchinger M, Neuhaus HE, Möhlmann T** (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family, *Biochem. J.*, **383**, 19-26.
- Wu X, Dinneny JR, Crawford KM, Rhee Y, Citovsky V, Zambryski PC, Weigel D** (2003) Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex, *Development*, **130**, 3735-3745.
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmülling T** (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum, *Plant Physiol.*, **156**, 1808-1818.
- Yadav RK, Girke T, Pasala S, Xie M, Reddy GV** (2009) Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4941-4946.
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jonsson H, Reddy GV** (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex, *Genes Dev.*, **25**, 2025-2030.
- Yadav RK, Tavakkoli M, Xie M, Girke T, Reddy GV** (2014) A high-resolution gene expression map of the *Arabidopsis* shoot meristem stem cell niche, *Development*, **141**, 2735-2744.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T** (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1017-1023.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N** (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis, *Curr. Biol.*, **15**, 1566-1571.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL** (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134-145.

- Zalabák D, Johnová P, Plíhal O, Šenková K, Šamajová O, Jiskrová E, Novák O, Jackson D, Mohanty A, Galuszka P** (2016) Maize cytokinin dehydrogenase isozymes are localized predominantly to the vacuoles, *Plant Physiol. Biochem.*, **104**, 114-124.
- Zatloukal M, Gemrotová M, Doležal K, Havlíček L, Spíchal L, Strnad M** (2008) Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 9268-9275.
- Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li XH, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF** (2010) High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **107**, 12028-12033.
- Zhang K, Novak O, Wei Z, Gou M, Zhang X, Yu Y, Yang H, Cai Y, Strnad M, Liu C-J** (2014) *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins, *Nat. Commun.*, **5**, 1-12.
- Zhang W, Swarup R, Bennett M, Schaller GE, Kieber Joseph J** (2013a) Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem, *Curr. Biol.*, **23**, 1979-1989.
- Zhang W, To JPC, Cheng C-Y, Eric Schaller G, Kieber JJ** (2011) Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers, *Plant J.*, **68**, 1-10.
- Zhang X, Chen Y, Lin X, Hong X, Zhu Y, Li W, He W, An F, Guo H** (2013b) Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in *Arabidopsis*., *Mol. Plant*, **6**, 1661-1672.
- Zhou YQ, Li WC, You WJ, Di ZG, Wang ML, Zhou HY, Yuan SG, Wong NK, Xiao YL** (2018) Discovery of *Arabidopsis* UGT73C1 as a steviol-catalyzing UDP-glycosyltransferase with chemical probes, *Chem. Commun.*, **54**, 7179-7182.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox, *Plant Physiol.*, **136**, 2621-2632.
- Zubo YO, Blakley IC, Yamburenko MV, Worthen JM, Street IH, Franco-Zorrilla JM, Zhang W, Hill K, Raines T, Solano R, Kieber JJ, Loraine AE, Schaller GE** (2017) Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E5995-E6004.
- Zürcher E, Liu J, di Donato M, Geisler M, Müller B** (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks, *Science*, **353**, 1027-1030.
- Zürcher E, Müller B** (2016) Cytokinin synthesis, signaling, and function-advances and new insights, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **324**, 1-38.
- Zürcher E, Tavor-Deslex D, Lituiev D, Enkeli K, Tarr PT, 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 PJ, Robinson BR, Risley MG, Rashotte AM** (2013) Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses, *Plant Cell Physiol.*, **54**, 971-981.

