

**Untersuchung der Rolle der Cytokinine
im Primärmetabolismus und bei der Regulierung
der *sink/source*-Verhältnisse in Pflanzen**

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

Kerstin Holst
aus Berlin

Juni 2009

Diese Arbeit wurde von März 2005 bis Mai 2009
unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Schmülling
im Institut für Biologie/Angewandte Genetik angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Disputation am 25.06.2009

DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Thomas Schmülling sehr, dass er mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe diese Promotionsarbeit anfertigen zu können. Ich bedanke mich für die konstruktiven Gespräche und Denkanstöße und auch für das Engagement bei der Schaffung der „Mittel und Wege“ für die Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe.

Prof. Wolfgang Schuster möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation zu begutachten, und darüber hinaus auch für die Aufrechterhaltung eines funktionierenden Computersystems und eines unentbehrlichen Arbeitsplatzes.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Tomáš Werner für die großartige Betreuung meiner Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft wie auch Anregungen und Tipps und Tricks im Labor haben diese Arbeit bereichert.

Ich danke dem Labor 107 für die vielen offenen Ohren, die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, die entspannte Arbeitsatmosphäre im Labor und die vielen lustigen Momente. Auch allen anderen „Institutlern“ möchte ich für Rat und Tat sehr danken.

Bei dem Gärtnerteam bedanke ich mich für die Pflege meiner Pflanzen und allen anderen Arbeitserleichterungen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und Henry für ihre Unterstützung und die Motivation. Vor allem Henry bin ich sehr dankbar, dass er da war, mir stets zuhörte und mich aufbaute, wenn es mal nicht so klappte wie es sollte.

Vielen, vielen Dank!

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Cytokinine.....	1
1.1.1	Biosynthese der Cytokinine.....	1
1.1.2	Homöostase, Metabolismus und Modifikation von Cytokinen.....	3
1.1.3	Cytokininkatabolismus.....	4
1.1.4	Cytokintransport und Funktion als Signalmolekül.....	5
1.1.5	Signaltransduktion der Cytokinine.....	6
1.2	Auswirkungen von Cytokindefizienz in transgenen Pflanzen.....	7
1.3	Das Sprossapikalmeristem.....	10
1.4	Die <i>source</i> - und <i>sink</i> -Verhältnisse in Pflanzen.....	11
1.5	Die Rolle der Invertasen im Saccharosemetabolismus.....	13
1.6	Der Zellzyklus und die Bedeutung von CyclinD3.....	14
1.7	Die Rolle des Trehalosemetabolismus.....	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Verwendete Materialien.....	19
2.2	Verwendete Organismen.....	19
2.2.1	Bakterien.....	19
2.2.2	Pflanzen.....	20
2.3	Kultivierung der Organismen.....	20
2.3.1	Kulturbedingungen.....	20
2.3.2	Methoden zur Samensterilisation.....	21
2.3.3	Nährmedien.....	21
2.4	Analyse physiologischer Parameter.....	22
2.4.1	Probennahme.....	22
2.4.2	Photometrische Messung.....	22
2.4.3	Bestimmung der Kohlenhydrat- und Adenylatgehalte.....	23
2.4.3.1	Extraktion der Metabolite.....	23
2.4.3.2	Photometrische Bestimmung der Kohlenhydrate.....	23
2.4.3.3	Luminometrische Bestimmung der Adenylatgehalte.....	24
2.4.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	24
2.4.4.1	Extraktion der Invertasen.....	24
2.4.4.2	Extraktion der glykolytischen Enzyme.....	25
2.4.4.3	Photometrische Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	25
2.4.5	Stärkefärbung.....	26
2.5	Internetdatenbanken.....	26
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.6.1	Agarosegelelektrophorese.....	26
2.6.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	27
2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.6.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und Agrobakterien.....	28
2.6.5	Präparation von BAC-DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.6.6	DNA-Sequenzierung.....	30
2.6.7	DNA-Restriktionsverdau.....	30
2.6.8	Methoden zur DNA-Aufreinigung.....	31
2.6.8.1	Alkoholfällung.....	31

2.6.8.2	Präparative Gelelektrophorese	31
2.6.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	32
2.6.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
2.6.11	Extraktion von Gesamt-RNA aus Arabidopsis.....	32
2.6.12	Northern Blot-Analyse.....	33
2.6.13	Semiquantitative RT-PCR.....	35
2.6.14	Klonierungsstrategien	36
2.7	Transformationsmethoden	38
2.7.1	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	38
2.7.2	Transformation von <i>E. coli</i> und Agrobakterien	39
2.7.3	Transformation von Arabidopsis	39
2.8	Analyse der Wachstumsparameter.....	40
2.8.1	Messung der Wurzelelongation	40
2.8.2	Bestimmung der Schotenzahl und Schotendichte.....	40
2.8.3	Kinematische Analyse der Blattepidermis.....	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Physiologische Charakterisierung von <i>35S:CKX</i> -transgenen Tabakpflanzen	42
3.1.1	Kohlenhydratgehalte in <i>35S:CKX</i> -transgenen Tabakpflanzen	42
3.1.2	ATP- und ADP-Gehalte in <i>35S:CKX</i> -transgenen Tabakpflanzen	45
3.1.3	Aktivitäten von Invertasen und glykolytischen Enzymen in <i>35S:CKX</i> -transgenen Tabakpflanzen.....	46
3.2	Einfluss der Zellwand-Invertase auf das Wachstum cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen.....	48
3.2.1	Selektion von <i>ANT:CINI</i> - und <i>LFY:CINI</i> -transgenen Arabidopsispflanzen und Kreuzung mit cytokinindefizienten Pflanzen.....	49
3.2.2	Transformation cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen mit <i>ANT:CINI</i> - bzw. <i>LFY:CINI</i> -Konstrukten.....	52
3.3	Einfluss von CyclinD3 auf das Wachstum cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen	54
3.4	Einfluss von Trehalose-6-phosphat auf das Wachstum cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen.....	57
3.4.1	Einfluss exogener Trehalose auf das Sprosswachstum.....	58
3.4.2	Einfluss exogener Trehalose auf das Wurzelwachstum.....	61
3.5	Effekt lokaler Cytokinindefizienz durch spezifische Expression von <i>CKX3</i> in verschiedenen Domänen des <i>sink</i> -Gewebes im Spross von Arabidopsis	64
3.5.1	Auswirkung der <i>CKX3</i> -Expression im gesamten Sprossapikalmeristem auf das Pflanzenwachstum	66
3.5.1.1	Auswahl <i>STM:CKX3</i> -transgener Arabidopsislinien und Expressionsanalysen	67
3.5.1.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>STM:CKX3</i> -transgenen Pflanzen.....	68
3.5.2	Auswirkung der <i>CKX3</i> -Expression im Organisierenden Zentrum und in den Stammzellen.....	71
3.5.2.1	Auswahl <i>WUS:CKX3</i> - und <i>CLV3:CKX3</i> -transgener Arabidopsislinien und Analyse des Phänotyps der Keimlinge.....	72
3.5.2.2	Expressionsanalysen <i>WUS:CKX3</i> - und <i>CLV3:CKX3</i> -transgener Pflanzen.....	75
3.5.2.3	Phänotypische Charakterisierung von <i>WUS:CKX3</i> - und <i>CLV3:CKX3</i> -transgenen Pflanzen.....	76
3.5.3	Auswirkung der <i>CKX3</i> -Expression in den Primordien der Sprossorgane	78
3.5.3.1	Auswahl <i>ANT:CKX3</i> - und <i>LFY:CKX3</i> -transgener Arabidopsislinien und Expressionsanalysen	79
3.5.3.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>ANT:CKX3</i> -transgenen Pflanzen.....	80

3.5.3.3	Phänotypische Charakterisierung von <i>LFY:CKX3</i> -transgenen Pflanzen	86
4	DISKUSSION.....	91
4.1	Physiologischer Phänotyp cytokinindefizienter Tabakpflanzen	91
4.1.1	Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus des Spross- <i>sink</i> -Gewebes cytokinindefizienter Pflanzen	91
4.1.2	Photosyntheseaktivität und <i>source</i> -Stärke cytokinindefizienter Pflanzen	94
4.1.3	Physiologische Veränderungen in cytokinindefizienten Wurzeln	96
4.2	Einfluss verschiedener Faktoren der <i>sink</i> -Bildung auf das Wachstum cytokinindefizienter Pflanzen	97
4.2.1	Spezifische Expression der Zellwand-Invertase <i>CIN1</i> im Spross- <i>sink</i> -Gewebe cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen	97
4.2.2	Spezifische Expression von <i>CycD3</i> im Spross- <i>sink</i> -Gewebe cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen	100
4.2.3	Erhöhung des Trehalose-6-phosphat-Gehaltes in cytokinindefizienten Arabidopsispflanzen.....	104
4.3	Auswirkung lokaler Cytokinindefizienz in verschiedenen Domänen des Spross- <i>sink</i> - Gewebes auf das Wachstum von Arabidopsispflanzen	109
4.3.1	Reduktion des Cytokiningehaltes im gesamten Sprossapikalmeristem.....	109
4.3.2	Reduktion des Cytokiningehaltes im Organisierenden Zentrum und in den Stammzellen.....	113
4.3.3	Reduktion des Cytokiningehaltes in Primordien der Sprossorgane.....	115
4.3.3.1	Cytokinindefizienz in Organprimordien während der gesamten Wachstumsphase	115
4.3.3.2	Cytokinindefizienz in Organprimordien insbesondere während der reproduktiven Wachstumsphase.....	118
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	121
6	SUMMARY	123
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	VERZEICHNIS DER ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN.....	139
9	LEBENS LAUF	140
10	ANHANG	141
10.1	Messprinzipien der optisch-enzymatischen Tests.....	141
10.2	Primer.....	142
10.3	Vektorkarten.....	144
10.4	T-DNA-Insertion <i>CKX3</i> -transgener Linien	146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
AHK	Arabidopsis Histidinkinase
AHP	Arabidopsis Histidinphosphotransmitterprotein
AMP	Adenosinmonophosphat
ANT	AINTEGUMENTA
ARR	Arabidopsis Responseregulator
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BAP	Benzylaminopurin bidest. zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BS	Blütenstadium
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CIN1	Chenopodium rubrum Invertase 1
CKX	Cytokininoxidase/-dehydrogenase
CLV3	CLAVATA 3
CycD	Cyclin D, D-Typ Cyclin
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribinukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dihydrozeatin
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykolbisaminoethylethertetraessigsäure
Fa.	Firma
FG	Frischgewicht
Fru6P	Fructose-6-phosphat
Fru2,6BP	Fructose-2,6-bisphosphat
Fru1,6BP	Fructose-1,6-bisphosphat
g	Erdschwerebeschleunigung
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulphonsäure
Hyg	Hygromycin
iP	Isoprenyladenin
IPT	Isopentenyltransferase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>left border; lysogeny broth</i>

Abkürzungsverzeichnis

LFY	LEAFY
M	Molar
MES	Morpholinoethansulphonsäure
MOPS	Morpholinopropansulphonsäure
MS	Murashige-Skoog
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NOS	Nopalin-Synthase
OD	optische Dichte
OZ	Organisierendes Zentrum
P	Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
PFP	Pyrophosphat-Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RB	<i>right border</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAM	Sprossapikalmeristem
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	SOB (<i>super optimal broth</i>) mit Glucose
SSC	NaCl-Natriumcitrat (<i>saline-sodium citrate</i>)
STM	SHOOTMERISTEMLESS
Suc	Saccharose (<i>sucrose</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNA	Tage nach Aussaat
TPI	Triosephosphat-Isomerase
TPP	Trehalose-6-phosphat-Phosphatase
TPS	Trehalose-6-phosphat-Synthase
Tre	Trehalose
Tre6P	Trehalose-6-phosphat
tRNA	transfer-RNA
tZ	<i>trans</i> -Zeatin
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
ÜN	über Nacht
ValA	Validamycin A
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
WUS	WUSCHEL
w/v	Gewichtsprozent



1 EINLEITUNG

Pflanzen wachsen und bilden neue Organe während ihres gesamten Lebenszyklus. Dabei versorgen photosynthetisch aktive Gewebe (*source*-Gewebe) die photosynthetisch weniger aktiven oder inaktiven Gewebe wie junge Blätter, Blüten, Samen und Wurzeln (*sink*-Gewebe) mit Nährstoffen. Die *source-sink*-Verhältnisse in der Pflanze sind dynamisch und werden durch Entwicklungs- und Umweltsignale beeinflusst. Bei der Regulierung des Pflanzenwachstums sind Phytohormone maßgeblich beteiligt. Vor allem Cytokinine beeinflussen die *source-sink*-Verhältnisse der Pflanze, da sie während des gesamten Pflanzenwachstums zahlreiche verschiedene Entwicklungs- und physiologische Prozesse regulieren, wie die Bildung und Aktivität von Meristemen (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003), Zelldifferenzierung (Dello Ioio *et al.*, 2007), Apikaldominanz (Shimizu-Sato *et al.*, 2009), Chloroplastenreifung (Lochmanová *et al.*, 2008), Nährstoffverteilung (Roitsch und Ehneß, 2000) und Seneszenz (Gan und Amasino, 1995; Kim *et al.*, 2006). Cytokinin reguliert einige dieser Prozesse hauptsächlich durch die Stimulation der Zellteilung – eine Eigenschaft, die Cytokinin 1955 entdeckt wurde (Miller *et al.*, 1955).

1.1 Cytokinine

1.1.1 Biosynthese der Cytokinine

Natürlich vorkommende Cytokinine sind Adeninderivate, die N^6 -substituiert meist eine Isoprenoidseitenkette tragen (z.B. Isopentenyladenin, iP; *trans*-Zeatin, tZ; *cis*-Zeatin, cZ; Dihydrozeatin, DZ) oder seltener eine aromatische Gruppe (z.B. Benzyladenin, BA) (Mok und Mok, 2001). Kurz nach der Entdeckung von Cytokinin wurde vermutet, dass dieses durch den Abbau von tRNA entsteht, doch Berechnungen der *turnover*-Raten der tRNA führten zu dem Schluss, dass dies nicht der Hauptweg der Cytokininbiosynthese ist (Sakakibara, 2006). Die Identifizierung eines Substrates und des Syntheseweges von Isoprenoid-Cytokinin erfolgte zuerst beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978). Der erste und limitierende Schritt der Biosynthese der Isoprenoid-Cytokinine ist die *N*-Prenylierung von Adenosinphosphaten (AMP, ADP oder ATP) an der N^6 -Position des Adeninrings mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), der durch Isopentenyltransferasen (IPT) katalysiert wird.

Die Substratspezifität der IPTs variiert je nach Herkunft und Spezies. Biochemische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Pflanzen-IPTs hauptsächlich ADP und ATP als Prenylakzeptor verwenden, während bakterielle IPTs AMP als Substrat bevorzugen (Sakakibara, 2006). In *Arabidopsis thaliana* gibt es neun IPT-Enzyme, von denen sieben ADP/ATP-IPTs (AtIPT1, AtIPT3-AtIPT8) sind und die oben beschriebene Reaktion katalysieren (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2004a). AtIPT2 und wahrscheinlich auch AtIPT9 sind tRNA-IPTs, die tRNA anstelle von Adenosinphosphaten prenylieren (Kakimoto, 2001; Golovko *et al.*, 2002). Durch tRNA-IPT-Aktivität wird cZ synthetisiert (Miyawaki *et al.*, 2006).

Es gibt zwei Wege der DMAPP-Biosynthese, den Methylerythritol-Weg (MEP-Weg) in Bakterien und Plastiden und den Mevalonat-Weg (MVA-Weg) im Cytosol von Eukaryoten (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 2003). Die Isoprenoidseitenketten von Cytokinin des iP- und des tZ-Typs stammen vor allem aus dem plastidären MEP-Weg, während ein großer Teil von cZ-Typ-Cytokinin über den cytosolischen MVA-Weg synthetisiert wird (Kasahara *et al.*, 2004). Entsprechend der DMAPP-Syntheseorte sind die AtIPTs in Plastiden (AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5 und AtIPT8) und im Cytosol (AtIPT4) lokalisiert, aber auch in Mitochondrien (AtIPT7) (Kasahara *et al.*, 2004).

Bei dem ersten, durch ADP/ATP-IPTs katalysierten Schritt der Cytokininbiosynthese entstehen iP-Nukleotide, die durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP735A1 und CYP735A2) durch Hydroxylierung der Isoprenoidseitenkette in tZ-Nukleotide umgewandelt werden (Takei *et al.*, 2004b). Um biologisch aktiv zu werden, werden iP- und tZ-Nukleotide durch Dephosphorylierung und Deribosylierung zu iP- und tZ-Nukleobasen umgewandelt (Chen und Kristopeit, 1981a; Chen und Kristopeit, 1981b), doch die kodierenden Gene der entsprechenden Enzyme wurden bisher nicht identifiziert. Kürzlich wurde in Reis ein neuer Weg identifiziert, bei dem die aktiven Cytokininnukleobasen direkt aus den Cytokininnukleotiden, genauer gesagt den Cytokininnucleosidmonophosphaten, hervorgehen (Kurakawa *et al.*, 2007). Dieser Schritt wird durch die Cytokininnucleosid-5'-monophosphat-Phosphoribohydrolase namens LONELY GUY (LOG) katalysiert.

Ursprünglich wurde angenommen, dass Cytokinine hauptsächlich in Wurzeln synthetisiert werden, da diese hohe Cytokiningehalte aufweisen. Es zeigte sich jedoch, dass Cytokinine auch im Spross gebildet werden. Promotor-Reporter-Expressionsanalysen der *AtIPT*-Gene offenbarten eine Gewebe- und Organspezifität der Cytokininbiosynthese durch IPTs (Miyawaki *et al.*, 2004). *AtIPT*-Gene werden zum Beispiel im Spross- und Wurzelphloem (*AtIPT3*, *AtIPT7*), in Vorläuferzellen des Wurzelxylems (*AtIPT1*), in Wurzel-

primordien (*AtIPT5*), in der Wurzelhaube (*AtIPT5*), in Axillarknospen (*AtIPT1*), im jungen Infloreszenzgewebe (*AtIPT5*), in Samenanlagen (*AtIPT1*) und in Samen (*AtIPT1*, *AtIPT4*, *AtIPT8*) exprimiert.

Des Weiteren wird die Cytokininbiosynthese durch verschiedene interne und externe Stimuli reguliert. So wurde gezeigt, dass Auxin die *AtIPT*-Expression (*AtIPT5*, *AtIPT7*) induziert, während Cytokinin *AtIPT*-Gene (*AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5*, *AtIPT7*) reprimiert (Miyawaki *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wird die Expression von *CYP735A1* und *CYP735A2* durch Cytokinin hochreguliert und durch Auxin und Abscisinsäure herabreguliert (Takei *et al.*, 2004b). Außerdem wurde in Arabidopsis eine Reduktion des Cytokiningehaltes durch Auxin nachgewiesen (Nordström *et al.*, 2004) und in der Erbse die Inhibierung der Expression von zwei *IPT*-Genen (Tanaka *et al.*, 2006). Die Cytokininbiosynthese wird neben Phytohormonen auch durch Makronährstoffe und durch Homöodomänen-Transkriptionsregulatoren beeinflusst. So wurde gezeigt, dass *AtIPT3* durch Nitrat, Sulfat und Phosphat positiv reguliert wird (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004a; Hirose *et al.*, 2008). Im Sprossapikalmeristem werden *AtIPT7* in Arabidopsis (Jasinski *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005) sowie *OsIPT2* und *OsIPT3* in Reis (Sakamoto *et al.*, 2006) durch einen *KNOX*-Transkriptionsfaktor hochreguliert.

1.1.2 Homöostase, Metabolismus und Modifikation von Cytokinin

Die Homöostase von Cytokinin in der Zelle wird durch die Rate der *de novo* Synthese, der Importrate, der Rate von Umwandlung und Abbau von Cytokininconjugaten und durch die Rate von Export und Abbau reguliert (Mok und Mok, 2001). Wichtige Aspekte des Cytokininmetabolismus sind die wechselseitigen Umwandlungen von freien Cytokinin (Nukleobasen), Cytokininribosiden (Nukleoside) und Cytokininmonophosphaten (Nukleotide) und die Konjugation von Zuckerresten, durch die Aktivität, Stabilität und Mobilität der Cytokinine beeinflusst werden (Mok und Mok, 2001). Die Umwandlungen von Nukleobasen in Nukleoside und Nukleotide werden vermutlich durch Enzyme des Purinmetabolismus katalysiert, die jedoch zu Cytokinin eine geringere Affinität haben als zu Adenin, Adenosin und AMP (Chen, 1997; Mok und Mok, 2001).

Die Modifikation der Cytokinine durch Konjugation von Zuckerresten führt im Allgemeinen zu ihrer Inaktivierung und erfolgt entweder am Adeninrest (*N*-Glykosylierung) oder an der Seitenkette (*O*-Glukosylierung, *O*-Xylosylierung). *N*-Glykosylierung kann an den

Positionen N^3 , N^7 und N^9 des Adeninrings durch *N*-Glykosyltransferasen erfolgen, ist irreversibel und führt mit Ausnahme der N^3 -Glukoside zur Inaktivierung der Cytokinine (Mok und Mok, 2001). *O*-Glykosylierung kann an der Hydroxygruppe der Isoprenoidseitenkette von tZ, DZ und cZ durch *O*-Glykosyltransferasen erfolgen (Mok und Mok, 2001). Da Cytokinin-*O*-Glukoside resistent gegen den Abbau durch Cytokininoxidasen/-dehydrogenasen sind und durch β -Glucosidasen wieder in biologisch aktive Cytokinine umgewandelt werden können, könnte *O*-Glykosylierung eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Cytokininaktivität und -homöostase haben (Brzobohaty *et al.*, 1993; Mok und Mok, 2001). *O*-Glukoside stellen also eine inaktive, stabile Speicherform der Cytokinine dar.

1.1.3 Cytokininkatabolismus

Ein weiterer, wichtiger Weg der Inaktivierung von Cytokinen ist ihr Abbau. Der irreversible Cytokininabbau wird in einem einzigen Schritt durch die Cytokininoxidase/-dehydrogenase (CKX) katalysiert, die die Seitenkette von Isoprenoid-Cytokinen und ihren Ribosiden abspaltet, wobei Adenin bzw. Adenosin und die entsprechenden Seitenkettenaldehyde entstehen (Brownlee *et al.*, 1975; McGaw und Horgan, 1983). Die CKX-Genfamilie in *Arabidopsis* besteht aus sieben Mitgliedern (*AtCKX1-AtCKX7*), die alle funktionale Proteine mit CKX-Aktivität kodieren (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2004). Die *AtCKX*-Proteine unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation, die vakuolär (*AtCKX1*, *AtCKX3* und wahrscheinlich auch *AtCKX5*), extrazellulär (*AtCKX2*, *AtCKX4* und wahrscheinlich auch *AtCKX6*) oder cytosolisch (*AtCKX7*) sein kann (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2009) und ihren biochemischen Eigenschaften (Schmülling *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007). Des Weiteren werden die *AtCKX*-Gene gewebespezifisch sowohl im Spross als auch in Wurzeln exprimiert. Die Expression erfolgt vor allem in proliferierenden Geweben, wie dem Sprossapex (*AtCKX1*, *AtCKX2*), Axillarknospen (*AtCKX5*), jungen Blättern (*AtCKX4*, *AtCKX5*), den Vorläuferzellen der Stomata (*AtCKX4*, *AtCKX6*), dem Prokambium des Wurzelmeristems (*AtCKX5*) und den Wurzelprimordien (*AtCKX5*, *AtCKX6*). Expression wurde auch im Leitgewebe von Spross und Wurzeln (*AtCKX6*, *AtCKX7*), im Gynoeceum (*AtCKX6*, *AtCKX7*) und in endoreduplizierenden Zellen wie in Trichomen (*AtCKX4*) und in Stipeln (*AtCKX2*, *AtCKX4*) gefunden (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2004). Insgesamt sind die Expressionslevel der *AtCKX*-Gene jedoch sehr gering.

Die Expressionsdomänen der *AtCKX*-Gene überlappen sich teilweise mit denen der *AtIPT*-Gene, das heißt Cytokinin wird möglicherweise dort abgebaut, wo es synthetisiert wird (Werner *et al.*, 2006). *AtCKX*-Gene (*AtCKX3* bis *AtCKX6*) werden zudem durch Cytokinin positiv reguliert (Rashotte *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2006). Das weist einerseits auf eine lokal begrenzte Wirkung von Cytokinin hin und andererseits auf einen negativen Feedback-Mechanismus zur Kontrolle der Cytokininhomöostase. Einige *AtCKX*-Gene (*AtCKX2*, *AtCKX4*, *AtCKX5*, *AtCKX7*) werden durch Auxin reprimiert (Goda *et al.*, 2004; Rashotte *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2006), was die Cytokininwirkung positiv beeinflusst und in Übereinstimmung mit der Auxininduktion zweier *AtIPT*-Gene steht (Miyawaki *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen, dass erhöhtes exogenes oder endogenes Auxin zu einer Reduktion des Cytokiningehaltes führt (Eklöf *et al.*, 1997; Kamínek *et al.*, 1997). Dies kann zum einen aus der auxinabhängigen Unterdrückung der Cytokininbiosynthese, zum Beispiel durch Repression von *IPT*-Genen resultieren, was bei Tabak und Erbse gezeigt wurde (Nordström *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006). Zum anderen kann die Cytokininreduktion durch Auxin auch aufgrund der Verstärkung des Cytokininabbaus durch positive Regulation der *CKX*-Expression oder der *CKX*-Aktivität erfolgen (Palni *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 2004). Die gegensätzlichen Beobachtungen, die sowohl Cytokininbiosynthese als auch Cytokininabbau betreffen, lassen vermuten, dass der Effekt von Auxin auf den Cytokiningehalt spezie- und/oder gewebespezifisch ist (Rashotte *et al.*, 2005). Die Regulation der *AtCKX*-Expression erfolgt neben Cytokinin und Auxin auch durch Abscisinsäure. Es wurde gezeigt, dass einige *AtCKX*-Gene (*AtCKX1*, *AtCKX3*, *AtCKX4*, *AtCKX6*) durch dieses Phytohormon herabreguliert wird (Werner *et al.*, 2006). Darüber hinaus werden *CKX*-Gene in Arabidopsis (*AtCKX4*, *AtCKX6*; Werner *et al.*, 2006) und Lupine (Uhde-Stone *et al.*, 2003) durch Phosphat negativ reguliert.

1.1.4 Cytokinintransport und Funktion als Signalmolekül

Da die *de novo* Cytokininbiosynthese durch *IPTs* gewebespezifisch ist, müssen die Cytokinine durch Diffusion und/oder durch selektiven Transport zu ihren Zielorten gelangen. Cytokinin ist im Xylemsaft verschiedener Spezies zu finden, wobei vor allem Cytokinine des tZ-Typs darin vorkommen, die vermutlich hauptsächlich in Wurzeln produziert werden (Hirose *et al.*, 2008). Cytokinin, vermutlich insbesondere die des tZ-Typs, scheinen daher eine Rolle bei der akropetalen Signalübertragung von den Wurzeln zum Spross zu spielen und

als Langstreckensignal über das Xylem zu wirken. Sie spielen vor allem bei der Übermittlung des Stickstoffstatus eine Rolle (Sakakibara, 2006). Phloemsaft enthält ebenfalls Cytokinine, jedoch hauptsächlich solche vom iP- und cZ-Typ, die als basipetales oder als systemisches Signal agieren könnten (Hirose *et al.*, 2008). Dass tZ-Cytokinine im Xylem und iP-/cZ-Cytokinine im Phloem akkumulieren, spricht für einen selektiven Transport der Cytokinine.

Der Cytokintransport erfolgt vermutlich über Purintransporter. In Arabidopsis können einige Mitglieder der Purinpermease (PUP)-Familie (AtPUP1 und AtPUP2) Cytokininnukleobasen transportieren (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003). *AtPUP1* wird im Epithem von Hydathoden exprimiert, was auf eine Funktion bei der Rückgewinnung von Cytokinin aus dem Xylemsaft hinweist, um einen Verlust durch Guttation zu verhindern. Die Expression von *AtPUP2* im Phloem von Blättern lässt auf eine Rolle beim Langstreckentransport von Cytokinin schließen (Bürkle *et al.*, 2003). Die Haupttransportform der Cytokinine sind vermutlich Cytokininnukleoside (Sakakibara, 2006). Die selektive Translokation von Cytokininnukleosiden erfolgt vermutlich über Äquilibrierende Nukleosidtransporter (ENT). Dies wurde für OsENT2 in Reis (Hirose *et al.*, 2005) sowie für AtENT3, AtENT6 und AtENT8 in Arabidopsis (Sun *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2008) gezeigt, deren Gene vor allem im Vaskularsystem exprimiert werden.

De novo Cytokininbiosynthese erfolgt hauptsächlich in Plastiden (Abschnitt 1.1.1). Bisher gibt es jedoch keine Hinweise darüber, wie Cytokinin aus Plastiden in das Cytosol transportiert wird (Sakakibara, 2006). Die Komplexität der subzellulären Lokalisation von Cytokininbiosynthese und -metabolismus deuten auf ein kompliziertes intrazelluläres Transportnetzwerk hin. Das räumliche Expressionsmuster von Genen der Cytokininbiosynthese (*IPT*; Abschnitt 1.1.1), des Cytokininabbaus (*CKX*; Abschnitt 1.1.3) und auch der Cytokinin-signaltransduktion (*ARR*; Abschnitt 1.1.5) zeigt, dass Cytokinin auch lokal synthetisiert und katabolisiert wird und somit als lokales, das heißt autokrines oder parakrines Signal wirken kann (Hirose *et al.*, 2008).

1.1.5 Signaltransduktion der Cytokinine

Die Cytokininsignaltransduktion erfolgt in Pflanzen über ein komplexes Zweikomponentensystem in einer Phosphorylierungskaskade (Hwang und Sheen, 2001; Heyl und Schmülling, 2003). Nach dem derzeitigen Modell wird in Arabidopsis das extrazelluläre Cytokininsignal durch drei membranständige Rezeptor-Histidinkinasen (AHK2, AHK3 und

CRE1/WOL/AHK4) wahrgenommen (Mähönen *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Nach dem Binden des Cytokininmoleküls dimerisieren die Rezeptoren, autophosphorylieren und übertragen die Phosphatgruppe auf ein im Cytosol befindliches Histidinphosphotransmitterprotein (AHP). In Arabidopsis werden AHPs von fünf Genen (*AHP1-AHP5*) kodiert (Suzuki *et al.*, 2000). Phosphorylierte AHPs wandern in den Zellkern und übertragen die Phosphatgruppe dort auf B-Typ Responseregulatoren (B-Typ ARRs), die dann als Transkriptionsfaktoren die Expression von primären Cytokininantwortgenen aktivieren, unter anderem auch Gene der A-Typ ARRs (Hwang und Sheen, 2001). In Arabidopsis werden 11 B-Typ ARRs und zehn A-Typ ARRs kodiert (Imamura *et al.*, 1999; D'Agostino *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2002). A-Typ ARRs sind negative Regulatoren des Cytokinin-signalweges und spielen daher bei der negativen Feedback-Regulation eine Rolle (Hwang und Sheen, 2001; To *et al.*, 2004). Sie vermitteln außerdem die cytokininabhängige Regulation weiterer Signalwege (Sweere *et al.*, 2001; Heyl und Schmülling, 2003; Heyl *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu B-Typ *ARR*-Genen sind A-Typ *ARR*-Gene durch Cytokinin induzierbar (Heyl und Schmülling, 2003). Als weitere Komponenten des Cytokinin-signalweges wurden Cytokininresponsefaktoren (CRFs) identifiziert, die unabhängig von den B-Typ ARRs einen großen Teil der transkriptionellen Cytokininantwort vermitteln (Rashotte *et al.*, 2006).

1.2 Auswirkungen von Cytokinindefizienz in transgenen Pflanzen

Pflanzen mit einem reduzierten Cytokiningehalt bieten die Möglichkeit, Prozesse des Wachstums und der Entwicklung zu identifizieren, bei denen Cytokinin limitierend ist und die somit durch das Hormon reguliert werden könnten. Durch konstitutive Expression von *AtCKX*-Genen in Tabak (*AtCKX1-AtCKX4*; Werner *et al.*, 2001) und Arabidopsis (*AtCKX1-AtCKX6*; Werner *et al.*, 2003) war es möglich, den endogenen Cytokiningehalt in den Pflanzen aufgrund eines verstärkten Cytokininabbaus auf bis zu 30 % zu reduzieren. Dies führt zu komplexen phänotypischen Veränderungen, die als Cytokinindefizienzsyndrom bezeichnet werden. Cytokinindefiziente Pflanzen sind kleinwüchsig, wachsen langsam und blühen später (Abbildungen 1A und D). Das reduzierte und verlangsamte Sprosswachstum resultiert aus der stark verringerten Größe und Aktivität der vegetativen und reproduktiven apikalen Meristeme (Abbildung 1E). Die Verringerung der Meristemgröße ist hauptsächlich auf eine Reduktion der Zahl der meristematischen Zellen zurückzuführen. Die Bildung neuer

Blätter ist in *35S:AtCKX*-transgenen Pflanzen verzögert, die Blätter sind kleiner und haben weniger, aber größere Zellen als Wildtypblätter. Das Vaskularsystem der Blätter ist reduziert. Cytokinindefiziente Pflanzen bilden weniger Blüten pro Infloreszenz, wobei die Blütengröße unverändert ist. Cytokinin wird demzufolge für die Aktivität der Sprossmeristeme und die Entwicklung der Organprimordien benötigt, wobei es offenbar bei der Zellteilung eine wichtige Rolle spielt. Das axilläre Sprosswachstum ist bei Cytokinindefizienz verstärkt, das heißt im Gegensatz zu den dormanten Wildtypknospen bilden axilläre Knospen transgener Tabakpflanzen wenige kleine Blätter und transgene Arabidopsispflanzen haben mehr axilläre Infloreszenzen als Wildtyppflanzen. Diese Veränderungen deuten auf eine reduzierte Apikaldominanz hin und lassen auf eine Rolle von Cytokinin bei der Regulation der Apikaldominanz schließen.

Anders als das Sprosswachstum ist das Wachstum der Wurzeln cytokinindefizienter Tabak- und Arabidopsispflanzen verstärkt (Abbildungen 1B, C und F) (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). Die Verlängerung der Primärwurzel ist beschleunigt und die Zahl der Lateral- und der Adventivwurzeln erhöht. Die lateralen Wurzelprimordien *35S:AtCKX*-transgener Pflanzen werden häufig näher an der Wurzelspitze und dichter beieinander initiiert als die des Wildtyps. Cytokinin ist also vermutlich an der Kontrolle der Wurzelwachstumsrate und der Bildung neuer Wurzelmeristeme beteiligt. Das primäre Wurzelmeristem cytokinindefizienter Pflanzen ist vergrößert und die Zellzahl sowie die Zahl der sich teilenden Zellen im Wurzelapikalmeristem erhöht (Abbildung 1G). In voll entwickelten Wurzeln ist die Zahl oder Größe der Zellen in einigen Zellreihen erhöht. Cytokinin beeinflusst demnach möglicherweise die Wurzelwachstumsrate über die Regulation der Zahl der sich teilenden Zellen im Wurzelapikalmeristem, indem es den Übergang von der Zellteilung zur Zelldifferenzierung kontrolliert (Werner *et al.*, 2003; Dello Ioio *et al.*, 2007). Cytokinin ist also ein positiver Regulator des Sprosswachstums und ein negativer Regulator des Wurzelwachstums.

Der reduzierte Cytokininingehalt in *ipt*-Mutanten führte zu ähnlichen phänotypischen Veränderungen wie bei *AtCKX*-überexprimierenden Pflanzen (Miyawaki *et al.*, 2006). Auch Mutanten des Cytokininsignalweges, wie *ahk*-Mutanten (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006), *ahp*-Mutanten (Hutchison *et al.*, 2006) und B-Typ *arr*-Mutanten (Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008) zeigten teilweise phänotypische Merkmale *35S:AtCKX*-transgener Pflanzen. Darüber hinaus führte die Repression der Ziel-

gene der B-Typ ARR zu einem Phänotyp, der den Cytokinindefizienzphänotyp widerspiegelte (Heyl *et al.*, 2008).

Die Überexpression von *AtCKX1*, *AtCKX3* und *AtCKX5*, deren Genprodukte vakuolär lokalisiert sind, verursacht stärkere phänotypische Veränderungen in den transgenen Tabak- bzw. Arabidopsispflanzen als die Überexpression von *AtCKX2*, *AtCKX4* und *AtCKX6*, die extrazellulär lokalisierte Proteine kodieren (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). Die subzelluläre Kompartimentierung der *AtCKX*-Enzyme und/oder ihre biochemischen Eigenschaften scheinen eine wichtige Rolle bei der Cytokininfunktion zu spielen.

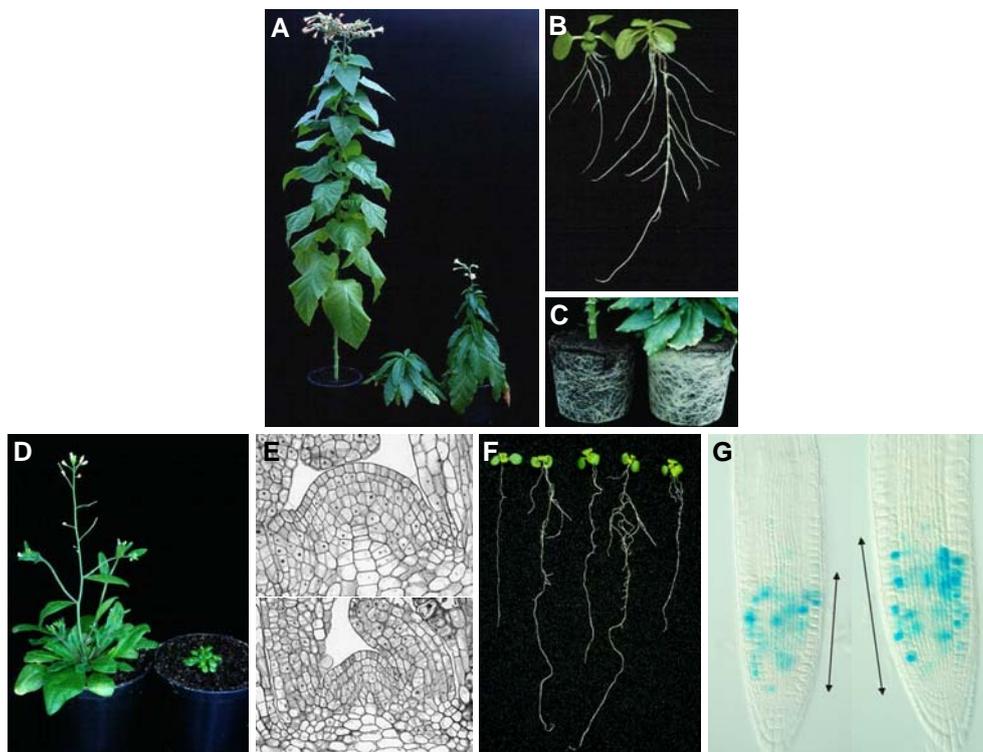


Abbildung 1: Phänotypische Veränderungen cytochindefizienter Tabak- und Arabidopsispflanzen. (A) Das Sprosswachstum transgener Tabakpflanzen ist stark reduziert. Von links nach rechts: Wildtyp, *35S:AtCKX1*- und *35S:AtCKX2*-transgene Pflanze. (B) und (C) Verstärktes Wurzelwachstum *35S:AtCKX1*-transgener Tabakpflanzen (rechts) im Vergleich zum Wildtyp (links). (D) Reduziertes Sprosswachstum einer *35S:AtCKX1*-transgenen Arabidopsispflanze (rechts) im Vergleich zum Wildtyp (links). (E) Im Vergleich zum Wildtyp (oben) ist das Sprossapikalmeristem bei *35S:AtCKX1*-transgenen Arabidopsispflanzen (unten) kleiner. (F) Wurzelwachstum von Arabidopsiskeimlingen. Von links nach rechts: Wildtyp, *35S:AtCKX1* bis *35S:AtCKX4*. (G) Die *CycB1:GUS*-Expression in mitotischen Zellen des Wurzelmeristems verdeutlicht die Vergrößerung der Zellteilungszone (markiert mit Pfeil) in der *35S:AtCKX1*-transgenen Arabidopsiswurzel (rechts) im Vergleich zur Wildtypwurzel (links). Die Abbildungen stammen aus Werner *et al.*, 2001 und Werner *et al.*, 2003.

1.3 Das Sprossapikalmeristem

Das Sprossapikalmeristem (SAM) ist eine Gruppe aus undifferenzierten, proliferierenden Zellen am Sprossapex, aus denen kontinuierlich neue Gewebe und Organe der Pflanze hervorgehen. Man unterscheidet vegetative Meristeme, Infloreszenz- und Blütenmeristeme. Das SAM ist hochorganisiert und lässt sich in cytologisch und funktionell verschiedene Zonen einteilen: die zentrale, die periphere und die Rippenzone (siehe Abschnitt 3.5, Abbildung 19). Die zentrale Zone befindet sich apikal in der Mitte des SAM und wird ringförmig von der peripheren Zone umgeben. Unterhalb der zentralen Zone schließt sich die Rippenzone an. Die Aufteilung in Zonen überlagernd ist das SAM darüber hinaus in verschiedene Zellschichten unterteilt. Das typische Angiospermen-SAM ist in eine äußere Schicht, die Tunika, und eine innere Schicht, den Korpus, gegliedert (Vernoux *et al.*, 2000). In Dikotylen besteht die Tunika aus zwei verschiedenen Zellschichten, L1 und L2, die sich antiklin teilen und jeweils eine Zelle dick sind. Im Bereich der Organinitiation teilen sich die Zellen der L2 in allen Orientierungen (Vernoux *et al.*, 2000). Korpuszellen werden entsprechend als L3 bezeichnet.

Die zentrale Zone des SAM enthält die Stammzellen, eine kleine Population aus meist pluripotenten, sich kontinuierlich teilenden Zellen, deren Tochterzellen entweder als Stammzellen in der so genannten Stammzellnische verbleiben und diese dadurch erhalten, oder in die beiden benachbarten Zonen übergehen (Groß-Hardt und Laux, 2003). Die letztgenannten Zellen durchqueren im wachsenden Meristem die periphere Zone bzw. die Rippenzone, wobei sie sich weiter teilen und schließlich die Organprimordien und die äußeren bzw. die inneren Stängelgewebe bilden (Vernoux *et al.*, 2000). Die Initiation der Primordien erfolgt in zwei Phasen. In der kurzen Rekrutierungsphase finden sich etwa 60 Zellen als Vorläuferzellen (*founder cells*) des Primordiums zusammen und in der nachfolgenden Wachstums- bzw. Proliferationsphase vergrößert sich das Primordium durch die Erhöhung der Zellzahl aufgrund einer verstärkten Zellteilung (Grandjean *et al.*, 2004). Die Zellen der drei verschiedenen SAM-Zonen unterscheiden sich in ihren cytohistologischen Eigenschaften und durch unterschiedliche Zellteilungsrate (Vernoux *et al.*, 2000; Groß-Hardt und Laux, 2003). Zellen der zentralen Zone teilen sich langsamer als die der peripheren Zone und der Rippenzone; in den Primordien ist die Zellteilungsrate höher als im SAM (Laufs *et al.*, 1998; Grandjean *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004). Die Unterschiede der Zellteilungsrate der Zonen können zwischen den Spezies und mit der Meristemidentität variieren.

Die Stammzellregion umfasst die drei äußeren Zellschichten mit zwei bis drei Stammzellen pro Zellschicht (Groß-Hardt und Laux, 2003). Sie ist durch die Expression des *CLAVATA3*-Gens (*CLV3*) charakterisiert, das daher als Stammzellmarker des Sprossmeristems verwendet wird (Fletcher *et al.*, 1999). Die *CLV3*-Expression wird durch *WUSCHEL* (*WUS*) induziert, wodurch die Stammzellen spezifiziert und aufrecht erhalten werden (Mayer *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000). *WUS* wird in vegetativen und Infloreszenzmeristemen unterhalb der drei äußeren Zellschichten, also unterhalb der Stammzellen, im so genannten Organisierenden Zentrum exprimiert und kodiert einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor (Mayer *et al.*, 1998). *CLV3* ist ein extrazelluläres Polypeptid, das als Signalmolekül den *CLV1/CLV2*-Rezeptorkomplex in der apikalen L3-Zellschicht aktiviert, darüber die Expression von *WUS* reprimiert und die *WUS*-Aktivität somit begrenzt (Fletcher *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2002). Durch diese negative Feedback-Regulation wird die Zellzahl und die Größe des Meristems konstant gehalten und ein Gleichgewicht zwischen undifferenzierten und sich differenzierenden Zellen im Sprossapex erhalten (Schoof *et al.*, 2000).

Die *CLV*- und *WUS*-Gene sind insbesondere für die Regulation der Zahl der Stammzellen im SAM wichtig, doch für die Aufrechterhaltung des Meristems wird auch das *KNOTTED*-ähnliche Homöobox (*KNOX*)-Protein *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) benötigt, das die Expression von Genen der Organbildung herabreguliert (Byrne *et al.*, 2000; Kumaran *et al.*, 2002) und die Akkumulation einer ausreichenden Zahl meristematischer Zellen vor der Primordieninitiation gewährleistet (Lenhard *et al.*, 2002). *STM* wird im gesamten SAM, jedoch nicht in sich entwickelnden Organprimordien exprimiert (Long *et al.*, 1996; Long und Barton, 1998). Die Herabregulation von *STM* in Primordienvorläuferzellen ermöglicht die Differenzierung der Zellen (Piazza *et al.*, 2005). Dies ist mit dem gleichzeitigen Einsetzen der Expression von *AINTEGUMENTA* (*ANT*), einem Transkriptionsfaktor der *APETALA2*-Domänen-Familie, und dem Transkriptionsfaktor *LEAFY* (*LFY*) verbunden (Elliott *et al.*, 1996; Blázquez *et al.*, 1997).