6 Anhang

Tabelle S1: Liste der verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
Primer für Klonierungen und Sequenzierungen		
UGT76c1_attB1	AAAAAGCAGGCTTTATGGAGAAGAGAAACGAGAGAC	Klonierung
UGT76c1_ns_attB2	AGAAAGCTGGGTTTCGTAGGCACTAGTGGCTC	Klonierung
UGT76c2_attB1	AAAAAGCAGGCTTTATGGAGGAG AAG AGA AAT G	Klonierung
UGT76c2_ns_attB2	AGAAAGCTGGGTTCAACAATAGTATATGATTAGC TAG	Klonierung
attB1_proUGT76C2_lang_fw	AAAAAGCAGGCTTTCAACTCGGTCCAATGGATTC	Klonierung
UGTC2_ns_attB2	AGAAAGCTGGGTTCAACAATAGTATATGATTAGCTAG	Klonierung
attB1_proUGT76C2_kurz_fw	AAAAAGCAGGCTTTCATCTCTATTGCCAAGTC	Klonierung
attB2_PromUGT76C2_noATG_rev	AGAAAGCTGGGTTTGTAAATTGAAACGCTCTAG	Klonierung
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG	Klonierung
attB2	GGGGACCACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTA	Klonierung
M13r	AACAGCTATGACCATG	Sequenzierung
M13f	GTAACGACGCGCCAGT	Sequenzierung
T7	TAATACGACTCACTATAGG	Sequenzierung
pJET1_fw	GCCTGAACACCATATCCATCC	Sequenzierung
pJET1_rev	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC	Sequenzierung
C1sgRNAguide18 fw	ATTGGAGATTCAGACAAGCCGTCG	Klonierung
C1sgRNAguide18 rev	AAACCGACGGCTTGTCTGAATCTC	Klonierung
C1sgRNAguide1 fw	ATTGACGCGACGAAGCCAGCTTCA	Klonierung
C1sgRNAguide1 rev	AACTGAAGCTGGCTTCGTGCGCT	Klonierung
C1sgRNAguide8 fw	ATTGGGATTGTGTGAAAACCCAAC	Klonierung
C1sgRNAguide8 rev	AAACGTTGGGTTTTACACAATCC	Klonierung
SS42	TCCCAGGATTAGAATGATTAGG	Sequenzierung
SS43	CGACTAAGGGTTTCTTATATGC	Sequenzierung
SS61	GAGCTCCAGGCCTCCAGCTTTCG	Sequenzierung
Primer zur Identifikation der <i>ugt76c1,2</i>-Doppelmutante		
RT1	ATGGAGGAGAAGAGAAATG	Screen, Genotypisierung
RT2	CAAAGGTTTTCGGGGAG	Screen, Genotypisierung
RT3	CTCGATCCGTTCTTACATG	Screen, Genotypisierung
RT4	GATTGCGTGTGGTTTAAAG	Screen, Genotypisierung
RT5	CTCTAGCTAATCATATACTATTGTTGTAA	Screen, Genotypisierung
RT6	ATGGAGAAGAGAAACGAGAGAC	Screen, Genotypisierung
RT7	CAGTAGTCTACGTGAGCTTAGG	Screen, Genotypisierung
RT8	GAGCCACTAGTGCCTACGTGA	Screen, Genotypisierung
IF	GCTTCCGAGGCTCGTTCTCTG	Screen, Transposon-Ansatz
OFl	ACCGGTGGAAGTTGAATGGGT	Screen, Transposon-Ansatz
OFlI	TGCAATGGAGACTCTGTTTTCGA	Screen, Transposon-Ansatz
IR	GAACAGAGTCCTCTGCTTCCGATTC	Screen, Transposon-Ansatz
OR	TGCTAGCTGAAGCATAGGGTTTATG	Screen, Transposon-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G18_G8_fw	AGCAATGTAGGCCAGTGGTT	Screen, CRISPR-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G18_rev	TGGAAGAAACCCTTCACGAC	Screen, CRISPR-Ansatz

Fortsetzung nächste Seite.