1.4 Die *source*- und *sink*-Verhältnisse in Pflanzen

Source-Gewebe sind photosynthetisch aktive, das heißt autotrophe Gewebe, wie zum Beispiel vollentwickelte Blätter. Sie produzieren Photoassimilate, die hauptsächlich in Form von Saccharose über das Phloem zu den *sink*-Geweben transportiert und dort symplastisch

über Plasmodesmata oder apoplastisch über den extrazellulären Raum bzw. die Zellwand importiert werden. *Sink*-Gewebe sind photosynthetisch weniger aktive oder inaktive Gewebe wie Sprossmeristeme, junge Blätter, Blüten, Früchte, Samen und Wurzeln. Man unterscheidet zwischen verbrauchenden *sinks* und Speicher-*sinks*. Der Zuckermetabolismus und damit die Verhältnisse von *source* und *sink* in der Pflanze sind sehr dynamisch und metabolische Flüsse und Zuckerkonzentrationen verändern sich sowohl während der Entwicklung als auch als Antwort auf Umweltsignale, wie diurnale Veränderungen sowie biotischer und abiotischer Stress (Rolland *et al.*, 2006). Licht und Zucker regulieren metabolische Prozesse durch eine koordinierte Modulation von Genexpression und Enzymaktivitäten sowohl in Kohlenhydrat-exportierenden *source*-Gewebe als auch in Kohlenhydrat-importierenden *sink*-Gewebe (Rolland *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006). Generell wird die *source*-Aktivität einschließlich Photosynthese, Nährstoffmobilisierung und Export durch geringe Zuckergehalte verstärkt, während *sink*-Aktivität wie Wachstum und Speicherung durch hohe Zuckergehalte stimuliert wird (Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2002). Hohe Zuckergehalte in *source*-Gewebe regulieren dagegen die Photosynthese herab, um die Zuckerhomöostase zu gewährleisten. Bei der Kohlenstoffverteilung und -bereitstellung spielt auch der circadiane bzw. diurnale Zyklus eine Rolle (Harmer *et al.*, 2000; Bläsing *et al.*, 2005).

Die Fähigkeit eines *sink*-Gewebes, Assimilate zu importieren, wird als *sink*-Stärke bezeichnet. Die *sink*-Stärke ergibt sich aus der *sink*-Größe, das heißt den physischen Beschränkungen, und der *sink*-Aktivität, das heißt den physiologischen Bedingungen (Ho, 1988). Die physiologische bzw. metabolische Aktivität des *sink*-Gewebes wird durch die Entladung der Saccharose aus dem Phloem, die Aufnahme der Saccharose aus der Zellwand in die *sink*-Zellen (bei apoplastischer Phloementladung) und die Verwertung oder Kompartimentierung bzw. Speicherung des Zuckers in den Zellen bestimmt (Ho, 1988). Durch diese Prozesse wird ein Gradient der Saccharosekonzentration zwischen *source*- und *sink*-Gewebe erzeugt, der den Transport der Saccharose über das Phloem vorantreibt und den Import ermöglicht. Die Aufrechterhaltung des Saccharosegradienten ist also entscheidend für die Importrate des *sink*-Gewebes. Bei der Etablierung und der Regulation von *sink*-Gewebe spielen Phytohormone, insbesondere Cytokinin, eine wichtige Rolle (Kuiper, 1993).

1.5 Die Rolle der Invertasen im Saccharosemetabolismus

Saccharose ist sowohl als Kohlenstoff- und Energiequelle als auch für die Erzeugung von Signalmolekülen für das Pflanzenwachstum bedeutsam. Die einzigen bekannten Wege der Saccharosespaltung *in vivo* werden durch Saccharose-Synthasen und Invertasen katalysiert (Koch, 2004). Saccharose-Synthasen sind Glykosyltransferasen, die Saccharose in Gegenwart von UDP reversibel in UDP-Glucose und Fructose umwandeln. Die meisten Pflanzenspezies enthalten zwei Isoformen der Saccharose-Synthase (Sturm und Tang, 1999). Invertasen sind Hydrolasen, die Saccharose irreversibel in Glucose und Fructose spalten und damit im Vergleich zu Saccharose-Synthasen doppelt so viele Hexosen bilden, die als Signalmoleküle agieren können. Invertasen besitzen somit eine größere Kapazität, spezifische Zuckersensoren zu stimulieren, wodurch die Expression verschiedener Gene beeinflusst werden kann (Koch, 1996; Sturm und Tang, 1999; Smeeckens, 2000; Rolland *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006). Es gibt verschiedene Mechanismen der Zuckerwahrnehmung, die sowohl extra- als auch intrazellulär sein können (Rolland *et al.*, 2006).

In Pflanzen gibt es drei Invertase-Isoformen, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften und der subzellulären Lokalisation unterscheiden: cytosolische, vakuoläre und Zellwand-Invertasen (Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998; Sturm, 1999; Winter und Huber, 2000; Roitsch und González, 2004). Die Gene der Invertasen zeigen während der Pflanzenentwicklung ein zeitliches und räumliches Expressionsmuster. Die Genexpression bzw. die Enzymaktivitäten werden durch verschiedene endogene Faktoren und Umweltfaktoren reguliert, wie zum Beispiel Entwicklungsstatus, Zucker, Hormone, Verwundung oder Pathogeninfektion und Temperatur (Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998; Sturm, 1999). Cytosolische Invertasen haben ein neutrales bis leicht alkalisches pH-Optimum. Ihre physiologische Funktion ist unklar, da sie nur geringe Aktivität aufweisen (Koch, 2004; Roitsch und González, 2004). Vakuoläre Invertasen sind so genannte lösliche saure Invertasen. Sie spielen bei der *sink*-Initiation eine Rolle und sind vor allem in expandierenden Geweben aktiv (Koch, 2004). Durch die Spaltung der osmotisch wenig aktiven Zuckerform in osmotisch aktive Hexosen in der Vakuole sind sie an der Aufrechterhaltung und der Regulation des Zellturgors beteiligt, der als treibende Kraft der Zellstreckung wirkt (Sturm, 1999). Zellwand-Invertasen sind ebenfalls saure Invertasen, die aber ionisch an die Zellwand gebunden sind und auch als extrazelluläre oder apoplastische Invertasen bezeichnet werden. Sie spielen bei der apoplastischen Phloementladung in symplastisch isolierten Zellen oder Geweben wie Pollen,

Schließzellen und Samen eine Rolle, können aber auch in *sink*-Geweben mit symplastischen Verbindungen aktiv sein (Koch, 2004; Roitsch und González, 2004).

Bei der apoplastischen Phloementladung wird Saccharose über Efflux-Saccharosetransporter aus den Siebelementen des Phloems in den Apoplast transportiert und dort durch Zellwand-Invertasen hydrolysiert. Die extrazellulären Hexosen, die auch im Apoplast als Signalmoleküle agieren können, werden dann über Hexosetransporter in die *sink*-Zelle transportiert, wo sie dem Metabolismus zugeführt werden oder als Zuckersignale der Genregulation dienen. Die Gene der Hexosetransporter werden mit den Genen der Zellwand-Invertasen coexprimiert und koordiniert reguliert (Roitsch und González, 2004). Die Expression dieser Gene wird durch Cytokinin induziert (Ehneß und Roitsch, 1997). Durch die Aktivität der extra- und intrazellulären Invertasen werden nicht nur Zuckersignale erzeugt, sondern auch ein Saccharosegradient zwischen *source*- und *sink*-Geweben etabliert und aufrechterhalten, indem im *sink*-Gewebe die Saccharosekonzentration reduziert und damit die *sink*-Stärke reguliert wird (Eschrich, 1980; Koch, 2004; Roitsch und González, 2004).

1.6 Der Zellzyklus und die Bedeutung von CyclinD3

Die meristematische Aktivität wird durch endogene mitogene Signale reguliert, die den Zellzyklus antreiben, sowie durch Umweltsignale, die meist durch Phytohormone wie Cytokinin, Abscisinsäure oder Jasmonat vermittelt werden (del Pozo *et al.*, 2005; Hartig und Beck, 2006). Der mitotische Zellzyklus umfasst vier aufeinander folgende Phasen: die Präsynthesephase (G1), die Synthese- bzw. DNA-Replikationsphase (S), die Postsynthesephase (G2) und die Mitosephase (M). Die G-Phasen (*gap*-Phasen) ermöglichen den Ablauf von Kontrollprozessen, die gewährleisten, dass die S-Phase vollständig abgeschlossen ist, bevor die M-Phase beginnt bzw. umgekehrt. Die wichtigsten Kontrollpunkte des Zellzyklus sind somit der G1/S-Übergang und der G2/M-Übergang (Meijer und Murray, 2000; Dewitte und Murray, 2003). Die Durchquerung dieser Kontrollpunkte benötigt aktivierte Kinasekomplexe, bestehend aus einer cyclinabhängigen Kinase (CDK) und einem Cyclin, wobei mehrere CDK-Komplexe unterschiedliche Abschnitte des Zellzyklus regulieren. Die CDK-Aktivität ist von der Cyclinbindung abhängig und durch die fortlaufende Aktivierung und Aufhebung des jeweiligen CDK-Komplexes wird der Zellzyklus vorangetrieben (Meijer und Murray, 2000; Dewitte und Murray, 2003). In Pflanzen gibt es 49 Cycline in acht Klassen (Typen), wobei A-Typ, B-Typ und D-Typ Cycline bei der Zellzyklusregulierung primäre

Rollen spielen (de Jager *et al.*, 2005; Inzé und De Veylder, 2006). Generell regulieren D-Typ Cycline den G1/S-Übergang, B-Typ Cycline den G2/M-Übergang und A-Typ Cycline die S- bis M-Phase (Dewitte und Murray, 2003; Inzé und De Veylder, 2006).

D-Typ Cycline (CycD) spielen eine wichtige Rolle bei der Antwort des Zellzyklus auf externe Signale (Meijer und Murray, 2000). In *Arabidopsis* werden CycD durch zehn Gene in sieben Untergruppen repräsentiert (Dewitte und Murray, 2003; de Jager *et al.*, 2005). Die Expression von *CycD2* und *CycD3* wird durch Saccharose induziert, und *CycD3*, nicht aber *CycD2*, wird außerdem auch durch Cytokinin, Auxin und Brassinosteroid positiv reguliert, wobei Cytokinin den stärksten Effekt zeigt (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Oakenfull *et al.*, 2002). Die wachstumshemmenden Hormone Abscisinsäure und Jasmonat regulieren die *CycD3*-Expression dagegen herab (Oakenfull *et al.*, 2002). *CycD3* wird in proliferierenden Sprossgeweben wie vegetatives und Infloreszenzmeristem, Blattprimordien, jungen Blättern, Axillarknospen, Prokambium sowie im Vaskulargewebe exprimiert, während die Expression von differenzierten und endoreduplizierenden Geweben ausgeschlossen ist (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Dewitte *et al.*, 2003).

Der Austritt aus dem Zellzyklus in der G1-Phase ist für die normale Differenzierung während der Pflanzenentwicklung notwendig. Sich differenzierende Pflanzenzellen können meist einen alternativen Zyklus durchlaufen, der als Endozyklus oder Endoreduplikation bezeichnet wird und durch einen Anstieg des Ploidiegrades gekennzeichnet ist, der aus aufeinanderfolgenden S-Phasen ohne eingeschobene Mitose resultiert (Joubès und Chevalier, 2000). *CycD3* verhindert durch das Vorantreiben des G1/S-Übergangs den Austritt aus dem Zellzyklus und das Eintreten der Zelle in den Endozyklus und fördert den Ablauf des mitotischen Zellzyklus (Dewitte *et al.*, 2003). Die Herabregulation von *CycD3* ist daher ein wichtiger Faktor für das Einsetzen der zellulären Expansion und Differenzierung in Blättern und anderen Geweben.

1.7 Die Rolle des Trehalosemetabolismus

Trehalose wird in einer Vielzahl von Organismen akkumuliert, die Trocken-, Salz-, Hitze- und Froststress widerstehen (Avonce *et al.*, 2004). Das nichtreduzierende Disaccharid stabilisiert Proteine und biologische Membranen unter diesen Stressbedingungen (Crowe *et al.*, 1992; Paul *et al.*, 2008). Lange Zeit wurde angenommen, dass Trehalose in Pflanzen nur bei spezialisierten austrocknungsresistenten Spezies wie *Selaginella lepidophylla* („Rose von

Jericho“) vorkommt, doch seit kurzem geht man davon aus, dass viele andere Spezies ebenfalls Trehalose synthetisieren können, wobei Trehalose dort allerdings nur in Spuren vorkommt und keine Schutzfunktion bei Stress hat (Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007; Paul *et al.*, 2008). Vielmehr spielt der Trehalosemetabolismus in diesen Pflanzen eine regulatorische Rolle bezüglich des Wachstums und der Entwicklung.

Trehalose kann in allen Organismen außer Vertebraten synthetisiert werden (Grennan, 2007; Paul, 2007). Es gibt mindestens fünf Wege der Trehalosebiosynthese, wobei nur einer, der TPS/TPP-Weg, das Intermediat Trehalose-6-phosphat (Tre6P) einbezieht (Avonce *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2008). Der TPS/TPP-Weg ist der einzige Trehalosebiosyntheseweg in Pflanzen (Paul *et al.*, 2008). Bei diesem Weg überträgt die Trehalose-6-phosphat-Synthase (TPS) den Glucoserest von UDP-Glucose auf Glucose-6-P, wobei Tre6P entsteht, das durch die Trehalose-6-phosphat-Phosphatase (TPP) zu Trehalose dephosphoryliert wird (Cabib und Leloir, 1958). Trehalose kann durch Trehalase wiederum zu Glucose abgebaut werden (Boos *et al.*, 1990). In Arabidopsis gibt es 11 *TPS*-Gene, unterteilt in Klasse I (*AtTPS1-AtTPS4*) und Klasse II (*AtTPS5-AtTPS11*), zehn *TPP*-Gene, unterteilt in Klasse I (*AtTPP B-AtTPP H*) und Klasse II (*AtTPP A, AtTPP I, AtTPP J*) und nur ein Trehalasegen (*AtTRE*) (Lunn, 2007; Paul *et al.*, 2008). Microarray-Analysen ergaben, dass *AtTPS*-Gene durch Cytokinin hochreguliert werden und in cytokinindefizienten Pflanzen herabreguliert sind (Brenner *et al.*, 2005).

Bei der Regulation des Pflanzenwachstums spielt Tre6P eher als Trehalose eine essenzielle Rolle (Schluepmann *et al.*, 2003 und 2004). Tre6P, dessen endogener Gehalt durch Saccharose erhöht wird, ist ein Signalmolekül, das den Zuckerstatus des Cytosol an die Chloroplasten übermittelt und dadurch die Stärkeakkumulation aktiviert (Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2008). Es stimuliert die Stärkesynthese durch posttranslationale Redoxaktivierung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), die den ersten Schritt der Stärkesynthese katalysiert, sowie durch Verstärkung der Expression des AGPase-Gens *ApL3* (Wingler *et al.*, 2000; Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2007). Zudem hemmt Tre6P auch den Stärkeabbau durch Herabregulation von Genen der Stärkespaltung (Ramon *et al.*, 2007). Tre6P verknüpft den Primärmetabolismus mit Wachstum und Entwicklung.

Die *tps1*-Mutation in Arabidopsis, durch die die Tre6P-Synthese blockiert ist, ist rezessiv embryoletal (Eastmond *et al.*, 2002). Die Embryomorphogenese dieser Mutante ist anfänglich normal, kommt jedoch mit dem Übergang zur Reservespeicherung zum Stillstand (Eastmond *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006). Die Akkumulation von

endogenem Tre6P durch exogene Trehalose bewirkt eine Wachstumshemmung bei Keimlingen (Schluepmann *et al.*, 2004). Die Umgehung der Notwendigkeit des Stärkeabbaus durch Dauerlicht oder zusätzlichen Zucker im Nährmedium verhindert diese Wachstumshemmung, was darauf hinweist, dass eher die Hemmung der Stärkemobilisierung als die Verstärkung der Stärkesynthese an der Trehalose- bzw. der Tre6P-Wirkung bei Keimlingen beteiligt ist (Ramon *et al.*, 2007).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Koordination von Stoffwechsel-, Wachstums- und Entwicklungsprozessen der Pflanze erfordert die Integration verschiedener interner und externer Faktoren wie den Entwicklungszustand der Pflanze oder einzelner Organe und die Verfügbarkeit von Assimilaten oder exogener Nährstoffe. Dabei müssen Assimilatsynthese und -verteilung, Kohlenhydratverwertung und -speicherung, Speicherstoffmobilisierung sowie Zellvermehrung und Organbildung ausbalanciert und den jeweiligen Bedingungen bzw. Bedürfnissen der Pflanze angepasst werden. Das Verhältnis von *source* und *sink* in der Pflanze ist daher dynamisch und bedarf einer präzisen Regulation. Die molekularen Mechanismen der Regulation der *source-sink*-Verhältnisse in der Pflanze sind noch wenig verstanden. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Cytokinin, das bekanntermaßen das Sprosswachstum positiv beeinflusst, bei der Spross-*sink*-Bildung, der Regulation der Kohlenstoffverteilung und der Kontrolle verschiedener Parameter des Primärstoffwechsels eine wesentliche Rolle spielt (Roitsch und Ehneß, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es daher, Faktoren zu identifizieren, die das Cytokinin signal mit den physiologischen und entwicklungsbiologischen Antworten der Pflanze verknüpfen und somit an der *sink*-Bildung bzw. der Regulation der *sink-source*-Verhältnisse beteiligt sind. Dazu wurden Pflanzen analysiert, die einen konstitutiv oder gewebespezifisch reduzierten Cytokiningehalt, bewirkt durch die Expression eines *AtCKX*-Gens, aufwiesen. Zunächst wurde ein physiologischer Phänotyp von *35S:AtCKX*-transgenen Tabakpflanzen erstellt, um Hinweise auf regulatorische Schaltstellen von Cytokinin zu erhalten. Für diese Analyse wurden Metabolitgehalte, Adenylatgehalte und Aktivitäten von Enzymen des Kohlenhydratmetabolismus in *sink*- und *source*-Gewebe des Sprosses sowie in Wurzeln von Wildtyp und transgenen Pflanzen bestimmt und verglichen. Des Weiteren wurde die Rolle von Zellwand-Invertase, CycD3 und Trehalose bzw. Tre6P hinsichtlich der Cytokininwirkung untersucht. Diese Faktoren sind cytokininreguliert und beeinflussen Prozesse des Primärmetabolismus

und der *sink*-Bildung und könnten daher Aufschluss über kausale Zusammenhänge geben. In diesem Versuchsansatz sollte die Auswirkung der Expression des jeweiligen Gens auf das Wachstum cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen untersucht werden, sowie deren Wachstumsverhalten bei Erhöhung des endogenen Tre6P-Gehaltes. Zuletzt wurden Arabidopsispflanzen phänotypisch analysiert, in denen durch spezifische *AtCKX*-Expression der Cytokiningehalt gewebespezifisch in verschiedenen Domänen des SAM und in Organprimordien verringert wurde. Dies sollte Hinweise darauf liefern, in welchen Domänen oder Geweben Cytokinin für die Regulation des Pflanzenwachstums wichtig ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Materialien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bioline (Luckenwalde), Bio-Rad (München), Boehringer Mannheim (Mannheim), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Rapidozym (Berlin), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Steinheim) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Radioaktive Isotope wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) erhalten.

Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Reaktionsgefäße und Petrischalen von Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht), Einwegküvetten von Roth (Karlsruhe), Dialysemembranen von Millipore (Schwalbach), Röntgenfilme, Nylonmembranen und Sephadex-Säulen von GE Healthcare (München).

2.2 Verwendete Organismen

2.2.1 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Bakterienstämme.

Spezies	Stamm	Genetische Merkmale
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>supE44 thi</i> ⁻¹ <i>gyrA96 relA1</i> λ ⁻ (Hanahan, 1983; Grant <i>et al.</i> , 1990)
	DH10B	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i> (Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101::pMP90	Rif ^R Gent ^R (Koncz und Schell, 1986)

2.2.2 Pflanzen

Die physiologischen Untersuchungen von Tabakpflanzen erfolgten anhand von *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN und den daraus abgeleiteten transgenen Linien 35S:*AtCKX1-50-8* und 35S:*AtCKX2-38-3* (Werner *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten wurden mit *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Ackerschmalwand) und den daraus abgeleiteten cytokinindefizienten Linien 35S:*AtCKX1-11-7*, 35S:*AtCKX2-9-3* und 35S:*AtCKX3-9-4* (Werner *et al.*, 2003), den Cytokininrezeptormutanten *ahk2-5 ahk3-7* und *ahk2-5 ahk3-7 cre1-2* (Riefler *et al.*, 2006) und der 35S:*OTSA*-transgenen Linie A19.3 (Schluepmann *et al.*, 2003) durchgeführt.

2.3 Kultivierung der Organismen

2.3.1 Kulturbedingungen

Bakterien

E. coli und Agrobakterien wurden auf LB-Festmedium bzw. in LB-Flüssigmedium (Bertani, 1951) angezogen, das mit entsprechenden Antibiotika (Tabelle 2) versetzt wurde, um auf rekombinante Plasmide zu selektieren. *E. coli* wurde über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C und Agrobakterien 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte unter Schütteln bei 200 rpm (*E. coli*) bzw. 160 rpm (Agrobakterien).

Pflanzen

Bei der *in vitro* Kultur von *Arabidopsis* wurden sterilisierte Samen (2.3.2) auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) oder Ats-Medium (Estelle und Somerville, 1987) ausgelegt, 2-3 Tage bei 4 °C dunkel aufbewahrt und anschließend bei 22 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) auf horizontalen oder vertikalen Medienplatten kultiviert. Die Nährmedien wurden gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika (Tabelle 2) versetzt, um transgene Pflanzen zu selektieren. Für die *in vitro* Kultur von *Arabidopsis* in Flüssigmedium wurden die Samen mittels Natriumhypochlorid sterilisiert und in ½ MS-Medium unter Schütteln (120 rpm) kultiviert.

Die Kultur von *Arabidopsis* auf Erde erfolgte im Gewächshaus bei 22 °C unter Langtagbedingungen. Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus bei 20-24 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) kultiviert.

2.3.2 Methoden zur Samensterilisation

Für die *in vitro* Kultur von Arabidopsis erfolgte zunächst eine Oberflächensterilisation der Samen. Dazu wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurden die Samen mit einer 1,2 %igen Natriumhypochloridlösung mit 0,1 % (v/v) Triton in einem 2 ml Eppendorfgefäß 10 min unter Schütteln behandelt, anschließend viermal mit sterilem Wasser gewaschen und zuletzt mit Wasser auf einen sterilen Papierfilter überführt und getrocknet. Bei der zweiten Methode erfolgte die Sterilisation mit 70 % Ethanol mit 0,1 % (v/v) Triton, ebenfalls für 10 min und unter Schütteln. Die Samen wurden anschließend zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und mit dem letzten Waschschrift auf einen sterilen Papierfilter überführt und getrocknet.

2.3.3 Nährmedien

Alle Angaben gelten für 1 l Medium. Die Herstellung erfolgte mit H₂O bidest.

LB-Medium

(Bertani, 1951)

25 g	LB-Medium (Luria/Miller; Fa. Roth)
ggf. 15 g	Agar

SOC-Medium

(Sambrook und Russel, 2001)

20 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Hefe-Extrakt
0,5 g	NaCl
	pH 7,0 (mit 5 N NaOH)
	Nach dem Autoklavieren:
5 ml	2 M MgCl ₂ (autoklaviert)
20 ml	1 M Glucose (sterilfiltriert)

MS-Medium

(Murashige und Skoog, 1962)

fest:	
4,6 g	MS-Salze (Fa. Duchefa)
0,5 g	MES
10 g	Saccharose
7 g	Agar
	pH 5,7 (mit 1 N KOH)
flüssig:	
2,3 g	MS-Salze (Fa. Duchefa)
0,5 g	MES
10 g	Saccharose
	pH 5,7 (mit 1 N KOH)

Ats-Medium

(Estelle und Somerville, 1987)

5 ml	1 M KNO ₃
2,5 ml	1 M KPO ₄
2 ml	1 M MgSO ₄
2 ml	1 M Ca(NO ₃) ₂
2,5 ml	20 mM Fe-EDTA
1 ml	Mikronährstoffe:
	70 mM H ₃ BO ₃ , 14 mM MnCl ₂ ,
	0,5 mM CuSO ₄ , 1 mM ZnSO ₄ ,
	0,2 mM Na ₂ MoO ₄ , 10 mM NaCl,
	0,01 mM CoCl ₂
10 g	Saccharose
7 bzw. 11 g	Agar (für horizontale bzw. vertikale Kultur)

Nach dem Autoklavieren der Nährmedien (20 min bei 120 °C) wurden gegebenenfalls entsprechende Antibiotika (Tabelle 2), CKX-Inhibitor (0,1 µM; Zatloukal *et al.*, 2008) oder Trehalose (10 mM, 50 mM) zugegeben.

Tabelle 2: Für die Selektion verwendete Antibiotika.

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung	Lösungsmittel
Gentamycin	25 mg/l	25 mg/ml	H ₂ O
Hygromycin B	15 mg/l	50 mg/ml	H ₂ O
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/ml	H ₂ O
Rifampicin	50 mg/l	10 mg/ml	Methanol
Validamycin A	10 µM	20 mM	DMSO

2.4 Analyse physiologischer Parameter

2.4.1 Probennahme

Das Pflanzenmaterial wurde von 8-9 Wochen alten Pflanzen in der Mitte der Lichtperiode genommen und umfasste *sink*- und *source*-Gewebe des Sprosses und Wurzeln. Proben des Spross-*sink*-Gewebes beinhalteten den Sprossapex inklusive der jüngsten Blätter von bis zu 1,5 cm Länge. Proben des *source*-Gewebes wurden interkostalen Bereichen voll entwickelter Blätter entnommen, und zwar mittig zwischen Blattgrund und Blattspitze. Für die Untersuchung des Stärkegehaltes im Tagesverlauf wurden im Abstand von etwa 2-3 Stunden Proben des *source*-Gewebes von 6 Wochen alten Pflanzen genommen. Es wurden 200 mg Pflanzenmaterial pro Extraktion abgewogen, sofort in Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.2 Photometrische Messung

Die Bestimmung der Kohlenhydratgehalte und der Enzymaktivitäten wurde mit Hilfe von optisch-enzymatischen Tests, falls nicht anders angegeben, mit dem Photometer Uvikon 931 (Fa. Kontron, München) durchgeführt. Es wurde die Bildung bzw. der Verbrauch von NADH während der enzymatischen Reaktionen anhand der Messung der Extinktion bei 340 nm detektiert. Das Messprinzip des jeweiligen optisch-enzymatischen Tests ist im Anhang erläutert (Abschnitt 10.1). Aus der Extinktionsänderung wurde mit Hilfe des

Lambert-Beerschen Gesetzes ($E = \varepsilon \cdot c \cdot d$) und des Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm ($\varepsilon = 6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) der Gehalt bzw. die Aktivität berechnet. Es wurden Einwegküvetten mit 1 ml Probenvolumen (Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$) verwendet.

2.4.3 Bestimmung der Kohlenhydrat- und Adenylatgehalte

2.4.3.1 Extraktion der Metabolite

Die Extraktion der Kohlenhydrate wurde modifiziert nach Mustroph (2005) durchgeführt. Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert, mit 1 ml 0,83 N HClO₄ homogenisiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Abweichend davon erfolgten bei den Proben zur Bestimmung des Stärkegehaltes im Tagesverlauf Aufschluss und Homogenisierung mit 1 ml 0,83 N HClO₄ mit der Schwingmühle (Retsch MM 300, Fa. Retsch, Haan) im Eppendorfgefäß unter Verwendung einer Metallkugel mit 5 mm Durchmesser. Das Homogenat wurde 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Analyse der löslichen Zucker und der Adenylate verwendet und das Pellet für die Extraktion der Stärke. Der Überstand wurde mit 250 µl 1 M Bicin gemischt, mit 150 µl 4 M KOH neutralisiert und der entstandene Niederschlag erneut 10 min abzentrifugiert. Der Extrakt wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Stärkeextraktion wurde das Pellet zunächst zweimal mit je 800 µl 80 % Ethanol gewaschen und 15-20 min bei 60-70 °C getrocknet. Das Pellet wurde dann mit 800 µl 0,2 M KOH homogenisiert und für 1 h bei 95 °C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation wurde der Überstand mit 140 µl 1 N Essigsäure neutralisiert. Von diesem Extrakt wurden 50 µl zu 100 µl Amyloglucosidase (2 mg/ml, gelöst in 50 mM Na-acetatpuffer, pH 5,0) gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde der Gehalt der freigesetzten Glucose bestimmt.

2.4.3.2 Photometrische Bestimmung der Kohlenhydrate

Die Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose wurden photometrisch in einem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Dabei wurde die Extinktion vor dem Reaktionsstart als Blindwert von der Extinktion nach Reaktionsablauf abgezogen. Zu 800 µl 0,1 M Imidazolpuffer (pH 6,9) mit 5 mM MgCl₂, 0,8 mM ATP, 2,3 mM NAD und 1 U Glucose-6-P-Dehydrogenase wurden 10 µl (Zuckerbestimmung) bzw. 20 µl (Stärkebestimmung) Extrakt gegeben. Die Reaktion zur Bestimmung der Glucose wurde durch Zugabe von 0,5 U Hexo-

kinase gestartet. Nach dem Reaktionsstillstand wurde die Reaktion zur Fructosebestimmung durch Zugabe von 0,2 U Phosphoglucose-Isomerase gestartet und nach erneutem Reaktionsstillstand die Reaktion zur Saccharosebestimmung durch 60 U Invertase (Mustroph, 2005).

2.4.3.3 Luminometrische Bestimmung der Adenylatgehalte

Die Adenylatgehalte wurden nach Mustroph (2005) mit Hilfe des Luciferase-Systems luminometrisch bestimmt (Luminometer Lumat LB 9501, Fa. Berthold, Bad Wildbad). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass Luciferase mit Hilfe von ATP das Substrat Luciferin zum Lumineszieren bringt, wobei die Stärke der Lumineszenz direkt proportional zur ATP-Konzentration ist. Zur Konzentrationsbestimmung von ADP wurde dieses zu ATP umgewandelt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte 10 s nach dem Start der Reaktion über eine Dauer von 5 s. Der Messpuffer für ATP beinhaltete 25 mM HEPES-KOH (pH 7,8) mit 5 mM Mg-acetat, 0,15 mM EDTA, 12,6 μ M DTT, 0,075 % BSA, 0,28 mM Luciferin und 5 μ U Luciferase (Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim). Die Umwandlung von ADP in ATP erfolgte für 10 min in 6,25 mM HEPES-KOH (pH 7,8) mit 2 mM Mg-acetat, 0,3 mM PEP und 1 U Pyruvat-Kinase. Die Bestimmung der Adenylatgehalte der Proben, die 1:10 verdünnt eingesetzt wurden, erfolgte anhand einer ATP-Standardkurve.

2.4.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.4.4.1 Extraktion der Invertasen

Für die Bestimmung der Aktivitäten der vakuolären, cytosolischen und Zellwandgebundenen Invertase-Isoformen (EC 3.2.1.26) wurde die Extraktion modifiziert nach Roitsch *et al.* (1995) durchgeführt. Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert, mit 1 ml 50 mM HEPES-KOH (pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 2 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 1 mM Benzamidin homogenisiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Homogenat wurde 30 min bei 4 °C geschüttelt, anschließend 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der die vakuolären und cytosolischen Invertasen enthielt, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet, das die Zellwand-Invertase enthielt, wurde dreimal mit eisgekühltem Wasser gewaschen und in 750 μ l Homogenisierungspuffer (siehe oben) homogenisiert. Beide Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.4.2 Extraktion der glykolytischen Enzyme

Für die Bestimmung der Aktivitäten von Phosphofruktokinase (PFK; EC 2.7.1.11), Pyrophosphat-Fruktose-6-P-Phosphotransferase (PFK; EC 2.7.1.90), Aldolase (EC 4.1.2.13) und Enolase (EC 4.2.1.11) erfolgte die Extraktion modifiziert nach Biemelt *et al.* (1999). Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert, mit 1 ml 50 mM HEPES-KOH (pH 6,8) mit 5 mM Mg-acetat, 5 mM Mercaptoethanol, 15 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA und 0,1 mM Pefabloc Proteaseinhibitor homogenisiert und in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Probe wurde 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.4.3 Photometrische Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Invertaseaktivitäten wurden mit der Methode von Sung *et al.* (1989) analysiert. Hierbei wurde nach einer definierten Reaktionszeit die Konzentration des Reaktionsproduktes bestimmt und daraus die Enzymaktivität ermittelt. Die Invertasereaktionen erfolgten in Kaliumphosphat/Citrat-Puffer, pH 4,5 (70 mM K₂HPO₄/ 40 mM Citronensäure) für vakuoläre und Zellwand-Invertase bzw. pH 6,8 (160 mM K₂HPO₄/ 20 mM Citronensäure) für cytosolische Invertase, mit 125 mM Saccharose als Substrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl Extrakt zum Reaktionsgemisch aus 510 µl Kaliumphosphat/Citrat-Puffer und 30 µl 2,5 M Saccharose gestartet und nach exakt 60 min Inkubation bei 26 °C durch Hitzeinaktivierung für 5 min bei 95 °C gestoppt. Anschließend wurde der Gehalt der in dieser Reaktion freigesetzten Glucose mit der in 2.4.3.2 beschriebenen Methode photometrisch gemessen (GENESYS 10 uv scanning, Fa. Thermo Scientific, Waltham, USA).

Die Aktivitäten von PFK und PFP wurden modifiziert nach Hatzfeld *et al.* (1990) gemessen. Für die Bestimmung der PFK-Aktivität wurden 40 µl Extrakt zu 800 µl 0,1 M HEPES-KOH (pH 7,9) mit 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM NADH, 12 mM Fru6P, 1 U Aldolase, 1 U Triosephosphat-Isomerase (TPI) und 1 U Glycerin-3-P-Dehydrogenase (GDH) gegeben und die Reaktion mit 10 µl 0,25 M ATP gestartet. Die Aktivität der PFP wurde mit 40 µl Extrakt in 800 µl 0,1 M HEPES-KOH (pH 7,9) mit 3,3 mM Mg-acetat, 0,2 mM NADH, 12 mM Fru6P, 1 µM Fru2,6BP, 1 U Aldolase, 1 U TPI und 1 U GDH bestimmt und die Reaktion mit 10 µl 0,1 M NaPP_i gestartet.

Die Aktivitätsbestimmung von Aldolase und Enolase erfolgte modifiziert nach Mustroph (2005). Für die Messung der Aldolase-Aktivität wurden 25 µl Extrakt zu 810 µl

50 mM Tris-HCl (pH 7,2) mit 1 mM EDTA, 0,25 mM NADH, 1 U TPI und 1 U GDH gegeben und die Reaktion mit 10 µl 0,16 M Fru1,6BP gestartet. Für die Bestimmung der Aktivität der Enolase wurden 30 µl Extrakt in ein Reaktionsgemisch aus 830 µl 50 mM MOPS-NaOH (pH 7,0) mit 50 mM KCl und 10 mM MgSO₄ und 40 µl einer Lösung mit 4,8 mM NADH, 35 mM ADP, 3 U Lactat-Dehydrogenase und 2 U Pyruvat-Kinase gegeben und die Reaktion mit 33 µl 30 mM Glycerat-2-P gestartet.

Die Proteingehalte der Extrakte wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurden 10 µl Extrakt mit 990 µl 1:5 verdünntes Bradford-Reagenz (Fa. Bio-Rad, München) versetzt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt.

2.4.5 Stärkefärbung

Die Keimlinge wurden 15 min in 70 % Ethanol bei 80 °C inkubiert, 10 min in Lugolscher Lösung gefärbt und anschließend 15 min mit Wasser gewaschen.

2.5 Internetdatenbanken

Für Sequenzanalysen wurde die Datenbank des *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder der *Arabidopsis Information Resource* (TAIR; <http://www.arabidopsis.org>; Swarbreck *et al.*, 2007) verwendet. Für *in silico* Expressionsanalysen anhand von Microarray-Daten wurden der *Arabidopsis electronic Fluorescent Pictograph (eFP) Browser* (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter *et al.*, 2007) und *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann *et al.*, 2004) verwendet.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse wurden Plasmide oder Nukleinsäurefragmente elektrophoretisch in einem Agarosegel unter Verwendung einer horizontalen Elektrophoreseapparatur aufgetrennt. Dazu wurde ein 1 %iges Agarosegel mit 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-acetat; 1 mM EDTA)

verwendet, das zur Detektion der Nukleinsäuren mit UV-Licht mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde, und 1x TAE als Laufpuffer. Die Proben wurden vor dem Beladen des Agarosegels mit 1/10 des Volumens 10x TAE-Ladepuffer (10x TAE mit 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol) gemischt. Die Laufzeit betrug je nach Fragmentgröße 40-80 min und die angelegte Spannung 75-85 V. Zur Bestimmung der Größen und Abschätzung der Konzentration der DNA-Fragmente wurde gleichzeitig der DNA-Größenstandard „HyperLadderI“ (Fa. Bioline, Luckenwalde) aufgetrennt. Die Detektion mittels UV-Licht und die Dokumentation der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgten mit dem Gene Genius Bio Imaging System der Firma Syngene (Cambridge, UK).

2.6.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte photometrisch mit dem DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer der Firma Beckman (Krefeld) oder dem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 der Firma Peqlab (Erlangen). Dabei wurde die Extinktion (Absorption) bei 260 nm gemessen und für die Überprüfung der Reinheit zusätzlich bei 280 nm. Der Quotient der Werte $E_{260/280}$ sollte größer als 1,8 sein. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen hin. Eine weitere Möglichkeit war die Abschätzung der DNA-Konzentration anhand der Bandenstärke im Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung durch den Vergleich mit dem DNA-Marker „HyperLadderI“ (Fa. Bioline, Luckenwalde).

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR (Mullis und Faloona, 1987) zur Amplifizierung der Klonierungsfragmente wurde die BIO-X-ACT-Short Polymerase (Fa. Bioline, Luckenwalde) verwendet, die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*-Aktivität) besitzt. Für die PCR zu analytischen Zwecken wurde die *Taq*-Polymerase eingesetzt, die nicht über *proofreading*-Aktivität verfügt. Die Oligonukleotide (Primer) wurden mit dem PC-Programm Primer Designer 2.0 (Scientific and Educational Software) entworfen und von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 13). Standardreaktionsansätze sowie die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt. Die PCR-

Amplifizierung erfolgte mit den Thermocyclern T1 oder T Gradient der Firma Biometra (Göttingen). Die Qualität der PCR-Produkte wurde mittels Agarosegel überprüft.

Tabelle 3: PCR-Reaktionsansätze.

	BIO-X-ACT-Short	Taq
Reaktionspuffer (10x)	5 µl	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl	0,8 µl
dNTPs (20 mM)	5 µl	0,8 µl
5'-Primer (15 µM)	3,3 µl	1 µl
3'-Primer (15 µM)	3,3 µl	1 µl
H ₂ O bidest.	27,9 µl	11,4 µl
DNA	2 µl	2 µl
Polymerase	1 µl	1 µl

Tabelle 4: PCR-Programme.

	BIO-X-ACT-Short	Taq
1. Initiale Denaturierung	95 °C 5 min	95 °C 5 min
2. Denaturierung	95 °C 30 s	95 °C 30 s
3. Primer Annealing	60 °C 1 min	58 °C 45 s
4. Extension	68 °C 1 min / kb	72 °C 1 min / kb
5. Wiederholung der Schritte 2 bis 4	29x	24-34x
6. Finale Extension	68 °C 10 min	72 °C 10 min
7. Reaktionsende	16 °C ∞	16 °C ∞

2.6.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und Agrobakterien

Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse (basierend auf der Anleitung in „QIAGEN Plasmid Purification Handbook“ von Qiagen, Hilden) und anschließender Alkoholfällung. Dazu wurden für eine Minipreparation 3 ml LB-Selektionsmedium mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. Es wurden 2 ml der ÜN-Kultur für 1 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl gekühltem Lysepuffer (200 mM NaOH; 1 % SDS) wurde der Ansatz durch sechsmaliges Invertieren vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl eisgekühlter Neutralisationspuffer (3 M K-acetat, pH 5,5) zugegeben, durch sechsmaliges

Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 5-10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 600 µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und durch Zentrifugation für 10-15 min bei 16000 x g und 4 °C sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, 10 min abzentrifugiert und nach Trocknung bei 37 °C in 50 µl H₂O bidest. gelöst. Alternativ erfolgte die Minipräparation mit dem „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ der Firma Peqlab (Erlangen). Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen wurde eine Midipräparation mit dem „QIAGEN Plasmid Midi Prep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) unter Verwendung des QIAGEN-tip 100 durchgeführt.

Plasmidpräparation aus Agrobakterien

Die Agrobakterien wurden in 10 ml LB-Selektionsmedium gezogen. Die Kultur wurde in einem Falconröhrchen 10 min bei 4600 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml 150 mM NaCl in 10x TE-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde 1 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es wurde weiter wie oben beschrieben verfahren, mit folgenden Modifikationen: Nach der Inkubation mit dem Resuspensionspuffer wurde der Ansatz mit 20 µl Lysozym (20 mg/ml) versetzt, 1 s gevortext und 15 min bei 37 °C inkubiert. Vor der Alkoholfällung der DNA erfolgte ein Aufreinigungsschritt mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Nach fünfminütiger Zentrifugation bei RT wurde die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Fällung mit 300 µl Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das DNA-Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde die DNA bei 37 °C getrocknet und in 20 µl H₂O bidest. gelöst.

Im Anschluss an die Plasmidpräparation erfolgte ein Testverdau, um die Qualität der Plasmid-DNA zu überprüfen. Dazu wurden 7 µl der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNA in einem 10 µl Ansatz bzw. 15 µl der aus Agrobakterien isolierten Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (2.6.7) und zur Analyse elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt, zusammen mit der unverdauten Plasmid-DNA als Kontrolle.

2.6.5 Präparation von BAC-DNA aus *E. coli*

Es wurden 5 ml LB-Selektionsmedium mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. Die gesamte ÜN-Kultur wurde schrittweise in einem 2 ml-Eppendorfgefäß abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris, pH 8,0; 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 400 µl Lysepuffer (siehe 2.6.4) zugegeben, durch Invertieren vorsichtig gemischt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (siehe 2.6.4) wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt und für 15 min bei -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min. Vom Überstand wurden 750 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 450 µl Isopropanol versetzt und erneut für 15 min bei -80 °C eingefroren. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation für 5 min sedimentiert, nach Entfernung des Überstandes mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 40 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) über Nacht bei 4 °C gelöst.

2.6.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde am Institut der Humboldt-Universität zu Berlin von Dr. Martin Meixner oder von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Anhang (Tabelle 14) aufgelistet. Die Sequenzen wurden unter Verwendung des PC-Programmes BioEdit 7.0.4.1 (Hall, 1999) mit der entsprechenden Referenzsequenz verglichen.

2.6.7 DNA-Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau der DNA wurden Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffer der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Zu Analysezwecken wurde standardmäßig ein 10 µl Reaktionsansatz mit 10 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die Reaktionspuffer und die Inkubationstemperaturen wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen gewählt. In der Regel erfolgte die Inkubation 1 h bei 37 °C. Bei Verwendung von zwei Restriktionsenzymen erfolgte ein gleichzeitiger Verdau, wobei Pufferbedingungen gewählt wurden, bei denen beide Enzyme eine Aktivität von 50-100 % aufwiesen. War dies nicht möglich, wurden die Verdaue nacheinander durchgeführt mit einer eingeschobenen

Alkoholfällung (2.6.8.1). Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

Um eine DNA-Sequenz bezüglich der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme zu untersuchen, wurde das PC-Programm Clone Manager 4.0 (Scientific and Educational Software) oder das Internetprogramm Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>) verwendet.

2.6.8 Methoden zur DNA-Aufreinigung

2.6.8.1 Alkoholfällung

Die Alkoholfällung diente neben der Reinigung auch der Umpufferung oder Aufkonzentrierung der DNA. Die Probe wurde mit 1/10 Volumen 3 M NH₄-acetat und 2,5-fachem Volumen Ethanol oder 0,8-fachem Volumen Isopropanol versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und die DNA mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde wieder der Überstand entfernt, die DNA bei 37 °C getrocknet und in H₂O bidest. gelöst.

2.6.8.2 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese wurde zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden verwendet, die zuvor mit Restriktionsendonukleasen verdaut wurden und als Klonierungsfragmente verwendet werden sollten. Mit dieser Methode konnten die gewünschten Fragmente durch elektrophoretische Auftrennung aus dem Fragmentgemisch im Restriktionsansatz isoliert werden. Für den Restriktionsverdau wurden 10-15 µg DNA eingesetzt. Erfolgte der Verdau mit zwei Enzymen gleichzeitig, wurde die DNA zunächst 1 h in einem 40 µl Ansatz inkubiert. Anschließend wurden erneut Enzyme zugegeben, mit H₂O bidest. auf 60 µl aufgefüllt und wieder 1 h inkubiert. Erfolgte der Verdau nacheinander, so wurde in einem 60 µl Ansatz mit dem ersten Enzym 1,5 h verdaut und anschließend eine Alkoholfällung (2.6.8.1) durchgeführt. Die DNA wurde in H₂O gelöst und mit dem zweiten Enzym in einem 60 µl Ansatz 1,5 h inkubiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der gesamten Probe in einem Agarosegel mit 0,15 µg/ml Ethidiumbromid, wurde die gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Tisch (Fa. Bachofer, Reutlingen) mit dem Skalpell ausgeschnitten

und die DNA mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aus dem Agarosegel extrahiert.

2.6.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Selbstligation der durch Restriktion linearisierten Vektoren zu verhindern, wurden diese direkt nach dem Restriktionsverdau mit einer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde der 60 µl Restriktionsansatz mit 1 U CIAP (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und 6 µl CIAP-Verdünnungspuffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) für 15 min bei 37 °C inkubiert und die Phosphatase 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.6.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 und mit einer Gesamtmenge von etwa 100 ng eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C in einem 20 µl Ansatz mit 10 U T4-Ligase (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer (Fa. MBI Fermentas, St. Leon Rot). Im Anschluss folgte eine Inaktivierung für 10 min bei 65 °C. Der Ligationsansatz wurde mit Hilfe einer semipermeablen Dialysemembran (Nitrocellulosemembran, Fa. Millipore, Schwalbach) dialysiert, um Ionen zu entfernen, und direkt für die Transformation von *E. coli* (2.7.2) verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.11 Extraktion von Gesamt-RNA aus Arabidopsis

Das Pflanzenmaterial (100-200 mg) wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur Verarbeitung aller Proben in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dabei war darauf zu achten, dass das Material zwischenzeitlich nicht auftaute. Die Extraktion der RNA erfolgte mit der TRIzol-Methode. Das dafür verwendete TRIzol-Reagenz (38 % Phenol; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0; 5 % Glycerin) wurde entsprechend der GIBCO TRIzol Anleitung der Firma Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt. Die Probe wurde mit 1 ml TRIzol-Reagenz durch vortexen homogenisiert und nach fünfminütiger Inkubation bei RT 5 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml

Eppendorfgesäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) kurz gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 16000 x g und 4 °C. Es wurden 700 µl der oberen Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt und zur Fällung der RNA mit jeweils 350 µl Isopropanol und Hochsalzlösung (1,2 M NaCl; 0,8 M Na-citrat) durch Invertieren gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das RNA-Pellet zweimal mit 900 µl 70 % Ethanol gewaschen, wobei jeweils 5 min bei 7500 x g und 4 °C abzentrifugiert wurde. Nach der Entfernung des Überstandes wurde die RNA bei 50 °C getrocknet und in 30-40 µl H₂O bidest. gelöst. Die Qualität der isolierten RNA wurde mit einem Agarosegel überprüft. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Messung der Extinktionen bei 280 nm und 230 nm ermöglichte die Überprüfung der Reinheit des RNA-Extraktes. Der Quotient $E_{260/280}$ sollte größer als 1,8 sein und der Quotient $E_{260/230}$ bei 2,0 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen bzw. organische Verbindungen wie Phenolate oder Thiocyanate hin.