CRISP_HPY99I_Fw	CTTGGAAGGTCGGATTGAAA	Screen, CRISPR-Ansatz
CRISP_HPY99I_rev	ATCATCTGCCTCCGAATCTG	Screen, CRISPR-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G18_G8_fw	AGCAATGTAGCCAGTGGTT	Screen, CRISPR-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G18_rev	TGGAAGAAACCCTTCACGAC	Screen, CRISPR-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G8_rev	GGTCAAGCTCTTTCAGGAC	Screen, CRISPR-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G1_fw	GTCGTGAAGGGTTTCTTCCA	Screen, CRISPR-Ansatz
LB_CRISP_Seq_G1_rev	GGACAACCCACAAGAAGGAT	Screen, CRISPR-Ansatz
AT3G59400_fw	TGCCAATCTCACTTCGGACC	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT3G59400_rev	CTCCTGCCTGTTCCTTAGCC	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT3G11340_fw	CCAATGTTTCAGCTCGCCAA	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT3G11340_rev	ACTGGGAATTCTATGCGGGC	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT3G17180_fw	CTTCTGAACAACCACTGAACC	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT3G17180_rev	AACCCTACTCCGACTGGTGA	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT2G22850_fw	TCCAGACCGGATTCCTCTCT	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT2G22850_rev	TGCCTCATCTCCAAGAATCTCC	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT2G14680_fw	TGCGACCAATTTTACCAGCC	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT2G14680_rev	TTTCCAGGGTTCTGTGGCAG	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT1G67500_fw	AGTAGCTACCATCCACCCGA	Off-targets, CRISPR-Ansatz
AT1G67500_rev	GACTGGGCTTGTGAAAGGGA	Off-targets, CRISPR-Ansatz
Ds1-1	GAGTACAATCAATTTTCTTGTGGACTTG	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3-1a	GGTTCCCGTCCGATTTTCGACT	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3-1	CGATTACCGTATTTATCCCGTTCCG	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3-2	CCGGTATATCCCGTTTTCCG	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3-3a	CGGTCCGTACGGGATTTTCC	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3-3	GAAAATGAAAACGGTAGAGGT	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3'-Tm1	ACCGGTTCCCGTCCGATTTTCGACT	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3'-Tm2	GCGGGACGGAAACGAAAACGGGATA	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3'-Tm3	CGGTTCCCGTCCGATTTTCGACT	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3'-Tm4	ACAAAAATACCGGTTCCCGTCCGA	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3'-Tm5	CGGTTCCCGTCCGATTTTCGACT	Screen, Transposon-Ansatz
Ds3'-Tm6	TCGACTTTAACCCGACCGGATCGTA	Screen, Transposon-Ansatz
Primer für qPCR-Analysen		
ARR5 qRT_f	CTACTCGCAGCTAAAACGC	qPCR-Analysen
ARR5 qRT_r	GCCGAAAGAATCAGGACA	qPCR-Analysen
ARR6 qRT_f	GAGCTCTCCGATGCAAAT	qPCR-Analysen
ARR6 qRT_r	GAAAAAGGCCATAGGGGT	qPCR-Analysen
ARR7 qRT_f	CTTGGAACCAATCTGCTCTC	qPCR-Analysen
ARR7 qRT_r	ATCATCGACGGCAAGAAC	qPCR-Analysen
ARR15	GAGAGGTGGTGAAGCTGAA	qPCR-Analysen
ARR15	GATGGAGTGTCTCATCAAG	qPCR-Analysen
ARR16 qRT f	TCAGGAGGTTCTTGTTCTGCTCTT	qPCR-Analysen
ARR16 qRT r	AACCCAAATACTCCAATGC	qPCR-Analysen
ARR17 qRT f	TTCTTGCAAAGTGACAACTGC	qPCR-Analysen
ARR17 qRT r	TCAATGAATCAGTCTGTTGTGG	qPCR-Analysen
IPT5 qRT_f	CTTGGGATAACTCAGTGGCT	qPCR-Analysen

Fortsetzung nächste Seite.

IPT5_qRT_	CTCCGGTAGGAGAATATTGG	qPCR-Analysen
qRT-IPT5_2_f	TTTACAAGCAGTGGAAGTGGA	qPCR-Analysen
qRT-IPT5_2_r	GAAGAGGCGGAACGGCA	qPCR-Analysen
IPT3_FW	ACCATCTCCTCGGCGTCT	qPCR-Analysen
IPT3_RV	CCATTCCACTCTCCACCATC	qPCR-Analysen
IPT1_FW	TCACCAAACGAAGACGAAAA	qPCR-Analysen
IPT1_RV	AAGGGAACGAGTAGCGAGA	qPCR-Analysen
IPT7_qRT-f	ATCGTGTTGACGCCACTGAGG	qPCR-Analysen
IPT7_qRT-r	GATGCCGCCAAACAGTGCTC	qPCR-Analysen
LOG3-qRT-f	TACCTTTTCTCTTCCGCC	qPCR-Analysen
LOG3-qRT-r	GGTAACTGCTCTTCTTGCT	qPCR-Analysen
LOG4-qRT-f	TGGAGGTCAACAATGAAACCA	qPCR-Analysen
LOG4-qRT-r	GCGAAACCAAACCCATCAAA	qPCR-Analysen
LOG5-qRT-f	CCATCTCAGCGTCACATCTT	qPCR-Analysen
LOG5-qRT-r	TTTCTTCTCAACCTCCCACC	qPCR-Analysen
LOG7-qRT-f	GTAAGGGCGGAAAGAAGACA	qPCR-Analysen
LOG7-qRT-r	AGTGGGGAGTGATAGGGTTT	qPCR-Analysen
qRT_CYP735A2_f	ACTTTACCCTCCTGCCACAC	qPCR-Analysen
qRT_CYP735A2_r	GTTCCGCATCTTCGCCCA	qPCR-Analysen
qRT_CYP735A1_f	GGGGAAGGAGCAAATGAGGT	qPCR-Analysen
qRT_CYP735A1_r	TGGAGGACAGTGAGGTGGTT	qPCR-Analysen
qRT_AHK4_f	ATGAACTGGGCACTCAACAATC	qPCR-Analysen
qRT_AHK4_r	TCAACCCCGAACGCCAAAA	qPCR-Analysen
83_AHK3_qPCR_f	GTGACCAGGCCAAGAACTTA	qPCR-Analysen
84_AHK3_qPCR_r	CTTCCCTGTCCAAAGCAA	qPCR-Analysen
81_AHK2_qPCR_f	GAGCTTTTTGACATCGGG	qPCR-Analysen
82_AHK2_qPCR_r	TTCTCACTCAACCAGACGAG	qPCR-Analysen
qrt_Kieber_UGT76C2_f	ATCTGCCTACCAGGAGGTTG	qPCR-Analysen
qrt_Kieber_UGT76C2_r	CACCCTCACAGCTTTCTCAA	qPCR-Analysen
qrt_spichal_UGT76C1_f	TCTTGTTCTCAGATTCGTCGT	qPCR-Analysen
qrt_spichal_UGT76C1_r	AAGCAAGTAAGCATCTAGAGGC	qPCR-Analysen
qrt_spichal_UGT73C1_f	GAGAAATTTGGACTTGCTCGATT	qPCR-Analysen
qrt_spichal_UGT73C1_r	GATTATGCAGTTTGGCCTAGGT	qPCR-Analysen
qrt_spichal_UGT73C5_f	CAATTTAAAGTCAGATAAGGAGCT	qPCR-Analysen
qrt_spichal_UGT73C5_r	AGATATCTTCCAGTCTCCAGCT	qPCR-Analysen
CKX1_qRT_fw	ATGGATCAGGAAACTGGCAA	qPCR-Analysen
CKX1_qRT_rv	AGATGAAAACAAAGTGGATGGAA	qPCR-Analysen
qRT CKX2-fw	GGGACAATCGTATGTCGG	qPCR-Analysen
qRT CKX2-rev	TCTCGTTAACGCTCTCCACT	qPCR-Analysen
CKX3-F	AATGATCGGATGTCTGCC	qPCR-Analysen
CKX3-R	ACCCCATATTAGCATCCTC	qPCR-Analysen
CKX4_for	GCTCCAGGGTTTATGTTCTGT	qPCR-Analysen
CKX4_rev	GCGGTTGTTCCATTTGTTTC	qPCR-Analysen
CKX5-F	CGACTCGTCAGAACAGCTTAC	qPCR-Analysen

Fortsetzung nächste Seite.

CKX5-R	GTTACGCCGTGGTTCATT	qPCR-Analysen
CKX7_F	CCAACTCAACCATTGACAAGAGG	qPCR-Analysen
CKX7_R	CTCCTTCGCGATTTCTTCTGAC	qPCR-Analysen
qRT_UGTC4_fw	GCCATCCACTCTTCACCTTCA	qPCR-Analysen
qRT_UGTC4_rv	GCTAATCCTCTGTTTCTCTTCCTTG	qPCR-Analysen
qRT_UGTC5_fw	TTCAAGCCATCCTCTCTTCACC	qPCR-Analysen
qRT_UGTC5_rv	CTCTGTTTCTCTTCCCCTGTTTC	qPCR-Analysen
qRT_UGTC3_fw	AGACAAGCAAGAAGACAAATCCG	qPCR-Analysen
qRT_UGTC3_rv	GACTACCGAACCACCCCGT	qPCR-Analysen
qRT_UGTC6_fw	TGGTCATCGTCTTCGTTTTGTA	qPCR-Analysen
qRT_UGTC6_rv	AGGTGGTTGCGGTCTCTGG	qPCR-Analysen
UGT85A1_fw	ACAACCAGTGCTGTGCG	qPCR-Analysen
UGT85A1_rev	TGGTATAAAATCTATAACCGTGTCT	qPCR-Analysen
Primer Genotypisierung		
RIO1-F1	TGATCCATGTAGATTTCCCGACATGAAG	Genotypisierung
RIO1-R1	GCTGAACTATGCAATGCGGA	Genotypisierung
CKX3-A8	TCCCCAACGTTTCTAGCCAT	Genotypisierung
CKX3-A7	CACCTCGGACCAAAATGTCT	Genotypisierung
salk_LB1.3	CGAAAACGGACGGTGTAGAT	Genotypisierung
CKX5-A5	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Genotypisierung
CKX5-A6	TTGTGATTGTGGACGAAGGA	Genotypisierung
RT1	ATTTTGGCACGAAGAGGTTG	Genotypisierung
RT2	ATGGAGGAGAAGAGAAATG	Genotypisierung
RT3	CAAAGGTTTTCGGGGAG	Genotypisierung
RT4	CTCGATCCGTTCTTACATG	Genotypisierung
RT5	GATTGCGTGTGGTTTAAG	Genotypisierung
RT6	CTCTAGCTAATCATATACTATTGTTGTAA	Genotypisierung
RT7	ATGGAGAAGAGAAACGAGAGAC	Genotypisierung
RT8	CAGTAGTCTACGTGAGCTTAGG	Genotypisierung
CRISP_HPY99I_Fw	GAGCCACTAGTGCTACGTGA	Genotypisierung
Crisp_HPY99I_rev	CTTGGAAGGTCGGATTGAAA	Genotypisierung
ROCK4-dCAPS-F1	TGGACATTGCCAGTCGA	Genotypisierung
ROCK4-dCAPS-R1	TTCCACCACTCATCGTAGCC	Genotypisierung