2.6.12 Northern Blot-Analyse

Bei der Northern Blot-Analyse wurde die Gesamt-RNA in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Durch die Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden an die mRNA konnte die Expression des entsprechenden Gens detektiert werden. Für den Northern-Blot wurden zunächst die RNA-Proben (10 µl mit 15 µg) und der RNA-Größenstandard „RNA Ladder High Range“ (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot; 4 µl) 1:1 mit RNA Loading Dye (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) versetzt, 10 min bei 65 °C denaturiert und bis zur Gelbeladung auf Eis gestellt. Nach einem Vorlauf von 10 min bei 20 V wurde ein 1,5 %iges denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel, bestehend aus 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,0; 2 mM Na-acetat; 1 mM EDTA) und 6,2 % Formaldehyd, mit den vorbereiteten Proben und dem RNA-Größenstandard beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte 3 h bei 80 V mit 1x MOPS als Laufpuffer. Anschließend wurde die RNA über Nacht durch einen Kapillarblot mit 10x SSC (1,5 M NaCl; 150 mM Na-citrat; pH 7,4) auf eine Nylonmembran (Hybond-NX, Fa. GE Healthcare, München) übertragen. Mit UV-Licht wurde die RNA auf der Membran fixiert (UV Stratalinker 2400, Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Zur Visualisierung der RNA-Banden des Größenstandards wurde der entsprechende Teil der Membran abgeschnitten und 20 min in einer

Färbelösung aus 0,1 % Toluidinblau und 20 % Ethanol gefärbt und kurz in 70 % Ethanol entfärbt. Der andere Teil der Membran wurde für die Hybridisierung verwendet.

Für die Herstellung der radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde das „Prime-It II Random Primer Labeling Kit“ der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet. Dabei wurden 25 ng DNA mit 10 µl Random Oligonukleotid Primer in einem 34 µl Ansatz 10 min bei 95 °C denaturiert, 1 min auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 µl 5x dCTP-Reaktionspuffer (mit dATP, dGTP, dTTP), 5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 µCi/µl) und 1 µl Exo(-) Klenow Polymerase (5 U/µl) wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Sonde wurde anschließend über eine Sephadex G-50 Säule (Nick Columns, Fa. GE Healthcare, München) durch Ausschlusschromatographie gereinigt, wobei die Säulenmatrix zunächst mit H₂O bidest. gewaschen, dann die Sonde und anschließend 400 µl H₂O bidest. aufgetragen wurden. Der Durchfluss nach Zugabe von weiteren 400 µl H₂O bidest. enthielt die Sonde und wurde in einem neuen Eppendorfgeläß aufgefangen. Zuletzt wurde die DNA-Sonde 10 min bei 95 °C denaturiert.

Die Membran mit den RNA-Proben wurde zunächst vorhybridisiert, um eine unspezifische Bindung der markierten DNA-Sonden zu verhindern. Dazu wurde die Membran 30 min im Hybridisierungssofen (Fa. Bachofer, Reutlingen) bei 65 °C in 15-20 ml Hybridisierungslösung (0,25 mM Na-phosphatpuffer, pH 7,2; 1 mM EDTA; 1 % (w/v) BSA; 7 % (w/v) SDS) inkubiert, die pro ml 10 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) enthielt, die zuvor 10 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt wurde. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend ausgetauscht und die denaturierte DNA-Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen, wurde die Membran zweimal mit 2x SSC / 0,1 % SDS und einmal mit 0,2x SSC / 0,1 % SDS gewaschen (15 bzw. 30 min bei 65 °C). Die radioaktiv markierten DNA-Banden wurden autoradiographisch durch Exposition der Membran mit einem Röntgenfilm (Kodak BioMax MR, Fa. GE Healthcare, München) bei -70 °C detektiert. Die Membran wurde nach dem Entfernen der DNA-Sonde durch Waschen mit 0,1 % SDS (10-20 min bei 68 °C) für eine weitere Hybridisierung verwendet.

Die Quantifizierung der Bandenintensität auf dem entwickelten Röntgenfilm wurde mit dem PC-Programm TINA Version 2.09g (Fa. Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) durchgeführt.

2.6.13 Semiquantitative RT-PCR

Mit der semiquantitativen RT-PCR wurde die mRNA eines bestimmten Gens mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die anschließend durch eine HotStarTaq-Polymerase in einer PCR amplifiziert wurde. Je mehr mRNA des Gens in der Gesamt-RNA-Probe vorhanden war, desto mehr PCR-Produkt wurde während einer bestimmten PCR-Zyklenzahl gebildet. Der Vergleich der Menge der PCR-Produkte ließ auf die Menge der mRNA und somit auf die Expressionsstärke im untersuchten Gewebe schließen. Vor der RT-PCR wurde die RNA mit DNase I (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt, um vorhandene DNA abzubauen. Dazu wurden in einem 10 µl Ansatz 5 µg RNA mit 1 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl DNase I (1 U/µl) 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde zur Inaktivierung der DNase I 1 µl EDTA zugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Endkonzentration der RNA in dem Ansatz betrug 0,45 µg/µl.

Die RT-PCR wurde mit dem „QIAGEN OneStep RT-PCR Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. In einem 25 µl Ansatz wurden 0,5 µg der mit DNase I behandelten RNA eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das verwendete RT-PCR-Programm sind in Tabelle 5 und 6 angegeben. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 15).

Tabelle 5: RT-PCR-Reaktionsansatz.

Für die RT-PCR-Reaktion wurde das „QIAGEN OneStep RT-PCR Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet.

Komponente	Menge
Reaktionspuffer (5x)	5 µl
dNTP-Mix	1 µl
5'-Primer (15 µM)	1 µl
3'-Primer (15 µM)	1 µl
H ₂ O bidest.	14,89 µl
DNA (0,45 µg/µl)	1,11 µl
Enzymmix	1 µl

Tabelle 6: RT-PCR-Programm.

	Reaktionsbedingung	
1. Reverse Transkription	50 °C	30 min
2. Initiale PCR-Aktivierung	95 °C	15 min
3. Denaturierung	94 °C	30 s
4. Primer Annealing	55 °C	30 s
5. Extension	72 °C	1 min
6. Wiederholung der Schritte 3 bis 5	23-45x	
7. Finale Extension	72 °C	10 min
8. Reaktionsende	16 °C	∞

2.6.14 Klonierungsstrategien

Im Folgenden wird die Herstellung der Promotor-Gen-Konstrukte durch klassische Klonierung mit Endonukleasen beschrieben. Die Vektorkarten sowie verwendete Primer sind im Anhang (Abschnitt 10.3 bzw. Tabelle 13) aufgeführt.

Klonierung von *ANT:CIN1* und *LFY:CIN1*

Das *CIN1*-Gen wurde mittels PCR amplifiziert. Als *template*-DNA diente das Plasmid pMB3, ein Derivat des pUC19-Plasmids mit der *full length* cDNA der Zellwand-Invertase *CIN1* von *Chenopodium rubrum* L. (Roitsch *et al.*, 1995). Es wurden Primer mit zusätzlichen *multiple cloning sites* verwendet, um Restriktionsstellen an den Enden des PCR-Produktes einzufügen. Durch Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit *ClaI* und *SacI* wurde ein Fragment erhalten, das in den binären Pflanzenvektor pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986) ligiert wurde, aus dem zuvor durch Restriktion mit *ClaI* und *SacI* der *35S*-Promotor entfernt wurde. Das *CIN1*-Gen wurde zur Kontrolle sequenziert. Durch Restriktionsverdau des Vektors pANT:CKX3-GFP mit *BlnI* und *Acc65I* wurde ein Fragment mit der *ANT*-Promotorregion (4,2 kb stromaufwärts vom *ANT*-Startcodon) herausgeschnitten, das in die *BlnI/Acc65I* Schnittstellen des pROK2-*CIN1*-Plasmids vor das *CIN1*-Gen ligiert wurde. Entsprechend wurde der Vektor pLFY:CKX3-GFP mit *BlnI* und *Cfr9I* verdaut, um ein Fragment mit der *LFY*-Promotorregion (2,3 kb stromaufwärts vom *LFY*-Startcodon) zu erhalten, das in die *BlnI/Cfr9I*-Schnittstellen des pROK2-*CIN1*-Plasmids ligiert wurde.

Klonierung von *ANT:CycD3* und *LFY:CycD3*

Das *CycD3*-Gen wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Als *template* diente genomische DNA von *Arabidopsis thaliana* im BAC-Klon F28A23 (Mozo *et al.*, 1998). Es wurden Primer mit jeweils einer Erkennungssequenz für *Bsp1407I* bzw. *Cfr9I* und *SalI* verwendet und zwei verschiedene PCR-Produkte erhalten (*Bsp1407I/SalI*- und *Cfr9I/SalI*-*CycD3*-Fragmente). Die PCR-Produkte wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut. Aus den fertigen Konstrukten der oben beschriebenen Klonierungen wurde das *CIN1*-Gen herausgeschnitten und durch das *CycD3*-Gen ersetzt. Das heißt, für die *ANT:CycD3*-Klonierung wurde das Plasmid pROK2-ANT-CIN1 mit *Acc65I* und *SalI* verdaut und das *Bsp1407I/SalI*-*CycD3*-Fragment in das Plasmid ligiert. Dies war möglich, da *Bsp1407I* und *Acc65I* kompatible Enden produzieren. Für die *LFY:CycD3*-Klonierung wurde das *Cfr9I/SalI*-*CycD3*-Fragment in die *Cfr9I/SalI*-Schnittstellen des Plasmids pROK2-LFY-CIN1 ligiert. Das *CycD3*-Gen wurde ebenfalls zur Kontrolle sequenziert.

Klonierung von *STM:CKX3-GFP*, *CLV3:CKX3-GFP*, *WUS:CKX3-GFP*, *ANT:CKX3-GFP* und *LFY:CKX3-GFP*

Aus dem Plasmid pBinSMGFP (Werner *et al.*, 2003) wurde mit *EcoRI* und *KpnI* herausgeschnitten und durch ein synthetisches doppelsträngiges Oligonukleotid mit der *multiple cloning site* *EcoRI*-*AvrII*-*SmaI*-*KpnI* ersetzt (5'-CGGAATTCCTAGGCTTCTGCCGGGCTTCTGGGTACCCC-3'). Ein *AtCKX3*-Fragment wurde über die *KpnI*/*XhoI*-Restriktionsstellen des Plasmids pBS-*AtCKX3* (Werner *et al.*, 2001) subkloniert, so dass eine N-terminale Fusion mit GFP erzeugt wurde. Anschließend wurden folgende Promotoren amplifiziert und in diesen Vektor *upstream* vom *CKX3-GFP*-Fusionsgen kloniert:

LFY-Promotor: Ein 2,3 kb Promotorfragment wurde vom Plasmid pDW132 (pLFY:GUS; *L. erecta*-DNA als *template*) (Blázquez *et al.*, 1997) amplifiziert und nach Verdau mit *AvrII* und *SmaI* kloniert, wodurch der Vektor pLFY:CKX3-GFP erzeugt wurde.

ANT-Promotor: Ein 4,2 kb Promotorfragment (Grandjean *et al.*, 2004) wurde vom Plasmid MD65 (*L. erecta*-DNA als *template*) (Schoof *et al.*, 2000) amplifiziert und nach Verdau mit *AvrII* und *KpnI* kloniert, wodurch der Vektor pANT:CKX3-GFP erzeugt wurde.

STM-Promotor: Ein 5,5 kb Promotorfragment (Kirch *et al.*, 2003) wurde vom BAC-Klon F2401 (Col-0 DNA als *template*) amplifiziert und nach Verdau mit *AvrII* und *Bsp1407I* in die *AvrII/KpnI*-Schnittstellen des Vektors kloniert, wodurch der Vektor pSTM:CKX3-GFP erzeugt wurde.

WUS-Promotor: Ein 1,7 kb Promotorfragment wurde vom Plasmid MT61 (*L. erecta*-DNA als *template*) (Mayer *et al.*, 1998) amplifiziert und nach Verdau mit *AvrII* und *KpnI* kloniert, wodurch der Vektor pWUS:CKX3-GFP erzeugt wurde.

CLV3-Promotor: Ein 1,8 kb Promotorfragment (Brand *et al.*, 2002) wurde vom Plasmid ML196 (Groß-Hardt *et al.*, 2002) amplifiziert und mit *AvrII* und *SmaI* verdaut. Zusätzlich wurde ein 1,27 kb Fragment der 3'UTR-Region (Brand *et al.*, 2002) vom Plasmid ML196 amplifiziert und mit *SacI* und *SalI* verdaut. Das *AvrII/SmaI*-Fragment wurde *upstream* und das *SacI/SalI*-Fragment *downstream* vom *CKX3-GFP*-Fusionsprotein kloniert, wodurch der Vektor pCLV3:CKX3-GFP erzeugt wurde.

Die Plasmide wurden in *E. coli*-Zellen eingebracht, durch diese vervielfacht und aus den Zellen isoliert. Anschließend wurden die isolierten Plasmide in *A. tumefaciens* eingebracht, mit deren Hilfe Arabidopsispflanzen transformiert wurden. Die genauen Vorgehensweisen sind in Abschnitt 2.7 beschrieben.

2.7 Transformationsmethoden

2.7.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer frischen ÜN-Kultur angeimpft. Die Zellen wurden unter Schütteln (200 rpm) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 angezogen und nach Aufteilung auf zwei Zentrifugenbecher 15 min bei 4000 x g und 4 °C (J2-21 Zentrifuge mit Rotor JA-10, Fa. Beckman, Krefeld) zentrifugiert. Der Überstände wurden entfernt und die Bakterienpellets in insgesamt 500 ml eiskaltem H₂O bidest. und nach erneuter Zentrifugation (15 min bei 4000 x g und 4 °C) in insgesamt 500 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit insgesamt 50 ml 10 % Glycerin wurden die Bakteriensuspensionen vereint, erneut zentrifugiert und in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots in Eppendorfgefäßen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.7.2 Transformation von *E. coli* und Agrobakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte mit Hilfe der Elektroporation. Es wurde ein Aliquot von 50 µl elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 1-2 µl dialysierter Vektor-DNA versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch aus Vektor-DNA und Zellen in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt, im Elektroporator (MicroPulser, Fa. Bio-Rad, München) bei 1,8 kV elektroporiert und anschließend sofort in 600 µl SOC-Nährmedium (2.3.3) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 2-3 h bei 28 °C (Agrobakterien) unter Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 2 Tage bei 28 °C (Agrobakterien) inkubiert. Zur Überprüfung der Klone wurden aus einzelnen Kolonien ÜN-Kulturen hergestellt, aus denen die Plasmid-DNA isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen wurde. Alternativ wurde das Transgen mittels PCR nachgewiesen, indem einzelne Kolonien mit einem Zahnstocher gepickt und direkt in den PCR-Reaktionsansatz gegeben wurden.

2.7.3 Transformation von *Arabidopsis*

Die Transformation von Arabidopsispflanzen mittels Agrobakterien erfolgte mit der *floral dip* Methode nach Clough und Bent (1998). Dazu wurden 250 ml LB-Medium, das entsprechende Antibiotika enthielt, mit der ÜN-Kultur eines Agrobakterienklons angeimpft und unter Schütteln 18-24 h bei 28 °C inkubiert. Die Kultur wurde 20 min bei 5500 x g und RT abzentrifugiert (J2-21 Zentrifuge mit Rotor JA-10, Fa. Beckman, Krefeld) und das Bakterienpellet mit Inokulationsmedium (5 % Saccharose; 0,05 % Silvet L77; 2,3 g/l MS; 0,01 mg/l BAP) bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,8 resuspendiert. Bei den Pflanzen wurden zuvor ältere Blüten und Schoten entfernt. Die Infloreszenzen wurden für etwa 5 s in die Bakterien-suspension getaucht und die Pflanzen, mit einer Plastikhaube abgedeckt, möglichst dunkel 15-20 h stehen gelassen. Die Prozedur wurde nach 6-7 Tagen wiederholt. Nach der Ernte der Samen wurden die Pflanzen auf Medium mit Antibiotikum angezogen, um transgene Pflanzen zu selektieren.

35S:*AtCKX1*-transgene Pflanzen wurden gegebenenfalls vor der Transformation mit einem chemischen CKX-Inhibitor (Zatloukal *et al.*, 2008) behandelt, um die Blütenproduktion zu erhöhen. Die etwa 10 Tage alten Pflanzen wurden alle 2-3 Tage mit der

Inhibitorlösung (10 μ M Inhibitor; 0,01% Silvet L77) besprüht. Etwa eine Woche vor der Transformation wurde die Behandlung eingestellt.

2.8 Analyse der Wachstumsparameter

2.8.1 Messung der Wurzelelongation

Für die Untersuchung des Wurzelwachstums wurden die Pflanzen auf vertikalen Platten mit Atn-Nährmedium (mit 1,1 % Agar) kultiviert. Am 4. und am 11. Tag nach Aussaat (TNA) wurden die Primärwurzelspitzen der Keimlinge markiert. Es wurden nur Wurzeln ausgewertet, die auf der Oberfläche des Mediums gewachsen sind. Die Wurzeln wurden fotografiert und die Längenzunahme der Primärwurzeln innerhalb des Zeitintervalls anhand der Bilder mit dem PC-Programm Scion Image Beta 4.0.2 (Fa. Scion Corporation, Frederick, USA) gemessen.

2.8.2 Bestimmung der Schotenzahl und Schotendichte

Die Zahl der Schoten am Hauptstängel wurde bestimmt, nachdem dieser die Blühphase eingestellt hatte. Zusätzlich wurde der Abstand zwischen erster Schote und Sprossapex gemessen, um daraus die mittlere Schotendichte, das heißt die Zahl der Schoten pro cm Stängel, zu bestimmen.

2.8.3 Kinematische Analyse der Blattepidermis

Für die kinematische Analyse von Zellgröße, Zellzahl und Stomataindex in Arabidopsisblättern wurde die abaxiale Epidermis des sechsten Rosettenblattes im Abstand von 3 Tagen untersucht. Die ersten Proben (am Tag 0) waren Blätter, die eine Länge von 2 mm erreicht hatten. Weitere Proben wurden 3, 6, 9, 12, 15 und 18 Tage nach dem Erreichen der 2 mm-Blattlänge genommen. Dazu wurde für jede Pflanze individuell der Zeitpunkt des Erreichens der 2 mm-Blattlänge, das heißt der Tag 0, bestimmt. Die Blätter wurden zur gleichen Tageszeit geerntet, in Ethanol/Essigsäure (6:1) fixiert und bei 4 °C aufbewahrt. Um das Gewebe für die Mikroskopie transparent zu machen, wurde es zunächst durch Schwenken in einer Ethanolreihe (85 %, 70 %, 50 %, 20 %) rehydriert und anschließend bis zu 2 Tage mit

Chloralhydrat/Glycerin/H₂O (8:1:2; w/v/v) geklärt. Die Blätter wurden unter dem Stereomikroskop fotografiert (OLYMPUS SZX12 und OLYMPUS CAMEDIA Digital Camera C4040Zoom, Fa. Olympus, Hamburg) und die Fläche der Blattspreiten anhand der Bilder mit dem PC-Programm Scion Image (siehe 2.8.1) gemessen. An drei verschiedenen Blattpositionen, und zwar jeweils mittig zwischen Mittelrippe und Blattrand nach einem Viertel, der Hälfte und einem Dreiviertel der Blattspreitenlänge vom Spreitengrund zur Spreitenspitze, wurde die abaxiale Epidermis mikroskopiert und fotografiert (Axioskop 2 plus, AxioCam ICc3, Fa. Zeiss, Jena). Anhand der Bilder wurden die Zahl und die durchschnittliche Fläche der Epidermiszellen sowie die Zahl der Stomata in dem aufgenommenen Epidermisausschnitt bestimmt und aus den Werten der drei Blattpositionen der Mittelwert gebildet. Der Stomataindex errechnete sich aus dem Anteil der Stomata an der Gesamtpopulation der epidermalen Zellen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Physiologische Charakterisierung von 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen

Die Reduktion des endogenen Cytokiningehaltes durch die konstitutive Expression eines *Arabidopsis thaliana* CKX-Gens in transgenen Tabakpflanzen führt zu einem komplexen Phänotyp, der als Cytokinindefizienzsyndrom bezeichnet wird. Charakteristisch für diesen Phänotyp sind insbesondere die Bildung langsam wachsender, kleinwüchsiger Sprosse mit kleinen Blättern und ein vergrößertes Wurzelsystem (Werner *et al.*, 2001). Die zellulären Mechanismen in wachsenden Geweben, die bei Cytokinindefizienz das Sprosswachstum hemmen und das Wurzelwachstum fördern, sind jedoch bisher nicht bekannt. Es wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob cytokinindefiziente Tabakpflanzen Veränderungen in verschiedenen *sink*- und *source*-Parametern aufweisen, was möglicherweise in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Ausbildung des Cytokinindefizienzsyndroms stehen könnte.

Für die Erstellung des physiologischen Phänotyps wurden verschiedene Parameter in *sink*- und *source*-Geweben des Sprosses und in Wurzeln von Wildtyppflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. SNN) sowie 35S:*AtCKX1*- und 35S:*AtCKX2*-transgenen Tabakpflanzen (im Folgenden als nur 35S:*CKX1*- und 35S:*CKX2*-transgen bezeichnet) bestimmt. Das untersuchte Spross-*sink*-Gewebe beinhaltete den Sprossapex inklusive der jüngsten Blätter. Als *source*-Gewebe wurden interkostale Bereiche voll entwickelter Blätter verwendet. Die analysierten Parameter waren Metabolitgehalte, ATP-/ADP-Gehalte sowie Aktivitäten verschiedener Invertase-Isoformen und einiger glykolytischer Enzyme.

3.1.1 Kohlenhydratgehalte in 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen

Die Kohlenhydratverteilung zwischen *sink*- und *source*-Geweben ist ein wichtiger Faktor für Wachstum und Entwicklung der Pflanze, an dem Cytokinine maßgeblich beteiligt sind (Roitsch und Ehneß, 2000). Es wurde daher analysiert, wie sich ein reduzierter endogener Cytokiningehalt auf den Gehalt verschiedener Kohlenhydrate (Glucose, Fructose,

Saccharose und Stärke) von *sink*- und *source*-Gewebe auswirkt. Die Messungen ergaben, dass in *source*-Blättern cytokinindefizienter Pflanzen die Gehalte an löslichen Zuckern kaum verändert waren. So waren die Gehalte an Glucose und Fructose in den transgenen Pflanzen nicht signifikant verändert, lediglich der Saccharosegehalt war in *35S:CKX1*-transgenen *source*-Blättern im Vergleich zum Wildtyp signifikant um etwa 40 % reduziert und in *35S:CKX2 source*-Blättern nur gering, jedoch nicht signifikant erniedrigt (Abbildung 2). Insgesamt waren die Gehalte an löslichen Zuckern (Glucose, Fructose und Saccharose) in *35S:CKX1 source*-Blättern um 31 % und in *35S:CKX2 source*-Blättern um 13 % reduziert. Die Stärkegehalte waren in den *source*-Blättern von *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen dagegen stärker verringert, um 61 % bzw. 45 % verglichen mit der Stärkeakkumulation in *source*-Blättern des Wildtyps (Abbildung 2).

Im Gegensatz zu den *source*-Blättern zeigten cytokinindefiziente Spross-*sink*-Gewebe starke signifikante Reduktionen der Zuckergehalte. Im Spross-*sink* von *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen war der Glucosegehalt auf 10 %, der Fructosegehalt auf 26 % und der Saccharosegehalt auf 33 % des Wildtypwertes reduziert und bei *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen betragen die Zuckergehalte 11 %, 33 % bzw. 42 % (Glucose, Fructose bzw. Saccharose) der Wildtypgehalte (Abbildung 2). Insgesamt waren die Gehalte aller analysierten löslichen Zucker in *35S:CKX1* Spross-*sink*-Gewebe auf 26 % und in *35S:CKX2* Spross-*sink*-Gewebe auf 33 % des Wildtypgehaltes reduziert. Die Stärkeakkumulation war hingegen im Vergleich zum Wildtyp in den transgenen Pflanzen erhöht. So wurde in *35S:CKX1*-Pflanzen eine signifikante Zunahme des Stärkegehaltes um 83 % des Wildtypwertes gemessen und in *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen eine, allerdings nicht signifikante, Erhöhung um 40 % (Abbildung 2).

Ähnlich wie im Spross-*sink*-Gewebe waren in cytokinindefizienten Wurzeln die Zuckergehalte stark verringert (Abbildung 2). Die Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose waren in *35S:CKX1*-Wurzeln auf 18-22 % des Wildtypgehaltes und in *35S:CKX2*-Wurzeln auf 22-28 % reduziert. Der Stärkegehalt war bereits in Wildtypwurzeln sehr gering und in cytokinindefizienten Wurzeln sogar noch weiter auf 41 % (*35S:CKX1*) bzw. 61 % (*35S:CKX2*) reduziert.

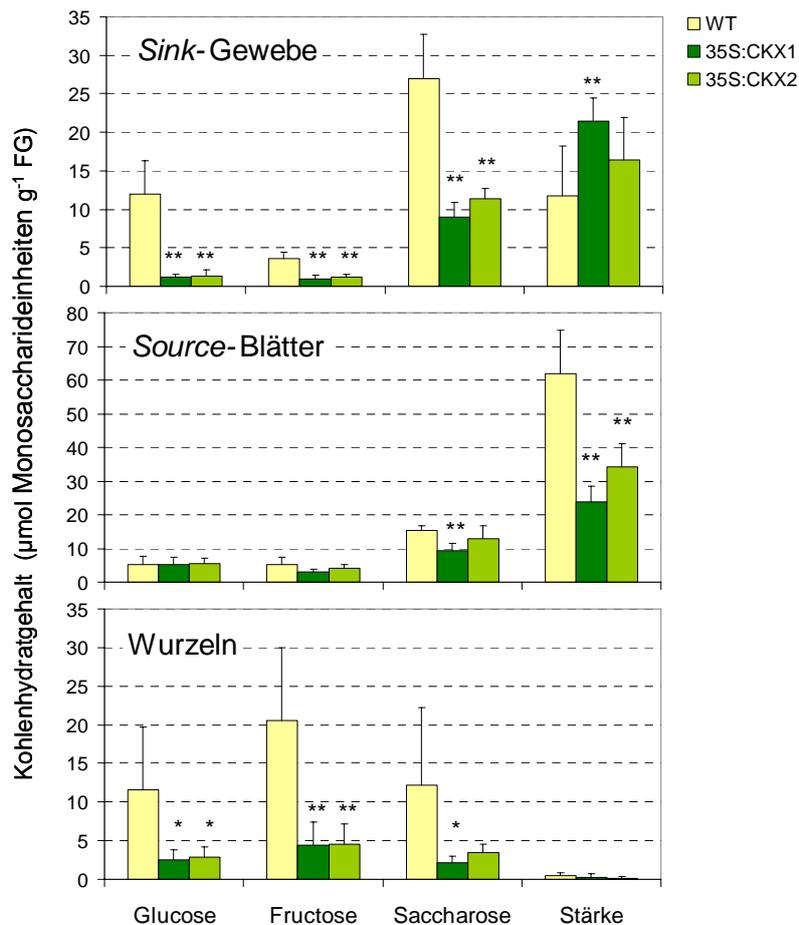


Abbildung 2: Kohlenhydratgehalte in *sink*- und *source*-Gewebe des Sprosses und in Wurzeln von Wildtyp und *35S:CKX*-transgenen Tabakpflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 6$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom entsprechenden Wert des Wildtyps. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Die Gewebeprobe für die Bestimmung der Metabolitgehalte wurden in der Mitte der Lichtperiode genommen. Die Ergebnisse repräsentieren somit nur die Assimilatgehalte der Gewebe zu einem bestimmten Tageszeitpunkt. Da diese jedoch stark von der Licht/Dunkel-Phase, das heißt von der Photosyntheseleistung und der Assimilatverwertung abhängen, wurde zusätzlich der Tagesgang des Stärkegehaltes in *source*-Blättern unter natürlichen Lichtbedingungen bestimmt. Die Zeit zwischen Sonnenaufgang und Sonnenuntergang betrug 15 Stunden. Die Messungen ergaben, dass in cytokinindefizienten *source*-Blättern die Stärkegehalte zu jeder Tageszeit geringer waren als die der Wildtypblätter (Abbildung 3). Die Stärkeakkumulation in *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen war auf 5-40 % und in *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen auf 8-45 % der Wildtypwerte reduziert. Die Veränderungen der Stärkegehalte im Tagesverlauf, also die diurnale Zu- und Abnahme der Stärkegehalte von transgenen und Wildtyppflanzen waren jedoch ähnlich.

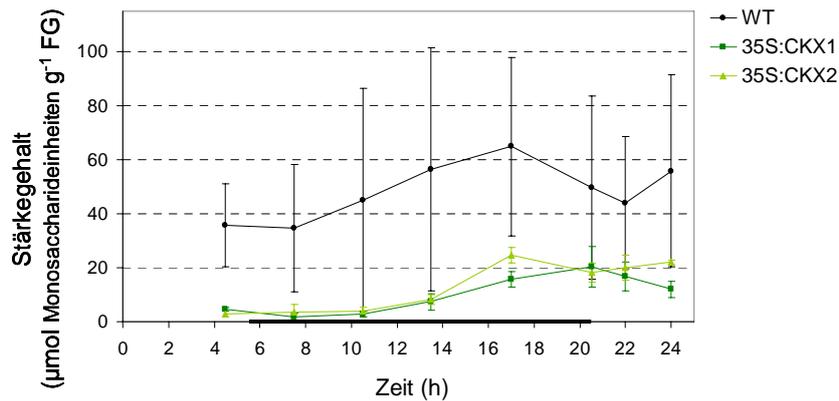


Abbildung 3: Der Stärkegehalt in *source*-Blättern von Wildtyp und 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen im Tagesverlauf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$). Die Zeitperiode zwischen Sonnenaufgang (5:30 Uhr) und Sonnenuntergang (20:30 Uhr) ist mit einem Balken auf der x-Achse gekennzeichnet.

3.1.2 ATP- und ADP-Gehalte in 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen

Die ATP-Gehalte in den Spross-*sink*-Gewebe der 35S:CKX1- und 35S:CKX2-transgenen Pflanzen waren gegenüber dem Wildtyp signifikant um etwa 60 % bzw. 38 % reduziert (Abbildung 4). Die ADP-Gehalte waren mit einer Reduktion um 18 % bzw. 13 % nur wenig verändert, was zu geringeren ATP/ADP-Verhältnissen in den transgenen *sink*-Gewebe führte. Bei 35S:CKX1-Pflanzen betrug diese Reduktion etwa 50 % des wildtypischen ATP/ADP-Verhältnisses. Ein hohes ATP/ADP-Verhältnis, wie es im *sink*-Gewebe des Wildtyps vorgefunden wurde, ist charakteristisch für metabolisch aktives Gewebe. Die Werte der transgenen *sink*-Gewebe weisen demnach möglicherweise auf einen gehemmten Metabolismus hin.

Im Gegensatz zu Spross-*sink*-Gewebe waren in transgenen *source*-Blättern die ATP- und ADP-Gehalte in ähnlichem Maße reduziert, so dass die ATP/ADP-Verhältnisse im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert waren (Abbildung 4). So waren die Adenylatgehalte in 35S:CKX1 *source*-Blättern um ~50 % und in 35S:CKX2 *source*-Blättern um 20-36 % des Wildtypgehaltes reduziert. In den transgenen Wurzeln wurden trotz stark reduzierter Zuckergehalte kaum Veränderungen der Gehalte von ATP und ADP vorgefunden (Abbildung 4). Die ATP-Gehalte waren im Vergleich zum Wildtyp nur gering erhöht und die ADP-Gehalte unverändert bzw. gering erniedrigt, wobei die jeweiligen Veränderungen jedoch nicht signifikant waren. Die ATP/ADP-Verhältnisse waren in cytokinidefizienten Wurzeln somit gering erhöht verglichen mit Wildtypwurzeln.

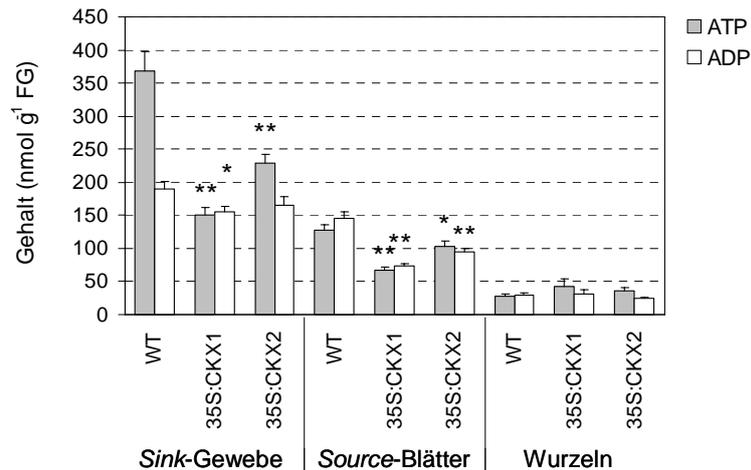


Abbildung 4: ATP- und ADP-Gehalte in *sink*- und *source*-Gewebe des Sprosses und in Wurzeln von Wildtyp und 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen ($n = 6-9$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom entsprechenden Wert des Wildtyps. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

3.1.3 Aktivitäten von Invertasen und glykolytischen Enzymen in 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen

Veränderte Kohlenhydratgehalte könnten auf veränderte Aktivitäten von Enzymen des Kohlenstoffmetabolismus zurückgeführt werden. So weisen der verringerte Hexosegehalt und die erhöhte Stärkeakkumulation in den transgenen *sink*-Gewebe des Sprosses auf eine gestörte metabolische Saccharoseverwertung hin, die möglicherweise aus veränderten Aktivitäten der Saccharose-spaltenden Invertasen resultieren könnte. Es wurden daher die Aktivitäten der vakuolären, cytosolischen und Zellwand-gebundenen Isoformen der Invertase bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten sowohl bei Wildtyppflanzen als auch bei den cytokinin-defizienten Pflanzen, dass in allen analysierten Geweben der hauptsächliche Teil der gesamten Invertaseaktivität von der vakuolären Invertase eingenommen wurde, insbesondere in *sink*- und *source*-Gewebe des Sprosses (Abbildung 5). In den transgenen Spross-*sink*-Gewebe waren die Enzymaktivitäten der vakuolären und der cytosolischen Invertasen um etwa 50-60 % der Aktivität im Wildtyp stark reduziert, während die Aktivität der Zellwand-Invertasen nicht signifikant verändert war. Im Gegensatz dazu zeigten in cytokinindefizienten *source*-Blättern die vakuolären und cytosolischen Invertasen keine oder nur geringe Veränderungen in ihrer Aktivität, während die Aktivität der Zellwand-Invertasen bei beiden transgenen Linien um etwa 30 % der Wildtypaktivität reduziert war. Die Analyse der Wurzeln

ergab, dass erstaunlicherweise nur in *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen alle Invertaseaktivitäten stark erhöht waren, und zwar um etwa 150 % des Wildtypwertes. *35S:CKX2*-transgene Wurzeln zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen.

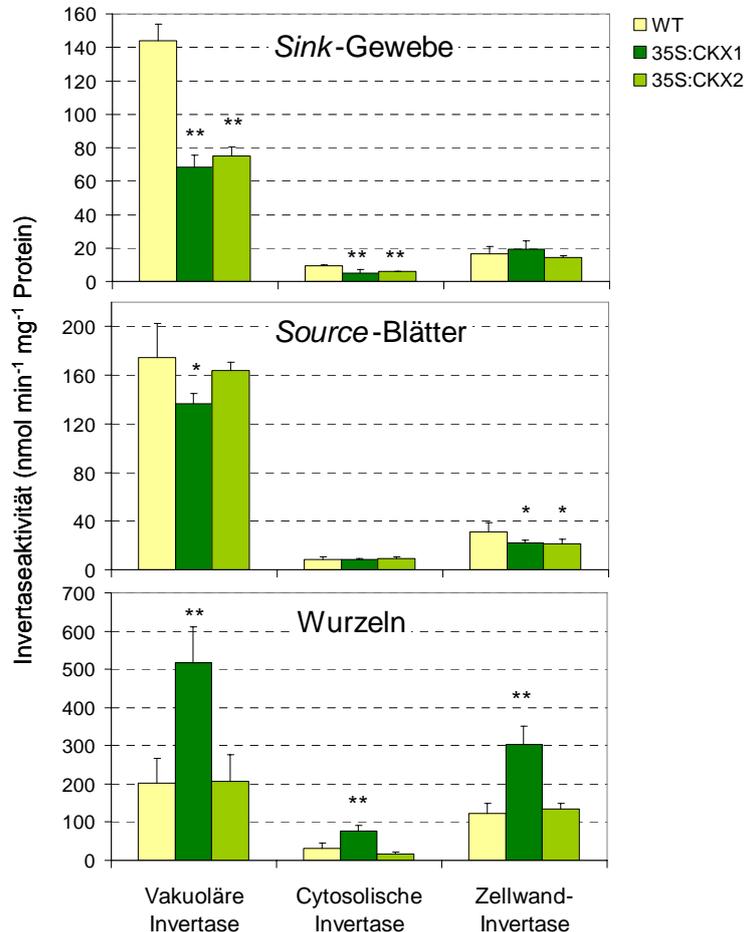


Abbildung 5: Aktivitäten der verschiedenen Invertase-Isoformen in *sink*- und *source*-Geweben des Sprosses und in Wurzeln von Wildtyp und *35S:CKX*-transgenen Tabakpflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 6$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom entsprechenden Wert des Wildtyps. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Neben Invertaseaktivitäten wurden auch die Aktivitäten einiger glykolytischer Enzyme bestimmt. In cytokinindefizienten Spross-*sink*-Geweben waren die Enzymaktivitäten von Pyrophosphat-Fructose-6-P-Phosphotransferasen (PFP) und Aldolasen gegenüber dem Wildtyp fast verdoppelt. Die Aktivität der Phosphofruktokinasen (PFK) war dagegen im Vergleich zum Wildtyp unverändert und die Enolasenaktivität um 26 % (*35S:CKX1*) bzw. 10 % (*35S:CKX2*, nicht signifikant) erniedrigt (Abbildung 6). In den transgenen *source*-Blättern wiesen Aldolasen und Enolasen ebenfalls erhöhte bzw. reduzierte Enzymaktivitäten auf, jedoch war im Gegensatz zum Spross-*sink*-Gewebe keine PFP-Aktivität nachweisbar. In

den Wurzeln 35S:CKX-transgener Pflanzen wurden keine signifikanten Veränderungen der Aktivitäten der glykolytischen Enzyme vorgefunden.

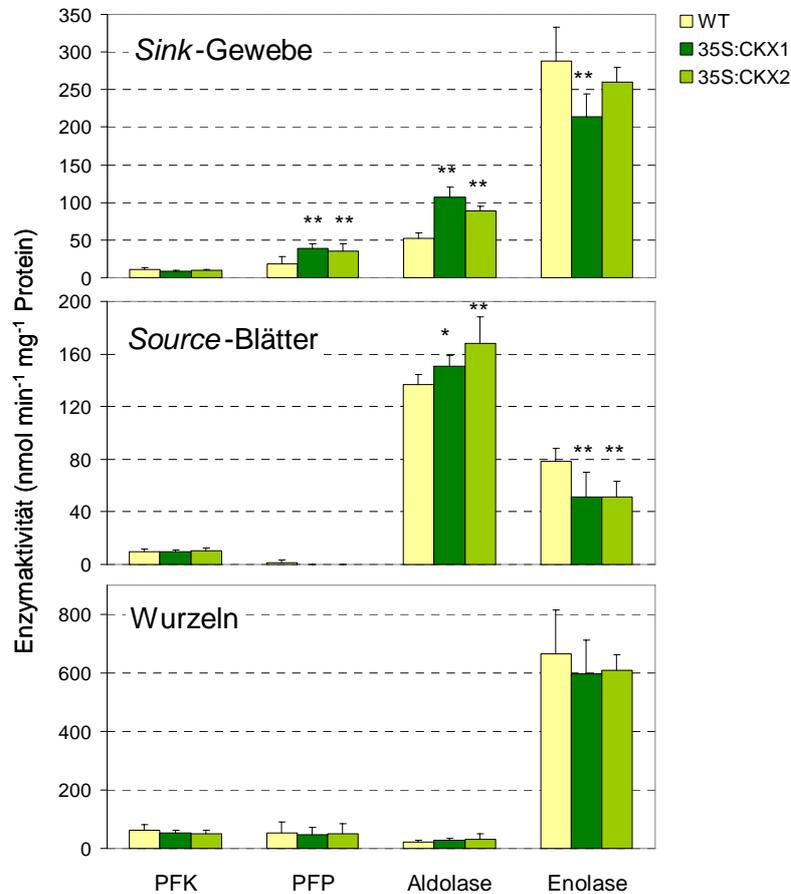


Abbildung 6: Enzymaktivitäten von PFK, PFP, Aldolase und Enolase in *sink*- und *source*-Gewebe des Sprosses und in Wurzeln von Wildtyp und 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 6$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom entsprechenden Wert des Wildtyps. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

3.2 Einfluss der Zellwand-Invertase auf das Wachstum cytokinin-defizienter Arabidopsispflanzen

Eine zentrale Rolle bei der cytokinininduzierten *sink*-Bildung könnte die Zellwand-Invertase (extrazelluläre Invertase) spielen. Die Expression der Zellwand-Invertase wird durch Cytokinin positiv reguliert (Ehneß und Roitsch, 1997; Godt und Roitsch, 1997). Als Saccharose spaltendes Enzym ist sie zum einen an der apoplastischen Phloementladung und der Erzeugung eines Saccharosegradienten durch den Assimilatinfux in *sink*-Organe beteiligt (Eschrich, 1980; Koch, 2004; Roitsch und González, 2004), zum anderen an der Bildung von

Signalmolekülen für die Induktion der Zellteilung (Koch, 1996; Borisjuk *et al.*, 1998; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Beide Prozesse tragen zu einer Erhöhung der *sink*-Stärke bei. Um die mögliche Rolle als Vermittler der Cytokininwirkung zu untersuchen, wurde das Gen der Zellwand-Invertase *CINI* aus *Chenopodium rubrum* L. (Roter Gänsefuß) (Roitsch *et al.*, 1995) spezifisch im *sink*-Gewebe cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen exprimiert. Die *CrCINI*-Expression wurde unter Kontrolle der Promotoren *AINTEGUMENTA* (*ANT*) bzw. *LEAFY* (*LFY*) gestellt, die in den Primordien von Kotyledonen, Blättern, Blüten und Blütenorganen aktiv sind (Elliott *et al.*, 1996; Weigel *et al.*, 1992). Falls die Zellwand-Invertase bei Cytokinindefizienz limitierend für die *sink*-Bildung ist, sollte ihre Expression im jungen Sprossgewebe das Sprosswachstum verbessern und zu einer zumindest teilweisen Reversion des Cytokinindefizienzsyndroms führen.

Das *CrCINI*-Gen (im Folgenden nur als *CINI* bezeichnet) wurde sowohl durch Kreuzung von *ANT:CINI*- bzw. *LFY:CINI*-transgenen Arabidopsispflanzen mit *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen als auch durch direkte Transformation der *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen eingeführt. Die *Promotor:CINI*-transgenen Linien mit genetischem Hintergrund des Wildtyps wurden als *ANT:CINI(WT)* bzw. *LFY:CINI(WT)* bezeichnet und die Linien mit cytokinindefizientem Hintergrund als *ANT:CINI(CKX)* bzw. *LFY:CINI(CKX)*.

3.2.1 Selektion von *ANT:CINI*- und *LFY:CINI*-transgenen Arabidopsispflanzen und Kreuzung mit cytokinindefizienten Pflanzen

Die *in vitro* Selektion von *ANT:CINI(WT)*- bzw. *LFY:CINI(WT)*-transgenen Primärtransformanten (transgene Pflanzen der T1-Generation) erfolgte mit Hilfe des Kanamycinresistenzmarkers und brachte 20 bzw. 18 überlebende Pflanzen hervor. Es wurden weitere Transformanten gefunden, die jedoch nicht überlebensfähig waren. Aufgrund der geringen Transformationsrate ($\leq 0,1$ % Transformanten) und der teilweise auftretenden schlechten Vitalität der Transformanten waren mehrere Selektionsrunden erforderlich, um eine hinreichende Zahl an Primärtransformanten zu erhalten (Tabelle 7). Die Saccharosekonzentration im Selektionsmedium wurde anfänglich gering gehalten, um zu verhindern, dass eine verstärkte Saccharosespaltung durch die primordienspezifische Überexpression des *CINI*-Gens möglicherweise zu einem starken Anstieg des Glucosegehaltes führt, der sich auf die Keimlingsentwicklung hemmend auswirken könnte (Gibson, 2004; Dekkers *et al.*, 2008). Die Erhöhung der Saccharosekonzentration im Medium von 0,1 % auf 1 % zeigte jedoch,

dass das Wachstum transgener Keimlinge durch Saccharose verbessert und die Ausbeute an überlebenden Primärtransformanten gering erhöht werden konnte (Tabelle 7). Möglicherweise war für die Ausbildung der Kanamycinresistenz die Verfügbarkeit von Saccharose essenziell oder die Expression des Transgens beeinflusste die Entwicklung der Pflanzen entgegen der erwarteten Weise.

Die Primärtransformanten zeigten im Vergleich zu Wildtyppflanzen keinen auffälligen Phänotyp (Abbildung 7). Einige transgene Pflanzen waren lediglich höher als der Wildtyp, was möglicherweise aus einer verbesserten Assimilatversorgung des Spross-*sink*-Gewebes aufgrund der Expression des Invertasetransgens resultierte, was wiederum das Sprosswachstum förderte. Diese Beobachtungen wurden auch in der T2-Generation gemacht.

Tabelle 7: Selektion der *ANT:CIN1(WT)*- und *LFY:CIN1(WT)*-Primärtransformanten. Übersicht über die Selektionsbedingungen und die Anzahl der erhaltenen Primärtransformanten (T1-Generation). In Klammern ist die Transformationsrate angegeben. Kan, Kanamycin; MS, MS-Nährmedium; Suc, Saccharose.

Selektion	Selektionsbedingungen	<i>ANT:CIN1(WT)</i>		<i>LFY:CIN1(WT)</i>	
		T1-Pflanzen insgesamt	Überlebende T1-Pflanzen	T1-Pflanzen insgesamt	Überlebende T1-Pflanzen
I	MS + Kan, 0,1 % Suc	8 ($< 0,1\%$)	0	2 ($< 0,1\%$)	1
II	MS + Kan, 0,1 % Suc	2 ($< 0,1\%$)	2	7 ($\sim 0,1\%$)	7
III	MS + Kan, ohne Suc	2 ($< 0,1\%$)	1	0 (0%)	0
IV	MS + Kan, 1 % Suc	17 ($\sim 0,3\%$)	17	11 (keine Angabe)	10



Abbildung 7: *ANT:CIN1(WT)*- und *LFY:CIN1(WT)*-transgene Pflanzen der T1-Generation. Transgene Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp 42 Tage nach Aussaat (TNA).

Es wurden drei *ANT:CIN1(WT)*- und acht *LFY:CIN1(WT)*-Primärtransformanten mit *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen gekreuzt. Die Pflanzen der F1-Generation waren sehr viel kleiner und entwickelten sich deutlich langsamer als Wildtyppflanzen (Abbildung 8A). Ihr Erscheinungsbild ähnelte tendenziell *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen. Verglichen mit *35S:CKX1*-Pflanzen waren die Rosetten jedoch meist größer und die Infloreszenzen höher (Abbildungen 8A und B). Die Zahl der Blütenknospen war erhöht und die Blüten waren größer (Abbildung 8C). Im Vergleich zu Wildtyppflanzen waren die Schoten der F1-Pflanzen meist etwas kürzer und dicker, jedoch nicht mit *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen vergleichbar, bei denen die Schotenlänge deutlich reduziert war und die Schoten insbesondere basal verdickt waren. Der Phänotyp wurde auch in der F2-Generation beobachtet. Die Linie *LFY:CIN1(WT)-0, 35S:CKX1* wurde bis in die F3-Generation verfolgt, in der phänotypische Merkmale *35S:CKX1*-transgener Pflanzen vorgefunden wurden, das heißt reduzierte Blütenknospenzahl, reduzierte Blüten- und Schotengröße und die charakteristische Schotenform. Die Sprosse der F3-Hybriden waren jedoch höher und buschiger als die der *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen.

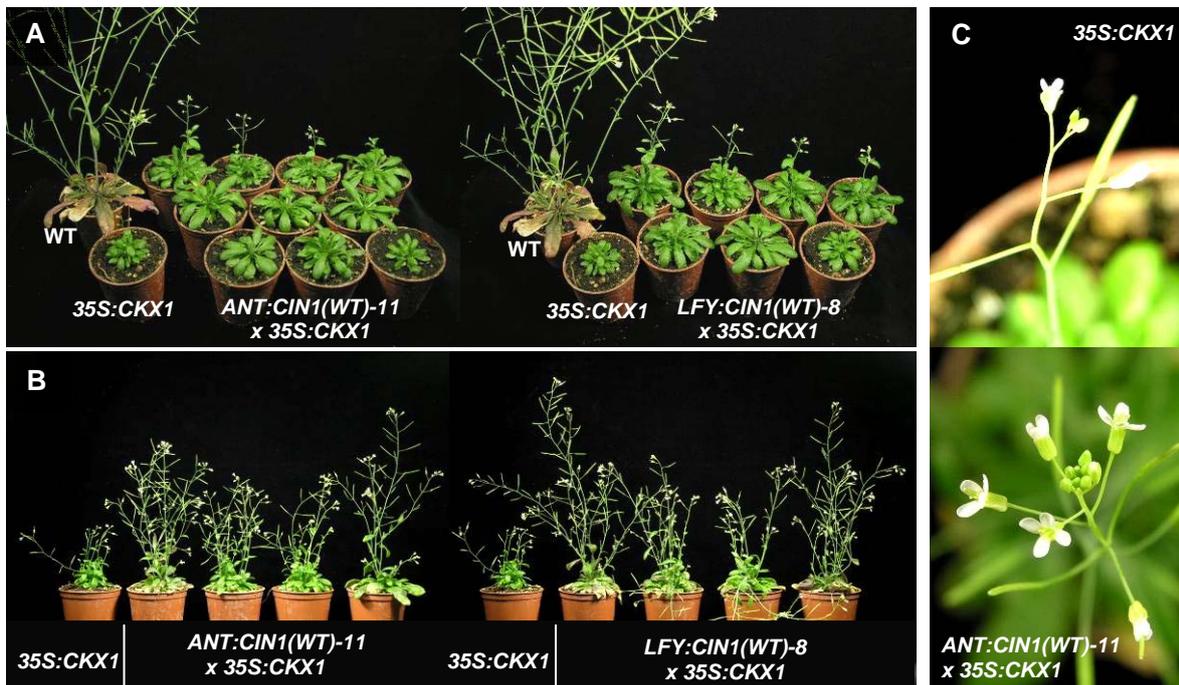


Abbildung 8: *ANT:CIN1(WT) x 35S:CKX1* und *LFY:CIN1(WT) x 35S:CKX1* Pflanzen der F1-Generation. (A) F1-Hybriden im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX1*-transgener Pflanze 55 TNA. Im Gegensatz zu den transgenen Pflanzen wies der Wildtyp bereits eine starke Seneszenz auf. (B) F1-Hybriden im Vergleich zu *35S:CKX1*-transgener Pflanze 69 TNA. (C) Blütenstände einer *35S:CKX1*-transgenen Pflanze und eines *ANT:CIN1(WT)A x 35S:CKX1* Hybriden 69 TNA.

Die Expression des *CINI*-Transgens konnte mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die spezifische *CINI*-Expression im Spross-*sink*-Gewebe *35S:CKXI*-transgener Arabidopsispflanzen nur in den ersten beiden Generationen eine teilweise Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps ergab. Das Sprosswachstum war zwar gegenüber *35S:CKXI*-Pflanzen verstärkt, jedoch nicht vergleichbar mit dem Wildtyp. In der F3-Generation, die aus homozygoten Pflanzen bestand, ging die partielle Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps jedoch verloren, was möglicherweise aus der Instabilität der *CINI*-Expression über mehrere Generationen resultierte oder aber aus der verstärkten *CKXI*-Expression in homozygoten Pflanzen gegenüber *CKXI*-hemizygoten Pflanzen.

3.2.2 Transformation cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen mit *ANT:CINI*- bzw. *LFY:CINI*-Konstrukten

Die *in vitro* Selektion von Primärtransformanten mit *35S:CKXI*-transgenem Hintergrund (*ANT:CINI(CKX)* bzw. *LFY:CINI(CKX)*) mit Hilfe des Kanamycinresistenzmarkers ergab 15 bzw. 67 überlebende Pflanzen. Auch hier waren mehrere Selektionsrunden für das Auffinden von Primärtransformanten erforderlich (Tabelle 8), wobei das Fehlen von Saccharose im Medium während der ersten Selektionen offensichtlich ein Grund für den ausbleibenden Erfolg war. Bei der Selektion IV (Tabelle 8) wurde eine größere Zahl von Primärtransformanten identifiziert. Hier wurde Medium mit 1 % Saccharose verwendet, was das Keimlingswachstum begünstigt haben könnte. Außerdem wurden Samen eines neuen Transformationsdurchgangs verwendet, bei dem *35S:CKXI*-transgene Pflanzen transformiert wurden, die zuvor mit einem CKX-Inhibitor behandelt wurden, um einen größeren Samenertrag aufgrund verstärkter Blütenbildung zu erzielen. Diese Vorgehensweise bewirkte insbesondere bei *LFY:CINI(CKX)* einen starken Anstieg der Zahl der identifizierten Primärtransformanten und eine Erhöhung der Selektionsrate (Tabelle 8).

Tabelle 8: Selektion der *ANT:CIN1(CKX)*- und *LFY:CIN1(CKX)*-Primärtransformanten. Übersicht über die Selektionsbedingungen und die Anzahl der erhaltenen Primärtransformanten (T1-Generation). In Klammern ist die Transformationsrate angegeben. Kan, Kanamycin; MS, MS-Nährmedium; Suc, Saccharose.

Selektion	Selektionsbedingungen	<i>ANT:CIN1(CKX)</i>		<i>LFY:CIN1(CKX)</i>	
		T1-Pflanzen insgesamt	Überlebende T1-Pflanzen	T1-Pflanzen insgesamt	Überlebende T1-Pflanzen
I	MS + Kan, ohne Suc	0 (0 %)	0	1 (< 0,1 %)	1
II	MS + Kan, ohne Suc	0 (0 %)	0	0 (0 %)	0
III	MS + Kan, ohne Suc	0 (keine Angabe)	0	0 (keine Angabe)	0
IV	MS + Kan, 1 % Suc	17 (~0,3 %)	15	76 (~1 %)	66

Die Pflanzen der T1-Generation zeigten die phänotypischen Merkmale der *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen, das heißt die Bildung langsam wachsender, kleinwüchsiger, buschiger Sprosse mit kleinen Blättern und verringerter Blütenzahl und Blütengröße (Abbildung 9). Dieser Phänotyp wurde auch in der T2-Generation beobachtet.



Abbildung 9: *ANT:CIN1(CKX)*- und *LFY:CIN1(CKX)*-transgene Pflanzen der T1-Generation. Transgene Pflanzen im Vergleich zu *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen 61 TNA. Wildtyppflanzen waren bereits verblüht.

Die Expression des *CIN1*-Transgens in den Hybridpflanzen (Abschnitt 3.2.1) und den Transformanten wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR-Analyse überprüft. Dafür wurden junge Blütenstände einiger Pflanzen der F2- und der T2-Generation verwendet. Die Expression konnte in den meisten Fällen nachgewiesen werden (Abbildung 10).



Abbildung 10: Semiquantitative RT-PCR-Analyse des *CIN1*-Transkriptes in *ANT:CIN1(WT)*, *35S:CKX1*; *LFY:CIN1(WT)*, *35S:CKX1*; *ANT:CIN1(CKX)*- und *LFY:CIN1(CKX)*-transgenen Pflanzen. Für die RT-PCR-Analyse wurde RNA aus jungen Blütenständen von Pflanzen der F2- bzw. der T2-Generation isoliert. Als Kontrolle diente *Actin2*. Es wurden 46 Reaktionszyklen für *CIN1* und 24 Reaktionszyklen für *Actin2* durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Cytokinindefizienzphänotyp weder vollständig noch teilweise durch die spezifische Expression des Gens der Zellwand-Invertase *CIN1* im Spross-*sink*-Gewebe cytokinindefizienter Arabidopsis reversiert werden konnte. Der Ansatz der direkten Transgeninsertion in das Genom der cytokinindefizienten Pflanzen durch Transformation zeigte dies noch deutlicher als der weniger direkte Ansatz des Einkreuzens (Abschnitt 3.2.1).

3.3 Einfluss von CyclinD3 auf das Wachstum cytokinindefizienter Arabidospispflanzen

Cytokinine kontrollieren den Zellzyklus der Pflanze und somit die mitotische Zellteilungsaktivität und darüber möglicherweise auch die Größe von *sink*-Organen. So induzieren Cytokinine in Arabidopsis beispielsweise das Gen für das D-Typ Cyclin *CycD3* (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999), das den G1/S-Übergang im Zellzyklus reguliert. Die Expression von *CycD3* ist mit proliferierenden Geweben assoziiert (Dewitte *et al.*, 2003). In cytokinindefizienten Pflanzen ist die *CycD3*-Expression reduziert (Yang *et al.*, 2003) und in der Cytokinin-überproduzierenden Mutante *amp1* erhöht (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Nogué *et al.*, 2000). Es stellte sich die Frage, ob *CycD3* eine regulatorische Schaltstelle zwischen Cytokininen und der *sink*-Bildung darstellt und ob durch die spezifische Expression des *CycD3*-Gens im Spross-*sink*-Gewebe cytokinindefizienter Arabidospispflanzen der Cytokinindefizienzphänotyp zumindest teilweise kompensiert werden kann. Um dies zu

überprüfen, wurde das *AtCycD3;1*-Gen (At4g34160; im Folgenden nur als *CycD3* bezeichnet) unter Kontrolle der primordienspezifischen Promotoren *ANT* bzw. *LFY* gestellt und in cytokinindefizienten Arabidopsispflanzen exprimiert.

Für die Erzeugung der *ANT:CycD3*- bzw. *LFY:CycD3*-transgenen Arabidopsis wurden sowohl Wildtyppflanzen als auch *35S:CKX1*-transgene Pflanzen transformiert. Die transgenen Linien wurden entsprechend als *ANT:CycD3(WT)* und *LFY:CycD3(WT)* bzw. als *ANT:CycD3(CKX)* und *LFY:CycD3(CKX)* bezeichnet. Die Selektion der Primärtransformanten erfolgte *in vitro* mit Hilfe des Kanamycinresistenzmarkers und ergab ca. 160 *ANT:CycD3(WT)*-, 270 *LFY:CycD3(WT)*-, 60 *ANT:CycD3(CKX)*- und 48 *LFY:CycD3(CKX)*-transgene Pflanzen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der *ANT:CycD3*- und *LFY:CycD3*-Primärtransformanten. In Klammern ist die Transformationsrate angegeben.

	T1-Pflanzen insgesamt	Weiter beobachtete T1-Pflanzen
<i>ANT:CycD3(WT)</i>	ca. 160 (~2,5 %)	125
<i>LFY:CycD3(WT)</i>	ca. 270 (~3 %)	125
<i>ANT:CycD3(CKX)</i>	60 (~0,6 %)	59
<i>LFY:CycD3(CKX)</i>	48 (~0,6 %)	48

Die Primärtransformanten mit wildtypischem Hintergrund waren den Wildtyppflanzen relativ ähnlich. Lediglich der Blühbeginn, die Blühdauer und die Sprosshöhe waren abweichend. Die *ANT:CycD3(WT)*- und *LFY:CycD3(WT)*-transgenen Pflanzen blühten durchschnittlich zwei bzw. drei Tage später als der Wildtyp und erreichten eine deutlich höhere Sprosshöhe (Abbildung 11A). Die reproduktive Wachstumsphase war bei der Mehrheit der transgenen Pflanzen verlängert und endete später als bei Wildtyppflanzen (siehe vergrößerter Bildausschnitt in Abbildung 11A). Die Primärtransformanten mit cytokinindefizientem Hintergrund zeigten die phänotypischen Merkmale der *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen (Abbildung 11B). Sie bildeten langsam wachsende, kleinwüchsige Sprosse mit kleinen Blättern und Infloreszenzen mit verringerter Blütenzahl und Blütengröße.

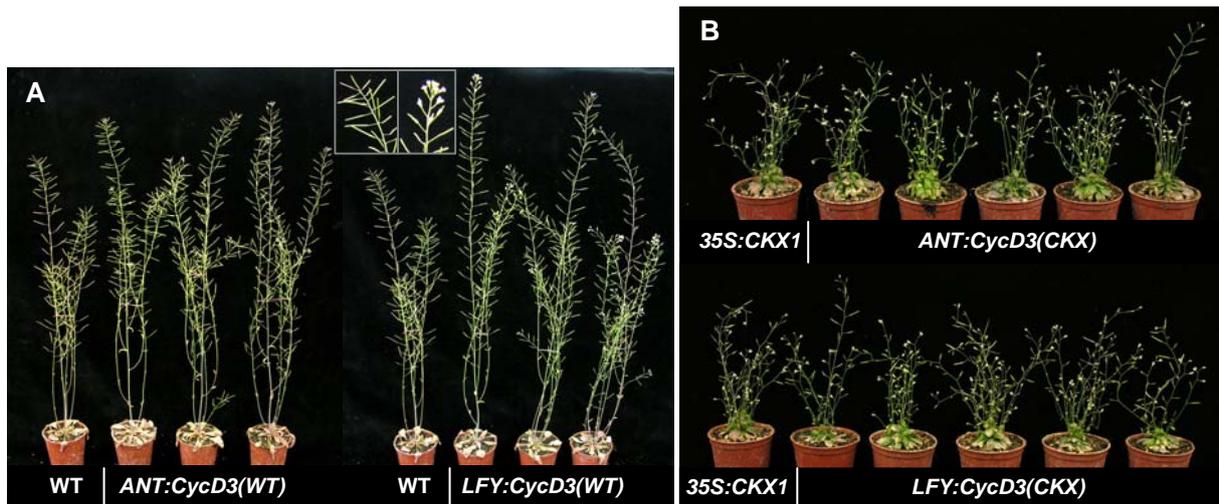


Abbildung 11: *CycD3*-transgene Pflanzen der T1-Generation. **(A)** *ANT:CycD3(WT)*- und *LFY:CycD3(WT)*-transgene Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp 53 TNA. Vergrößert abgebildet sind die apikalen Bereiche der Hauptspitze von Wildtyp (links) und einer *LFY:CycD3(WT)*-transgenen Pflanze (rechts). **(B)** *ANT:CycD3(CKX)*- und *LFY:CycD3(CKX)*-transgene Pflanzen im Vergleich zu einer *35S:CKX1*-transgenen Pflanze 74 TNA. Wildtyppflanzen waren bereits verblüht.

Die Expression des *CycD3*-Transgens wurde in jungen Blütenständen einiger Pflanzen der T2-Generation mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse überprüft. Die Expression konnte in den meisten Fällen nachgewiesen werden (Abbildung 12). Die spezifische Expression des *CycD3*-Gens im Spross-*sink*-Gewebe cytokinindefizienter Pflanzen bewirkte auch hier weder eine vollständige noch eine teilweise Kompensierung des Cytokinindefizienzphänotyps.

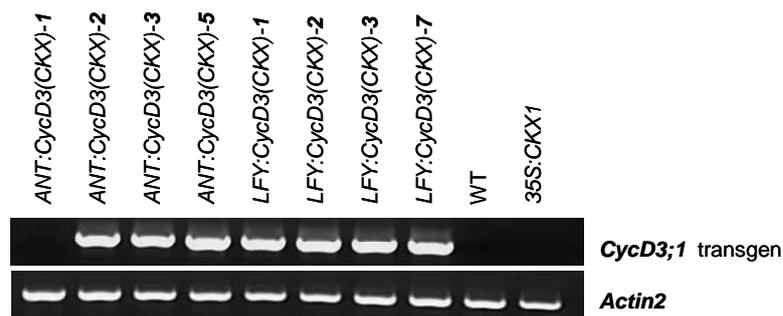


Abbildung 12: Semiquantitative RT-PCR-Analyse des *CycD3*-Transkriptes in *ANT:CycD3(CKX)*- und *LFY:CycD3(CKX)*-transgenen Pflanzen. Für die RT-PCR-Analyse wurde RNA aus jungen Blütenständen von Pflanzen der T2-Generation isoliert. Als Kontrolle diente *Actin2*. Es wurden 35 Reaktionszyklen für *CycD3* und 24 Reaktionszyklen für *Actin2* durchgeführt.

3.4 Einfluss von Trehalose-6-phosphat auf das Wachstum cytokinin-defizienter Arabidopsispflanzen

Trehalose-6-phosphat (Tre6P) ist essenziell für die Kohlenhydratverwertung und das gesamte Pflanzenwachstum (Schluepmann *et al.*, 2003). Es wird aus Glucose-6-phosphat und UDP-Glucose durch die Trehalose-6-phosphat-Synthase (TPS) synthetisiert und durch die Trehalose-6-phosphat-Phosphatase (TPP) dephosphoryliert, wobei Trehalose entsteht, die wiederum durch Trehalase in Glucose umgewandelt wird (Cabib und Leloir, 1958; Boos *et al.*, 1990). *TPS*-Gene werden durch Cytokinin induziert und sind in cytokinindefizienten Arabidopsispflanzen herabreguliert (Brenner *et al.*, 2005), was zu einem verringerten Tre6P-Gehalt in diesen Pflanzen führen sollte. Tre6P ist somit ein weiterer Kandidat für die Vermittlung der Cytokininwirkung bezüglich der Kohlenhydratverwertung und des Pflanzenwachstums. In verschiedenen Versuchsansätzen sollte der endogene Tre6P-Gehalt in cytokinindefizienten Arabidopsispflanzen erhöht werden, um zu überprüfen, ob eine Erhöhung des Tre6P-Gehaltes das Cytokinindefizienzsyndrom kompensieren und damit Tre6P als limitierender Faktor für das cytokininregulierte Pflanzenwachstum identifiziert werden kann.

Eine Möglichkeit, den endogenen Tre6P-Gehalt zu erhöhen, ist die Expression eines *TPS*-Gens in cytokinindefizienten Pflanzen. Für Kreuzungen mit *35S:CKXI*-Pflanzen standen transgene Arabidopsis zur Verfügung, die das *TPS* kodierende *otsA*-Gen aus *E. coli* konstitutiv exprimieren (Schluepmann *et al.*, 2003). Bei den Hybridpflanzen der F1-Generation wurde eine die Blütengröße und Blütenknospenzahl betreffende partielle Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps vorgefunden, die allerdings aus dem *silencing* des *CKXI*-Transgens resultierte. So ergab die Überprüfung der *CKXI*-Expression mittels Northern-Blot-Analyse eine Verringerung der *CKXI*-Transkriptmenge auf 23 % bei *35S:OTSA* x *35S:CKXI* Hybriden und 29 % bei *35S:CKXI* x *35S:OTSA* Hybriden (Abbildung 13).

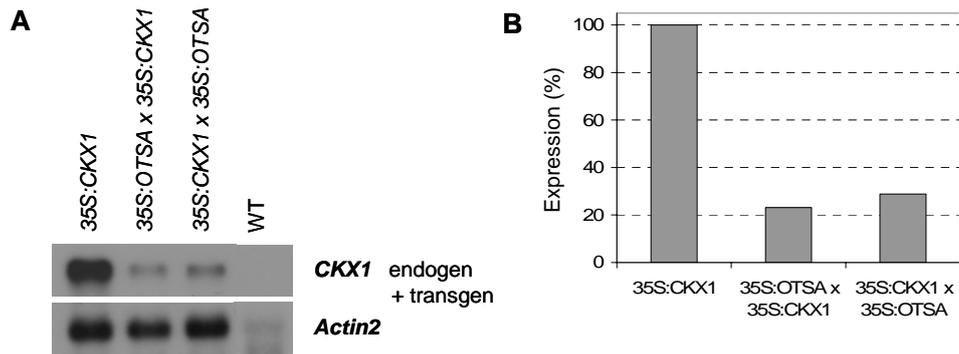


Abbildung 13: Analyse der *CKX1*-Expression in *35S:OTSA x 35S:CKX1* Hybridpflanzen der F1-Generation. **(A)** Northern-Blot-Analyse der Transkripte von endogenem und transgenem *CKX1*. Es wurde RNA aus den jüngsten Rosettenblättern von Pflanzen 35 TNA isoliert. Als Kontrolle diente *Actin2*. **(B)** Stärke der *CKX1*-Expression in *35S:OTSA x 35S:CKX1* Hybridpflanzen im Vergleich zu *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen. Es wurden die Bandenstärken des Northern-Blots quantifiziert.

3.4.1 Einfluss exogener Trehalose auf das Sprosswachstum

Ein anderer Weg, den Tre6P-Gehalt in der Pflanze zu erhöhen, ist die Gabe von exogener Trehalose. Trehalose im Medium wird effizient in die Pflanzenzelle importiert und führt dort zu einer Akkumulation von endogenem Tre6P (Schluepmann *et al.*, 2004). Eine Wachstumshemmung durch Tre6P kann durch zusätzlichen metabolisierbaren Zucker (z.B. Saccharose) neben Trehalose im Medium verhindert werden (Schluepmann *et al.*, 2004). Um einem Trehaloseabbau entgegenzuwirken, kann die Aktivität der Trehalase durch das Antibiotikum Validamycin A (ValA) inhibiert werden (Goddijn *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2001). Für die Überprüfung der Rolle des Trehalosemetabolismus bei der Vermittlung der Cytokininwirkung wurde das Keimlingswachstum von cytokinindefizienten Arabidopsis und Cytokininrezeptormutanten in Gegenwart von verschiedenen Trehalosekonzentrationen untersucht.

Zur Untersuchung der Veränderungen des Sprosswachstums bei verschiedenen Trehalosekonzentrationen wurden die Sprossmassen von Wildtyppflanzen und der cytokinindefizienten Linien *35S:CKX1* und *35S:CKX2* bestimmt sowie der Cytokininrezeptormutanten *ahk2 ahk3* und *ahk2 ahk3 cre1*, die einen gestörten Cytokinin-signalweg aufweisen. Diese Doppel- und Dreifachmutanten zeigen wie cytokinindefiziente Pflanzen verlangsamtes und reduziertes Sprosswachstum und verstärktes Wachstum der Wurzeln (Riefler *et al.*, 2006). Die Pflanzen wurden auf Kulturmedien mit 0, 10 und 50 mM Trehalose, ohne und mit 1 % Saccharose als metabolisierbaren Zucker und unter Verwendung von 10 µM ValA gezogen

und 14 TNA analysiert. In Abbildung 14 sind Beispiele von Keimlingen mit verschiedenen Wachstumsbedingungen zum Zeitpunkt der Ernte abgebildet.

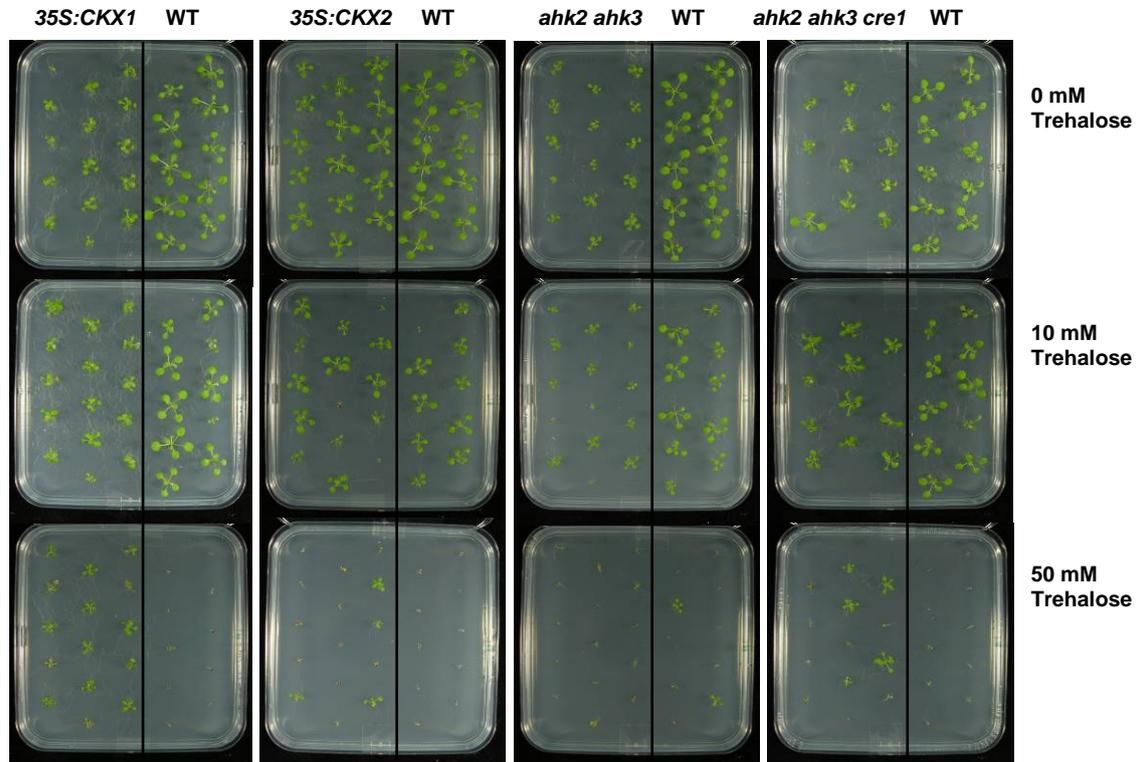


Abbildung 14: *In vitro* Kultur von Wildtyp, 35S:CKX1- und 35S:CKX2-transgenen Pflanzen sowie *ahk2 ahk3*- und *ahk2 ahk3 cre1*-Rezeptormutanten in Gegenwart verschiedener Trehalosekonzentrationen. Die Keimlinge wurden auf Ats-Medium mit Saccharose und ValA gezogen. Die Bilder wurden 14 TNA aufgenommen.

Die Sprossmassen der untersuchten Linien sind unter normalen Wachstumsbedingungen bereits sehr verschieden. Daher wurden für eine bessere Vergleichbarkeit die Ergebnisse zusätzlich als relative Werte dargestellt, wobei für jede Linie die Sprossmassen bei 10 bzw. 50 mM Trehalose in Relation zur Sprossmasse bei Wachstum ohne Trehalose gesetzt wurden (Abbildung 15). Die Analyse zeigte, dass das Sprosswachstum der 35S:CKX1-transgenen Pflanzen und der Rezeptordreifachmutanten *ahk2 ahk3 cre1* bei niedriger Trehalosekonzentration (10 mM) und in Gegenwart von Saccharose um 14 % bzw. 40 % verstärkt war im Vergleich zum Wachstum ohne Trehalose (Abbildung 15A). Im Gegensatz dazu waren die Sprossmassen der Wildtyp-, 35S:CKX2- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen um etwa 30-40 % reduziert. Bei hoher Trehalosekonzentration (50 mM) und Saccharose war das Wachstum der 35S:CKX1- und *ahk2 ahk3 cre1*-Pflanzen weniger inhibiert als das der übrigen Genotypen. Im Vergleich zu den gebildeten Sprossmassen bei Wachstum ohne Trehalose

waren die Sprossmassen in Gegenwart von 50 mM Trehalose bei *35S:CKX1*- und *ahk2 ahk3 cre1*-Pflanzen nur auf 56 % bzw. 32 % reduziert, während bei den Wildtyp-, *35S:CKX2*- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen eine drastische Reduktion auf 3-17 % zu beobachten war (Abbildung 15A). Diese oben beschriebenen Wachstumsänderungen traten auch bei Abwesenheit von Saccharose mit ähnlichen relative Werten auf (Abbildung 15B). Lediglich die Sprossmassen der *ahk2 ahk3 cre1*-Mutanten waren bei Wachstum mit 50 mM Trehalose nur um etwa 30 % reduziert, während die Reduktion in Gegenwart von Saccharose etwa 70 % betrug.

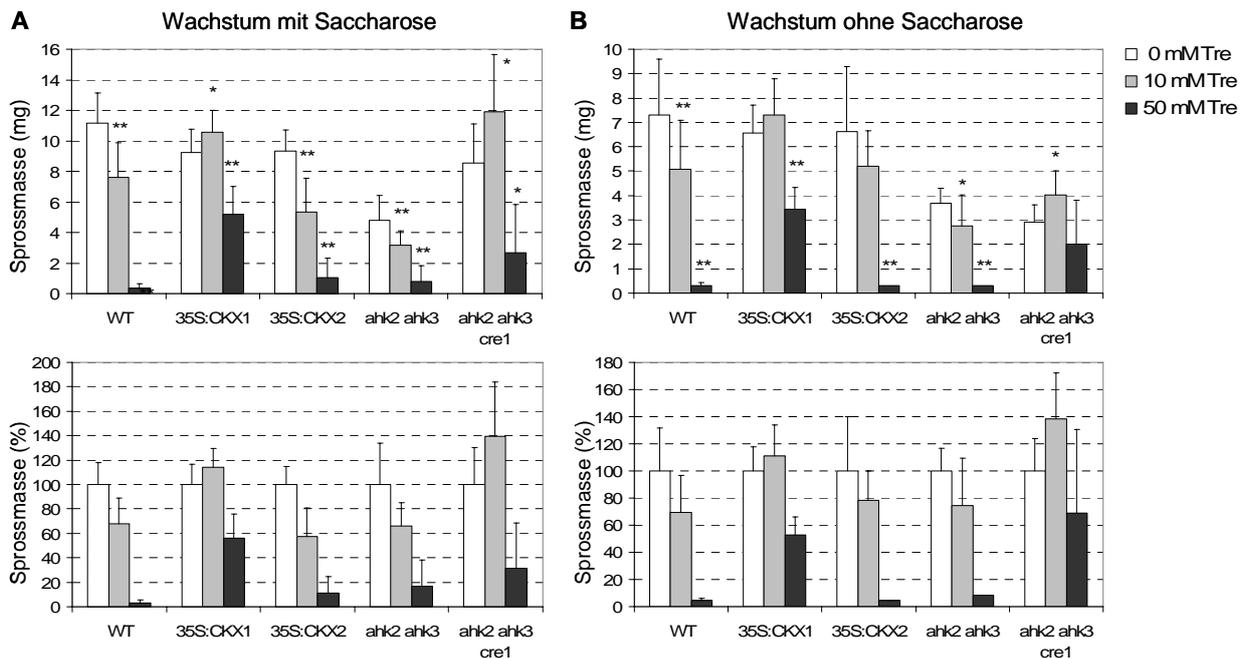


Abbildung 15: Sprosswachstum von Wildtyp, *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen sowie *ahk2 ahk3*- und *ahk2 ahk3 cre1*-Rezeptormutanten in Gegenwart verschiedener Trehalosekonzentrationen. Die Keimlinge wurden auf Ats-Medium mit ValA gezogen und die Frischgewichte der Sprosse 14 TNA analysiert. Dargestellt sind absolute (oben) und relative (unten) Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 16-30$; für *ahk2 ahk3 cre1* $n = 9-12$). Bei relativen Werten wurde für jede Linie die Sprossmasse bei Wachstum ohne Trehalose als 100 % gesetzt. **(A)** Sprosswachstum mit 1 % Saccharose als zusätzlichen metabolisierbaren Zucker. **(B)** Sprosswachstum ohne Saccharose. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Veränderungen des Sprosswachstums gegenüber dem Wachstum bei 0 mM Trehalose. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Tre, Trehalose.

In Abbildung 16 wurden die Ergebnisse aus Abbildung 15 in Relation zum Sprosswachstum ohne Trehalose und Saccharose im Medium dargestellt. Auffällig war, dass die Dreifachmutante *ahk2 ahk3 cre1* auf die Saccharosegabe deutlich stärker mit Wachstumszunahme reagierte als die übrigen Linien. Ihre Sprossmasse verdreifachte sich in Gegenwart von Saccharose und vervierfachte sich sogar, wenn zusätzlich 10 mM Trehalose verfügbar war. Bei Wildtyp-, *35S:CKX1*-, *35S:CKX2*- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen nahmen die

Sprossmassen dagegen bei Saccharosegabe nur um 30-50 % zu. In Gegenwart von Saccharose und 10 mM Trehalose blieben die Sprossmassen bei Wildtyp unverändert bzw. waren bei *35S:CKX2* und *ahk2 ahk3* um 14-20 % reduziert. Lediglich bei *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen erhöhte sich die Sprossmasse bei 10 mM Trehalose auf 60 % im Vergleich zur Erhöhung auf 40 % ohne Trehalose. Bei Wachstum mit Saccharose und 50 mM Trehalose war bei allen Linien eine unterschiedlich ausgeprägte Reduktion der Sprossmasse zu beobachten.

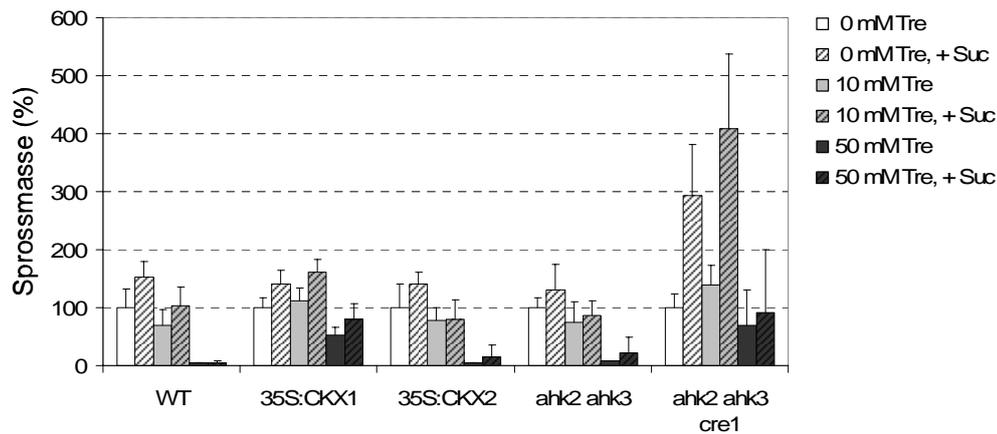


Abbildung 16: Sprosswachstum von Wildtyp, *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen sowie *ahk2 ahk3*- und *ahk2 ahk3 cre1*-Rezeptormutanten in Abhängigkeit von Trehalose und Saccharose. Die Abbildung zeigt eine andere Darstellung des Datensatzes aus Abbildung 15. Dargestellt sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 16-30$; für *ahk2 ahk3 cre1* $n = 9-12$). Für jede Linie wurde die Sprossmasse bei Wachstum ohne Saccharose und Trehalose als 100 % gesetzt. Tre, Trehalose; Suc, Saccharose (1 %).

3.4.2 Einfluss exogener Trehalose auf das Wurzelwachstum

Zur Untersuchung der Veränderung des Wurzelwachstums bei verschiedenen Trehalosekonzentrationen wurde die Längenzunahme der Primärwurzeln von Wildtyp-pflanzen, *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen und *ahk2 ahk3*-Rezeptormutanten innerhalb von sieben Tagen bestimmt. Die Pflanzen wurden auch hier auf Kulturmedien mit 0, 10 und 50 mM Trehalose, ohne und mit 1 % Saccharose und unter Verwendung von ValA gezogen.

Wildtyp-, *35S:CKX2*- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen zeigten in Gegenwart von Saccharose mit zunehmender Trehalosekonzentration eine zunehmende starke Inhibierung des Primärwurzelswachstums. So war die Wurzelverlängerung dieser Pflanzen bei 10 mM Trehalose auf 75-85 % reduziert und bei 50 mM Trehalose auf etwa 20-25 % verglichen mit

dem Wachstum ohne Trehalose (Abbildung 17A). Mit Ausnahme der *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen wurde eine inhibierte Wurzelverlängerung auch bei Wachstum ohne Saccharose beobachtet (Abbildung 17B). *35S:CKX2*-Pflanzen zeigten hier erstaunlicherweise bei 10 mM Trehalose eine starke signifikante Zunahme der Primärwurzellänge um 57 %, bei 50 mM Trehalose wiederum eine starke Reduktion auf 15 %. Interessanterweise wies das Wurzelwachstum *35S:CKX1*-transgener Pflanzen im Gegensatz zu Wildtyp-, *35S:CKX2*- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen in Anwesenheit von exogener Trehalose nur geringe Veränderungen im Vergleich zum Wachstum ohne Trehalose auf, und zwar unabhängig von der Saccharoseverfügbarkeit (Abbildung 17).

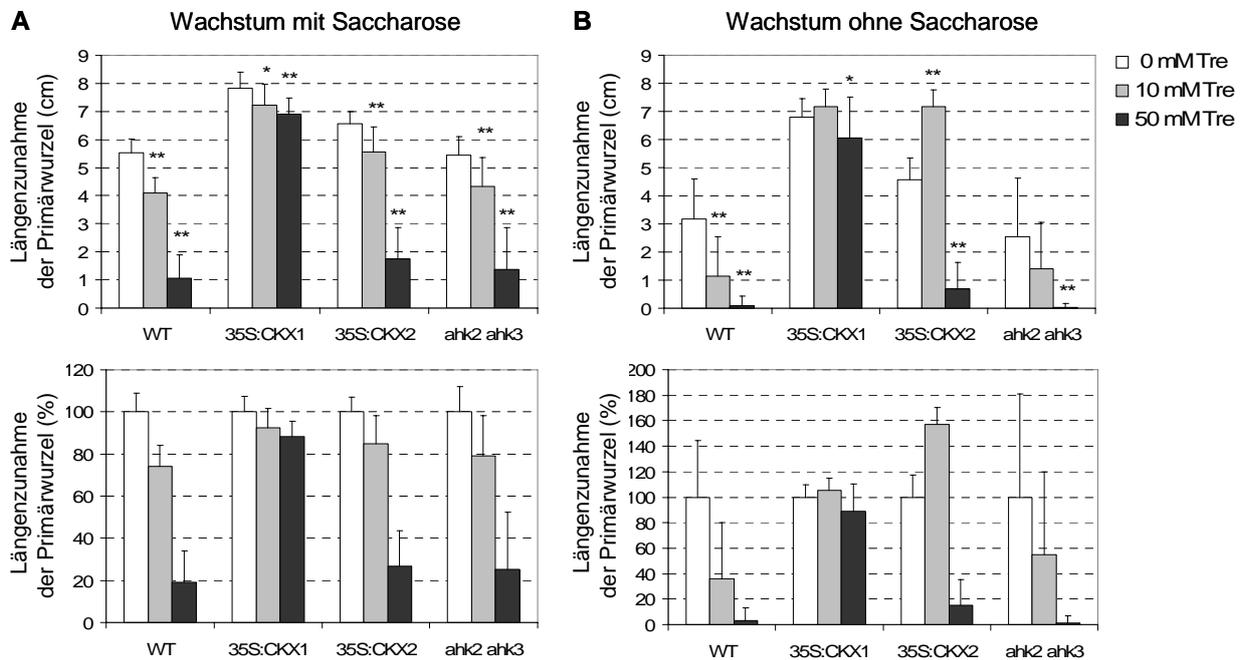


Abbildung 17: Wurzelwachstum von Wildtyp, *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen sowie *ahk2 ahk3*-Rezeptormutanten in Gegenwart verschiedener Trehalosekonzentrationen. Die Keimlinge wurden auf Ats-Medium mit ValA gezogen. Es wurde die Längenzunahme der Primärwurzel zwischen 4. und 11. TNA gemessen. Dargestellt sind absolute (oben) und relative (unten) Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 16-30$). Bei relativen Werten wurde für jede Linie die Primärwurzelverlängerung bei Wachstum ohne Trehalose als 100 % gesetzt. **(A)** Sprosswachstum mit 1 % Saccharose als zusätzlichen metabolisierbaren Zucker. **(B)** Sprosswachstum ohne Saccharose. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Veränderungen des Wurzelwachstums gegenüber dem Wachstum bei 0 mM Trehalose. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Tre, Trehalose; Suc, Saccharose.

Neben der Längenzunahme der Primärwurzeln wurde außerdem die Anzahl der Lateralwurzeln erster Ordnung bei Wachstum mit Saccharose und verschiedenen Trehalosekonzentrationen 11 TNA bestimmt (Abbildung 18). Während bei Wildtyp-, *35S:CKX2*- und

ahk2 ahk3-Pflanzen eine geringe Trehalosekonzentration (10 mM) die Bildung von Lateralwurzeln nicht bzw. kaum beeinflusste, war die Anzahl der Lateralwurzeln von *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen signifikant um 23 % erhöht im Vergleich zur Lateralwurzelbildung ohne Trehalose. In Gegenwart von 50 mM Trehalose war die Lateralwurzelzahl bei *35S:CKX1*-Pflanzen auf 40 % verringert und bei Wildtyp-, *35S:CKX2*- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen noch etwas stärker auf etwa 20-25 % reduziert.

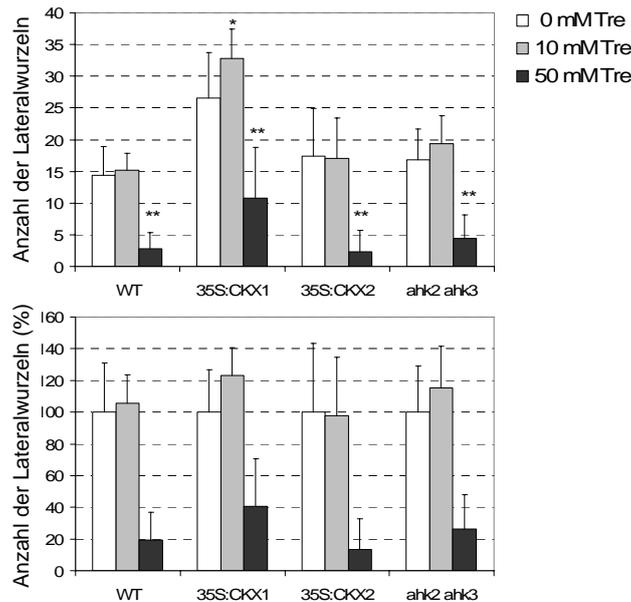


Abbildung 18: Bildung von Lateralwurzeln erster Ordnung von Wildtyp, *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen sowie *ahk2 ahk3*-Rezeptormutanten in Gegenwart verschiedener Trehalosekonzentrationen. Die Keimlinge wurden auf Ats-Medium mit ValA und 1 % Saccharose gezogen und die Anzahl der Lateralwurzeln 11 TNA bestimmt. Dargestellt sind absolute (oben) und relative (unten) Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 10$). Bei relativen Werten wurde für jede Linie die Lateralwurzelzahl bei Wachstum ohne Trehalose als 100 % gesetzt. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Veränderungen der Lateralwurzelzahl gegenüber dem Wachstum bei 0 mM Trehalose. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Tre, Trehalose.

3.5 Effekt lokaler Cytokinindefizienz durch spezifische Expression von *CKX3* in verschiedenen Domänen des *sink*-Gewebes im Spross von *Arabidopsis*

35S:*AtCKX*-transgene Pflanzen haben kleinere apikale Sprossmeristeme, die eine reduzierte Aktivität aufweisen (Werner *et al.*, 2001). Die Bildung neuer Blätter ist in cytokinindefizienten Pflanzen verlangsamt und der Zeitpunkt des Blühbeginns verzögert. Es stellte sich die Frage, ob sich der Cytokinindefizienzphänotyp auf die Reduktion des Cytokininingehaltes in bestimmten Geweben, Domänen oder Zelltypen des Spross-*sink*-Gewebes zurückführen lässt. Es sollte geklärt werden, welche Domänen für die Regulation von Wachstum und Entwicklung der Pflanze durch Cytokinin wichtig sind. Eine spezifische Absenkung des Cytokininingehaltes in verschiedenen Domänen des Spross-*sink*-Gewebes sollte zur Klärung dieser Fragestellung beitragen. Um eine lokale, domänenspezifische Cytokinindefizienz zu erzielen, wurde das *AtCKX3*-Gen (At5g56970) unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert, die in unterschiedlichen Regionen des Sprossapex aktiv sind. Dies waren der Sprossapikalmeristem-spezifische *SHOOTMERISTEMLESS*-Promotor (Long *et al.*, 1996), der Stammzellen-spezifische *CLAVATA3*-Promotor (Fletcher *et al.*, 1999), der Organisierendes Zentrum-spezifische *WUSCHEL*-Promotor (Mayer *et al.*, 1998) und die Primordien-spezifischen Promotoren von *AINTEGUMENTA* (Elliott *et al.*, 1996) und *LEAFY* (Weigel *et al.*, 1992). Die Aktivitäten der verwendeten Promotoren bezüglich des Expressionsortes und der Entwicklungsphase der Pflanze werden in den folgenden spezifischen Abschnitten erläutert und sind in Tabelle 10 zusammengefasst. In Abbildung 19 sind der Aufbau eines vegetativen Sprossapex und die Expressionsdomänen der jeweiligen Gene schematisch dargestellt. In der Arbeitsgruppe wurden bereits transgene *Arabidopsis*pflanzen hergestellt, die ein *AtCKX3-GFP*-Fusionsgen unter Kontrolle der oben genannten Promotoren exprimierten. Im Rahmen meiner Arbeit wurden repräsentative Transformanten ausgewählt, homozygote Linien gefunden und anhand von zwei unabhängigen homozygoten Linien die Analyse verschiedener Wachstumsparameter durchgeführt. Informationen zu Segregationsanalysen und die Anzahl der chromosomalen T-DNA-Insertionen in den jeweiligen Linien sind im Anhang zu finden (Tabelle 16). Im Folgenden werden die *AtCKX3-GFP*-transgenen Linien nur als *CKX3*-transgen bezeichnet.