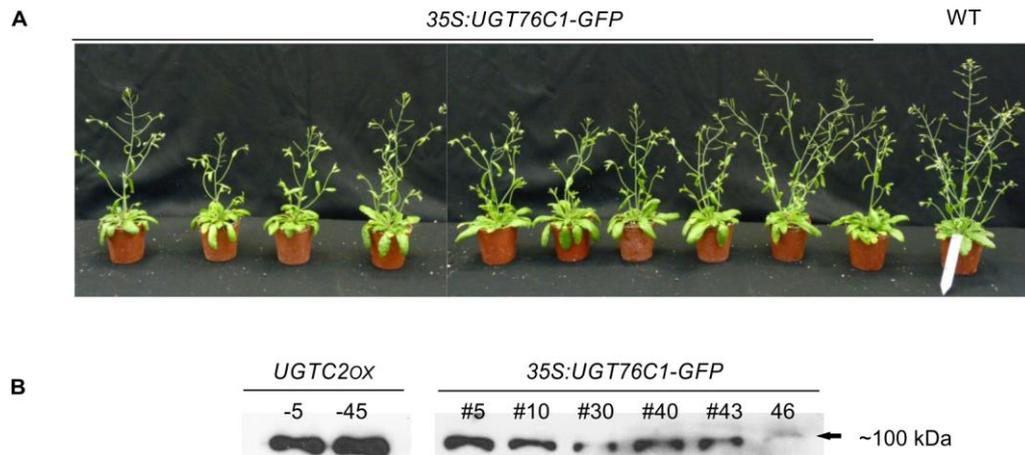


Abbildung S1: Herstellung von *35S:UGT76C1-GFP*-Überexpressionslinien.

A) Phänotypen von Primärtransformanten der *35S:UGT76C1-GFP*-Überexpressionslinien im Vergleich zu WT-Pflanzen (40 TNK).

B) Immunologischer Nachweis von UGT76C1-GFP in Proben von den *35S:UGT76C1-GFP*-Überexpressionslinien #5, #10, #30, #40, #43 und #46 im Vergleich zu UGT76C2-GFP in Proben der *35S:UGT76C2-GFP*-Überexpressionslinien #5 und #45. Die Immunodetektion erfolgte mit GFP-spezifischen Antikörpern.

A) Sequenzierung des PCR-Fragments (*UGT76C1*forward und WISC-T-DNA Primer L4) mit dem *UGT76C1_RT6*-Primer:

```
TTTTTTTTCTCCTACATTACAGGTTGCATAAACCCCTATGCTTCAGCTAGCAAAGATCCTTTACTCAAGAGGTTTTTCGATCACCATCATCCACA
CGCGCTTCAACGCGCCCAAATCTTCAGACCATCCTCTCTTCACTTTCTTACAAATCCGCGACGGCTTGTCTGAATCTCAGACTCAATCTCGTGA
TCTTTTGCTTCAACTCAGCTTCTCAACAACAATTATATTC AATTGTAAATGGCTTCATGTCCGGGAAATCTACATGGATCAA
```