Tabelle 10: Vergleichende Übersicht über die Aktivitäten der verwendeten Promotoren bezüglich des Expressionsortes und der Entwicklungsphase der Pflanze.

BS, Blütenstadium (Smyth *et al.*, 1990); k.A., keine Angaben; OZ, Organisierendes Zentrum; SAM, Sprossapikalmeristem.

	<i>STM</i>	<i>WUS</i>	<i>CLV3</i>	<i>ANT</i>	<i>LFY</i>
Embryo					
	ab globulärem Stadium (32- bis 64-Zell-Stadium) in SAM-Vorläuferzellen ^{a, b}	ab globulärem Stadium (16-Zell-Stadium) in Vorläuferzellen des OZ ^f	ab Herzstadium in Vorläufern der Stammzellen ⁱ	ab globulärem Stadium in den Vorläuferzellen der Kotyledonen ^{b, j}	k.A.
Keimling / adulte Pflanze					
SAM	gesamtes SAM ^{a, c}	OZ ^f	Stammzellen ⁱ	–	–
Primordien von					
Kotyledonen	–	–	–	+ ^{b, j}	k.A.
Blättern	–	–	–	+ ^j	+ ^{l, m}
Blüten	ab dem Ende von BS 2 im Blütenmeristem ^{a, c}	BS 1 bis 5 (bis Karpellinitiation) ^{f, g}	BS 2 bis 5 (bis Karpellinitiation) ⁱ	BS 1 bis 2 ^j	BS 1 bis 3 (und bereits vorher in den Anlagen) ^l
Sepalen	–	–	–	BS 3 bis 5 ^j	BS 3 bis 4 ^l
Petalen	–	–	–	BS 5 bis 12 ^j	BS 6 bis 9 ^l
Staubblätter	–	–	–	BS 3 bis 10 ^j	BS 6 bis 9 ^l
Gynoeceum	zentral in zwei Leisten ^a	–	–	ab BS 5, Maximum in Plazenta in BS 7, prokambiale Zellen ^j	BS 6 bis 9 ^l
Samenanlagen	–	Nucellus ^h	–	ab BS 8 in Chalaza/inneres und äußeres Integument ^{h, j}	–
Weitere Organe oder Gewebe	Stängel ^{a, d, e} ; Hypokotyl (Xylem, Phloem) ^{d, e} ; Pedikel ^e	Staubblätter ^d	–	prokambiale Zellen in Stängeln und Filamenten reifer Staubblätter ^j ; junge Blätter und deren prokambiale Zellen ^{j, k}	junge Blätter, Vaskularsystem sich entwickelnder Stängel ^m

^a Long *et al.*, 1996; ^b Long und Barton, 1998; ^c Long und Barton, 2000; ^d Winter *et al.*, 2007; ^e Zimmermann *et al.*, 2004; ^f Mayer *et al.*, 1998; ^g Schoof *et al.*, 2000; ^h Groß-Hardt *et al.*, 2002; ⁱ Fletcher *et al.*, 1999; ^j Elliott *et al.*, 1996; ^k Kang *et al.*, 2007; ^l Weigel *et al.*, 1992; ^m Blázquez *et al.*, 1997.

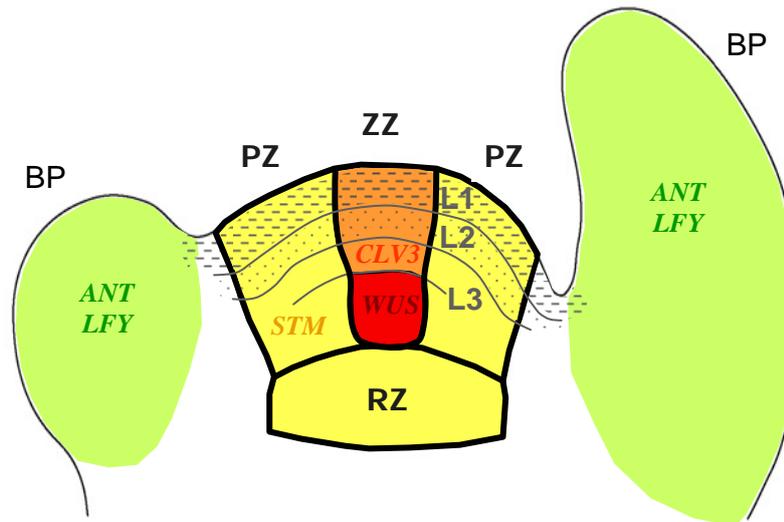


Abbildung 19: Schema des vegetativen Sprossapex. Dargestellt ist ein für dikotyle Pflanzen typisches Sprossapikalmeristem (SAM), das aus drei konzentrischen Zonen besteht (fett umrandet): einer zentralen Zone (ZZ) aus sich langsam teilenden Zellen, einer umschließenden peripheren Zone (PZ) aus sich schnell teilenden Zellen und einer darunter gelegenen Rippenzone (RZ), die Zellen für das innere Gewebe der Sprossachse abgliedert. Das SAM ist außerdem in drei Zellschichten unterteilt (L1, L2 und L3). L1 und L2 bestehen im Bereich des SAM aus jeweils einer Schicht sich antiklin teilender Zellen und bilden die sogenannte Tunica. Zellen der L3 teilen sich in allen Orientierungen und bilden den Korpus. Die zentrale Zone des SAM beinhaltet die Stammzellen und das darunter gelegenen Organisierenden Zentrum. Die Stammzellen umfassen sechs bis neun Zellen der drei äußeren Zellschichten und sind die Expressionsdomäne von *CLV3* (orange dargestellt). Das Organisierende Zentrum, das aus ca. zehn Zellen unterhalb der drei äußeren Zellschichten besteht, ist der Expressionsort von *WUS* (rot). Das gesamte SAM (ZZ, PZ und RZ) bildet die Expressionsdomäne von *STM* (gelb). Die periphere Zone gliedert die Organprimordien (hier Blattprimordien, BP) ab, in denen *ANT* und *LFY* exprimiert werden (grün). Die Abbildung ist modifiziert nach Tucker und Laux (2007). (Weigel *et al.*, 1992; Elliott *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998; Vernoux *et al.*, 2000; Groß-Hardt und Laux, 2003; Lenhard und Laux, 2003)

3.5.1 Auswirkung der *CKX3*-Expression im gesamten Sprossapikalmeristem auf das Pflanzenwachstum

Das Sprossapikalmeristem (SAM) ist eine kleine Gruppe pluripotenter Zellen an der Spitze des wachsenden Sprosses, aus denen kontinuierlich alle Organe des Sprosses hervorgehen. Das primäre SAM wird spät in der Embryogenese nach der Initiation der Kotyledonen angelegt (Barton und Poethig, 1993). In *Arabidopsis* ist an der Etablierung und der Aufrechterhaltung des SAMs wesentlich der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor SHOOTMERISTEMLESS (*STM*) beteiligt. Die Expression des *STM*-Gens erfolgt in allen SAMs, das heißt in vegetativen Meristemen (primäre und axilläre), in Infloreszenz- und in Blütenmeristemen. Dort ist die Aktivität des *STM*-Promotors strikt auf den Meristembereich begrenzt und nicht in Primordien von Blättern, Blüten und Blütenorganen sowie deren

Vorläufern (*founder cells*) detektierbar (Long *et al.*, 1996). Promotoraktivität wurde auch im Hypokotyl adulter Pflanzen und im Stängel gefunden (Long *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2007). Im Embryo ist der *STM*-Promotor noch vor der SAM-Initiation aktiv, und zwar in Zellen, aus denen das Embryo-SAM entsteht (Long *et al.*, 1996; Long und Barton, 1998). Die Verwendung des *STM*-Promotors für die *CKX3*-Expression sollte eine lokale Cytokinindefizienz in den SAMs der Pflanzen bewirken.

3.5.1.1 Auswahl *STM:CKX3*-transgener Arabidopsislinien und Expressionsanalysen

Die Erzeugung von *STM:CKX3*-transgenen Arabidopsispflanzen war aufgrund einer sehr geringen Transformationsrate schwierig. Zudem war die Expression des Transgens bei etwa 35 % der selektierten Keimlinge letal. In drei Selektionsrunden wurden insgesamt 29 Primärtransformanten erhalten, darunter zehn Pflanzen, die aber bald nach Überführung auf Erde starben. Die nicht überlebensfähigen Keimlinge bildeten *in vitro* ein primäres Sprossmeristem aus, was an der Bildung von Primärblättern zu erkennen war (Abbildung 20). Das Primärmeristem stellte aber seine Aktivität ein, so dass diese Keimlinge teilweise nur das erste Blattpaar bildeten. Die Keimlinge unterschieden sich deutlich von nicht transgenen, Hygromycin-sensitiven Keimlingen, da sie im Gegensatz zu letzteren Wurzelwachstum zeigten, das heißt die Verlängerung der Primärwurzel und teilweise auch die Bildung von Lateralwurzeln. Die lebensfähigen Pflanzen zeigten einen schwächeren Phänotyp, charakterisiert durch kleinere Rosetten, bzw. keinen Phänotyp.

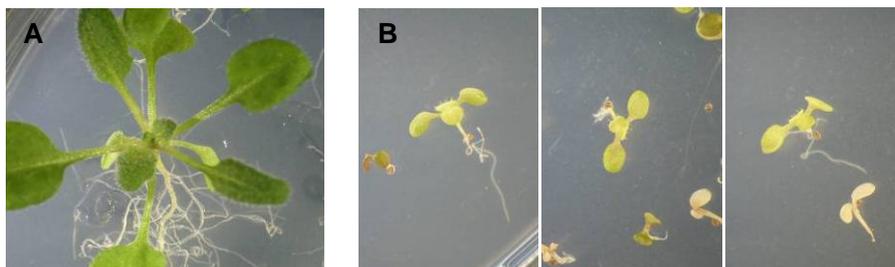


Abbildung 20: *STM:CKX3*-transgene Pflanzen der T1-Generation. (A) Pflanze ohne Phänotyp und (B) Pflanzen mit starkem Phänotyp 17 TNA. Die *STM:CKX3*-Expression war letal, die Keimlinge entwickelten nur das erste Blattpaar.

Für die anschließende phänotypische Charakterisierung wurden die homozygoten *STM:CKX3*-transgenen Linien 6-1 und 16-7 verwendet, die in der T1-Generation einen schwachen Phänotyp, das heißt kleinere Rosetten, aufwiesen. Die Expression des *CKX3*-

Transgens in diesen Linien wurde in sechs Tage alten Keimlingen der T3-Generation mittels semiquantitativer RT-PCR-Analyse überprüft. Zusätzlich wurde mit Hilfe dieser Analyse die gesamte *CKX3*-Transkriptmenge untersucht, das heißt die Expression von transgenem und endogenem *CKX3*. Weiterhin wurde die *STM*-Transkriptmenge bestimmt, um ein *silencing* des *STM*-Gens durch das Transgen auszuschließen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Expression des *CKX3*-Transgens konnte nachgewiesen werden, ebenso die Erhöhung der Gesamt-*CKX3*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp sowie die unveränderte Expression des *STM*-Gens.



Abbildung 21: Homozygote *STM:CKX3*-transgene Pflanzen der T4-Generation im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX3*-transgener Pflanze 42 TNA. Die Pfeile kennzeichnen die Hauptstängel.

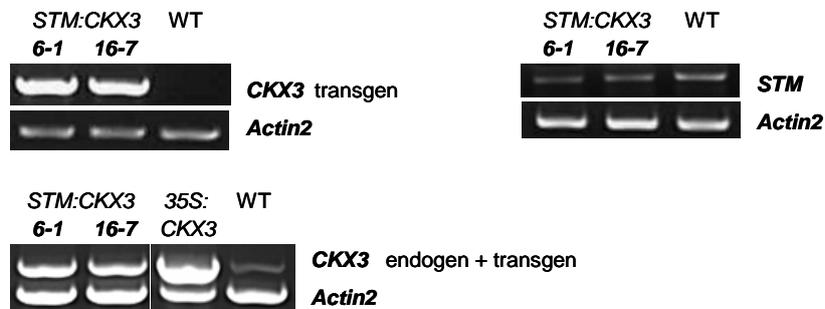


Abbildung 22: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Transkripte von transgenem *CKX3*, Gesamt-*CKX3* und *STM* in *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen. Für die RT-PCR-Analyse wurde RNA aus sechs Tage alten Keimlingen der T3-Generation isoliert. Als Kontrolle diente *Actin2*. Für den Transkriptnachweis wurden für transgenes *CKX3* 37 Reaktionszyklen, für Gesamt-*CKX3* und *STM* 40 Reaktionszyklen und für *Actin2* 24 Reaktionszyklen (*CKX3* transgen, *STM*) bzw. 40 Reaktionszyklen mit einem Viertel der üblichen Primerkonzentration (Gesamt-*CKX3*) durchgeführt.

3.5.1.2 Phänotypische Charakterisierung von *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen

Die Bestimmung verschiedener Wachstumsparameter erfolgte mit Pflanzen der T4-Generation der homozygoten Linien 6-1 und 16-7 (Abbildung 21). Wachstum und

Entwicklung des Sprosses waren bei den *STM:CKX3*-transgenen Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen etwas verzögert. So waren die Durchmesser der Hauptrosetten der transgenen Linien 28 TNA signifikant um etwa 10-13 % kleiner als Wildtyprosetten, jedoch wurde die wildtypische Rosettengröße 35 TNA noch erreicht (Abbildung 23A). Die Bildung neuer Rosettenblätter während des vegetativen Wachstums war verzögert. Bezogen auf den Wachstumszeitraum bis zum Blühbeginn betrug das Plastochron der transgenen Pflanzen $2,0 \pm 0,2$ Tage/Blatt (Linie 6-1) bzw. $1,8 \pm 0,2$ Tage/Blatt (Linie 16-7) gegenüber $1,6 \pm 0,1$ Tage/Blatt beim Wildtyp (Abbildung 23C). Der Wechsel zur reproduktiven Phase erfolgte bei den *STM:CKX3*-transgenen Linien unter Langtagbedingungen zwei Tage später als bei Wildtyppflanzen, und zwar $23,5 \pm 1,2$ TNA (Linie 6-1) bzw. $23,5 \pm 1,0$ TNA (Linie 16-7) gegenüber $21,5 \pm 1,0$ TNA beim Wildtyp (Abbildung 23B). Bei *CKX3*-überexprimierenden Pflanzen war die Dauer der vegetativen Phase im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt und das Plastochron betrug $2,6 \pm 0,5$ Tage/Blatt (Abbildung 23B und C).

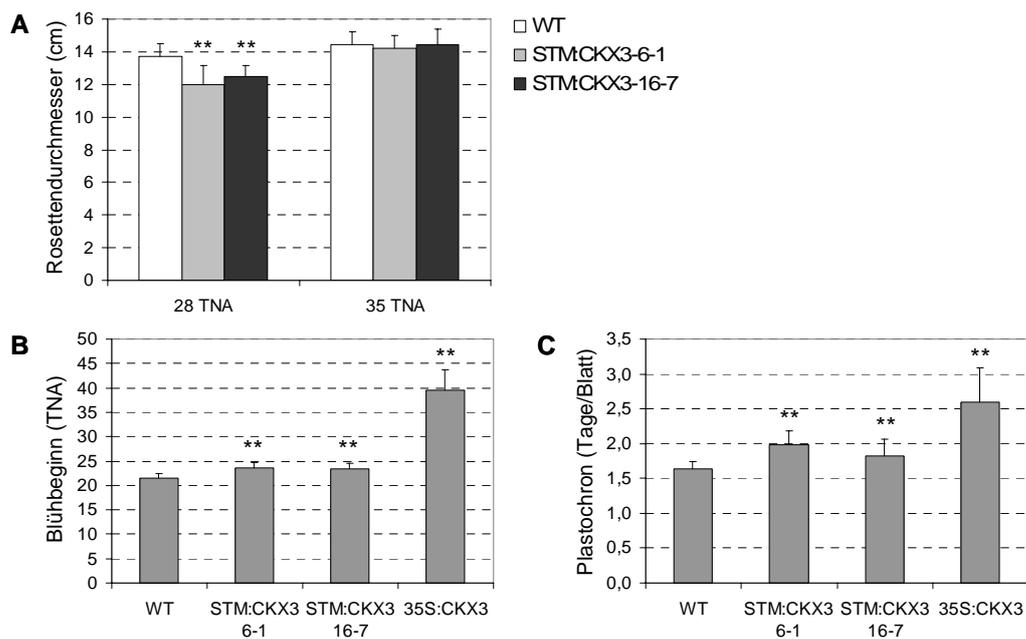


Abbildung 23: Rosettenwachstum und Übergang zur reproduktiven Phase *STM:CKX3*-transgener Pflanzen unter Langtagbedingungen. **(A)** Durchmesser der Hauptrosetten nach dem Wechsel zur reproduktiven Phase von *STM:CKX3*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp 28 TNA und 35 TNA ($n = 10-20$). **(B)** Blühbeginn und **(C)** Plastochron von *STM:CKX3*-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und 35S:*CKX3*-Pflanzen ($n = 14-20$). Als Blühbeginn wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem der Blütenstand eine Länge von 5 mm erreicht hat. Das Plastochron wurde aus dem Wachstumszeitraum bis zum Blühbeginn und der Anzahl der bis dahin gebildeten Blätter der Hauptrosette ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. ** $P < 0,01$.

Auffällig an den *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen waren die im Vergleich zum Wildtyp dünneren, häufig niederliegenden Hauptstängel (Abbildung 21), deren Länge signifikant um 21 % (Linie 6-1) bzw. 14 % (Linie 16-7) der Wildtyplänge reduziert waren (Abbildung 24A). Bei nahezu allen transgenen Pflanzen (100 % bei Linie 6-1, 94 % bei Linie 16-7) war ein Teil der axillären Infloreszenzen höher als der Hauptspross, was bei Wildtyppflanzen nie beobachtet wurde. Die Länge des höchsten axillären Sprosses war um 26 % (Linie 6-1) bzw. 14 % (Linie 16-7) höher als die Hauptsprosslänge. Die Anzahl der axillären Sprosse der *STM:CKX3*-Pflanzen war zudem verglichen mit dem Wildtyp verdoppelt (Abbildung 24B), was auf eine reduzierte Apikaldominanz hinweist. Da insbesondere die axillären Infloreszenzen sehr lange blühten, verlängerte sich deutlich die reproduktive Phase der *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

STM:CKX3-transgene Pflanzen zeigten des Weiteren Veränderungen in der Schotenproduktion. Die Schotenzahlen am Hauptstängel waren signifikant um 23 % (Linie 6-1) bzw. 19 % (Linie 16-7) reduziert (Abbildung 24C), wobei die mittlere Schotendichte (Zahl der Schoten pro cm Stängel) am Hauptstängel nur bei Linie 16-7 gering um 10 % erniedrigt war (Abbildung 24D). Folglich resultierte die reduzierte Schotenzahl hauptsächlich aus der verringerten Länge des Hauptstängels. Bei *CKX3*-überexprimierenden Pflanzen, deren Hauptsprosslänge nur etwa 50 % der Wildtyplänge betrug (Abbildung 24A), war die Zahl der Schoten am Hauptstängel mit 36 % des Wildtypwertes noch stärker reduziert, was neben der reduzierten Sprosslänge auch aus der um 30 % reduzierten Schotendichte resultierte (Abbildungen 24C und D).

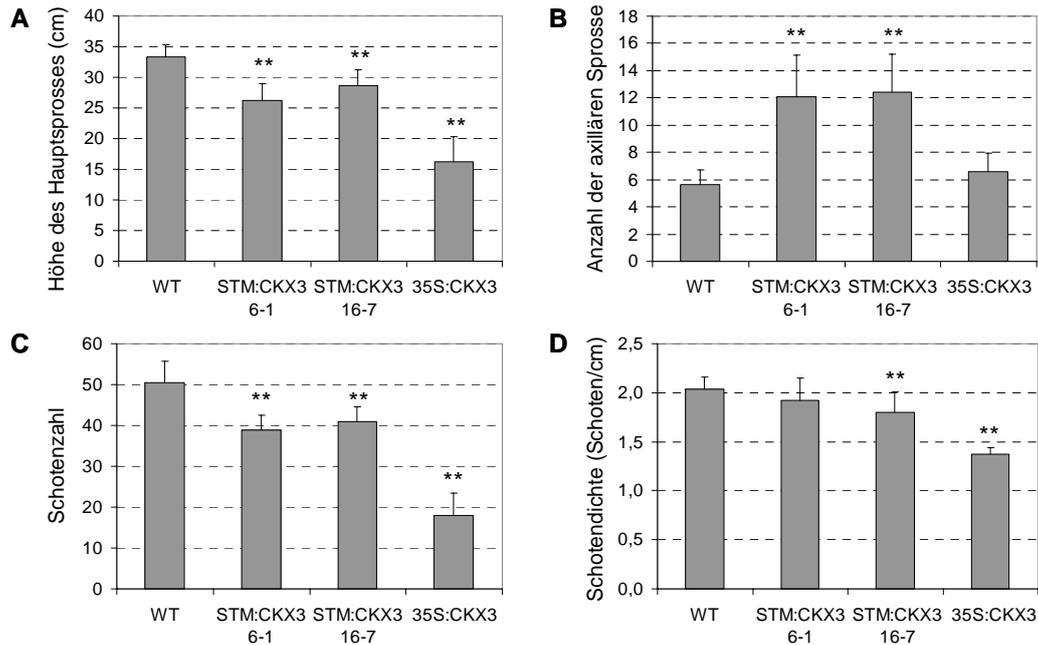


Abbildung 24: Sprosswachstum in der reproduktiven Phase und Schotenproduktion *STM:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-Pflanzen. **(A)** Höhe des Hauptsprosses. **(B)** Anzahl der axillären Sprosse. **(C)** Schotenanzahl am Hauptstängel. **(D)** Mittlere Schotendichte am Hauptstängel. Alle Parameter (A-D) wurden zum Zeitpunkt der Termination des Hauptsprosses bestimmt (WT 45 TNA; *STM:CKX3* 49 TNA; *35S:CKX3* 64-71 TNA). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 9-18$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. ** $P < 0,01$.

3.5.2 Auswirkung der *CKX3*-Expression im Organisierenden Zentrum und in den Stammzellen

Die *STM*-Expressionsdomäne umfasst mit Ausnahme der Primordienvorläufer das gesamte SAM, das heißt die zentrale und die periphere Zone sowie die Rippenzone des Apikalmeristems (Abbildung 19). Für eine bessere räumliche Auflösung der Cytokinindefizienzwirkung wurde der Bereich der *CKX3*-Expression innerhalb des SAM noch weiter eingegrenzt, indem die *CKX3*-Expression unter Kontrolle der Promotoren von *WUSCHEL* (*WUS*) bzw. *CLAVATA3* (*CLV3*) gestellt wurde.

WUS kodiert einen Homoedomänen-Transkriptionsfaktor und wird in vegetativen und reproduktiven SAMs in einer kleinen zentralen Zellgruppe unterhalb der drei äußeren Zellschichten, in Blütenmeristemen unterhalb der zwei äußeren Zellschichten, exprimiert, dem sogenannten Organisierenden Zentrum (*organizing centre*; Mayer *et al.*, 1998). Das Organisierende Zentrum befindet sich direkt unterhalb der Stammzellen und bildet mit diesen die zentrale Zone des SAM (Abbildung 19). Bei den Stammzellen handelt es sich um eine

kleine, apikal gelegene Zellgruppe in den drei äußeren Zellschichten vegetativer und reproduktiver SAMs. Sie sind die Expressionsdomäne von *CLV3*, das ein extrazelluläres Polypeptid kodiert (Fletcher *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2002). Die Expression von *WUS* und *CLV3* setzt bereits während der Embryogenese ein. *WUS*-Expression wird im 16-Zell-Embryo initiiert und ist während der weiteren Entwicklung auf eine kleine Zellgruppe unterhalb der Stammzellvorläufer des embryonischen Sprossmeristems begrenzt (Mayer *et al.*, 1998). Die Expression von *CLV3* setzt erst im Herzstadium des Embryos ein und ist auf die zukünftigen Stammzellen beschränkt (Fletcher *et al.*, 1999; Brand *et al.*, 2002).

3.5.2.1 Auswahl *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgener Arabidopsislinien und Analyse des Phänotyps der Keimlinge

Bei der *in vitro* Selektion mit Hilfe des Hygromycinresistenzmarkers wurden 153 *WUS:CKX3*-transgene und 247 *CLV3:CKX3*-transgene Primärtransformanten erhalten, von denen 87 bzw. 142 Pflanzen weiter unter Gewächshausbedingungen beobachtet wurden. Die meisten dieser Pflanzen zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Lediglich wenige Transformanten unterschieden sich durch kleinere Rosetten und die Ausbildung axillärer Sprosse anstelle der Hauptinfloreszenzen von Wildtyppflanzen. Es wurden 13 *WUS:CKX3*- und 20 *CLV3:CKX3*-Transformanten weiter in der T2-Generation verfolgt. Bei der *in vitro* Kultur dieser Linien auf MS-Nährmedium mit Hygromycin wurde vereinzelt ein Keimlingsphänotyp vorgefunden, der auch bereits bei einigen Primärtransformanten beobachtet wurde. Dieser Phänotyp war gekennzeichnet durch das Fehlen des primären Sprossmeristems verbunden mit der Bildung mehrerer sekundärer Meristeme und/oder durch fehlende oder missgebildete erste Blätter (Abbildung 25). Er wurde bei jeweils etwa der Hälfte der *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen T2-Linien gefunden und betraf 1-7 % der transgenen Pflanzen der jeweiligen Linien. Die Nachkommen von 13 unabhängigen *WUS:CKX3*- und sechs unabhängigen *CLV3:CKX3*-Linien wurden weiter in der T3-Generation untersucht, wo der Keimlingsphänotyp bei fast allen Linien mit einer Penetranz von 1-10 % der auf Hygromycin selektierten transgenen Pflanzen vorgefunden wurde.

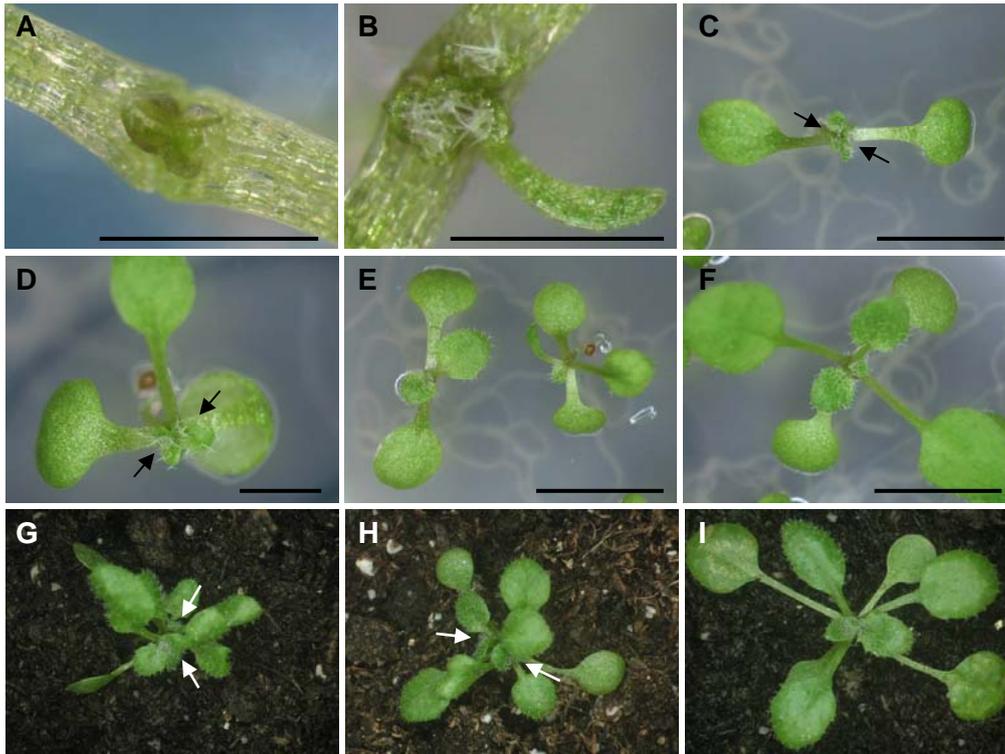


Abbildung 25: Beispiele für den Keimlingsphänotyp von *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen. (A-E) *WUS:CKX3*-transgene Keimlinge 10 TNA (A) bzw. 13 TNA (B-E). Die Abbildungen (A-D) zeigen Keimlinge, die sekundäre Meristeme bildeten und Blätter des ersten Blattpaares nicht oder missgebildet entwickelten. In (E) sind Keimlinge mit primärem Meristem abgebildet, die das erste Blattpaar nicht oder teilweise missgebildet entwickelten. (F) Wildtyp 13 TNA. (G-I) Juvenile *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenene Pflanzen (G und H) im Vergleich zum Wildtyp (I) 18 TNA. Die Sprosse der transgenen Pflanzen blieben auch in der weiteren Entwicklung kleiner als Wildtypsprosse. (A, B und D) Messbalken = 1 mm; (C, E und F) Messbalken = 5 mm; (G-I) Die Bilder wurden mit gleicher Vergrößerung aufgenommen. Die Pfeile kennzeichnen sekundär gebildete Sprosse.

Bei nachfolgenden Untersuchungen wurde beobachtet, dass der Keimlingsphänotyp nur in Gegenwart von Hygromycin auftrat, jedoch nicht bei Wachstum auf Erde oder Medium ohne Hygromycin. Zudem trat er in Gegenwart des Antibiotikums bei Wachstum auf Ats-Nährmedium häufiger auf als bei Wachstum auf MS-Nährmedium. Die Quantifizierung des Keimlingsphänotyps bei jeweils vier unabhängigen homozygoten *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Linien zeigte, dass in Anwesenheit von Hygromycin etwa 1-6 % der Keimlinge auf MS-Nährmedium diesen Phänotyp zeigten, während auf Ats-Nährmedium bei den meisten Linien 100 % der Keimlinge betroffen waren (Tabelle 11). Vergleicht man nur die Keimlinge, die einen Keimlingsphänotyp aufwiesen, so war die Entwicklung dieser Keimlinge auf Ats-Medium sogar noch drastischer gestört als die der Keimlinge auf MS-Medium. Das heißt auf Ats-Medium bildeten diese Keimlinge häufiger sekundäre Meristeme

anstelle des primären SAM und die ersten Blätter fehlten und/oder waren missgebildet, während Keimlinge auf MS-Medium seltener sekundäre Meristeme bildeten und keine Blattmissbildungen zeigten.

Tabelle 11: Häufigkeit des Keimlingsphänotyps von *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen bei *in vitro* Kultur in Abhängigkeit von Hygromycin und Nährmedium. Die Nährmedien (MS oder Ats) enthielten 1 % Saccharose. Die Hygromycinkonzentration betrug 15 mg/l. Es wurden mindestens 80 Keimlinge der T4-Generation 10 TNA ausgewertet.

	Wachstum ohne Hygromycin		Wachstum mit Hygromycin	
	MS	Ats	MS	Ats
<i>WUS:CKX3-14-1</i>	0 %	0,2 % ^a	2,5 % ^b	100 % ^c
<i>WUS:CKX3-16-3</i>	0 %	0 %	3 % ^b	100 % ^c
<i>WUS:CKX3-19-4</i>	0 %	0 %	2 % ^b	100 % ^c
<i>WUS:CKX3-21-5</i>	0 %	0 %	3 % ^b	100 % ^c
<i>CLV3:CKX3-5-2</i>	0 %	0 %	5,8 % ^b	100 % ^c
<i>CLV3:CKX3-7-2</i>	0 %	0 %	1 % ^b	5,2 % ^c
<i>CLV3:CKX3-13-2</i>	0 %	0 %	3 % ^b	100 % ^c
<i>CLV3:CKX3-45-2</i>	0 %	0 %	1 % ^b	26 % ^c

^a Ein Blatt des ersten Blattpaares fehlte.

^b Ein Blatt des ersten Blattpaares fehlte und vereinzelt wurden anstelle des primären Meristems sekundäre Meristeme gebildet.

^c Ein oder beide Blätter des ersten Blattpaares fehlten und/oder waren missgebildet und anstelle des primären Meristems wurden häufig sekundäre Meristeme gebildet.

Der beobachtete Phänotyp konnte möglicherweise allein durch Hygromycin verursacht worden sein oder aber aus der lokalen Cytokindefizienz durch die spezifische *CKX3*-Expression resultieren, die jedoch nur unter Selektionsdruck eine Wirkung auf das Pflanzenwachstum zeigte. Um dies zu überprüfen, wurde das Wachstumsverhalten der transgenen Keimlinge in Gegenwart eines chemischen CKX-Inhibitors (Zatloukal *et al.*, 2008) überprüft. Falls der Phänotyp durch die *CKX3*-Expression verursacht wurde, sollte er durch die Wirkung des CKX-Inhibitors kompensiert oder gemildert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Häufigkeit des Keimlingsphänotyps durch den CKX-Inhibitor reduziert wurde, wobei dieser reduzierende Effekt bei Nährmedium ohne Saccharose stärker war als bei Medium mit 1 % Saccharose (Tabelle 12). So reduzierte sich der Anteil der *WUS:CKX3*-transgenen Keimlinge mit Phänotyp in Gegenwart von CKX-Inhibitor mit Saccharose um 41 % und ohne Saccharose um 56 % (Linie 19-4). Bei *CLV3:CKX3*-transgenen Keimlingen der Linie 5-2 war die Reduktion des Phänotyps nicht so stark; sie betrug nur 2 % mit Saccharose und 21 % ohne Saccharose. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Saccharose die Penetranz des Keimlings-

phänotyps bei beiden Linien erhöhte - sowohl mit als auch ohne CKX-Inhibitor im Medium (Tabelle 12). Es muss außerdem betont werden, dass Keimlinge, die in Gegenwart von Hygromycin und CKX-Inhibitor den beschriebenen Phänotyp nicht zeigten, dennoch nicht wildtypisch aussahen, sondern deutlich kleinere Kotyledonen und Primärblätter hatten.

Tabelle 12: Häufigkeit des Keimlingsphänotyps von *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen bei *in vitro* Kultur in Abhängigkeit von Hygromycin, CKX-Inhibitor und Saccharose. Die Konzentrationen der zugegebenen Substanzen im Ats-Nährmedium betragen 15 mg/l Hygromycin, 0,1 µM CKX-Inhibitor und 1 % Saccharose. Der Keimlingsphänotyp war gekennzeichnet durch Fehlen und/oder Missbildung eines oder beider Blätter des ersten Blattpaares und der Bildung sekundärer Meristeme anstelle des primären Meristems. Es wurden 31-42 Keimlinge der T4-Generation 9 TNA ausgewertet.

	Saccharose	Ats	Ats + Hyg	Ats + Hyg + CKX-Inhibitor
<i>WUS:CKX3-19-4</i> <i>CLV3:CKX3-5-2</i>	+	0 % 0 %	93 % 98 %	52 % 95 %
<i>WUS:CKX3-19-4</i> <i>CLV3:CKX3-5-2</i>	-	0 % 0 %	76 % 82 %	20 % 61 %

3.5.2.2 Expressionsanalysen *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgener Pflanzen

Für weitere Untersuchungen wurden die homozygoten *WUS:CKX3*-transgenen Linien 14-1 und 19-4 und die homozygoten *CLV3:CKX3*-transgenen Linien 5-2 und 45-2 herangezogen (Abbildungen 27B und C). Die Expression des *CKX3*-Transgens in den *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Linien wurde in acht Tage alten Keimlingen der T3-Generation mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 26). Des Weiteren wurde die Erhöhung der Gesamt-*CKX3*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp detektiert und durch den Nachweis des *WUS*- bzw. des *CLV3*-Transkriptes ein *silencing* dieser Gene durch das Transgen ausgeschlossen (Abbildung 26).

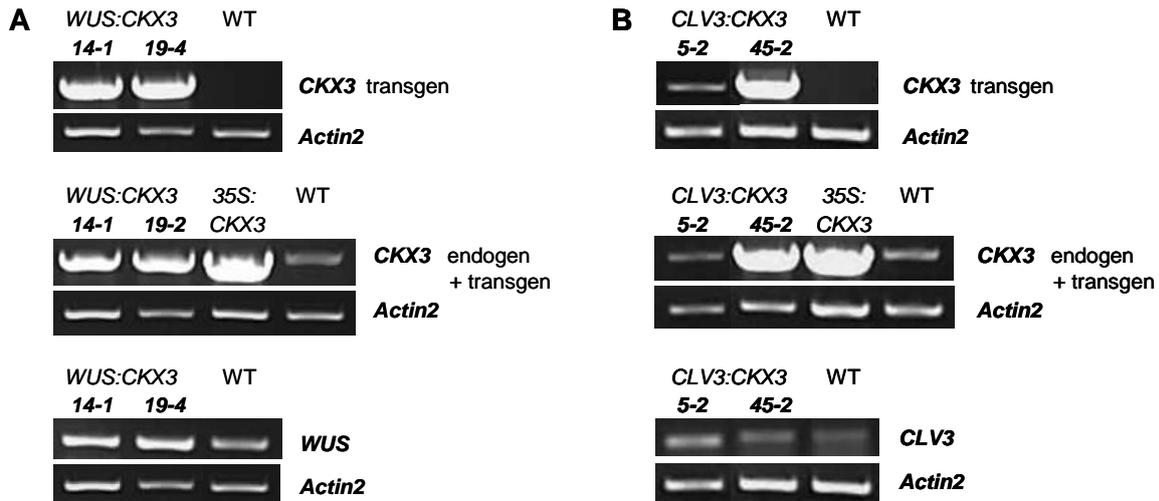


Abbildung 26: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Transkripte von transgenem *CKX3*, Gesamt-*CKX3* und *WUS* bzw. *CLV3* in *WUS:CKX3*-transgenen (A) und *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen (B). Für die RT-PCR-Analyse wurde RNA aus acht Tage alten Keimlingen der T3-Generation isoliert. Als Kontrolle diente *Actin2*. Für den Transkriptnachweis wurden bei transgenem *CKX3* 37 Reaktionszyklen, bei Gesamt-*CKX3* 40 (A) bzw. 41 (B) Reaktionszyklen, bei *WUS* und *CLV3* 40 Reaktionszyklen und bei *Actin2* 24 Reaktionszyklen durchgeführt.

3.5.2.3 Phänotypische Charakterisierung von *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen

WUS:CKX3- und *CLV3:CKX3*-transgene Pflanzen, die im Keimlingsstadium das primäre SAM nicht entwickelt und stattdessen ein oder mehrere sekundäre Sprossmeristeme gebildet hatten, zeigten in ihrer weiteren Entwicklung ein verzögertes und reduziertes Sprosswachstum, das heißt die Sprosshöhen waren verringert, der Rosettendurchmesser reduziert (Abbildung 27A) und das Einsetzen der Seneszenz verzögert. Pflanzen, die keinen Keimlingsphänotyp gezeigt hatten, unterschieden sich kaum vom Wildtyp. Für die Analyse verschiedener Wachstumsparameter wurden die *WUS:CKX3*-transgenen Linien 14-1 und 19-4 und die *CLV3:CKX3*-transgenen Linien 5-2 und 45-2 der T4-Generation verwendet, die ohne Selektionsdruck durch Hygromycin herangezogen wurden und somit keinen Keimlingsphänotyp aufwiesen (Abbildungen 27B und C). Die Ergebnisse zeigten, dass bei den transgenen Pflanzen der Übergang vom vegetativen zum generativen Wachstum nur ein bis zwei Tage später erfolgte als beim Wildtyp (Abbildung 28A) und das Plastochron unverändert war. Die Höhe der Sprosse war bei den transgenen Pflanzen nicht signifikant verändert und die Anzahl der Schoten am Hauptstängel variierte nur gering (Abbildungen 28B und D). Die axilläre Sprossverzweigung war nur bei *CLV3:CKX3*-5-2 mit einer Reduktion der Anzahl der axillären Infloreszenzen um etwa 50 % im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert

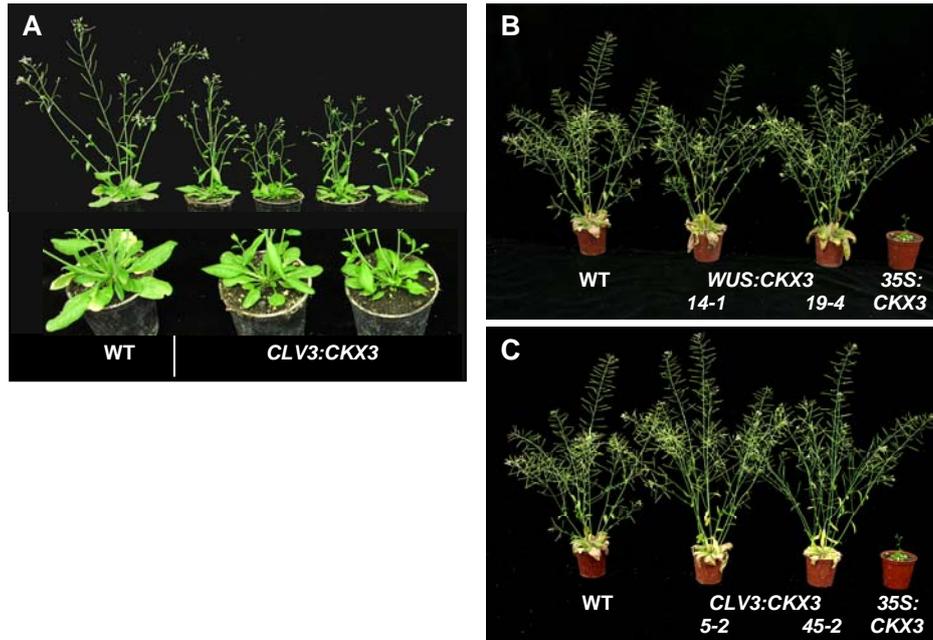


Abbildung 27: Adulte homozygote *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgene Pflanzen. (A) Beispiel für Pflanzen, die im Keimlingsstadium sekundäre Meristeme anstelle des primären SAMs bildeten. Abgebildet sind Wildtyp und *CLV3:CKX3*-transgene Pflanzen der T3-Generation 39 TNA. (B) *WUS:CKX3*-transgene und (C) *CLV3:CKX3*-transgene Pflanzen der T4-Generation im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX3*-transgener Pflanze 42 TNA. Die Pflanzen zeigten keinen Keimlingsphänotyp.

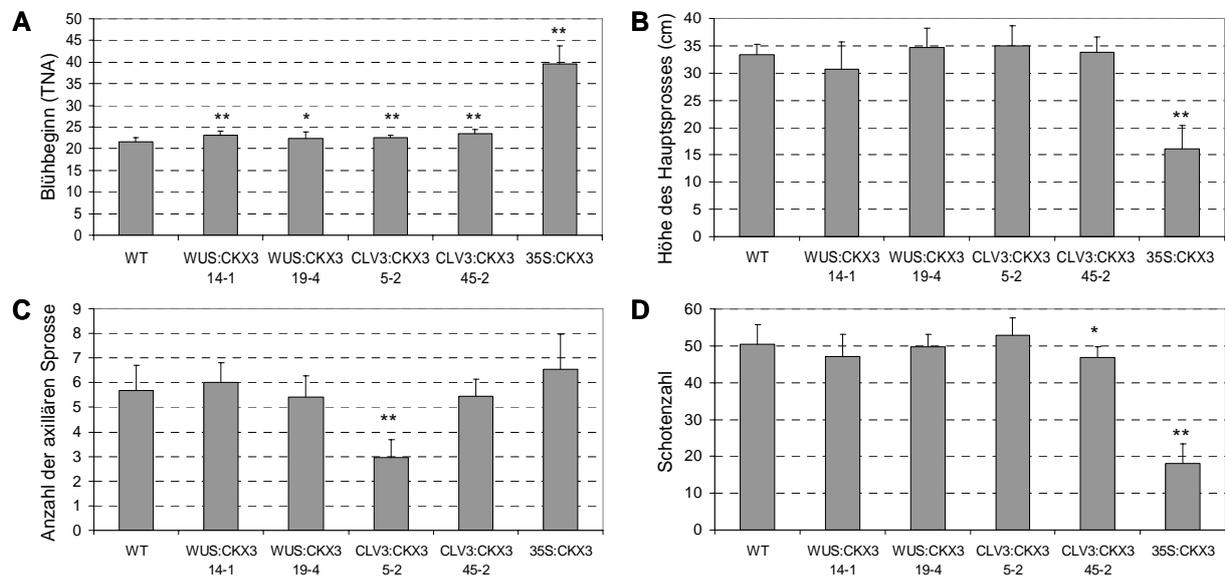


Abbildung 28: Blühbeginn, Sprosswachstum in der reproduktiven Phase und Schotenproduktion *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-Pflanzen. (A) Blühbeginn unter Langtagbedingungen. (B) Höhe des Hauptsprosses. (C) Anzahl der axillären Sprosse. (D) Schotenzahl am Hauptstängel. Die Parameter in (B-D) wurden zum Zeitpunkt der Termination des Hauptsprosses bestimmt (*WT*, *WUS:CKX3* und *CLV3:CKX3* 45 TNA; *35S:CKX3* 64-71 TNA). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 9-20$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

(Abbildung 28C). Auch bei *WUS:CKX3*- und *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen wurde beobachtet, dass einige axilläre Infloreszenzen höher waren als die Hauptinfloreszenzen. Dies war bei 10 % bzw. 40 % der *WUS:CKX3*-transgenen Pflanzen der Linien 14-1 bzw. 19-4 und bei 44 % der *CLV3:CKX3*-transgenen Pflanzen der Linie 45-2 der Fall. Die Längenunterschiede waren jedoch sehr gering.