B) Sequenzierung des PCR-Fragments (*UGT76C1*reverse und WISC-T-DNA Primer L4) mit dem *UGT76C1_RT7*-Primer:

```
TATCGCATCTACTGGATGCACTCTGGTCCGGTTCTAACAAAGCTGCTAGACGAGGCTGGGACGTCATGAATGTGAAAAGGGCCAATGGGAAATAT
CGGAATGCTGAAAACCTTGTGGACTCAGCAAAGTGAATCATGGTCAAGCTCTTTGCAGGACATAACTATAATCCCTGAAGCTGGCTTCGTCCGC
TCGAGTATCTTAAGCAAGTAAGCATCTAGAGGCTTACTCTGAGCGCTGGTCCCATAAATCTCGAAAGATCTTTCTTTCGAAGCGGTGGAAACT
CAGGAACTAGATCATCTGCCTCCGAATCTGAAACAAACCTAGAAAGTTCAAGAAATACGGACCAATGTGTCTTTGATGACTCAATTAACAATA
AGAACAATGACCTACTATGAGTCAAAGCCGTACCTGGTACTGGAAGAAACCCCTCACGACGAATCTGAGGAACAAGAAAATGTCGGAGAAAAGAA
AGAGAACTTATAAGCACAGAGGACAAATCGAGGAAGATTAATAACTCTCCGCCACGGATTGTGTGAAAACCCCAACCGAATCATCGATCACACAG
CTAATTTTCCTATCCCTGTTCCTGAATCTGAACTAGGTTTAAATGAGTTTAGCCAA TTTACATGGA TATATTC AATTGTAAATGGCTTCATGTG
CGGGAAATCTACATGGATCAAATTTTTTCCCCCCCCCCCCCCCCCATACATCTCCAGAGATAATAATGATTGGATAACCCGATTAAACT
CCTTT
```

C) Sequenz des *UGT76C1*-Locus:

```
ATGGAGAAGAGAAACGAGAGACAAGTGATTCTTTTCTCTACCATTACAAGGTTGCATAAACCCCTATGCTTCAGCTAGCAAAGATCCTTTACT
CAAGAGGTTTTTCGATCACCATCATCCACACGCGCTTCAACGCGCCCAAATCTTCAGACCATCCTCTCTTCACTTTCTTACAAATCCGCGACGG
CTTGTCTGAATCTCAGACTCAATCTCGTGATCTTTTGCTTCAACTCAGCTTCTCAACAACAATTGTCAGATCCCATTTTCGAGAGTGT TGGCT
AAACTCATTAAACCTAGTTTCAGATTCAGGAACAGAGGATAGGAAAATAGCTGTGTGATCGATGATTCGGTGGGTTTTTCACACAATCCGTGG
CGGAGAGTTTTAATCTTCCTCGATTGTCTCTGTCTTATAAGTTCTCTTTCTTTCTCGGACATTTCTTGTCTCAGATTTCGTCTGTAAGG
GTTTTCTCCAGTACCAGGtaacggcttgactcatagtaggtcattgttcttattgtaattgagtcataaagacacaattggctccgtatttct
tgaattttctaggtttgtttcagATTCGGAGGCAGATGATCTAGTTCTGAGTTCCACCGCTTCGAAAGAAAGATCTTCGAGAATTATGGGA
ACCAGCGCTCAGAGTAAGCCTCTAGATGCTTACTTGCTTAAGATACTCGACGCGACGAAGCCAGCTTCAGGGATTATAGTTATGTCCTGCAAAG
AGCTTGACCATGATTCACTTGCTGAGTCCAACAAGTTTTTCAGCATTTCCGATATTTCCCATTTGGCCCTTTTCACATTTCATGACGTCACGCTC
GTCTAGCAGCTTGTTAGAACCGGACCAGAGTTGCATTCCA TGGTTAGATATCGGTGAAACGAGAT CAGTAGTCTACGTGAGCTTAGGGAGCATT
GCGAGTCTTAACGAGTCTGACTTCTTGGAGATTGCTTGTGGACTAAGAAACACCAACCAATCCTTCTTGTGGGTTGTCCGGCCTGGTTTCAGTCC
ATGGCAGAGATTGGATCGAATCATTACCTCAGGGTTCATGGAAAGTCTCGATGGTAAAGGAAAGATAGTGAGATGGGCACCGCAGCTAGACGT
TCTTGCGCATAGAGCCACGGAGGGTTTTTGACTCATAATGGATGGAACTCGACATTAGAGAGTATATGCGAAGGAGTACCTATGATCTGCTTG
CCTTGTAAAGTGGACCAATTTGTAACGCGAGATTCATAAGCGAAGTTGGAGGGTTGGGATTCACTTGGAAGGTCGGATAGAGCGAAGAGAAA
TCGAGAGAGCTGTTATAAGACTAATGGTTGAGTCGAAAGGAGAAGAGATTTCAGGTAGAATCAAAGTCTTGCAGACGAAGTAAAGAGGTCAGT
TAAACAAGGAGGTTTCGTCATATCGATCTTTAGATGAGTTGGTTGATCGTATATCAATCATCATCGAGCCACTAGTGCCTACGTGA
```

Abbildung S2: Bestimmung der genauen Position der T-DNA-Insertion in der WiscDsLoxHs114_05B-Mutante *ugt76c1-2*.

A) Sequenzierungsergebnis des PCR-Fragments des WISC_L4-T-DNA Primers und des *UGT76C1_RT6*-Primers.

B) Sequenzierungsergebnis des PCR-Fragments des WISC_L4-T-DNA Primers und des *UGT76C1_RT7*-Primers.

C) Sequenz des *UGT76C1*-Locus.

Großbuchstaben: Exon; kleine Buchstaben: Intron; magenta unterlegt: *UGT76C1*-Sequenz in der Sequenzierungsreaktion mit dem *UGT76C1_RT6*-Primer; grün unterlegt: *UGT76C1*-Sequenz in der Sequenzierungsreaktion mit dem *UGT76C1_RT7*-Primer; gelb unterlegt: T-DNA-Border-Sequenz; hellgrau unterlegt: *UGT76C1_RT6*-Primer-Sequenz; dunkelgrau unterlegt: *UGT76C1_RT7*-Primer-Sequenz.

Tabelle S2: Sequenzanalyse des Übergangs zwischen *Ds*-Transposon und genomischer *UGT76C2*-DNA der relevanten Kandidaten der HS2-Pools.

ID-HS2-Pool	Sequenz des <i>UGT76C2</i> - <i>Ds</i> -Transposon-Übergangs
3H1	CGACCGTTACCGACCGTTTTTCATCCCT <u>AGTGCTAGCTGAAGCATAGGGTT</u>
3F9	ACGAACAGAGAAGTAGCTGTGAAACGT <u>AGGGATGAAAACGGTCGGTAACGGTCG</u>
3C12	<u>CCGACCGTTACCGACCGTTTTTCATCCCT</u> AAACACCCTCACAGCTTTTCTCAATCTCCTTT
2B6	TTTCTCGACCCaTTCAACTTTc <u>ACTCTAGGGGntGAAAACGGTCGGTAACGGTC</u>

Die *Ds*-Border-Sequenz ist unterstrichen und genomische DNA ist fett gedruckt.

Tabelle S3: Cytokinin-Gehalt in *ugt76c1*- und *ugt76c2*-Einzelmutanten- und *ugt76c1,2*-Doppelmutanten im Vergleich zum WT.

Genotyp	<i>tZ</i>	<i>tZR</i>	<i>tZRMP</i>	<i>tZOG</i>	<i>tZROG</i>	<i>tZ7G</i>	<i>tZ9G</i>
WT	0,036 ± 0,006	1,48 ± 0,38	5,11 ± 0,65	8,63 ± 2,47	0,43 ± 0,07	26,00 ± 3,45	7,20 ± 0,67
<i>ugt76c1-1</i>	0,047 ± 0,010	1,77 ± 0,33	5,25 ± 1,01	8,05 ± 2,04	0,42 ± 0,09	24,85 ± 1,40	7,11 ± 0,28
<i>ugt76c2-1</i>	0,049 ± 0,016	1,25 ± 0,13	4,58 ± 0,72	5,99 ± 0,95	0,41 ± 0,07	1,17 ± 0,12	0,05 ± 0,01
<i>ugt76c2-2</i>	0,028 ± 0,008	1,77 ± 0,42	4,66 ± 0,73	8,05 ± 0,83	0,46 ± 0,07	0,95 ± 0,10	0,04 ± 0,01
<i>ugt76c1,2_a</i>	0,039 ± 0,008	1,38 ± 0,30	3,50 ± 0,41	8,35 ± 1,19	0,35 ± 0,08	0,19 ± 0,04	<LOD
<i>ugt76c1,2_b</i>	0,039 ± 0,013	1,64 ± 0,42	4,19 ± 0,93	10,36 ± 1,36	0,35 ± 0,06	0,17 ± 0,01	<LOD