3.5.3 Auswirkung der *CKX3*-Expression in den Primordien der Sprossorgane

Mit den Promotoren von *STM*, *WUS* und *CLV3* wurden bei der Analyse der Auswirkung der domänenspezifischen Expressionen von *CKX3* verschiedene Domänen in apikalen Meristemen des Sprosses abgedeckt. Neben dem SAM sind ebenfalls die Primordien der Sprossorgane, die von den SAMs abgegliedert werden, wichtige *sink*-Gewebe. Es wurde daher auch die Auswirkung von Cytokinindefizienz in den Organprimordien untersucht, um zu klären, ob diese Domänen für die Regulation von Wachstum und Entwicklung der Pflanze, insbesondere der Blätter, durch Cytokinin wichtig sind. Die Expression des *CKX3*-Gens wurde dazu unter die Kontrolle der Promotoren von *AINTEGUMENTA (ANT)* und *LEAFY (LFY)* gestellt.

Die Expression von *ANT*, das einen Transkriptionsfaktor der *APETALA2*-Domänenfamilie kodiert, erfolgt bereits im Embryo der globulären Phase in den Vorläufern der Keimblattprimordien (Elliott *et al.*, 1996). In der weiteren Entwicklung ist der *ANT*-Promotor in den Primordien der Keimblätter, der Blätter, der Blüten und aller Blütenorgane sowie in sich entwickelnden Samenanlagen aktiv (Elliott *et al.*, 1996). *ANT*-Expression wurde auch in prokambialen Zellen vor und während der vaskulären Differenzierung in sehr jungen Blättern (Kang *et al.*, 2007) und in prokambialen Zellen sich entwickelnder Stängel, Staubblattfilamenten und Gynoeceen (Elliott *et al.*, 1996) detektiert.

Der *LFY*-Promotor ist ebenfalls in den Organprimordien aktiv, jedoch ist die Aktivität im Gegensatz zum *ANT*-Promotor in Blattprimordien schwach und steigt erst mit dem Wechsel zur reproduktiven Phase stark an (Blázquez *et al.*, 1997). *LFY*-Expression wurde in Blattprimordien und jungen Blättern nachgewiesen sowie in Primordien der Blüten und aller Blütenorgane (Weigel *et al.*, 1992; Blázquez *et al.*, 1997). Der Vergleich der Expressionsstärke von *ANT* und *LFY* zeigt, dass beispielsweise der Expressionslevel von *ANT* in der vegetativen Rosette vierfach, im vegetativen Sprossapex achtfach und in jungen Blüten (Stadium 10/11; Smyth *et al.*, 1990) zehnfach höher ist im Vergleich zu der *LFY*-Expression.

Der Expressionslevel von *LFY* im Infloreszenzapex ist hingegen nur 1,4-fach erhöht gegenüber der *ANT*-Expression (Winter *et al.*, 2007).

3.5.3.1 Auswahl *ANT:CKX3*- und *LFY:CKX3*-transgener Arabidopsislinien und Expressionsanalysen

Die *in vitro* Selektion der *ANT:CKX3*-Primärtransformanten ergab 41 transgene Pflanzen, von denen alle weiter unter Gewächshausbedingungen beobachtet wurden. Die Pflanzen der T1-Generation hatten meist kleinere Rosetten als Wildtyppflanzen sowie einen sehr verzögerten Blühbeginn. Es wurden 16 Linien weiter in der T2-Generation und fünf Linien in der T3-Generation analysiert.

Bei der Selektion der *LFY:CKX3*-Primärtransformanten wurden 183 transgene Pflanzen erhalten. Von den selektierten Pflanzen wurden 24 weiter auf Erde beobachtet. Viele Pflanzen bildeten kürzere Schoten und Pflanzen mit den kürzesten Schoten zeigten auch eine Reduktion der Sprosshöhe. Weiter analysiert wurden 17 Linien der T2-Generation und zehn Linien in der T3-Generation.

Für die genauere Analyse wurden die homozygoten *ANT:CKX3*-transgenen Linien 5-7 und 6-2 und die homozygoten *LFY:CKX3*-transgenen Linien 21-2 und 22-6 gewählt. Die Expression des *CKX3*-Transgens in den transgenen Linien wurde in sechs Tage alten Keimlingen der T3-Generation mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR-Analyse nachgewiesen (Abbildung 29). Außerdem wurde die Erhöhung der Transkriptmenge an Gesamt-*CKX3* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Durch die Detektion einer unveränderten *ANT*- bzw. *LFY*-Transkriptmenge wurde ein *silencing* dieser Gene durch das Transgen ausgeschlossen (Abbildung 29).

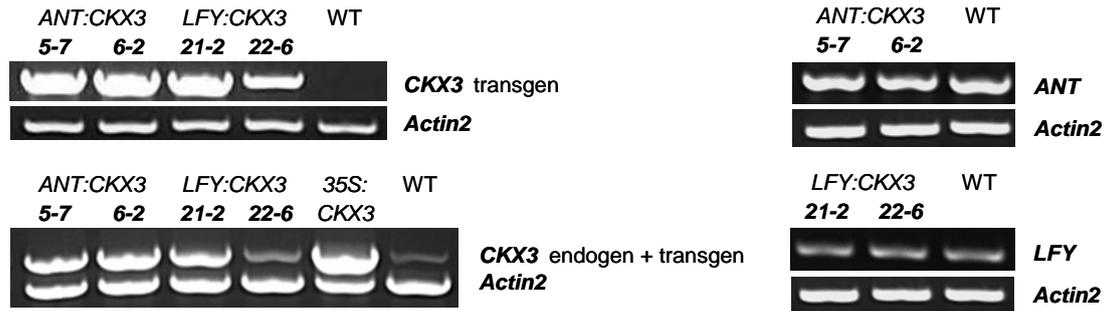


Abbildung 29: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Transkripte von transgenem *CKX3*, Gesamt-*CKX3* und *ANT* bzw. *LFY* in *ANT:CKX3*- und *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen. Für die RT-PCR-Analyse wurde RNA aus sechs Tage alten Keimlingen der T3-Generation isoliert. Als Kontrolle diente *Actin2*. Für den Transkriptnachweis wurden bei transgenem *CKX3* 37 Reaktionszyklen, bei Gesamt-*CKX3* 40 Reaktionszyklen, bei *ANT* 35 Reaktionszyklen, bei *LFY* 44 Reaktionszyklen und bei *Actin2* 24 Reaktionszyklen (*CKX3* transgen, *ANT*, *LFY*) bzw. 40 Reaktionszyklen mit einem Viertel der üblichen Primerkonzentration (Gesamt-*CKX3*) durchgeführt.

3.5.3.2 Phänotypische Charakterisierung von *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen

Die Bestimmung verschiedener Wachstumsparameter erfolgte mit Pflanzen der T4-Generation der homozygoten Linien 5-7 und 6-2 (Abbildung 30F). Wachstum und Entwicklung des Sprosses waren bei *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen stark verzögert und reduziert. Die transgenen Pflanzen zeigten ein deutlich verringertes Rosettenwachstum, das heißt der Durchmesser der Hauptrosetten war 28 TNA um 52 % (Linie 5-7) bzw. 45 % (Linie 6-2) reduziert im Vergleich zu Wildtyprosetten und 35 TNA um etwa 40 % (Abbildung 30D). Die Rosettenblätter der transgenen Pflanzen hatten sowohl kleinere Blattspreiten als auch kürzere Petiolen sowie teilweise veränderte Blattformen verglichen mit dem Wildtyp. So waren die Blätter 6 und 7 rundlich bis oval im Gegensatz zu den elliptischen bis lanzettlichen Wildtypblättern (Abbildung 30B).

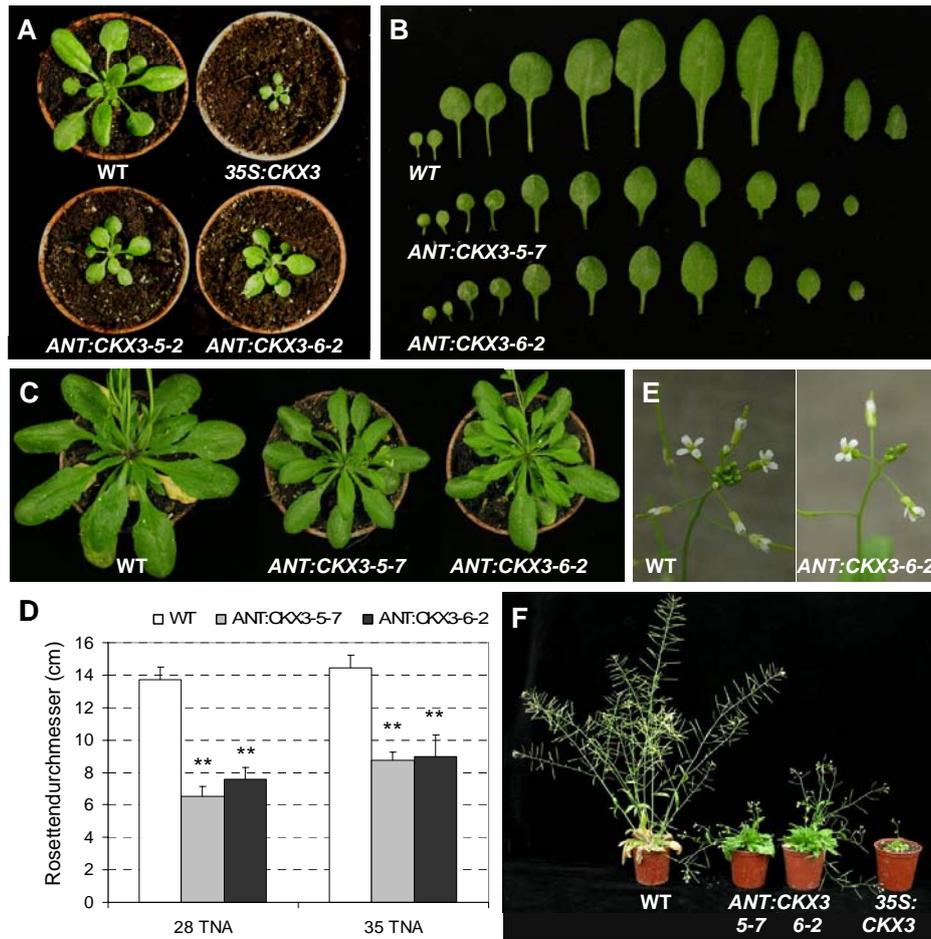


Abbildung 30: Sprosswachstum und Blütenbildung homozygoter *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen. **(A)** Rosetten *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen (Generation T5) im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX3*-transgener Pflanze 24 TNA. **(B)** Kotyledonen und Rosettenblätter von *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Blätter stammen von den Pflanzen aus (A). **(C)** Rosetten *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen (Generation T4) im Vergleich zum Wildtyp 39 TNA. **(D)** Rosettendurchmesser von *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp 28 TNA und 35 TNA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 15-20$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. $**P < 0,01$. **(E)** Blütenstände von Wildtyp und *ANT:CKX3*-transgenen Pflanze im Vergleich 37 TNA. Transgene Pflanzen bildeten weniger Blütenknospen pro Infloreszenz als Wildtyppflanzen. **(F)** *ANT:CKX3*-transgene Pflanzen der T4-Generation in der reproduktiven Phase im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX3*-transgener Pflanze 42 TNA. *ANT:CKX3*-transgene Pflanzen bildeten verstärkt axilläre Rosetten.

Um zu klären, ob die Reduktion der Blattgröße bei den *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen durch eine reduzierte Zellzahl oder durch reduzierte Zellgrößen verursacht wurde, erfolgte eine Analyse dieser Parameter bei Wildtyp-, *ANT:CKX3-5-7*- und *35S:CKX3*-transgenen Blättern (Abbildung 31). Es wurden die Fläche der Blattspreite, die Zahl und die durchschnittliche Größe der abaxialen Epidermiszellen des sechsten Rosettenblattes im Verlauf der Zeit bestimmt sowie weiterhin die Zahl der Stomata. Dabei wurden Zell- und Stomatazahl an drei verschiedenen Stellen des Blattes bestimmt, und zwar auf einem Viertel,

der Hälfte und einem Dreiviertel der Strecke von der Basis bis zur Spitze der Blattspreite und dabei jeweils mittig zwischen Mittelrippe und Blattrand. Beginn der Messreihe war der Zeitpunkt, an dem das sechste Rosettenblatt eine Länge von 2 mm erreicht hatte (= Zeitpunkt 0). Die 2 mm-Blattlänge des sechsten Rosettenblattes wurde von Wildtyppflanzen $13,7 \pm 0,8$ TNA, von *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen $16,1 \pm 0,7$ TNA und von *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen $19,9 \pm 2,3$ TNA erreicht. Die Messungen zeigten, dass die Spreitenfläche des sechsten Rosettenblattes *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen zwischen 12 und 18 Tagen nach dem Erreichen der 2 mm-Blattlänge auf durchschnittlich 26 % und die der *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen auf durchschnittlich 6 % der Wildtypgröße reduziert war (Abbildung 31A). Die Zahl der Epidermiszellen in Blättern von *ANT:CKX3*- und *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen war in 2 mm langen Blättern, also zum Zeitpunkt 0, um etwa 50 % reduziert verglichen mit dem Wildtyp und blieb während der weiteren Blattentwicklung nahezu konstant (Abbildung 31B). Die Zellteilungsaktivität in den transgenen Blättern wurde offensichtlich frühzeitig, das heißt noch vor dem Erreichen einer Blattlänge von 2 mm, eingestellt. Es ist außerdem möglich, dass die Zahl der *founder cells* der Blattprimordien verglichen mit dem Wildtyp zusätzlich reduziert war. Im Gegensatz zu den transgenen Blättern stieg die Zellzahl in Wildtypblättern in den ersten sechs Tagen der Messung auf den sechsfachen Wert an und blieb dann konstant (Abbildung 31B). Ab dem sechsten Tag der Messung war in *ANT:CKX3*-transgenen Blättern die Zahl der Epidermiszellen auf etwa 12 % und in *35S:CKX3*-transgenen Blättern auf etwa 5 % der Wildtypzellzahl reduziert (Abbildung 31B). Die Reduktion der Zellzahl wurde in den transgenen Blättern durch eine beschleunigte und verstärkte Zellexpansion teilweise kompensiert (Abbildungen 31C und E). Im Vergleich zu den Epidermiszellen der Wildtypblätter hatte sich die durchschnittliche Zellgröße in *ANT:CKX3*-transgenen Blättern zu jedem Zeitpunkt der Messung mindestens verdoppelt. In *CKX3*-überexprimierenden Blättern betrug die Größenzunahme im Vergleich zum Wildtyp dagegen durchschnittlich nur etwa 60 % (Abbildung 31), was darauf hinweist, dass Cytokinin nicht nur für die Zellteilungsaktivität wichtig ist, sondern auch für die Zellexpansion. Der Stomataindex, das heißt der Anteil der Stomata an der Gesamtpopulation der epidermalen Zellen, war in *ANT:CKX3*-transgenen Blättern im Vergleich zum Wildtyp nur innerhalb der ersten Hälfte der Messperiode erhöht. An Tag 3 war der Stomataindex der *ANT:CKX3*-Blätter um 40 % erhöht gegenüber dem Wildtypindex (Abbildung 31D).

Die kinematische Analyse der Entwicklung des sechsten Rosettenblattes von Wildtyppflanzen zeigte, dass mit dem Wechsel zur reproduktiven Phase die Zellteilungsprozesse im

Blatt abgeschlossen waren (Abbildung 31B, Pfeil), jedoch weiterhin Zellexpansion stattfand und die Blattfläche zunahm (Abbildung 31A, Pfeil). Der Blühbeginn der Wildtyppflanzen war $21,7 \pm 0,9$ TNA, was bezogen auf das Alter des sechsten Rosettenblattes dem Zeitpunkt 8 entsprach. Bei *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen erfolgte der Wechsel zur reproduktiven Phase $33,3 \pm 1,0$ TNA, was dem Zeitpunkt 17 der Messung entsprach (Abbildungen 31A und B, Pfeile). *35S:CKX3*-transgene Pflanzen erreichten den Zeitpunkt des Blühbeginns während der Messperiode nicht.

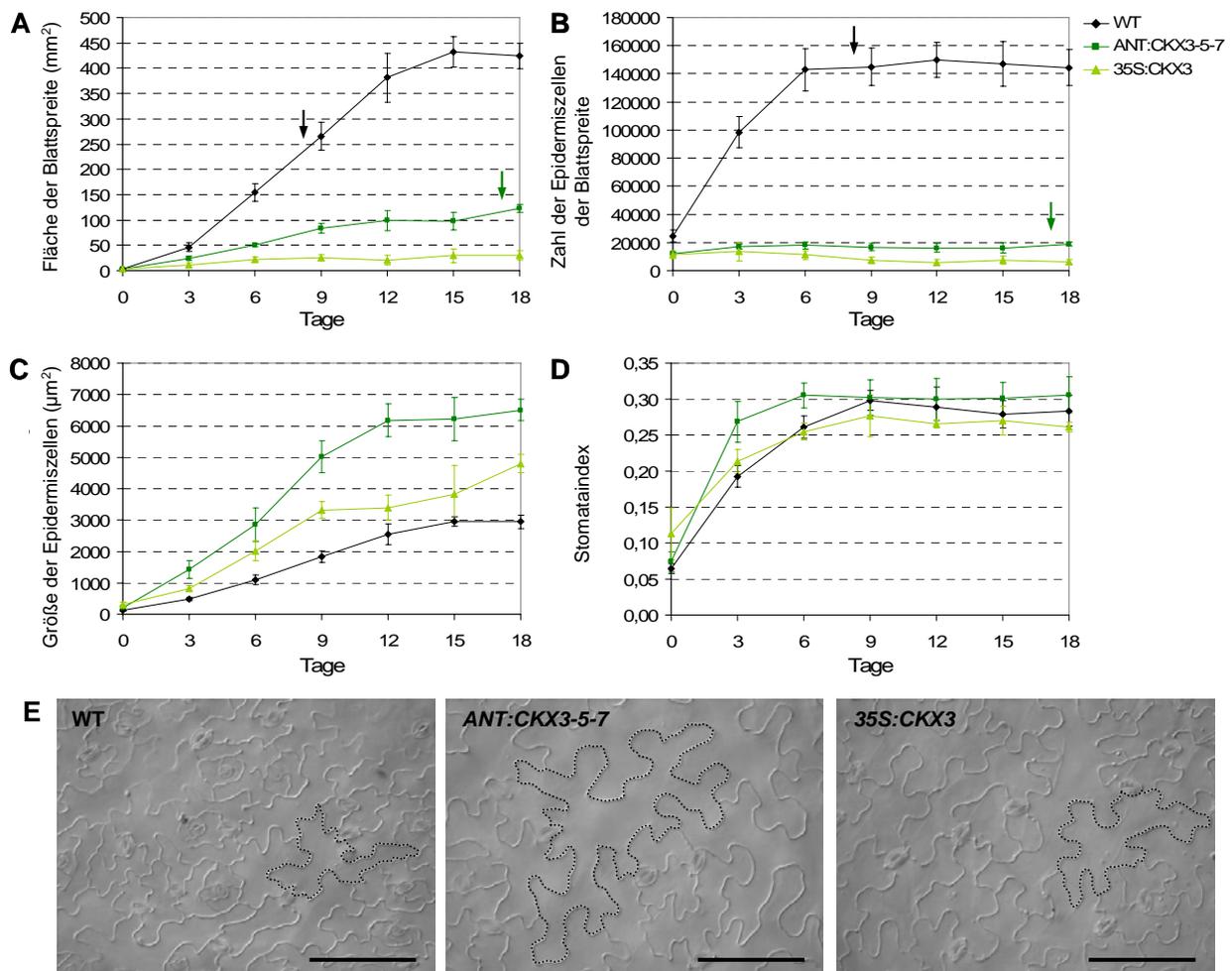


Abbildung 31: Kinematische Analyse der Blattepidermis. Blattfläche (A), Zahl (B) und durchschnittliche Größe (C) der abaxialen Epidermiszellen sowie Stomataindex (D) des sechsten Rosettenblattes von Wildtyp, *ANT:CKX3*- und *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen im zeitlichen Verlauf. Der Zeitpunkt, an dem das sechste Rosettenblatt eine Länge von 2 mm erreicht hat, wurde als Zeitpunkt 0 festgelegt und bei jeder Pflanze individuell bestimmt. Die Pfeile in (A) und (B) markieren den jeweiligen Zeitpunkt des Blühbeginns der Pflanzen bezogen auf das Alter des sechsten Blattes, der bei Wildtyppflanzen 22 TNA bzw. bei *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen 33 TNA entspricht. Der Stomataindex gibt den Anteil der Stomata in der Gesamtpopulation der abaxialen epidermalen Zellen an. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4-6$). (E) Abaxiale Epidermis auf einem Viertel der Blattspreitenlänge von der Spreitenbasis bis zur Spreitenspitze neun Tage nach Zeitpunkt 0. Um die Größenunterschiede der Zellen zu verdeutlichen, sind die Umrisse von Beispielzellen mit gepunkteten Linien markiert. Messbalken = 100 µm.

Der Vergleich des vaskulären Musters zeigte, dass das Vaskularsystem der *ANT:CKX3*-transgenen Blätter verglichen mit Wildtypblättern stark reduziert war (Abbildung 32). Die Zahl und die räumliche Dichte der Gefäße höherer Ordnungen waren verringert. In *35S:CKX3*-transgenen Blättern war die Reduktion des Vaskularsystems noch stärker ausgeprägt.

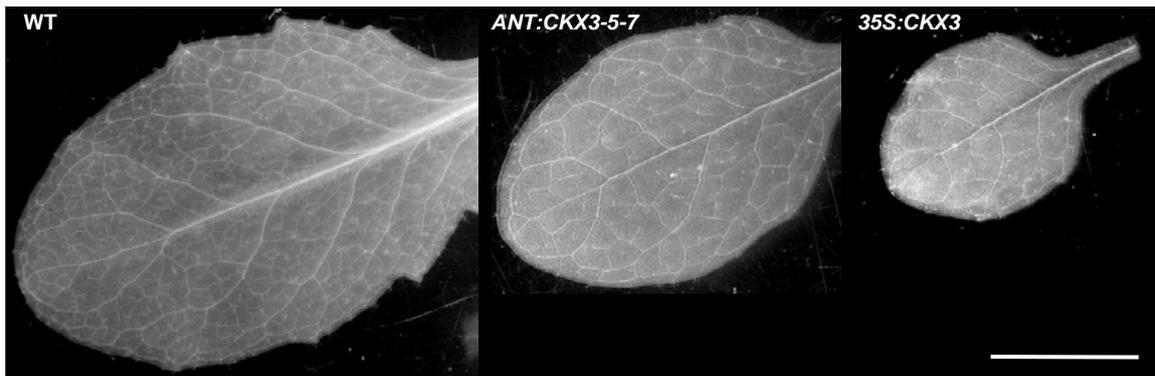


Abbildung 32: Wachstum und Entwicklung des sechsten Rosettenblattes *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-Pflanzen. Vergleich der Blattgrößen und des Entwicklungsgrades des Vaskularsystems sechs Tage nach Beginn der Messungen (Zeitpunkt 0, wie in Abbildung 31 beschrieben). Abgebildet sind mit Chloralhydrat geklärte Blätter. Messbalken = 5 mm.

Der Wechsel von der vegetativen zur reproduktiven Wachstumsphase war bei *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen zeitlich und, zumindest bei einer Linie, auch bezüglich der Entwicklung verzögert. So blühten die transgenen Pflanzen unter Langtagbedingungen 11 Tage (Linie 5-7) bzw. sechs Tage (Linie 6-2) später als der Wildtyp und Pflanzen der Linie 5-7 bildeten bis zum Blühbeginn mehr Rosettenblätter (Abbildungen 33A und B). Im Wachstumszeitraum bis zum Blühbeginn war das Plastochron signifikant um etwa 20 % (Linie 5-7) bzw. 30 % (Linie 6-2) erhöht verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 33C). Das Wachstum der Rosettenblätter war bei *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen demnach nicht nur reduziert, sondern ihre Bildung war auch verzögert.

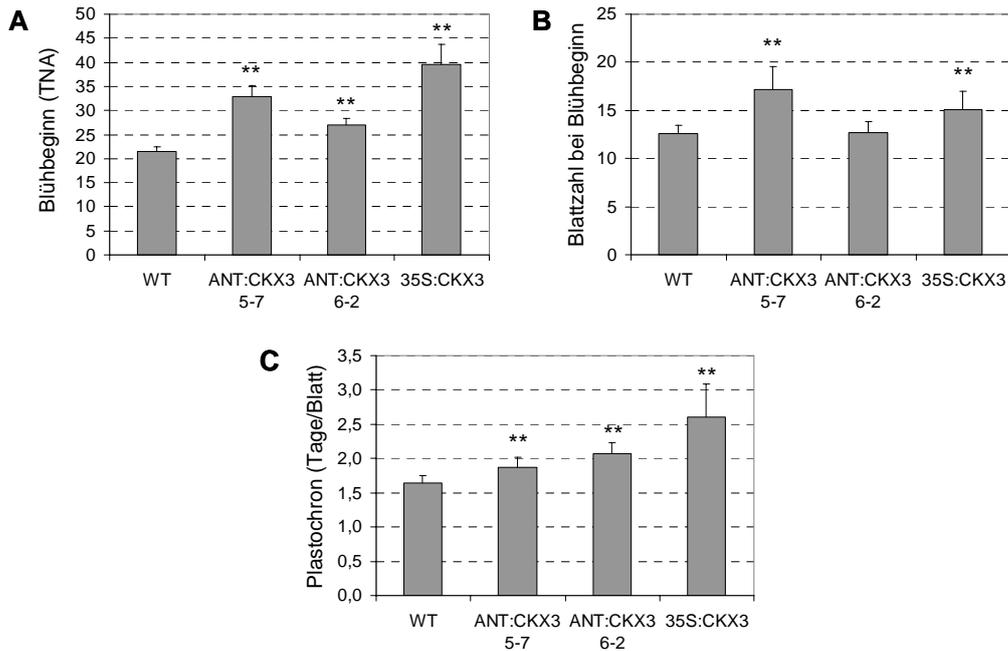


Abbildung 33: Übergang zur reproduktiven Phase *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen unter Langtagbedingungen. **(A)** Blühbeginn, **(B)** Zahl der bis zum Blühbeginn gebildeten Rosettenblätter und **(C)** Plastochron *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-Pflanzen. Als Blühbeginn wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem der Blütenstand eine Länge von 5 mm erreicht hat. Das Plastochron wurde aus dem Wachstumszeitraum bis zum Blühbeginn und der Anzahl der bis dahin gebildeten Blätter der Hauptrosette ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 14-20$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. ** $P < 0,01$.

Das Wachstum des Hauptsprosses *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen war auch während der reproduktiven Phase reduziert. Die Höhe der Hauptinfloreszenzen, welche nicht aufrecht wuchsen, sondern herabhingen, war im Vergleich zum Wildtyp um etwa 20-30 % reduziert (Abbildung 34A). Die reduzierte Sprosshöhe führte zusammen mit der um 25 % verringerten Schotendichte am Hauptstängel zu einer Reduktion der Schotenzahl um etwa 40 % verglichen mit dem Wildtyp (Abbildungen 34C und D). Während der verlängerten reproduktiven Phase bildeten *ANT:CKX3*-transgene Pflanzen mehr axilläre Sprosse als Wildtyppflanzen (Abbildung 34B), was auf eine Reduktion der apikalen Dominanz hinweist und auch bei *CKX*-überexprimierenden Pflanzen beobachtet wurde (Werner *et al.*, 2003). Die verstärkte Bildung axillärer Rosetten gab den transgenen Pflanzen ein buschiges Aussehen. Ihre Infloreszenzen bildeten weniger Blütenknospen als die des Wildtyps, die Größe der Blüten war jedoch nicht verändert (Abbildung 30E).

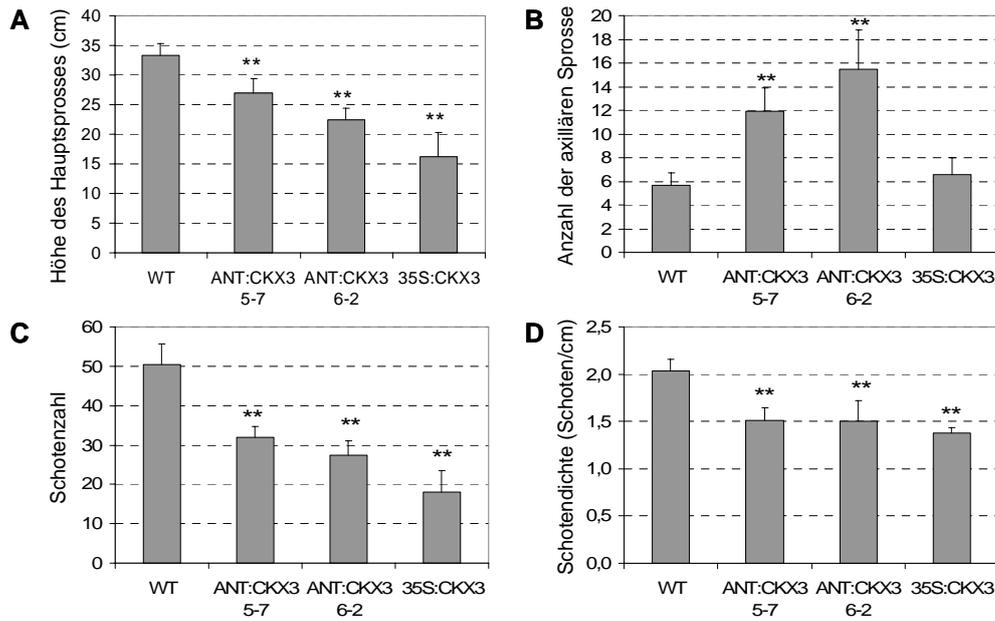


Abbildung 34: Sprosswachstum in der reproduktiven Phase und Schotenproduktion *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-Pflanzen. **(A)** Höhe des Hauptsprosses. **(B)** Anzahl der axillären Sprosse. **(C)** Schotenzahl am Hauptstängel. **(D)** Mittlere Schotendichte am Hauptstängel. Alle Parameter (A-D) wurden zum Zeitpunkt der Termination des Hauptsprosses bestimmt (WT 45 TNA; *ANT:CKX3* 53 TNA; *35S:CKX3* 64-71 TNA). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 9-18$). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. ** $P < 0,01$.

3.5.3.3 Phänotypische Charakterisierung von *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen

Für die Untersuchung verschiedener Wachstumsparameter wurden Pflanzen der T4-Generation der homozygoten *LFY:CKX3*-transgenen Linien 21-2 und 22-6 verwendet (Abbildung 35D). Die primordienspezifische Expression des *CKX3*-Gens unter Kontrolle des *LFY*-Promotors bewirkte nicht so starke phänotypische Veränderungen von Wachstum und Entwicklung wie die Genexpression unter dem stärkeren *ANT*-Promotor. Die primären Rosetten der transgenen Pflanzen waren in ihrem Durchmesser im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert (Abbildungen 35A und C). Auffällig war jedoch die Zunahme der Spreitenfläche der Rosettenblätter von transgenen Pflanzen der Linie 21-2 (Abbildung 35B). Auch die Blätter axillärer Rosetten von *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen waren deutlich größer als die der Wildtyppflanzen (Abbildung 35C).

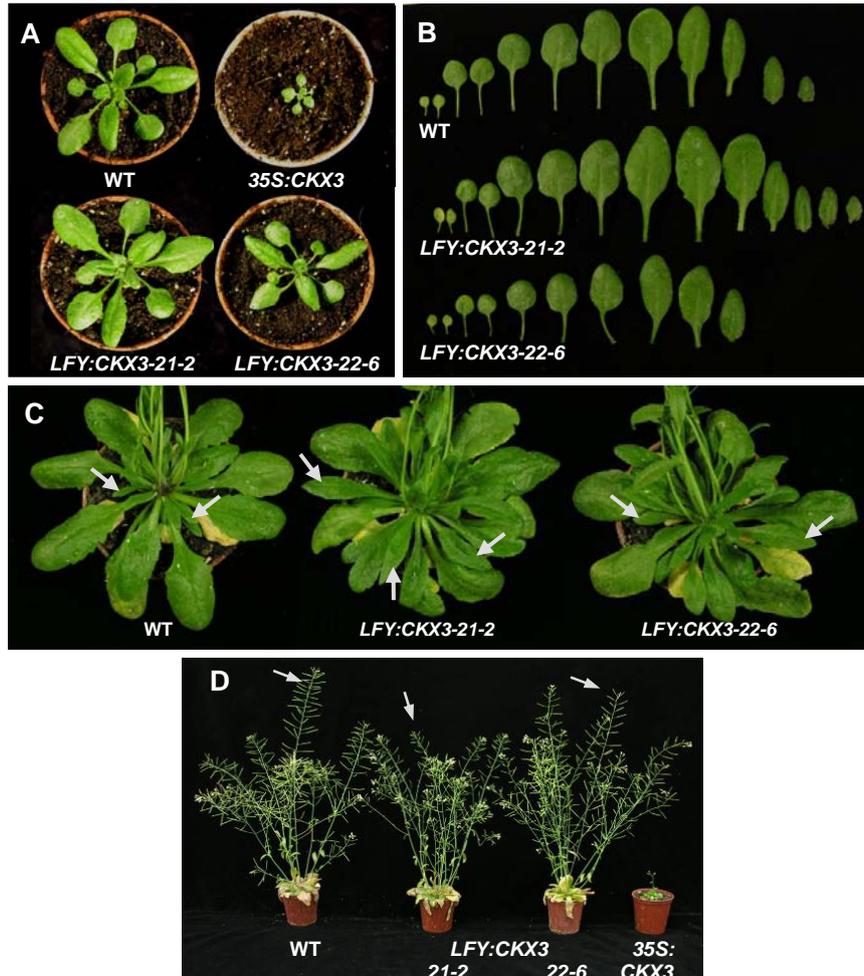


Abbildung 35: Sprosswachstum und Blütenbildung homozygoter *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen. **(A)** Rosetten *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen (Generation T5) im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX3*-transgener Pflanze 24 TNA. **(B)** Kotyledonen und Rosettenblätter von *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Blätter stammen von den Pflanzen aus (A). **(C)** Rosetten *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen (Generation T4) im Vergleich zum Wildtyp 39 TNA. Bei den transgenen Pflanzen waren die Blätter der axillären Rosetten deutlich größer als beim Wildtyp (beispielhaft durch Pfeile markiert). **(D)** *LFY:CKX3*-transgene Pflanzen der T4-Generation in der reproduktiven Phase im Vergleich zu Wildtyp und *35S:CKX3*-transgener Pflanze 42 TNA. Die Pfeile kennzeichnen die Hauptstängel, die bei transgenen Pflanzen von einigen axillären Infloreszenzen überragt wurden.

Der Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase war bei *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen bezüglich des Blühzeitpunktes und der Zahl der bis dahin gebildeten Rosettenblätter kaum verändert. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Hauptinfloreszenzen bei der Linie 21-2 in ihrer Höhe signifikant um 17 % reduziert und bei Linie 22-6 unverändert (Abbildung 36A). Die Stängel der Hauptinfloreszenzen der *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen waren deutlich dünner als die der Wildtyppflanzen, nicht aber die axillären Stängel. So war der Stängeldurchmesser 2 cm oberhalb der Rosette signifikant um 32-34 % des Wildtypwertes reduziert (Abbildung 36B). Trotz der reduzierten Stängeldicke wuchsen die Infloreszenzen

aufrecht und waren nicht herabhängend wie bei *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen. Das Wachstum der axillären Sprosse war bei *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen verstärkt. Die im Vergleich zum Wildtyp stark vergrößerten axillären Rosettenblätter wurden bereits erwähnt. Zudem war die Zahl der axillären Infloreszenzen um 21 % (Linie 21-2) bzw. 26 % (Linie 22-6) im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abbildung 36F) und bei 55 % (Linie 21-2) bzw. 70 % (Linie 22-6) der Pflanzen waren einige axilläre Infloreszenzen höher als der Hauptspross (Abbildung 35). Die Länge des höchsten axillären Sprosses war bei diesen Pflanzen um ~10 % der Hauptsprosslänge erhöht. Diese Beobachtungen weisen auf eine reduzierte apikale Dominanz bei den transgenen Pflanzen hin.

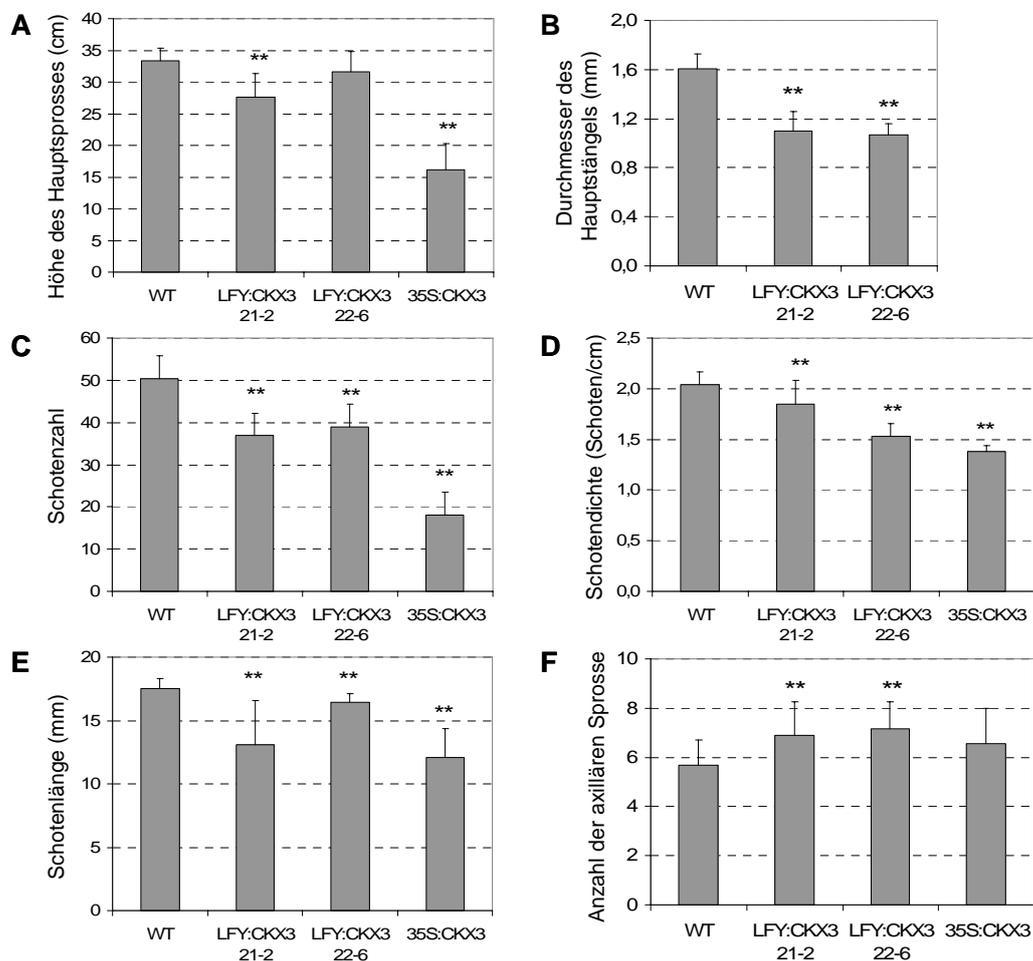


Abbildung 36: Sprosswachstum in der reproduktiven Phase und Schotenproduktion *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-Pflanzen. **(A)** Höhe des Hauptsprosses. **(B)** Durchmesser des Hauptstängels 2 cm oberhalb der Rosette. **(C)** Schotenzahl am Hauptstängel. **(D)** Mittlere Schotendichte am Hauptstängel. **(E)** Länge der Schoten am Hauptstängel. Gemessen wurden die Schoten 6 bis 15 ($n = 6-12$). **(F)** Anzahl der axillären Sprosse. Die Parameter (A-D) und (F) wurden zum Zeitpunkt der Termination des Hauptsprosses bestimmt (WT und *LFY:CKX3* 45 TNA; *35S:CKX3* 64-71 TNA). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 9-20$, außer (E)). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der Werte vom Wildtyp. $**P < 0,01$.

Bei *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen war die Zahl der Schoten am Hauptstängel um 23-27 % reduziert (Abbildung 36C), was neben der verringerten Hauptsprosslänge auch aus einer reduzierten Schotenproduktion, das heißt einer geringeren Schotendichte resultierte. Bei Pflanzen der Linie 21-2 war die mittlere Dichte der Schoten um 10 % und bei Linie 22-6 um 25 % reduziert (Abbildung 36D). *LFY:CKX3*-transgene Pflanzen zeigten außerdem eine signifikante Reduktion der Schotenlänge, die bei *LFY:CKX3-21-2* (28 % Reduktion) stärker ausgeprägt war als bei *LFY:CKX3-22-6* (11 % Reduktion), aber auch stärker variierte (Abbildungen 36E und 37A).

In *LFY:CKX3*-transgenen Schoten war die Samenentwicklung stark beeinträchtigt. Die Samenreifung erfolgte sehr unregelmäßig oder wurde abgebrochen (Abbildung 37B). Besonders häufig und ausgeprägt war dies bei Pflanzen der Linie 21-2 zu beobachten, deren Samen nach der Ernte teilweise eine veränderte Morphologie im Vergleich zu Wildtypsamen aufwiesen, das heißt sie waren dunkler und hatten eine runzlige Oberfläche (Abbildung 37C). Insgesamt waren *LFY:CKX3*-transgene Samen etwas kleiner als Wildtypsamen, was auf eine verringerte Größe der Embryonen schließen lässt. Erstaunlicherweise entwickelten sich aus den transgenen Samen deutlich größere Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 37D). Die Analyse der Samenkeimung mit Samen von Pflanzen, die zur selben Zeit und unter gleichen Bedingungen gewachsen sind, ergab, dass *LFY:CKX3*-transgene Samen früher keimten als Wildtypsamen. So keimten nach 24 h bereits etwa 40 % und nach 32 h 80-90 % der *LFY:CKX3*-transgenen Samen gegenüber ~10 % bzw. ~65 % der Wildtypsamen (Abbildung 37E). Bei *35S:CKX3*-transgenen Samen betrug die Keimungsrate nach 24 h 30 % und nach 32 h 90 %. Die erhöhte Größe der *LFY:CKX3*-transgenen Keimlinge im Vergleich zu Wildtypkeimlingen war jedoch nicht allein mit der früheren Keimung der Samen zu erklären, da insbesondere die voll entwickelten Kotyledonen der Keimlinge größer waren, als die vollständig expandierten Kotyledonen des Wildtyps.

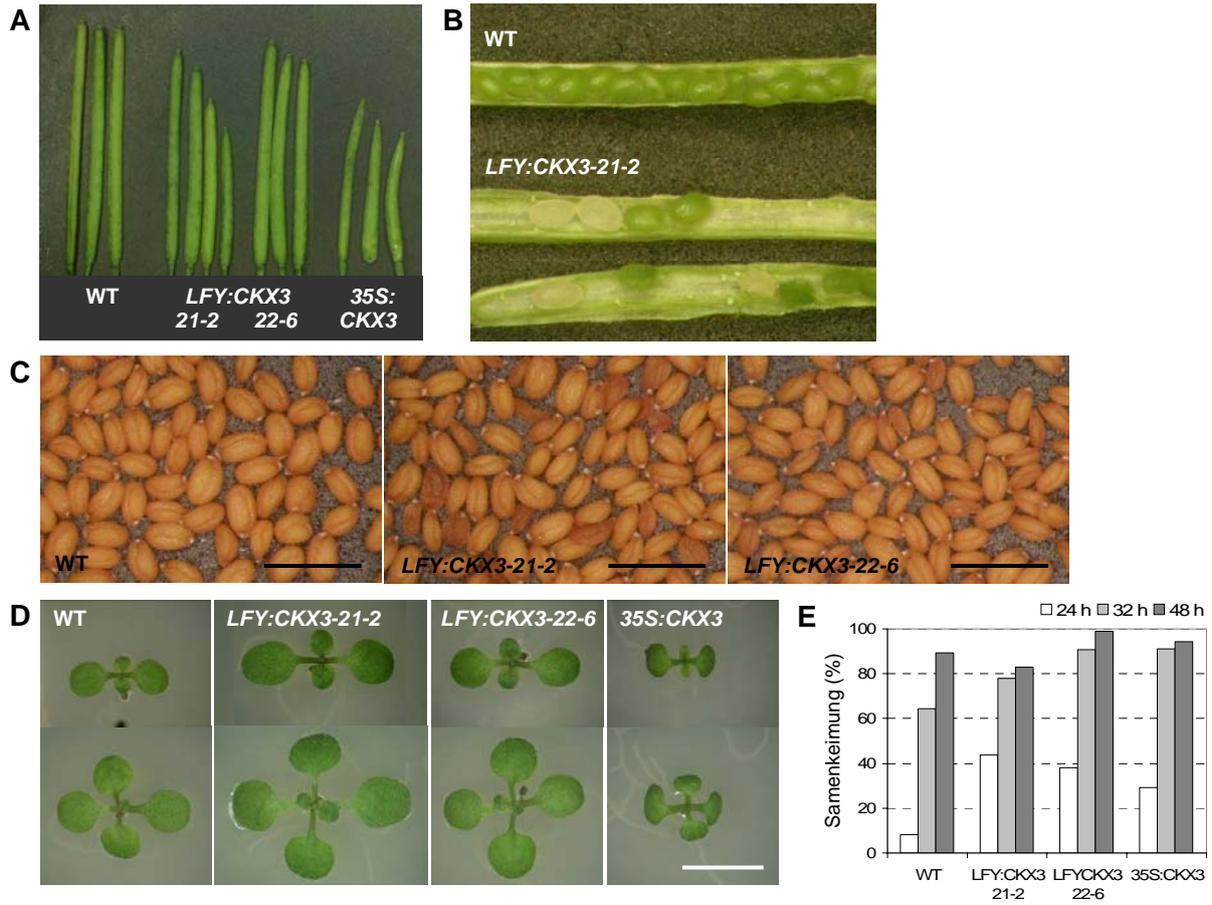


Abbildung 37: Schoten- und Samenentwicklung sowie Keimlingswachstum von homozygoten *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen. **(A)** Schoten *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen. **(B)** Samenentwicklung *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Samen der transgenen Pflanzen reiften ungleichmäßig oder entwickelten sich gar nicht. **(C)** Samen von *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen im Vergleich zu Wildtypsamens. Transgene Samen waren meist kleiner als Wildtypsamens. Samen der Linie 21-2 zeigten teilweise eine veränderte Morphologie im Vergleich zu Samen des Wildtyps (Pfeile). Messbalken = 100 μ m. **(D)** *LFY:CKX3*-transgene Keimlinge im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-transgenen Keimlingen 8 TNA (oben) und 11 TNA (unten). Alle Keimlinge sind mit gleicher Vergrößerung abgebildet. Messbalken = 5 mm. **(E)** Keimungsrate *LFY:CKX3*-transgener Samen im Vergleich zu Wildtyp- und *35S:CKX3*-transgenen Samen 24 h, 32 h und 48 h nach Überführung ins Licht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der zum gegebenen Zeitpunkt gekeimten Samen bezogen auf die Zahl der insgesamt gekeimten Samen, die 8 TNA ermittelt wurde ($n = 82-89$).