Genotyp	<i>cZ</i>	<i>cZR</i>	<i>cZRMP</i>	<i>cZOG</i>	<i>cZROG</i>	<i>cZ7G</i>	<i>cZ9G</i>
WT	0,038 ± 0,007	0,49 ± 0,08	6,76 ± 1,60	1,89 ± 0,39	2,98 ± 0,52	21,40 ± 2,43	0,22 ± 0,03
<i>ugt76c1-1</i>	0,052 ± 0,013	0,49 ± 0,05	6,05 ± 1,56	2,07 ± 0,29	3,09 ± 0,79	19,05 ± 2,15	0,17 ± 0,01
<i>ugt76c2-1</i>	0,036 ± 0,012	0,46 ± 0,06	6,60 ± 1,09	2,59 ± 0,48	3,02 ± 0,79	0,39 ± 0,05	0,04 ± 0,01
<i>ugt76c2-2</i>	0,027 ± 0,008	0,55 ± 0,12	4,96 ± 0,94	2,78 ± 0,80	3,98 ± 0,91	0,31 ± 0,02	0,03 ± 0,00
<i>ugt76c1,2_a</i>	0,037 ± 0,012	0,48 ± 0,14	5,41 ± 1,21	2,88 ± 0,45	3,95 ± 1,23	0,059 ± 0,018	<LOD
<i>ugt76c1,2_b</i>	0,028 ± 0,007	0,61 ± 0,10	5,62 ± 1,79	2,89 ± 0,46	2,75 ± 0,48	0,066 ± 0,018	<LOD

Genotyp	<i>iP</i>	<i>iPR</i>	<i>iPRMP</i>	<i>iP7G</i>	<i>iP9G</i>
WT	0,694 ± 0,243	1,18 ± 0,38	13,14 ± 0,79	66,99 ± 5,78	2,84 ± 0,33
<i>ugt76c1-1</i>	2,650 ± 0,719	1,37 ± 0,45	12,36 ± 2,08	57,70 ± 4,38	2,33 ± 0,14
<i>ugt76c2-1</i>	1,763 ± 0,500	0,82 ± 0,15	10,56 ± 0,67	1,13 ± 0,08	0,13 ± 0,01
<i>ugt76c2-2</i>	0,824 ± 0,243	1,41 ± 0,44	11,15 ± 0,99	0,92 ± 0,04	0,11 ± 0,02
<i>ugt76c1,2_a</i>	1,912 ± 0,530	1,07 ± 0,22	9,56 ± 1,05	0,07 ± 0,02	<LOD
<i>ugt76c1,2_b</i>	1,175 ± 0,374	1,36 ± 0,36	9,77 ± 1,28	0,09 ± 0,02	<LOD

Die Proben stammten von Keimlingen, die unter LT-Bedingungen *in vitro* angezogen wurden (11TNK). Pro Messung wurden jeweils ~ 20 mg Pflanzenmaterial verwendet. Angegeben ist der absolute Cytokinin-Gehalt in pmol/g Frischgewicht (n = 5). <LOD: unter der Detektionsgrenze.



Abbildung S3: Konditionaler Phänotyp von *ugt76c1,2_a*-Mutanten.

A) Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen Pflanzen des WTs und der Linie *ugt76c1,2_a* (33 TNK).

B) Quantifizierung des Frischgewichts der Rosetten von Pflanzen des WTs und der Linie *ugt76c1,2_a*. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde und unter Langtagbedingungen (n = 11-15). Sterne markieren signifikante Unterschiede zum WT (***) = $p < 0,001$; ANOVA, Tukey-Kramer

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den vergangenen Jahren unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Tomáš Werner für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken. Weiterhin danke ich ihm für seine beständige Unterstützung, sein offenes Ohr für Probleme hatte und seine stetige Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. T. Schmülling. Dafür, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat und für die freundliche Aufnahme in seinem Institut. Ich habe sehr gerne an diesem Ort gearbeitet.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern des Labors 107 danken. Für die großartige und inspirierende Atmosphäre und die vielen schönen Momente im und außerhalb des Labors.

Ein großes Dankeschön geht auch an die ehemaligen und derzeitigen Mitglieder des Instituts für Angewandte Genetik, die für die gute Stimmung sorgen und alles am Laufen halten, für die ausgesprochene Hilfsbereitschaft, die gemeinsamen Kaffeepausen, die Sommerfeste und Weihnachtsfeiern, die ich sehr gern in Erinnerung behalte. Auch bei den Gärtnern möchte ich mich bedanken für die Pflege der Pflanzen und des Gewächshauses.

Mein besonderer Dank geht auch an meine Eltern und Freunde, die mich auf meinem Weg begleiten und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann, für ihr Verständnis und den moralischen Beistand.

Danke!

Selbstständigkeitserklärung

zur

Dissertation

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

**Charakterisierung der Cytokinin-*N*-Glucosyltransferase-Gene *UGT76C1* und *UGT76C2*
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.

10.06.2021 Louisa Brock _____

Datum, Name