4 DISKUSSION

Cytokinin hat bei zahlreichen Vorgängen des Assimilatmetabolismus und der Assimilatverteilung sowie bei dem Zellzyklus der Pflanze eine regulatorische Funktion und beeinflusst dadurch maßgeblich wichtige Parameter der *sink/source*-Verhältnisse in der ganzen Pflanze (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Roitsch und Ehneß, 2000). Die molekularen Mechanismen, welche Cytokinin mit den physiologischen und entwicklungsbiologischen Antworten der Pflanze verknüpfen, sind bisher noch wenig verstanden. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, regulatorische Schaltstellen von Cytokinin zu identifizieren, das heißt Faktoren aufzudecken, die bei der Cytokininwirkungsvermittlung eine zentrale Rolle spielen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse von Pflanzen, bei denen der endogene Cytokiningehalt durch die Expression eines *AtCKX*-Gens verringert war. Von Pflanzen mit einem konstitutiv reduzierten Cytokiningehalt wurde ein physiologischer Phänotyp erstellt, der Hinweise auf regulatorische Schaltstellen von Cytokinin liefern sollte. Des Weiteren wurde der Einfluss von verschiedenen cytokininregulierten Faktoren der *sink*-Bildung auf das Wachstum cytokinindefizienter Pflanzen untersucht, um ein besseres Verständnis der kausalen Zusammenhänge zu erhalten. Dies geschah zum einen durch Expressionsversuche und zum anderen durch pharmakologische Untersuchungen. Zuletzt erfolgte die phänotypische Charakterisierung von Pflanzen, in denen der Cytokiningehalt gewebespezifisch in verschiedenen Domänen des *sink*-Gewebes verringert wurde, um Hinweise zur funktionellen räumlichen Organisation dieses *sink*-Gewebes in Hinblick auf die Rolle von Cytokinin zu erhalten.

4.1 Physiologischer Phänotyp cytokinindefizienter Tabakpflanzen

4.1.1 Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus des Spross-*sink*-Gewebes cytokinindefizienter Pflanzen

Kohlenhydrate werden in photosynthetisch aktiven Geweben, den *source*-Geweben, produziert und entweder dort vorübergehend als Stärke gespeichert oder direkt, primär in Form von Saccharose, über das Phloem in Speicher- oder Verbrauchsgewebe, den *sink*-Geweben, transportiert. Die Analyse der Metabolitgehalte in Spross-*sink*-Geweben von

Wildtyp und 35S:CKX-transgenen Tabakpflanzen zeigte, dass die Gehalte an löslichen Zuckern in cytokinindefizienten *sink*-Gewebe drastisch reduziert waren im Vergleich zum Wildtyp. Der Gesamtzuckergehalt betrug etwa 30 % des Wildtypgehaltes, wobei die stärkste Veränderung bei Glucose vorgefunden wurde, deren Gehalt auf 10 % des Wildtypgehaltes reduziert war (Abbildung 2). In cytokinindefizienten Spross-*sink*-Gewebe war demnach die Kapazität, Kohlenhydrate zu importieren und/oder zu verwerten stark reduziert. Eine mögliche Ursache kann die Beeinträchtigung der Phloementladung der Assimilate gewesen sein. An der apoplastischen Phloementladung sind im Wesentlichen Saccharose- und Hexose-transporter und extrazelluläre Invertasen beteiligt (Roitsch und Ehneß, 2000). Es wurde gezeigt, dass diese Enzyme auf transkriptioneller Ebene durch Cytokinin positiv reguliert werden. So konnte die Induktion durch Cytokinin für die Zellwand-Invertasegene *CINI* in *Chenopodium rubrum* (Ehneß und Roitsch, 1997) und *Lin6* in Tomate (Godt und Roitsch, 1997), die Hexosetransporter gene *CST2* und *CST3* von *C. rubrum* (Ehneß und Roitsch, 1997) und das Saccharosetransporter gene *SUT1* in Kartoffel (Harms *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Die an der apoplastischen Phloementladung beteiligten Enzyme könnten somit bei Cytokininmangel limitierend sein. Die Messungen haben jedoch ergeben, dass zumindest die Aktivität der Zellwand-Invertase in cytokinindefizienten Spross-*sink*-Gewebe nicht signifikant verändert war. Saccharose- und Hexosetransporter wurden nicht untersucht.

Eine weitere mögliche Ursache für die reduzierte *sink*-Kapazität kann die gestörte metabolische Verwertung der importierten Saccharose aufgrund veränderter Aktivitäten der Saccharose-metabolisierenden Invertasen sein. Im Gegensatz zur unveränderten Aktivität der Zellwand-Invertase waren im cytokinindefizienten Sprossapex die Aktivitäten der vakuolären und der cytosolischen Invertasen, die beim symplastischen Saccharoseimport eine Rolle spielen, im Vergleich zum Wildtyp um etwa 50-60 % reduziert (Abbildung 5). In *sink*-Gewebe des Wildtyps wurde der hauptsächliche Teil der Gesamtinvertaseaktivität von der vakuolären Invertase gestellt. Der Anteil ihrer Aktivität betrug etwa 85 %, während die cytosolische Invertase etwa 5 % und die Zellwand-Invertase 10 % der Gesamtaktivität einnahmen. Die starke Reduktion der intrazellulären Invertaseaktivitäten könnte sich erheblich auf den gesamten Saccharosemetabolismus im cytokinindefizienten *sink*-Gewebe ausgewirkt haben, so dass der Hexosegehalt aufgrund der verringerten Saccharosespaltung und der Saccharosegehalt aufgrund der verringerten Kapazität der symplastischen Phloementladung reduziert wurden. Das weist darauf hin, dass Invertaseaktivitäten eine wichtige Rolle bei der Etablierung des Cytokinindefizienzphänotyps spielen, und unterstützt die

Auffassung, dass Invertasen die Cytokininwirkung mit dem Primärmetabolismus verknüpfen (Roitsch *et al.*, 2003). Allerdings wurde bisher angenommen, dass die cytokininregulierte Zellwand-Invertase eine spezielle Rolle bei der Phloementladung und der Kontrolle des *sink*-Metabolismus spielt (Roitsch und Ehneß, 2000; Roitsch und González, 2004). Die vorliegenden Ergebnisse weisen dagegen darauf hin, dass die vakuoläre Invertase im Rahmen der symplastischen Phloementladung eine wichtigere Rolle bei der Saccharosespaltung und der *sink*-Regulation spielen könnte.

Als eine dritte Ursache für die verringerte Spross-*sink*-Kapazität bei cytokinindefizienten Pflanzen könnte die reduzierte *sink*-Größe angesehen werden. Es wurde gezeigt, dass das SAM cytokinindefizienter Tabakpflanzen aufgrund einer reduzierten Zellzahl kleiner war als das von Wildtyppflanzen und auch die cytokinindefizienten Blätter weniger Zellen enthielten als Wildtypblätter (Werner *et al.*, 2001). Des Weiteren deckte die ultrastrukturelle Analyse der Zellen in SAM und Blattprimordien deutliche cytologische Veränderungen in *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen auf, die auf eine reduzierte Zellteilungsaktivität und eine vorzeitige Zelldifferenzierung hinweisen (Werner *et al.*, 2008). Anzeichen der fortgeschrittenen Differenzierung der Meristemzellen cytokinindefizienter Pflanzen waren das im Vergleich zu Wildtypzellen größere Vakuolensystem und die Dekondensation des Chromatins im Nucleus (Werner *et al.*, 2008). Die Organellen zeigten ebenfalls Merkmale einer vorzeitigen Differenzierung, das heißt im Unterschied zu Wildtyporganellen waren die Proplastiden bereits vergrößert und enthielten meist interne präthylakoidale Strukturen oder Thylakoide und die größeren und längeren Mitochondrien wiesen geweitete Tubuli auf (Werner *et al.*, 2008). In Blattprimordien von *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen enthielten die Zellen sehr große Vakuolen, die von wenig Cytoplasma umgeben waren, sowie lange, große Chloroplasten mit kleinen Thylakoidstapeln (Werner *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu waren in den Zellen sich differenzierender Blattprimordien von Wildtyppflanzen die kleineren Vakuolen noch von vergleichsweise viel Cytoplasma umgeben und die Chloroplasten enthielten dicke Thylakoidstapel (Werner *et al.*, 2008). Die hier erläuterte beschleunigte Differenzierung sowie die verringerte Zellteilungsaktivität des Spross-*sink*-Gewebes cytokinindefizienter Pflanzen führten zu einer Reduktion der *sink*-Größe und folglich der *sink*-Stärke, so dass der Kohlenhydratbedarf und damit der Import der Photoassimilate in das *sink*-Gewebe reduziert gewesen sein könnte.

Die Analyse der Aktivitäten verschiedener glykolytischer Enzyme lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass der Kohlenstoffmetabolismus in *35S:CKX*-transgenen Spross-

sink-Gewebe gestört war. Die Aktivitäten von PFP und Aldolase, Enzyme der ersten Phase der Glykolyse, waren im cytokinindefizienten Sprossapex im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Abbildung 6). Dies könnte auf die Aktivierung eines Kompensationsmechanismus als Antwort auf den reduzierten Metabolitgehalt hindeuten. Allerdings lässt der deutlich erhöhte Stärkegehalt im cytokinindefizienten *sink*-Gewebe vermuten, dass ein Teil der Assimilate nicht für die nachfolgenden, Energie konservierenden Schritte der Glykolyse verwendet, sondern in die Stärkesynthese geleitet wurde. Diese Annahme wird zusätzlich durch die verringerte Aktivität der Enolase, ein Enzym, das den vorletzten Schritt der Glykolyse katalysiert, unterstützt. Eine daraus resultierende verminderte Bildung von Pyruvat und letztendlich reduzierte oxidative Phosphorylierung könnte die Reduktion des ATP-Gehaltes in cytokinindefizienten Spross-*sink*-Gewebe erklären (Abbildung 4). Im Gegensatz zur starken Reduktion des ATP-Gehaltes war der ADP-Gehalt im cytokinindefizienten Sprossapex nur gering reduziert. Daraus resultierte eine Verringerung des ATP/ADP-Verhältnisses auf etwa 1,0-1,5 im Vergleich zum Wildtyp-ATP/ADP-Verhältnis von 2,0. Ein hohes ATP/ADP-Verhältnis wie im *sink*-Gewebe des Wildtyps ist typisch für Gewebe mit hohen metabolischen Raten, die reduzierten Werte der cytokinindefizienten Sprossapices deuten dagegen auf eine Mittelstellung dieser Gewebe zwischen *sink* und *source* hin, was im Einklang mit der fortgeschrittenen Zelldifferenzierung steht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in cytokinindefizienten *sink*-Gewebe des Sprosses die *sink*-Stärke, das heißt die Kapazität Kohlenhydrate zu importieren und/oder zu verwerten, stark reduziert war. Dies könnte durch eine beeinträchtigte Phloementladung der Photoassimilate, durch eine gestörte Kapazität der metabolischen Verwertung der importierten Assimilate oder durch die reduzierte *sink*-Größe verursacht worden sein. Eine wichtige Rolle bei der Etablierung des Cytokinindefizienzphänotyps spielen möglicherweise Invertasen, insbesondere die vakuoläre Invertase.

4.1.2 Photosyntheseaktivität und *source*-Stärke cytokinindefizienter Pflanzen

Der Zuckermangel im Sprossapex cytokinindefizienter Pflanzen könnte auch aus einer reduzierten photosynthetischen Aktivität des *source*-Gewebes oder einem reduzierten Transport der Photoassimilate vom *source*- zum *sink*-Gewebe resultieren. Die Untersuchung der Chlorophyllbiosynthese in *35S:CKX*-transgenen *source*-Blättern hat ergeben, dass die Kapazität der 5-Aminolävulinsäure (ALA)-Synthese, dem ratenlimitierenden Schritt der

Tetrapyrrolbiosynthese im Rahmen der Chlorophyllbildung, reduziert war. Die ALA-Syntheserate war um 75 % (*35S:CKX1*) bzw. 28 % (*35S:CKX2*) der Wildtypsyntheserate verringert (Werner *et al.*, 2008). Dies hatte eine Reduktion des Gehaltes an Chlorophyll (Chl) relativ zur Blattfläche um 15-37 % zur Folge, wobei das Chl a/b-Verhältnis in den transgenen Blättern verglichen mit dem Wildtyp nicht signifikant verändert war (Werner *et al.*, 2008). Trotz des reduzierten Chlorophyllgehaltes war die photosynthetische Aktivität cytokinindefizienter *source*-Blätter jedoch nicht signifikant beeinträchtigt. Die photochemische Effizienz des Photosystem II (F_v/F_m) war nur gering erhöht und die photosynthetische Effizienz der CO₂-Aufnahme (Φ CO_{2app}) zeigte keine Veränderung verglichen mit Wildtypblättern (Werner *et al.*, 2008).

In cytokinindefizienten *source*-Blättern waren die Gehalte der löslichen Zucker nicht signifikant verändert, mit Ausnahme des Saccharosegehaltes *35S:CKX1*-transgener Blätter, der um etwa 40 % des Wildtypgehaltes reduziert war (Abbildung 2). Im Gegensatz dazu war die Stärkeakkumulation in den transgenen *source*-Blättern um etwa 60 % (*35S:CKX1*) bzw. 45 % (*35S:CKX2*) im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Trotz der unveränderten photosynthetischen Aktivität war der gesamte Photoassimilatgewinn in *35S:CKX*-transgenen *source*-Blättern verringert. Auch der ATP-Gehalt war verglichen mit dem Wildtyp um 50 % (*35S:CKX1*) bzw. 20 % (*35S:CKX2*) reduziert, wobei das ATP/ADP-Verhältnis in cytokinindefizienten Blättern aufgrund des ebenfalls reduzierten ADP-Gehaltes kaum verändert war (Abbildung 4). Ein Teil der Photoassimilate könnten durch Respiration aufgebraucht worden sein, was sich aus der Erhöhung der Dunkelrespirationsrate (R_D) um 30-50 % schließen lässt (Werner *et al.*, 2008).

In cytokinindefizienten *source*-Blättern waren trotz des reduzierten Chlorophyllgehaltes die photosynthetische Kapazität und Effizienz sowie der Gehalt an löslichen Zuckern kaum verändert. Chlorophyll war demnach nicht limitierend für die Photoassimilation und die *source*-Stärke war in cytokinindefizienten Blättern nicht beeinträchtigt. Der Zuckermangel im Sprossapex cytokinindefizienter Pflanzen könnte jedoch auch die Folge eines gestörten Assimilatexportes aus den *source*-Organen sein. Die Exportkapazität wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

4.1.3 Physiologische Veränderungen in cytokinindefizienten Wurzeln

Das Wurzelsystem ist neben dem Sprossapex und den Blattprimordien ein weiteres *sink*-Organ der Pflanze. Das Wachstum der Wurzeln cytokinindefizienter Pflanzen ist verstärkt, im Gegensatz zum deutlich reduzierten Sprosswachstum. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die cytokinindefizienten Wurzeln, ähnlich wie das Spross-*sink*-Gewebe, stark reduzierte Gehalte an löslichen Zuckern aufwiesen (Abbildung 2). Die geringeren Gehalte könnten durch eine schnelle Verwertung der Zucker aufgrund der erhöhten Wachstumsrate cytokinindefizienter Wurzeln verursacht worden sein, zum einen zur Bereitstellung von Energie und zum anderen zur Bildung von Biomasse. Das ATP/ADP-Verhältnis war in cytokinindefizienten Wurzeln gering erhöht, was ebenfalls auf eine verstärkte metabolische Aktivität hindeutet. Zumindest in *35S:CKX1*-transgenen Wurzeln waren die Aktivitäten aller Invertase-Isoformen sehr stark erhöht (Abbildung 5). Die damit einhergehende verstärkte Saccharosespaltung bewirkte eine vermehrte Freisetzung von Hexosen, die als Signalmolekül die Zellteilungsaktivität in den Wurzeln stimuliert haben könnten (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Roitsch und Ehneß, 2000) oder als Metabolite sofort verwertet wurden. Zudem bewirkten die erhöhten Invertaseaktivitäten vermutlich auch einen verstärkten Assimilatfluss, der den erhöhten Kohlenhydratbedarf der schnell wachsenden Wurzeln deckte. Erstaunlicherweise waren die Invertaseaktivitäten in *35S:CKX2*-transgenen Wurzeln unverändert. Ebenso erstaunlich war, dass trotz des reduzierten Zuckergehaltes und der vermuteten erhöhten metabolischen Aktivität cytokinindefizienter Wurzeln die Aktivitäten der analysierten glykolytischen Enzyme nicht verändert waren (Abbildung 6). Das deutet darauf hin, dass bei der Etablierung des Cytokinindefizienzphänotyps in Wurzeln die Glykolyse nicht limitierend war. Der Primärmetabolismus scheint für das Wurzelwachstum cytokinindefizienter Pflanzen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Betrachtet man die deutliche Vergrößerung des Wurzelmeristems dieser Pflanzen (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003), so könnte die Regulierung der Meristem- bzw. der Zellteilungsaktivität eine wichtigere Rolle spielen. Dafür spricht auch, zumindest bei *35S:CKX1*-transgenen Wurzeln, wie bereits erwähnt die erhöhte Invertaseaktivität und die damit verbundene verstärkte Bildung von Zuckersignalen, die wiederum durch positive Regulierung von Genen des Zellzyklus die Aktivität des Wurzelmeristems erhöhen können.

Das vergrößerte Wurzelsystem cytokinindefizienter Pflanzen lässt eine erhöhte *sink*-Stärke vermuten, die in Konkurrenz mit dem Spross-*sink* stehen könnte. Pfropfungsexperimente haben gezeigt, dass das Wachstum eines Wildtypsprosses durch eine stark

wachsende cytokinindefiziente Unterlage nicht negativ beeinflusst wurde (Werner *et al.*, 2008). Das verdeutlicht, dass in cytokinindefizienten Pflanzen das Wurzelwachstum nicht auf Kosten des Sprosswachstums erfolgte.

4.2 Einfluss verschiedener Faktoren der *sink*-Bildung auf das Wachstum cytokinindefizienter Pflanzen

4.2.1 Spezifische Expression der Zellwand-Invertase *CINI* im Spross-*sink*-Gewebe cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen

Cytokinindefizienz führt zu einer stark verminderten *sink*-Bildung und damit einhergehend zu einem stark reduzierten Sprosswachstum. Der Zellwand-Invertase wurde bisher eine zentrale Rolle bei der *sink*-Bildung und der Regulation des *sink*-Metabolismus zugeschrieben (Ehneß und Roitsch, 1997; Roitsch und Ehneß, 2000; Roitsch und González, 2004). Sie ist durch Cytokinin induzierbar und könnte somit eine regulatorische Schaltstelle von Cytokinin sein und dessen Wirkung vermitteln (Ehneß und Roitsch, 1997; Godt und Roitsch, 1997). Um dies zu überprüfen, wurde das Gen der Zellwand-Invertase *CINI* spezifisch im *sink*-Gewebe cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen unter Kontrolle der Promotoren *ANT* und *LFY* exprimiert. Falls die Zellwand-Invertase bei Cytokinindefizienz limitierend für die *sink*-Bildung war, sollte ihre Expression zu einer zumindest partiellen Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps führen.

Die Erzeugung der *CINI*-transgenen Pflanzen erfolgte auf zwei Wegen, nämlich durch das Kreuzen von *ANT:CINI(WT)*- bzw. *LFY:CINI(WT)*-transgenen Pflanzen mit *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen und durch direkte Transformation der *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen mit dem entsprechenden *CINI*-Konstrukt. Die durch Kreuzung erzeugten transgenen Pflanzen zeigten nur in der *CINI/CKX1*-hemizygoten F1- und der segregierenden F2-Generation eine teilweise Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps, die jedoch nicht mehr in der *CINI/CKX1*-homozygoten F3-Generation vorgefunden wurde, was ein Effekt der *CKX1*-Gendosis und nicht des eingekreuzten *CINI*-Gens sein könnte. Transgene Pflanzen, die durch direkte Transformation der *35S:CKX1*-Pflanzen erzeugt wurden, zeigten keine Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps. Die spezifische Expression des Gens der Zellwand-Invertase im Spross-*sink*-Gewebe cytokinindefizienter Pflanzen führte demnach nicht zu einer

Verbesserung des Sprosswachstums. Die Aktivität der Zellwand-Invertase war vermutlich nicht limitierend für das Sprosswachstum cytokinindefizienter Pflanzen.

Wie bereits besprochen, ergab die Analyse der physiologischen Veränderungen in *35S:CKX*-transgenen Tabakpflanzen, dass im cytokinindefizienten Spross-*sink*-Gewebe die Aktivität der Zellwand-Invertase nicht beeinträchtigt war. Es zeigte sich auch, dass im wildtypischen Sprossapex die Aktivität der vakuolären Invertase einen Anteil von 85 % der Gesamtinvertaseaktivität einnahm und daher möglicherweise eine wichtigere Rolle im *sink*-Metabolismus spielt als die Zellwand-Invertase. Im cytokinindefizienten Sprossapex war die Aktivität der vakuolären Invertase, im Gegensatz zur Zellwand-Invertase, stark reduziert. Die Reduktion der vakuolären Invertaseaktivität korrelierte mit dem deutlich gestörten Metabolismus in cytokinindefizienten Spross-*sink*-Geweben. Die vakuoläre Invertase könnte daher eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Assimilatflusses und der Regulierung der *sink*-Stärke spielen.

Weitere Hinweise für eine zentrale Funktion der vakuolären Invertase in *sink*-Geweben des Sprosses liefern Expressions- und Aktivitätsanalysen in verschiedenen Spezies. So wurde gezeigt, dass während der vegetativen Wachstumsphase von Arabidopsispflanzen die vakuoläre Invertase in jungen und auch älteren Blättern stärker exprimiert war als die Zellwand-Invertase (Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998). Während der reproduktiven Phase wurde in Rosetten- und Stängelblättern keine Expression der vakuolären Invertase detektiert, sondern nur Expression der Zellwand-Invertase (Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998). Die Expressionsanalyse der Invertasen der Ackerbohne (*Vicia faba* L.) ergab, dass die vakuoläre Invertase im Gegensatz zur Zellwand-Invertase in den meisten *sink*-Organen exprimiert wurde, einschließlich der *sink*-Blätter, und demnach eine generelle Rolle der vakuolären Invertase in *sink*-Geweben angenommen wurde (Weber *et al.*, 1995). In jungen Blättern der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) wurde im Vergleich zur Aktivität der Zellwand-Invertase eine dreifach höhere Aktivität der vakuolären Invertase gemessen (Ruffner *et al.*, 1990). Die Aktivität der vakuolären Invertase verringerte sich aber mit zunehmendem Blattalter stärker als die Aktivität der Zellwand-Invertase (Ruffner *et al.*, 1990). In *sink*-Blättern von *Lolium temulentum* L. wurde zu Beginn der Blattentwicklung nur vakuoläre Invertaseaktivität vorgefunden, jedoch keine Aktivität der Zellwand-Invertase (Kingston-Smith *et al.*, 1999). Des Weiteren konnten für zwei der drei untersuchten Zellwand-Invertasegene der Möhre (*Daucus carota* L.) (Lorenz *et al.*, 1995) sowie bei beiden analysierten Zellwand-Invertasegenen der Ackerbohne (Weber *et al.*, 1995) keine Expression in *sink*-Blättern nachgewiesen

werden. All diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, dass die Zellwand-Invertase im Vergleich zur vakuolären Invertase in *sink*-Organen des Sprosses eine eher untergeordnete Rolle spielt. Daher wäre zu untersuchen, ob die spezifische Expression der vakuolären Invertase im *sink*-Gewebe cytokinindefizienter Pflanzen eine Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps bewirkt.

Die spezielle Rolle der Zellwand-Invertase bei der *sink*-Bildung und der Regulation des *sink*-Metabolismus wurde bisher vor allem von Untersuchungen an *Chenopodium rubrum* L. abgeleitet. Es wurde gezeigt, dass die Zellwand-Invertase in *source*-Blättern, in Stängeln und insbesondere in Wurzeln eine höhere Aktivität aufwies als die intrazellulären Invertasen, deren Aktivitäten zudem, im Gegensatz zur Zellwand-Invertase, nicht durch Glucose stimuliert wurden (Roitsch *et al.*, 1995). Eine vergleichende Analyse der Invertaseaktivitäten in *sink*-Organen des Sprosses fehlte allerdings bei Roitsch *et al.* (1995). Weiterhin wurde anhand von Zellen einer Suspensionskultur von *C. rubrum* gezeigt, dass nur das Gen der Zellwand-Invertase *CINI*, jedoch nicht die Gene der intrazellulären Invertasen *CIN2* und *CIN3* durch Cytokinin induziert wurden, was für eine mögliche Rolle der Zellwand-Invertase bei der Cytokininwirkungsvermittlung spricht (Ehneß und Roitsch, 1997). Untersuchungen bei anderen Spezies verdeutlichen jedoch, dass die Expressionen oder Aktivitäten der verschiedenen Invertase-Isoformen bezüglich der Lokalisation und der Stärke zwischen den Spezies relativ zueinander variieren. Darüber hinaus werden die Gene der Invertase-Genfamilie einer Spezies differenziert, das heißt gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert, so dass sich Expressionsort und -stärke der Gene auch innerhalb einer Invertase-Isoform unterscheiden können. Dies wurde gezeigt bei Arabidopsis (Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998), Tomate (Godt und Roitsch, 1997), Möhre (Lorenz *et al.*, 1995; Sturm *et al.*, 1995), Ackerbohne (Weber *et al.*, 1995), Weinrebe (Davies und Robinson, 1996), Mais (Xu *et al.*, 1996) und Reis (Cho *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2005).

Auch die Regulation der Invertase-Gene durch Cytokinin unterscheidet sich offenbar in verschiedenen Spezies. Wie bereits erwähnt, wurde das Gen der vakuolären Invertase *CIN2* von *C. rubrum* durch Cytokinin nicht positiv reguliert (Ehneß und Roitsch, 1997). Das Gen der vakuolären Invertase *TIV* der Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) war ebenfalls nicht durch Cytokinin induzierbar (Godt und Roitsch, 1997). Im Gegensatz dazu wurde jedoch berichtet, dass zwei Gene der vakuolären Invertase von Mais (*Zea mays* L.) durch Cytokinin positiv reguliert wurden (Roitsch und Ehneß, 2000; Weber und Roitsch, 2000). Die starke Reduktion der vakuolären Invertaseaktivität im Sprossapex der in der vorliegenden Arbeit

untersuchten cytokinindefizienten Tabakpflanzen lässt auch bei Tabak auf eine mögliche positive Regulation durch Cytokinin schließen.

Ein weiterer Aspekt, der die fehlende phänotypische Reversion bei primordien-spezifischer Expression der Zellwand-Invertase in cytokinindefizienten Pflanzen erklären könnte, ist die Art der Phloementladung in *sink*-Gewebe. Es wird angenommen, dass verbrauchende *sink*-Gewebe wie das SAM oder junge Blätter Assimilate eher über den symplastischen Weg importieren als über den apoplastischen Weg (Ho, 1988; Turgeon, 1989). Die Erzeugung und Aufrechterhaltung eines Saccharosegradienten zwischen *source*- und *sink*-Organen als treibende Kraft des Assimilatimports in verbrauchende *sinks* könnte demnach vor allem durch die vakuoläre Invertase vermittelt werden.

Für eine mögliche Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps durch Expression eines Invertasegens könnte nicht nur die Isoform des kodierten Enzyms entscheidend sein, sondern auch die Expressionsdomäne. In dieser Arbeit wurde das Zellwand-Invertasegen in den Primordien lateraler Organe des Sprosses exprimiert. Es ist möglich, dass das SAM stärker durch Invertaseaktivität beeinflusst wird, als die Organprimordien und dass die Expression des Invertasegens im SAM, zum Beispiel unter Kontrolle des *STM*-Promotors, ein anderes Ergebnis gebracht hätte. Heyer *et al.* (2004) untersuchten in *Arabidopsis* die meristem-spezifische Expression eines Invertasegens der Hefe unter Kontrolle des *KNOTTED-1*-Promotors. Die Expression wurde mit Hilfe einer an das Gen fusionierten Signalsequenz in den Apoplasten geleitet und bewirkte einen früheren Blühbeginn der transgenen Pflanzen bei unverändertem Plastochron sowie eine erhöhte Schotenzahl aufgrund der verstärkten Bildung und Verzweigung axillärer Infloreszenzen. Diese Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp betrafen eher späte Entwicklungsprozesse, das generelle phänotypische Erscheinungsbild der transgenen Pflanzen unterschied sich bis zum Beginn der generativen Phase nicht vom Wildtyp (Heyer *et al.*, 2004).

4.2.2 Spezifische Expression von *CycD3* im Spross-*sink*-Gewebe cytokinin-defizienter *Arabidopsis*pflanzen

Das D-Typ Cyclin *CycD3* ist an der Regulation des Zellzyklus maßgeblich beteiligt. Durch das Vorantreiben des Übergangs von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verhindert *CycD3* den Austritt aus dem Zellzyklus und das Eintreten der Zelle in den Endozyklus (Endoreduplikation) und fördert den Ablauf des mitotischen Zellzyklus (Dewitte *et al.*, 2003). Die

CycD3-Expression ist durch Cytokinin induzierbar (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999) und auf proliferierende Gewebe wie SAM, Organprimordien und junge, sich entwickelnde Blätter beschränkt (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Dewitte *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass *CycD3* ein Vermittler der die Zellteilung stimulierenden Wirkung von Cytokinin ist (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob die spezifische Expression des Arabidopsis *CycD3;1*-Gens in den Primordien cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen unter Kontrolle der Promotoren *ANT* und *LFY* den Cytokinindefizienzphänotyp kompensieren kann. Die Primärtransformanten zeigten jedoch keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen. Die gewebespezifische *CycD3*-Expression führte also zu keiner Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps.

In verschiedenen Untersuchungen an Arabidopsis wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen *CycD3* und Cytokinin gezeigt. So wird die Expression von *CycD3;1* in Zellsuspensionskulturen und in Pflanzen durch Cytokinin induziert (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999) und ist in der Cytokinin-überproduzierenden *amp1*-Mutante erhöht (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Nogué *et al.*, 2000). In cytokinindefizienten *DSCKX1*-transgenen Pflanzen wurde eine Reduktion des *CycD3;2*-Transkriptes nachgewiesen (Yang *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *CycD3;1*-Überexpression ein von exogenem Cytokinin unabhängiges Wachstum von Arabidopsiskalli ermöglicht (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999) und der Verlust der *CycD3*-Aktivität in der *cycd3;1-3*-Dreifachmutante die Cytokininantwort reduziert (Dewitte *et al.*, 2007). All diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle von *CycD3* bei der Vermittlung der Cytokininwirkung. Es wird angenommen, dass Cytokinin den Zellzyklus primär am G1/S-Übergang durch *CycD3*-Induktion kontrolliert (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Der Übergang von der G1- zur S-Phase ist neben dem G2/M-Übergang ein wichtiger Kontrollpunkt des Zellzyklus (Meijer und Murray, 2000; Dewitte und Murray, 2003).

Untersuchungen an cytokinindefizienten Tabakpflanzen haben Hinweise darauf geliefert, dass in den Blättern dieser Pflanzen der Übergang von der G2- zur M-Phase inhibiert ist (Werner *et al.*, 2008). So enthielten sich entwickelnde Blätter juveniler *35S:CKX1*-transgener Tabakpflanzen und auch ältere Blätter adulter Pflanzen einen stark erhöhten Anteil an Zellen mit 4C-Kernen im Vergleich zu Wildtyppflanzen, während der Anteil an 2C-Kernen unverändert war (Werner *et al.*, 2008). Ein Anstieg des 4C-DNA-Gehaltes wurde auch in cytokinindefizienten Arabidopsispflanzen vorgefunden (Werner *et al.*, 2008). Diese Veränderungen lassen vermuten, dass das Eintreten der Zellen in die Mitose-

Phase in den cytokinindefizienten Tabakpflanzen inhibiert war und somit Zellen der G2-Phase akkumulierten. Unter Bedingungen der Cytokinindefizienz war also im Verlauf des Zellzyklus vermutlich der G2/M-Übergang limitierend. Ein Arrest in der G2-Phase wurde auch in Zellsuspensionskulturen von Tabak bei Mangel an exogenem Cytokinin vorgefunden (Zhang *et al.*, 2005). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cytokinin möglicherweise primär den G2/M-Übergang des Zellzyklus kontrolliert. Von einer regulatorischen Funktion von Cytokinin am G2/M-Kontrollpunkt wurde bereits berichtet (Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2005) und in Übereinstimmung damit wurde in synchronisierten Tabak BY-2-Zellen eine transiente Cytokininakkumulation während der G2/M-Übergangsphase detektiert (Redig *et al.*, 1996). Es gibt Hinweise, dass CycD3 neben der Regulation des G1/S-Übergangs ebenfalls eine zusätzliche Funktion am G2/M-Übergang haben könnte. So wurde gezeigt, dass synchronisierte Tabak BY-2-Zellen während der Mitose *CycD3;1*-Transkript akkumulieren (Sorrell *et al.*, 1999). Allerdings ist es möglich, dass die mitotische Akkumulation ein BY-2-zellspezifisches Phänomen ist und keine normale Erscheinung in Pflanzen (Meijer und Murray, 2000). Es könnten aber auch Mechanismen existieren, bei denen die Aktivierung der DNA-Replikation den Übergang in die Mitose-Phase stimuliert (Inzé und De Veylder, 2006). In *CycD3;1*-überexprimierenden Arabidopsis waren beispielsweise 90 % der Gene aus einem Set von 82 G2/M-spezifischen Genen hochreguliert (Dewitte *et al.*, 2007). Die Existenz solcher Mechanismen könnte auch den inhibierten G2/M-Übergang in cytokinindefizienten Tabakpflanzen erklären.

Eine Funktion von CycD3 bei der direkten Stimulierung des G2/M-Übergangs ist fragwürdig, da die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen sehr stark für eine zentrale Rolle bei der Regulation des G1/S-Übergangs sprechen. Die Überexpression von *CycD3;1* sowohl in Arabidopsispflanzen als auch in Zellsuspensionskulturen von Arabidopsis bewirkte eine Reduktion des Anteils von Zellen der G1-Phase, das heißt einen beschleunigten G1/S-Übergang, und eine Akkumulation der Zellen in der G2-Phase, förderte aber nicht den G2/M-Übergang und den Ablauf der Mitose (Dewitte *et al.*, 2003; Menges *et al.*, 2006). Auch in *CycD3;1*-überexprimierenden Tabakpflanzen wurde im SAM und in apikalen Internodien eine Reduktion der 2C-Kerne (G1-Phase) und eine Zunahme der 4C-Kerne (G2-Phase) vorgefunden (Boucheron *et al.*, 2005). Die Zunahme der 4C-Zellen in *CycD3;1*-Überexprimierern und der ebenfalls erhöhte Anteil der 4C-Zellen in cytokinindefizienten Pflanzen stehen bei einem angenommenen funktionellen Zusammenhang von CycD3 und Cytokinin im Widerspruch zueinander, könnten aber unterschiedliche Ursachen haben. So wurde die

Reduktion der 2C-Zellen in *CycD3;1*-überexprimierenden Pflanzen als beschleunigter G1-Austritt interpretiert (Dewitte *et al.*, 2003), während die Akkumulation von 4C-Kernen bei unverändertem Gehalt an 2C-Kernen in cytokinindefizienten Pflanzen für einen inhibierten G2/M-Übergang spricht (Werner *et al.*, 2008). Die Zunahme der 4C-Zellen in cytokinindefizienten Pflanzen könnte auch so interpretiert werden, dass es sich dabei um Zellen der G1-Phase handelte, die aus einer Endoreduplikation hervorgegangen sind (Meijer und Murray, 2000). Dafür spricht, dass in *CycD3;1*-überexprimierenden Pflanzen der Ablauf des Endozyklus durch CycD3 inhibiert wird (Dewitte *et al.*, 2003) und der Verlust der CycD3-Aktivität in der Dreifachmutante *cycD3;1-3* zu einer vorzeitigen Beendigung des mitotischen Zellzyklus und einem vorzeitigen Einsetzen der Endoreduplikation führt (Dewitte *et al.*, 2007).

Cytokinindefiziente Arabidopsispflanzen und *cycD3;1-3*-Mutanten haben die Reduktion der Zellzahl und die Zunahme der Zellgröße in Blättern gemeinsam (Werner *et al.*, 2003; Dewitte *et al.*, 2007). Die Kompensation der reduzierten Zellzahl durch die Zunahme der Zellgröße aufgrund einer vermehrten Endoreduplikation in *cycD3;1-3*-Mutanten führte dazu, dass die Organe der Mutanten keine Veränderungen in ihrer Größe zeigten (Dewitte *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den Blättern der Mutante wiesen cytokinindefiziente Blätter keine Erhöhung des Ploidiegrades auf und die geringe Zunahme der Zellgröße kompensierte nicht die Zellzahlreduktion, so dass die Blattgröße reduziert war. Zwischen der Zellgröße und dem Ploidiegrad besteht eine positive Korrelation (Sugimoto-Shirasu und Roberts, 2003) und CycD3 hat durch die Inhibierung des Endozyklus einen Einfluss auf den Ploidiegrad (Dewitte *et al.*, 2003). Möglicherweise ist in cytokinindefizienten Pflanzen die CycD3-Funktion nicht für das Wachstum limitierend, so dass die spezifische *CycD3*-Expression in den Organprimordien dieser Pflanzen keine Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps bewirkte.

Die Beeinflussung des Zellzyklus durch Cytokinindefizienz könnte auch teilweise indirekt durch den aufgrund der Cytokinindefizienz veränderten Zuckerstatus erfolgen. Es wurde gezeigt, dass die *CycD3*-Induktion durch Cytokinin von der Saccharoseverfügbarkeit abhängt und auch allein durch Saccharose möglich ist (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Eine reduzierte Zuckerverfügbarkeit könnte sich auf die Regulierung von Genen des Zellzyklus negativ ausgewirkt haben. Auch die Versorgung des *sink*-Gewebes mit Kohlenstoff und Energie könnte durch den reduzierten Zuckerstatus verringert gewesen sein. Es ist daher denkbar, dass ein reduzierter Zuckergehalt im cytokinindefizienten *sink*-Gewebe trotz der

ortsspezifischen *CycD3*-Expression eine Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps verhinderte.

Zusammenfassend sind folgende mögliche Gründe für die nicht erfolgte Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps durch die primordienspezifische *CycD3*-Expression in cytokinindefizienten Pflanzen zu nennen. In cytokinindefizienten Pflanzen ist der G2/M-Übergang des Zellzyklus inhibiert und für das Wachstum limitierend, so dass eine Erhöhung der Aktivität von *CycD3*, das primär den G1/S-Übergang reguliert, keinen Effekt hatte. Dies würde bedeuten, dass der limitierende Schritt während des Zellzyklus, der durch Cytokinin kontrolliert wird, eher der G2/M-Übergang und nicht der G1/S-Übergang sein könnte, so dass *CycD3* bei Cytokinindefizienz nicht limitierend ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass *CycD3* unter cytokinindefizienten Bedingungen für das Wachstum limitierend ist und die Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps durch *sink*-spezifische *CycD3*-Expression aufgrund der reduzierten Zuckerverfügbarkeit in cytokinindefizienten *sink*-Gewebe verhindert wurde.

4.2.3 Erhöhung des Trehalose-6-phosphat-Gehaltes in cytokinindefizienten Arabidopsispflanzen

Trehalose-6-phosphat (Tre6P) ist essenziell für die Kohlenhydratverwertung und die Pflanzenentwicklung (Eastmond *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003). Als Signalmolekül verknüpft Tre6P den primären Kohlenstoffmetabolismus mit Wachstum und Entwicklung (Avonce *et al.*, 2004; Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2008). Tre6P wird durch die Trehalose-6-phosphat-Synthase (TPS) aus Glucose-6-phosphat und UDP-Glucose synthetisiert und durch die Trehalose-6-phosphat-Phosphatase (TPP) zu Trehalose dephosphoryliert (Cabib und Leloir, 1958). In Microarray-Analysen wurden Gene des Trehalose-Metabolismus als bisher unbekanntes cytokininsensitive Gene identifiziert (Brenner *et al.*, 2005). So waren in *Arabidopsis* verschiedene Gene der *TPS*-Genfamilie bei Cytokininbehandlung hochreguliert und in cytokinindefizienten Pflanzen herabreguliert sowie außerdem ein Gen der *TPP*-Genfamilie durch Cytokinin herabreguliert (Brenner *et al.*, 2005). Die Expressionsdaten deuten auf einen geringeren Tre6P-Gehalt in cytokinindefizienten Pflanzen hin, der möglicherweise für das Pflanzenwachstum limitierend ist und an der Etablierung des Cytokinindefizienzphänotyps beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob eine Erhöhung des endogenen Tre6P-Gehaltes in cytokinindefizienten Pflanzen den Cytokinindefizienzphänotyp kompensieren kann. Dies sollte durch

Kreuzung cytokinindefizienter Arabidopsispflanzen mit Pflanzen, die das TPS kodierende *otsA*-Gen aus *E. coli* konstitutiv exprimieren und einen erhöhten Tre6P-Gehalt aufwiesen, erfolgten (Schluepmann *et al.*, 2003). Dieser Versuchsansatz konnte allerdings nicht zur Klärung der Rolle von Tre6P bei der Etablierung des Cytokinindefizienzphänotyps beitragen, da das Einkreuzen des unter der Kontrolle des *35S*-Promotors stehenden *otsA*-Gens in *35S:CKXI*-transgene Arabidopsispflanzen ein *silencing* des *CKXI*-Transgens bewirkte (Abbildung 13). Das Transgen-*silencing* erfolgte vermutlich durch transkriptionelle *trans*-Inaktivierung, die bei gleichen Promotoren der Transgene auftreten kann (Vaucheret *et al.*, 1998).

Ein anderer Ansatz zur Erhöhung des Tre6P-Gehaltes in Pflanzen ist die Gabe von exogener Trehalose, die effizient in die Pflanzenzelle importiert wird und als Produkt der TPP die Reaktion dieses Enzyms hemmt, was die Akkumulation von endogenem Tre6P, dem Substrat der TPP, zur Folge hat (Schluepmann *et al.*, 2004). Wildtypkeimlinge, cytokinindefiziente Keimlinge und Keimlinge von Cytokininrezeptormutanten von Arabidopsis zeigten *in vitro* in Gegenwart verschiedener Trehalosekonzentrationen differenzierte Wachstumsänderungen im Vergleich zum Wachstum ohne Trehalose. Es ist bekannt, dass exogene Trehalose das Keimlingswachstum, insbesondere das Wurzelwachstum, beeinträchtigt, was auf endogene Tre6P-Akkumulation zurückzuführen ist (Wingler *et al.*, 2000; Schluepmann *et al.*, 2004). Die Wachstumsinhibierung kann durch zusätzlichen metabolisierbaren Zucker im Nährmedium, wie zum Beispiel Saccharose, reduziert werden, was durch Wurzellängenmessungen gezeigt wurde (Schluepmann *et al.*, 2004). Im Versuch waren sowohl Spross- als auch Wurzelwachstum der Wildtyppflanzen in Korrelation zur Trehalosekonzentration vermindert, wobei durch zusätzliche Saccharose nur die Inhibierung des Wurzelwachstums reduziert wurde (Abbildungen 15 und 17).

Die Sprossmassen der *35S:CKXI*-transgenen Arabidopsispflanzen und der *ahk2 ahk3 cre1*-Dreifachmutanten waren bei niedriger Trehalosekonzentration (10 mM) sogar erhöht und bei hoher Trehalosekonzentration (50 mM) reduziert, jedoch nicht so stark wie bei dem Wildtyp (Abbildung 15). Diese Wachstumsänderungen als Antwort auf exogene Trehalose erfolgten zumindest bei *35S:CKXI*-Pflanzen unabhängig von Saccharose. Das Wachstum der Primärwurzel *35S:CKXI*-transgener Pflanzen war verglichen mit dem Wildtyp nahezu unverändert, sowohl mit als auch ohne Saccharose (Abbildung 17). Interessanterweise war zudem die Anzahl der Lateralwurzeln bei geringer Trehalosekonzentration im Vergleich zum Wachstum ohne Trehalose signifikant um etwa 20 % erhöht, während die Lateralwurzelzahl

der übrigen getesteten Genotypen nicht bzw. kaum verändert war (Abbildung 18). Das Wurzelwachstum von *ahk2 ahk3 cre1*-Mutanten wurde nicht untersucht. Die Wachstumsänderungen von Spross und Primärwurzel der *ahk2 ahk3*-Doppelmutanten als Antwort auf exogene Trehalose ähnelten denen der Wildtyppflanzen (Abbildungen 15 und 17). Bei *35S:CKX2*-transgenen Pflanzen ähnelten zumindest die Wachstumsänderungen des Sprosses denen des Wildtyps (Abbildungen 15 und 17).

Es wurde angenommen, dass cytokinindefiziente Pflanzen einen reduzierten Tre6P-Gehalt aufweisen (Brenner *et al.*, 2005). Die Erhöhung des endogenen Tre6P-Gehaltes durch Zufuhr von exogener Trehalose sollte zur Kompensierung des Cytokinindefizienzphänotyps führen, falls bei dessen Etablierung Tre6P eine Rolle spielt. Durch 10 mM exogene Trehalose erhöhte sich die Sprossmasse *35S:CKXI*-transgener Pflanzen etwa auf den Wert der Wildtypsprossmasse ohne Trehalose. Allerdings erfolgte keine Reversion der morphologischen Veränderungen *35S:CKXI*-transgener Pflanzen, da die Rosettengröße dieser Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp weiterhin stark reduziert war (Abbildung 14). Die Unterschiede der Rosettengrößen von transgenen und Wildtyppflanzen bei ähnlichen Sprossmassen könnten durch die reduzierte spezifische Blattfläche (Blattfläche pro Blattmasse) der cytokinindefizienten Blättern erklärt werden (T. Werner, persönliche Mitteilung).

Bei einer Kompensierung des Wurzelphänotyps *35S:CKXI*-transgener Pflanzen wäre eine Reduktion des Wurzelwachstums zu erwarten. Allerdings könnte diese auch Folge einer allgemeinen Tre6P-vermittelten Wachstumshemmung sein. Überraschenderweise war die Längenzunahme der Primärwurzeln der *35S:CKXI*-Pflanzen bei Wachstum mit Trehalose nicht reduziert, sondern nahezu unverändert, was darauf hindeutet, dass Cytokinindefizienz zu einer Trehalose- bzw. Tre6P-Insensitivität führte. Die verstärkte Bildung von Lateralwurzeln bei *35S:CKXI*-transgenen Pflanzen als Antwort auf exogene Trehalose deutet nicht auf eine Kompensierung des Cytokinindefizienzphänotyps hin, allerdings auch nicht auf eine Trehalose-/Tre6P-Insensitivität.

Im Gegensatz zu *35S:CKXI*-transgenen Pflanzen ähnelte das Wachstumsverhalten *35S:CKX2*-transgener Pflanzen bei exogener Trehalose dem des Wildtyps. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten beider *35S:CKX*-Linien in Gegenwart von exogener Trehalose resultierte möglicherweise aus der unterschiedlichen zellulären Lokalisation der CKX-Proteine. Im Gegensatz zum extrazellulären Cytokininabbau durch CKX2 scheint der intrazelluläre Cytokininabbau durch CKX1 eine Rolle bei der Trehalose/Tre6P-Wirkung zu spielen, was in Übereinstimmung mit dem intrazellulären Tre6P-Metabolismus steht. Die

subzelluläre Lokalisation der TPS- und TPP-Proteine ist hauptsächlich cytosolisch und plastidär (Winter *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2008).

Neben cytokinindefizienten Pflanzen wurden auch Cytokininrezeptormutanten dem Wachstumstest unterzogen, um zu überprüfen, ob Cytokininmetabolite oder/und das Cytokinin signal bei einer möglichen Regulation des Trehalose/Tre6P-Metabolismus eine Rolle spielen. Das Sprosswachstum der *ahk2 ahk3*- und *ahk2 ahk3 cre1*-Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp aufgrund des blockierten Cytokinin signalweges stark reduziert (Riefler *et al.*, 2006). Als Antwort auf exogene Trehalose zeigte nur die Dreifachmutante *ahk2 ahk3 cre1*, nicht aber die Doppelmutante *ahk2 ahk3*, eine vom Wildtyp abweichende relative Änderung des Sprosswachstums. Ähnlich wie bei *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen war die Sprossmasse der Dreifachmutante bei geringer Trehalosekonzentration erhöht (Abbildung 15). Mit Saccharose im Medium erreichte sie bei 10 mM Trehalose etwa die Sprossmasse von Wildtyppflanzen, die ohne Trehalose gewachsen sind. In Anwesenheit von Saccharose war die Sprossmasse der Dreifachmutante aber auch ohne Trehalose relativ hoch, obwohl die Sprossgröße im Vergleich zum Wildtyp verringert war (Abbildung 14), was auf eine reduzierte spezifische Blattfläche (Blattfläche pro Blattmasse) hinweist. Die Diskrepanz zum zuvor beschriebenen Phänotyp der Mutante kann mehrere Ursachen haben. Bei Riefler *et al.* (2006) wurde das Sprosswachstum durch Messung des Rosettendurchmessers von auf Erde gewachsenen Pflanzen 25 Tage nach Keimung analysiert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dagegen die Messung der Sprossmassen von *in vitro* gewachsenen Pflanzen zu einem früheren Zeitpunkt (14 TNA).

Ein weiterer Aspekt für das veränderte Wachstumsverhalten der Mutanten war die Verfügbarkeit von Saccharose. Im Gegensatz zu den übrigen analysierten Genotypen reagierte die *ahk2 ahk3 cre1*-Mutante auf Saccharose mit einer sehr starken Zunahme des Sprosswachstums, das heißt im Vergleich zum Wachstum ohne Saccharose verdreifachte sich die Sprossmasse der Mutante und vervierfachte sich sogar in Gegenwart von 10 mM Trehalose (Abbildung 16). Die Verstärkung des Sprosswachstums durch exogene Trehalose spricht für einen reduzierten Tre6P-Gehalt der *ahk2 ahk3 cre1*-Mutante. Allerdings wurde gezeigt, dass Zuckergabe das Wachstum von Pflanzen mit reduziertem Tre6P-Gehalt (*TPP*-Überexprimierer, *tps1*-Mutante) stark inhibiert und das von Pflanzen mit erhöhtem Tre6P-Gehalt (*TPS*-Überexprimierer) im Vergleich zu Wildtyppflanzen verbessert (Eastmond *et al.*, 2002; Schlupe mann *et al.*, 2003).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass möglicherweise sowohl intrazelluläre Cytokininmetabolite als auch das extrazelluläre Cytokinin signal eine Rolle bei der Regulierung des Tre6P-Metabolismus spielen. Hinweise dafür waren die Verstärkung des Sprosswachstums von *35S:CKX1*-transgenen Pflanzen und *ahk2 ahk3 cre1*-Mutanten durch exogene Trehalose sowie die unveränderte Wurzelverlängerung der *35S:CKX1*-Pflanzen. Die dem Wildtyp ähnliche Reaktion der *ahk2 ahk3*-Mutanten auf exogene Trehalose lässt eine funktionelle Redundanz der Cytokininrezeptoren bezüglich der Reaktion auf Tre6P vermuten. Es ist aber auch zu bedenken, dass der positive Effekt von exogener Trehalose auf das Wachstum von *35S:CKX1*- und *ahk2 ahk3 cre1*-Pflanzen auch indirekt erzielt worden sein kann und nicht unmittelbar mit Cytokinin verknüpft sein muss. Es wurde gezeigt, dass exogene Trehalose die Expression von Genen des Primärmetabolismus beeinflusst (Müller *et al.*, 1998; Wingler *et al.*, 2000). Es wäre also denkbar, dass Trehalose/Tre6P eine durch Cytokinindefizienz verursachte Reduktion der Expression bestimmter Gene kompensiert.

Die durch Microarray-Analyse identifizierten cytokininregulierten *TPS*-Gene von Arabidopsis, *TPS6* und *TPS8* bis *TPS11*, gehören zur *TPS*-Klasse II (W. Brenner, persönliche Mitteilung). Es konnte jedoch bei *TPS*-Genen der Klasse II weder *TPS*- noch *TPP*-Aktivität in Enzymtests nachgewiesen werden (Lunn, 2007; Paul *et al.*, 2008). In der *ahk2 ahk3 cre1*-Mutante war das Klasse II-Gen *TPS11* sehr stark herabreguliert und durch Cytokinin bereits nach 15 Minuten vierfach hochreguliert (M. Riefler, unveröffentlichte Ergebnisse). Allerdings war in *35S:CKX1*-transgenen Arabidopsis das Klasse I-Gen *TPS1* herabreguliert (Brenner *et al.*, 2005), dessen Produkt nachweislich *TPS*-Aktivität besitzt (Blázquez *et al.*, 1998). Ob *TPS1* als einziges Protein der *TPS*-Klasse I Aktivität besitzt (Ramon und Rolland, 2007; Paul *et al.*, 2008) oder alle vier Proteine, *TPS1* bis *TPS4* (Lunn, 2007), scheint nicht eindeutig geklärt zu sein. Falls nur ein Protein (*TPS1*) aktiv ist, könnte die Kontrolle des Tre6P-Gehaltes in der Pflanze hauptsächlich über den Tre6P-Abbau durch *TPP*-Aktivität erfolgen (Ramon und Rolland, 2007), möglicherweise auch cytokininreguliert. In Arabidopsis wurde zumindest eines der zehn *TPP*-Gene durch Cytokinin herabreguliert (Brenner *et al.*, 2005). Obwohl für Klasse II *TPS*-Proteine und *TPS2* bis *TPS4* keine katalytische Aktivität nachgewiesen wurde, kann eine regulatorische Funktion dieser Proteine nicht ausgeschlossen werden (Ramon und Rolland, 2007), so dass Cytokinin möglicherweise über diese Enzyme nicht den Tre6P-Gehalt der Pflanze kontrolliert, sondern andere Faktoren oder Prozesse.

Ob der Tre6P-Gehalt in cytokinindefizienten Pflanzen tatsächlich wie bisher vermutet reduziert ist, ist fraglich. Pflanzen mit reduziertem Tre6P-Gehalt (*TPP*-Überexprimierer)

unterscheiden sich stark in morphologischen und physiologischen Merkmalen von cytokinin-defizienten Pflanzen. Sie haben große, dünne, hellgrüne Blätter und eine reduzierte photosynthetische Kapazität pro Blattfläche und Pflanzen mit erhöhtem Tre6P-Gehalt (*TPS*-Überexprimierer) haben kleine, dicke, dunkelgrüne Blätter und eine erhöhte photosynthetische Kapazität pro Blattfläche (Schluepmann *et al.*, 2003; Pellny *et al.*, 2004; Paul, 2007). Außerdem akkumulieren Keimlinge mit erhöhtem Tre6P-Gehalt Stärke in Kotyledonen und Blättern aufgrund einer verstärkten Stärkesynthese und eines reduzierten Stärkeabbaus, was nicht bei Pflanzen mit reduziertem Tre6P-Gehalt auftritt (Wingler *et al.*, 2000; Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2007). Der Stärkenachweis in Arabidopsiskeimlingen mit Lugolscher Lösung zu Beginn der Lichtphase zeigte, dass auch *35S:CKX1*-transgene Keimlinge in ihren Kotyledonen Stärke akkumulierten und nicht während der Dunkelphase abbauten, was ebenfalls eher gegen einen reduzierten Tre6P-Gehalt spricht (Abbildung 38). Bei Wildtyp- und *35S:CKX2*-transgenen Keimlingen wurde keine Stärkeakkumulation gefunden. Im Gegensatz zu *35S:CKX1*-transgenen Keimlingen zeigten also *35S:CKX2*-transgene Keimlinge weder eine veränderte Reaktion auf exogene Trehalose noch eine gestörte Stärkemobilisierung.

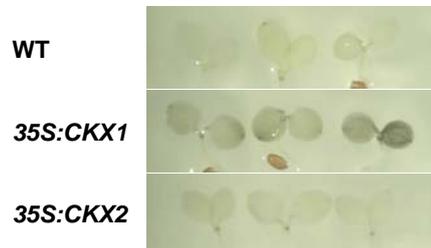


Abbildung 38: Stärkeakkumulation in den Kotyledonen von Wildtyp, *35S:CKX1*- und *35S:CKX2*-transgenen Arabidopsiskeimlingen. Der Stärkenachweise erfolgte mit Lugolscher Lösung zu Beginn der Lichtphase vier TNA. Bei älteren Keimlingen (11 TNA) war kein Unterschied in der Stärkeakkumulation zu beobachten.

4.3 Auswirkung lokaler Cytokinindefizienz in verschiedenen Domänen des Spross-*sink*-Gewebes auf das Wachstum von Arabidopsispflanzen

4.3.1 Reduktion des Cytokininingehaltes im gesamten Sprossapikalmeristem

Die lokale, spezifische Reduktion des Cytokininingehaltes in verschiedenen Regionen des Sprossapex von Arabidopsispflanzen sollte zur Klärung beitragen, welche Domänen oder Zelltypen des Spross-*sink*-Gewebes für die Regulation von Wachstum und Entwicklung durch

Cytokinin wichtig sind. Um den Cytokiningehalt spezifisch im Sprossapikalmeristem (SAM) zu reduzieren, wurde das *CKX3*-Gen unter Kontrolle des *STM*-Promotors exprimiert. Die *STM:CKX3*-Expression war bei 35 % der selektierten Primärtransformanten letal. Die nicht lebensfähigen Keimlinge bildeten ein primäres Sprossmeristem, das aber bald, meist nach der Bildung des ersten Blattpaares, seine Aktivität einstellte. Zudem waren die Keimlinge *in vitro* blassgrün bis gelblich, was darauf hindeutete, dass photosynthetische bzw. metabolische Prozesse beeinträchtigt waren. Es ist denkbar, dass eine verminderte Assimilatversorgung oder Kohlenhydratverwertung die Aktivität des SAM einschränkte und schließlich zur Termination führte. Das inhibierte Keimlingswachstum war daher möglicherweise nicht allein auf eine gestörte Meristemaktivität zurückzuführen. Keimlinge von Mutanten, bei denen die Etablierung und Aufrechterhaltung des SAM gestört ist, zum Beispiel *stm* und *wus* (Clark *et al.*, 1996; Laux *et al.*, 1996), sind grün im Gegensatz zu den chlorotischen *STM:CKX3*-tragenen Keimlingen.

Transgene Pflanzen, bei denen die *STM:CKX3*-Expression nicht letal war, durchliefen einen normalen Entwicklungszyklus. Wachstum und Entwicklung dieser Pflanzen waren im Vergleich zu Wildtyppflanzen aber etwas verzögert, was sich am verlängerten Plastochron, am verlangsamten Rosettenwachstum und dem späteren Blühbeginn zeigte (Abbildungen 23A, B und C). Die Zahl der Rosettenblätter der transgenen Linien war verglichen mit dem Wildtyp dagegen kaum verändert. Die Reduktion des Cytokiningehaltes im Bereich des gesamten SAM bewirkte vermutlich in geringem Maße eine Verlangsamung oder Reduktion der Meristemaktivität. Eine langsamere oder reduzierte Zellvermehrung im SAM könnte die Verlängerung des Zeitintervalls zwischen der Bildung zweier Blattprimordien, also des Plastochrons, erklären. Möglicherweise war auch die Größe, insbesondere der Durchmesser des primären SAM der *STM:CKX3*-tragenen Pflanzen reduziert. Dies würde die im Vergleich zum Wildtyp dünneren Stängel der Hauptinfloreszenzen erklären. In diesem Fall würden von der peripheren Zone und der Rippenzone des SAM weniger Zellen basipetal für die Bildung des Stängels abgegliedert werden (siehe Abbildung 19).

Die Hauptstängel der transgenen Pflanzen standen nicht wie beim Wildtyp aufrecht, sondern hingen herab, was eine verminderte Stabilität vermuten lässt, möglicherweise nicht nur durch den reduzierten Durchmesser, sondern auch aufgrund morphologischer Veränderungen des Stängels, die durch Cytokininmangel verursacht worden sein könnten. Dies ist denkbar, da *STM* nicht nur im SAM, sondern auch in Stängeln, inklusive der Leitgewebe, exprimiert wird (Long *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2007), so dass der

Cytokiningehalt auch in diesen Geweben durch *STM*-domänenspezifische *CKX3*-Expression reduziert wurde. Cytokinin könnte möglicherweise an der Bildung bzw. der Differenzierung von Stängelgeweben beteiligt sein.

Auch während der reproduktiven Phase war die Aktivität des primären Meristems scheinbar verlangsamt, was sich aus der Schotenbildung schließen lässt. Die Blühdauer der Hauptinfloreszenz, ermittelt aus dem gemessenen Blühbeginn (Abbildung 23B) und dem Zeitpunkt der Termination des Hauptsprosses (Abbildung 24, Legende), betrug bei *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen etwa 26 Tage und bei Wildtyppflanzen etwa 24 Tage. Trotz der etwas längeren Blüh- bzw. Wachstumsphase war im Vergleich zum Wildtyp die Höhe des Hauptsprosses der transgenen Pflanzen und damit einhergehend die Zahl der gebildeten Blüten bzw. Schoten reduziert, während die mittlere Schotendichte unverändert oder nur gering reduziert war (Abbildungen 24A, C und D). Die Wachstumsrate des Stängels, das heißt der Längenzuwachs pro Zeiteinheit, war demnach reduziert und das Zeitintervall zwischen der Bildung zweier Blütenprimordien verlängert, in Übereinstimmung mit dem verlängerten Plastochron der Blätter. Aufgrund der unveränderten Internodienlänge zwischen den Schoten war das räumliche Muster der Initiation der Blütenprimordien im SAM vermutlich kaum verändert. Bei *CKX3*-überexprimierenden Pflanzen waren die Wachstumsrate des Hauptsprosses und die Blütenbildung sogar noch stärker reduziert. Bei einer Blühdauer der Hauptinfloreszenzen von 25-32 Tagen waren die Hauptsprosslänge *35S:CKX3*-transgener Pflanzen auf 50 % und die Schotenzahl auf 36 % des Wildtypwertes reduziert (Abbildungen 24A und C). Zusätzlich war die Schotendichte verglichen mit dem Wildtyp aber um 30 % reduziert (Abbildung 24D), das heißt die Internodien zwischen den Schoten waren verlängert. Dies kann neben einer veränderten zeitlichen Regulation auch aus einem veränderten räumlichen Muster der Primordieninitiation im SAM resultieren und/oder aus dem nachfolgenden Wachstum der Internodien während der Stängelentwicklung.

STM:CKX3-transgene Pflanzen zeigten Merkmale, die auf eine reduzierte Apikaldominanz hinweisen. So hatte sich die Anzahl der axillären Sprosse im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt, während die Höhe des Hauptsprosses reduziert war (Abbildungen 24A und B). Zudem war bei nahezu allen Pflanzen ein Teil der axillären Infloreszenzen höher als der Hauptspross, was nie bei Wildtyppflanzen beobachtet wurde. Die Verzweigung eines Sprosses hängt sowohl von der Initiation axillärer Meristeme als auch von der Regulation des Auswachsens der axillären Knospen ab (Schmitz und Theres, 2005). Das Auswachsen der axillären Knospen wird durch den inhibierenden Effekt des primären Sprossapex, der so

genannten Apikaldominanz, kontrolliert (Cline, 1997). Diese Inhibierung erfolgt durch Auxin, das hauptsächlich im Sprossapex und in jungen Blättern synthetisiert wird (Ljung *et al.*, 2001) und basipetal in den Spross transportiert wird durch polaren, aktiven Transport im Vaskularparenchym (Blakeslee *et al.*, 2005). Falls das primäre SAM in *STM:CKX3*-trangen Pflanzen tatsächlich kleiner war, so war dadurch auch eine wichtige Auxin-*source* reduziert.

Es gibt verschiedene Hypothesen zur Kontrolle der Sprossverzweigung (Dun *et al.*, 2006). Nach der klassischen Hypothese kontrolliert Auxin die Sprossverzweigung durch die Beeinflussung potentieller sekundärer Botenstoffe, wie zum Beispiel Cytokinin, das das Auswachsen axillärer Knospen fördert (Cline, 1991; Chatfield *et al.*, 2000). Es wurde berichtet, dass Auxin direkt die Cytokininbiosynthese negativ reguliert (Nordström *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006) und den Cytokininabbau verstärkt (Palni *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1995). In *STM:CKX3*-trangen Pflanzen könnte die Inhibierung der Cytokininbiosynthese und der Cytokininabbau durch Auxin verringert gewesen sein, und zwar aufgrund einer möglichen reduzierten Auxinproduktion im SAM oder eines möglichen reduzierten Auxintransportes durch die dünneren Stängel. Nach der Auxintransport-Hypothese ist das Auswachsen axillärer Knospen von der Etablierung eines eigenen Auxintransportes abhängig, der mit dem Auxintransport im Hauptstängel konkurriert (Dun *et al.*, 2006; Ongaro und Leyser, 2007). Da bei *STM:CKX3*-trangen Pflanzen die axilläre Verzweigung verstärkt war, könnte der Auxintransport im Hauptstängel reduziert gewesen sein, so dass die axillären Knospen Auxin exportieren konnten, oder aber die Auxintransportkapazität war verändert.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cytokinin im primären SAM die Meristemaktivität und infolge dessen die Rate der Initiation von Blatt- und Blütenprimordien, also das Plastochron, sowie die Wachstumsrate der primären Sprossachse positiv beeinflusst. Es bleibt zu untersuchen, ob das primäre SAM und der Hauptstängel *STM:CKX3*-tranger Pflanzen morphologische Veränderungen aufweisen, die im Zusammenhang mit der reduzierten Apikaldominanz dieser Pflanzen und einer möglichen veränderten Auxinregulation stehen könnten. Erstaunlicherweise zeigten die axillären Infloreszenzen der *STM:CKX3*-trangen Pflanzen nicht die phänotypischen Merkmale der Hauptinfloreszenzen, und auch die Morphologie der Blüten war nicht verändert. Möglicherweise reguliert Cytokinin die Meristemaktivität in den verschiedenen SAM auf unterschiedliche Weise.

4.3.2 Reduktion des Cytokiningehaltes im Organisierenden Zentrum und in den Stammzellen

Die lokale Reduktion des Cytokiningehaltes im Organisierenden Zentrum (OZ) durch *WUS:CKX3*-Expression oder in den Stammzellen durch *CLV3:CKX3*-Expression bewirkte unter normalen Wachstumsbedingungen verglichen mit dem Wildtyp keine wesentlichen Veränderungen des Pflanzenwachstums. Im Gegensatz dazu war bei *in vitro* Wachstum in Gegenwart von Hygromycin teilweise die Entwicklung der transgenen Keimlinge beider Genotypen gestört. Phänotypische Veränderungen dieser Keimlinge betrafen die Meristem- bildung und die Entwicklung der ersten beiden Blätter, wobei die Merkmale in verschiedenen Kombinationen auftraten. Merkmale des Keimlingsphänotyps waren die Bildung sekundärer Meristeme anstelle des primären SAM und das Fehlen und/oder die Missbildung eines oder beider Blätter des ersten Blattpaares (Abbildung 25). Interessanterweise waren sowohl die Penetranz des Keimlingsphänotyps als auch die relative Häufigkeit der Bildung sekundärer Meristeme und der Blattmissbildungen bei Wachstum auf Ats-Nährmedium deutlich höher als auf MS-Medium (Tabelle 11). Die Nährmedien unterscheiden sich vor allem im Gehalt an Stickstoffverbindungen (NO_3^- und NH_4^+) und Phosphat. MS-Medium enthält 40 mM NO_3^- , 21 mM NH_4^+ und 1,25 mM PO_4^{3-} , während Ats-Medium nur 15 % der Stickstoffverbindungen enthält, und zwar lediglich 9 mM NO_3^- und kein NH_4^+ , sowie 2,5 mM PO_4^{3-} (Herstellerangaben der Fa. Duchefa, Haarlem, Niederlande; Abschnitt 2.3.3). Möglicherweise resultierten die Unterschiede im Keimlingswachstum auf Ats- und auf MS-Medium aus einem unterschiedlichen Cytokininstatus der Keimlinge, wenn man bedenkt, dass die Cytokin- biosynthese durch Nitrat hochreguliert wird (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004a). Bei Wachstum auf Ats-Medium könnte der lokale Cytokininabbau im SAM weniger ausgeglichen werden und sich daher drastischer auf das Keimlingswachstum auswirken.

Die Häufigkeit des Keimlingsphänotyps bei Wachstum auf Ats-Medium mit Hygromycin konnte durch Zugabe eines chemischen CKX-Inhibitors (Zatloukal *et al.*, 2008) reduziert werden (Tabelle 12), was auf einen Zusammenhang zwischen Hygromycineffekt und CKX-Aktivität hindeutet. Daraus lässt sich schließen, dass die Reduktion des Cytokiningehaltes im OZ bzw. in den Stammzellen unter Selektionsdruck eine negative Auswirkung auf das frühe Keimlingswachstum hat. Da die transgenen Keimlinge sich ohne Hygromycin völlig normal entwickelten, kann davon ausgegangen werden, dass trotz der OZ- bzw. der Stammzell-spezifischen Cytokininreduktion das primäre SAM während der Embryogenese ausgebildet wurde. In Gegenwart von Hygromycin konnte jedoch vermutlich

die Aktivität des primären Meristems teilweise nicht aufrechterhalten werden bzw. wurde die Initiation und/oder die Entwicklung der Blattprimordien inhibiert.

In einem anderen, hier nicht dargestellten Versuchsansatz wurden Pflanzen erzeugt, bei denen die *WUS*- bzw. *CLV3*-domänenspezifische *CKX3*-Expression Ethanol-induzierbar ist (Deveaux *et al.*, 2003). Diese transgenen Pflanzen besitzen sowohl Hygromycin- als auch Phosphinothricin (PPT)-Resistenz. Erste Untersuchungen ergaben, dass *WUS:alcR; alcA:CKX3*-transgene Keimlinge, bei denen das *CKX3*-Transgen an einen PPT-Resistenzmarker gekoppelt ist, den beschriebenen Phänotyp weder bei Wachstum mit Hygromycin noch mit PPT zeigten. Unter den *CLV3:alcR; alcA:CKX3*-transgenen Keimlingen, bei denen das *CKX3*-Transgen an einen Hygromycinresistenzmarker gekoppelt ist, zeigten dagegen in Gegenwart von Hygromycin einige den Keimlingsphänotyp, nicht aber bei Wachstum mit PPT. Hygromycin hemmt die Proteinbiosynthese im Translokationsschritt am 70S Ribosom, während PPT die Photosynthese inhibiert. Möglicherweise war bei der Etablierung des Keimlingsphänotyps die Wirkungsweise des Antibiotikums und nicht der Selektionsdruck an sich entscheidend. Interessanterweise wurde bei *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen der Phänotyp nicht vorgefunden, obwohl das OZ und die Stammzellregion innerhalb der *STM*-Expressionsdomäne liegen.

Die *WUS:CKX3*- bzw. die *CLV3:CKX3*-Expression verursachte unter normalen Kulturbedingungen, das heißt ohne Selektionsdruck, keine wesentlichen Veränderungen des Pflanzenwachstums. Die Rolle von Cytokinin im OZ und in den Stammzellen bei der Regulierung von Wachstum und Entwicklung der Pflanze konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es ist möglich, dass Cytokinin, das im Spross die Zellteilung fördert, in der zentralen Zone des SAM eine untergeordnete Rolle spielt, da dort die Zellteilungsrate geringer ist als in der peripheren Zone oder gar den Primordien (Vernoux *et al.*, 2000). Andererseits ist eine Funktion von Cytokinin im OZ naheliegend, da *WUS* Gene der A-Typ ARR negativ reguliert und somit den Cytokininstatus in dieser Domäne erhöht (Leibfried *et al.*, 2005). Da die Domänen nur wenige Zellen umfassen, das OZ etwa zehn Zellen und die Stammzellen sechs bis neun Zellen (Groß-Hardt und Laux, 2003), ist zu bedenken, dass möglicherweise Cytokinin aus dem umliegenden Gewebe in diese Domänen gelangen und einen Effekt der *WUS:CKX3*- bzw. *CLV3:CKX3*-Expression maskieren könnte. In diesem Fall könnte eine mögliche Funktion von Cytokinin im OZ oder den Stammzellen unerkannt geblieben sein.

4.3.3 Reduktion des Cytokiningehaltes in Primordien der Sprossorgane

Um den Cytokiningehalt lokal in den Primordien der Sprossorgane zu reduzieren, wurde das *CKX3*-Gen unter Kontrolle des *ANT*-Promotors bzw. des *LFY*-Promotors exprimiert. Die Auswirkungen dieser domänenspezifischen Expressionen auf das Pflanzenwachstum waren sehr unterschiedlich. *ANT:CKX3*-transgene Pflanzen zeigten sehr starke phänotypische Veränderungen des Sprosswachstums im Vergleich zum Wildtyp, während *LFY:CKX3*-transgene Pflanzen im Sprosswachstum nicht so starke, aber andersartige Abweichungen aufwiesen. Diese Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen Promotoraktivitäten erklären. Im Gegensatz zum *ANT*-Promotor ist die Aktivität des *LFY*-Promotors in Blattprimordien schwach und steigt erst mit dem Übergang zur reproduktiven Phase in den Organprimordien stark an (Blázquez *et al.*, 1997). Der *ANT*-Promotor ist bereits im globulären Embryo aktiv (Elliott *et al.*, 1996; Long und Barton, 1998) und insgesamt stärker als der *LFY*-Promotor, was ein Vergleich der Expressionsstärken von *ANT* und *LFY* anhand von Microarray-Daten (Winter *et al.*, 2007) sowie die RT-PCR-Analyse (Abbildung 29) vermuten lassen.

4.3.3.1 Cytokinindefizienz in Organprimordien während der gesamten Wachstumsphase

Das Wachstum der Sprosse *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen war im Vergleich zum Wildtyp nicht nur verzögert, wie bei *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen, sondern auch sehr reduziert. Die Verzögerung der Sprossentwicklung war durch ein verlängertes Plastochron und den deutlich späteren Blühbeginn gekennzeichnet (Abbildungen 33A und C). Die transgene Linie 5-7, deren vegetative Phase am stärksten verlängert war, bildete sogar bis zum Blühbeginn vier zusätzliche Rosettenblätter, was einer Erhöhung der Blattzahl von etwa 30 % im Vergleich zum Wildtyp entsprach (Abbildung 33B). Hier war also die Entwicklung der Pflanzen nicht nur zeitlich verzögert, sondern auch das Entwicklungsprogramm verändert. Wie bereits bei *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen vermutet, resultierte die verzögerte Sprossentwicklung möglicherweise aus einer Verlangsamung oder Reduktion der Meristemaktivität. Allerdings könnten die Blattprimordien auch normal initiiert worden sein, aber sehr langsam wachsen, so dass sie bei der makroskopischen Betrachtung nicht erfasst wurden. Im Gegensatz zu *STM:CKX3*-Pflanzen war in *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen der Cytokiningehalt im Bereich der Blattprimordien und nicht im SAM reduziert. Dies lässt einen Informations-

austausch zwischen Primordien und SAM vermuten, bei dem Cytokinin bzw. Cytokinindefizienz eine Rolle spielt. Dieser Aspekt wird später besprochen.

Die Reduktion des Sprosswachstums *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen betraf die Rosetten- bzw. Rosettenblattgröße (Abbildungen 30 und 31A). Als Ursache für die stark reduzierte Blattgröße wurde die drastische Verringerung der Zellzahl im Vergleich zu Wildtypblättern erkannt. Die kinematische Analyse der abaxialen Epidermis ergab, dass die Zellzahl bereits in 2 mm langen *ANT:CKX3*-transgenen Blättern um etwa 50 % reduziert war und während der weiteren Blattentwicklung nahezu konstant blieb (Abbildung 31B). Dies war auch bei *35S:CKX3*-transgenen Blättern der Fall. Offensichtlich wurde die Zellteilungsaktivität in den Blättern bereits sehr früh in der Blattentwicklung eingestellt und/oder möglicherweise war die Zahl der Vorläuferzellen der Blattprimordien reduziert. Die Zellteilungsrate ist in Primordien hoch (Vernoux *et al.*, 2000). Cytokinin scheint daher besonders für die Zellteilungsaktivität in Blattprimordien und jungen Blättern wichtig zu sein. Die Reduktion der Zellzahl in cytokinindefizienten Blättern schaltete vermutlich einen Kompensationsmechanismus ein, durch den die Zellgröße erhöht wurde. Die Zellexpansion war in *ANT:CKX3*-transgenen Blättern im Vergleich zu Wildtypblättern sowohl verstärkt als auch beschleunigt, so dass sich die durchschnittliche Zellgröße zu jedem Zeitpunkt der Messung mindestens verdoppelt hatte (Abbildung 31C). In *35S:CKX3*-transgenen Blättern war die durchschnittliche Zellgröße verglichen mit dem Wildtyp ebenfalls erhöht, jedoch nur um durchschnittlich 60 %. Das heißt, während bei Cytokinindefizienz in den Blattprimordien die Kompensation der reduzierten Zellzahl durch erhöhte Zellexpansion nicht beeinträchtigt schien, war dies bei konstitutiver Cytokinindefizienz der Fall. Cytokinin ist demnach nicht nur für die Zellteilung wichtig, sondern auch für die Zellexpansion. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der Aktivität der vakuolären Invertase, die bei der Osmoregulation und der Zellvergrößerung eine Rolle spielt (Sturm, 1999) und im Spross-*sink*-Gewebe cytokinindefizienter Tabakpflanzen stark reduziert war (Abschnitt 3.1.3, Abbildung 5).

Die Untersuchung zeigte, dass Cytokinin in den Blattprimordien, genauer gesagt in der *ANT*-Domäne des vegetativen Sprossapex, für die Zellteilungsaktivität von entscheidender Bedeutung ist. Es ist bekannt, dass *ANT* selber die Zellzahl in Organen und damit die Organgröße kontrolliert (Mizukami und Fischer, 2000). *ANT* hat dabei keinen Einfluss auf die Wachstumsrate, sondern reguliert die Dauer der Zellproliferation bzw. des Organwachstums durch Aufrechterhaltung der meristematischen Kompetenz während der Organogenese. Dies erfolgt durch Regulation von Zellzyklusgenen, wie zum Beispiel *CycD3* (Mizukami und

Fischer, 2000). Vergleichbar mit *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen hat die *ant-1 loss-of-function* Mutante kleinere Blätter mit weniger, aber größeren Zellen, *35S:ANT*-transgene Pflanzen haben dagegen größere Blätter mit mehr Zellen aber normaler Größe (Mizukami und Fischer, 2000). Man könnte nun vermuten, dass Cytokinin die ANT-Funktion reguliert, da Cytokinindefizienz in der *ANT*-Domäne zu ähnlichen morphologischen Veränderungen führt wie die der *ant-1* Mutante. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Expression des *ANT*-Gens in *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen unverändert war, was die RT-PCR-Analyse ergab (Abbildung 29).

In der reproduktiven Wachstumsphase zeigten *ANT:CKX3*-transgene Pflanzen, ähnlich wie *STM:CKX3*-transgene Pflanzen, eine reduzierte Apikaldominanz. Auch hier war die Anzahl der axillären Sprosse im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht, während die Hauptsprosshöhe reduziert war (Abbildungen 34A und B). Die Regulation von Apikaldominanz und Sprossverzweigung wurde bereits in Abschnitt 4.3.1 diskutiert. Die Schotenzahl am Hauptstängel war bei *ANT:CKX3*-transgenen Pflanzen jedoch noch stärker reduziert als bei *STM:CKX3*-Pflanzen (Abbildungen 24C und 34C). Im Gegensatz zu diesen waren bei *ANT:CKX3*-Pflanzen die Internodien zwischen den Schoten im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlängert, so dass die mittlere Schotendichte um 25 % reduziert war (Abbildung 34D). Die Reduktion der Schotendichte erfolgte somit etwa in gleichem Maße wie bei *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen.

Die erhöhte Internodienlänge zwischen den Schoten von *ANT:CKX3*- und *35S:CKX3*-transgenen Pflanzen ergibt sich vermutlich aus einem verlängerten Plastochron der Blüten. Wie bereits erwähnt, war bei den transgenen Linien auch das Plastochron der Blätter verlängert. Es gibt Hinweise, dass das Plastochron mit der Meristemgröße assoziiert sein könnte. So hat die Reismutante *plastochron1 (pla1)* ein aufgrund erhöhter Zellteilungsaktivität vergrößertes Meristem und weist eine beschleunigte Initiation neuer Blattprimordien und infolge dessen stark verkürzte Internodien auf (Miyoshi *et al.*, 2004). Die Beeinflussung des Plastochrons über die Regulierung der Meristemgröße könnte mit Cytokinin verknüpft sein. Die *ampl*-Arabidopsismutante, die einen erhöhten Cytokininingehalt hat, bildet ebenfalls ein größeres Sprossmeristem und hat ein stark verkürztes Plastochron (Chaudhury *et al.*, 1993; Helliwell *et al.*, 2001). Damit übereinstimmend haben konstitutiv cytokinindefiziente Arabidopsis- und Tabakpflanzen ein kleineres Sprossmeristem und ein verlängertes Plastochron (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003), was auch bei *ahk2 ahk3 cre1*-Cytokininrezeptormutanten gezeigt wurde (Higuchi *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Bei *ANT:CKX3*-

transgenen Pflanzen deuten die reduzierte Wachstumsrate und die reduzierte Blütenbildung der Hauptinfloreszenz ebenfalls auf eine verringerte Größe des SAM hin. Eine reduzierte Meristemgröße könnte den für die Primordieninitiation verfügbaren Platz limitieren, so dass in einem bestimmten Zeitintervall weniger Primordien untergebracht werden können, sich also das Plastochron und infolge dessen die Internodien verlängern.

Die phänotypischen Veränderungen *ANT:CKX3*-transgener Pflanzen lassen vermuten, dass das Cytokinin der Organprimordien eine Rolle bei der Initiation weiterer Primordien und der Organogenese spielt. Dies könnte durch die Kontrolle der Meristemgröße erfolgen, was eine Signalgebung vom Primordium zum Meristem vermuten lässt. Einen Hinweis für die Existenz derartiger Signalübertragungen liefert zum Beispiel die bereits erwähnte *plal*-Mutante. Das *PLAI*-Gen von Reis, das ein Cytochrom P450 (*CYP78A11*) kodiert, wird in jungen Blattprimordien, jedoch nicht im SAM exprimiert, beeinflusst aber die Meristemgröße und die Rate der Primordieninitiation (Miyoshi *et al.*, 2004). Die Kontrolle der Meristemgröße durch Cytokinin könnte möglicherweise über die positive Regulation der Zellteilungsaktivität erfolgen, ebenso die Kontrolle der Organgröße. Bezüglich der Veränderungen von Blühbeginn, Plastochron, Rosettenblattgröße, Sprosshöhe, Schotenzahl und Schotendichte nehmen *ANT:CKX3*-transgene Arabidopsispflanzen eine Mittelstellung zwischen Wildtyp und konstitutiv *CKX3*-exprimierenden Arabidopsis ein, was darauf schließen lässt, dass Cytokinindefizienz in Organprimordien des Sprosses bei der Etablierung des Cytokinindefizienzphänotyps eine Rolle spielt.

4.3.3.2 Cytokinindefizienz in Organprimordien insbesondere während der reproduktiven Wachstumsphase

LFY:CKX3-transgene Pflanzen zeigten kaum Veränderungen im Wachstum des vegetativen Sprosses, das heißt bezüglich der Rosettengröße, des Plastochrons und des Blühbeginns, was in Übereinstimmung mit der relativ geringen Transgenexpression unter Kontrolle des *LFY*-Promotors während dieser Phase steht. Der Wechsel zur reproduktiven Phase war dagegen mit phänotypischen Veränderungen verbunden. Ähnlich wie bei *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen weisen die Reduktion der Hauptsprosshöhe und die Erhöhung der Anzahl der axillären Sprosse (Abbildungen 36A und F), die ebenfalls zum Teil höher waren als der Hauptspross, auf eine reduzierte Apikaldominanz hin. Die Zahl der Schoten am Hauptstängel war reduziert, jedoch nicht allein aufgrund der verringerten Sprosshöhe, sondern auch durch die verringerte Schotendichte (Abbildungen 36C und D). Zudem waren die

Stängel der Hauptinfloreszenzen deutlich dünner als beim Wildtyp (Abbildung 36B), doch im Gegensatz zu *STM:CKX3*-transgenen Pflanzen sind sie aufrecht gewachsen. All diese Veränderungen deuten auf eine reduzierte Aktivität des primären Infloreszenzmeristems hin, insbesondere auf ein verändertes Plastochron der Blüten, und lassen auch hier eine Reduktion der Meristemgröße vermuten. Da *LFY*-Expression auch im Vaskularsystem sich entwickelnder Stängel nachgewiesen wurde (Blázquez *et al.*, 1997), ist die Reduktion des Stängeldurchmessers *LFY:CKX3*-transgener Pflanzen als Folge der Cytokinindefizienz in diesem Gewebe denkbar.

Interessanterweise war in *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen die Länge der Schoten reduziert (Abbildungen 36E und 37A). Des Weiteren war vermutlich die Samenentwicklung beeinträchtigt, so dass die Samenreife sehr unregelmäßig war oder sogar abgebrochen wurde (Abbildung 37B). Auffällig war, dass die Samen der *LFY:CKX3*-Pflanzen nicht so dicht in der Schote angeordnet waren wie Wildtypsamensamen (Abbildung 37B), was möglicherweise daraus resultierte, dass sich in den transgenen Schoten einige Samen nicht entwickelten oder auch Samenanlagen nicht befruchtet wurden. Es ist auch möglich, dass weniger Samenanlagen gebildet wurden. Im Gegensatz zur Linie 22-6 waren bei der Linie 21-2 diese Veränderungen in der Samenbildung besonders häufig und ausgeprägt, und zudem ergab die Analyse der Schotenlänge eine hohe Standardabweichung (Abbildung 36E). Die Samenproduktion könnte in einem Zusammenhang mit der Schotenlänge stehen. Es wurde gezeigt, dass die Arabidopsis *loss-of-function* Mutante *ckx3,5* längere Schoten und mehr Samenanlagen bzw. Samen bildet, was außerdem darauf hinweist, dass Cytokinin ein positiver Regulator für die Entwicklung von Samenanlagen ist (Bartrina y Manns, 2006). Eine genaue Untersuchung der Bildung von Samenanlagen und der Samenentwicklung wurde in *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen bisher nicht durchgeführt.

Die Samen der *LFY:CKX3*-transgenen Pflanzen waren etwas kleiner als Wildtypsamensamen (Abbildung 37C), was eine reduzierte Größe der Embryonen nahe legt. Überraschenderweise entwickelten sich aus diesen Samen Keimlinge mit deutlich größeren Kotyledonen und Primärblättern im Vergleich zu Wildtypkeimlingen (Abbildung 37D). Dies ist außerdem insofern erstaunlich, da *LFY*-Expression nicht im Embryo und in Kotyledonen nachgewiesen werden konnte und somit dort keine Expression des *CKX3*-Transgens und daher auch keine phänotypischen Veränderungen zu erwarten waren. Im Gegensatz dazu wird *ANT* bereits ab dem globulären Embryostadium und in Kotyledonen exprimiert (Elliott *et al.*, 1996; Long und Barton, 1998); *ANT:CKX3*-Expression bewirkte eine geringe Reduktion der Keimlingsgröße.

Die Keimung der *LFY:CKX3*-transgenen Samen erfolgte früher als die der Wildtypsamen (Abbildung 37E), doch kann die Größe der *LFY:CKX3*-Keimlinge nicht allein dadurch erklärt werden, da die Kotyledonen nach ihrer vollständigen Expansion bei transgenen Keimlingen weiterhin größer waren als bei Wildtypkeimlingen. Es ist möglich, dass die Blattzellen der *LFY:CKX3*-Keimlinge größer waren als die des Wildtyps, was zu einer Zunahme der Blattgröße geführt haben könnte. Zumindest ergab eine vorläufige Untersuchung der Größe und der Zahl von abaxialen Epidermiszellen des sechsten Rosettenblattes von *LFY:CKX3-21-2*-transgenen Pflanzen 12 Tage nach dem Erreichen einer Blattlänge von 2 mm, dass die Zellgröße im Vergleich zum Wildtyp gering erhöht war, wobei eine gleichzeitige geringe Reduktion der Zellzahl dazu führte, dass die Blattfläche unverändert war.

Die Untersuchung der Auswirkung lokaler Cytokinindefizienz in verschiedenen Domänen des Sprossapex zeigte, dass Cytokinin eine wichtige regulatorische Rolle in Organprimordien und jungen Organen spielt, und zwar während der gesamten Wachstumsphase der Pflanze. Möglicherweise kann Cytokinin die Meristemgröße auch von diesen Domänen aus kontrollieren, was eine Signalgebung vom Primordium zum Meristem vermuten lässt. Über die Kontrolle der Meristemgröße könnte Cytokinin wiederum die Organbildung bzw. das Plastochron regulieren. Auch im Bereich des gesamten SAM scheint Cytokinin wichtig zu sein, wo es Aktivität und Größe des primären SAM und die Apikaldominanz beeinflusst. Zur Funktion von Cytokinin in Stammzellen und dem Organisierenden Zentrum wurden in dieser Arbeit keine eindeutigen Hinweise gefunden. Im Rahmen des experimentellen Ansatzes kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die hier untersuchten Domänen der *CKX3*-Expression, die teilweise nur wenige Zellen umfassen, als lokale Cytokinin-*sinks* wirkten und Cytokinin von den umgebenden Geweben dort hinein gelangte und so einen Effekt maskierte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Cytokinin ist ein Phytohormon, das zahlreiche Prozesse in der pflanzlichen Entwicklung kontrolliert. Es beeinflusst wesentlich die *sink/source*-Verhältnisse in der ganzen Pflanze, indem es den Assimilatmetabolismus und die Assimilatverteilung sowie die Zellteilung reguliert. Die molekularen Mechanismen, welche Cytokinin mit den physiologischen und entwicklungsbiologischen Antworten der Pflanze verknüpfen, sind bisher noch wenig verstanden.

Cytokinindefizienz, hervorgerufen durch die Überexpression eines Gens der Cytokininabbauenden Arabidopsis Cytokininoxidase/-dehydrogenase (*AtCKX*), führt zur Reduktion des Sprosswachstums und zur Verstärkung des Wurzelwachstums. Die Untersuchung verschiedener physiologischer Parameter in Wildtyp- und *35S:AtCKX*-transgenem Tabak zeigte, dass trotz eines reduzierten Chlorophyllgehaltes die photosynthetische Kapazität und Effizienz sowie der Gehalt an löslichen Zuckern in cytokinindefizienten *source*-Blättern kaum verändert waren. Die *source*-Stärke war in cytokinindefizienten Pflanzen demnach wahrscheinlich nicht für das Sprosswachstum limitierend. Im Gegensatz dazu zeigten cytokinindefiziente Spross-*sink*-Gewebe einen stark reduzierten Gehalt an löslichen Zuckern, reduzierte Aktivitäten der vakuolären und der cytosolischen Invertasen und einen reduzierten ATP-Gehalt. Dies deutet darauf hin, dass Cytokinin die Spross-*sink*-Stärke reguliert, und dass ihre Reduktion ein Grund für das verlangsamte Sprosswachstum bei Cytokinindefizienz sein könnte. Transgene Wurzelgewebe enthielten ebenfalls weniger lösliche Zucker, was allerdings keinen negativen Einfluss auf die Glykolyse, den ATP-Gehalt oder das Wurzelwachstum hatte. Das zeigt, dass Cytokinin die *sink*-Aktivität in Spross und Wurzeln auf unterschiedliche Weise reguliert.

In einem funktionellen Komplementationsversuch wurde überprüft, ob Faktoren, die die *sink*-Stärke regulieren und transkriptionell durch Cytokinin kontrolliert werden, unter Bedingungen der Cytokinindefizienz für das Pflanzenwachstum limitierend sind. So bewirkte beispielsweise die Expression des Gens der Zellwand-Invertase *CINI* von *Chenopodium rubrum* in *35S:AtCKX1*-transgenen Arabidopsispflanzen keine Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps. Dies lässt vermuten, dass diese Invertase-Isoform bei Cytokinindefizienz nicht limitierend ist und bei der Vermittlung der Cytokininwirkung keine entscheidende Rolle spielt. Die Expression des Gens von CyclinD3, das den G1/S-Übergang im Zellzyklus positiv reguliert, bewirkte ebenfalls keine Kompensation des Cytokinindefizienzphänotyps, was darauf hindeutet, dass der limitierende Schritt während des Zellzyklus, der durch Cytokinin

kontrolliert wird, eher der G2/M-Übergang und nicht der G1/S-Übergang sein könnte, so dass CyclinD3 bei Cytokinindefizienz nicht limitierend ist.

Cytokinin induziert die Biosynthese von Trehalose-6-phosphat (Tre6P), das für die Kohlenhydratverwertung essenziell ist. Die Akkumulation von endogenem Tre6P durch Wachstum in Gegenwart von exogener Trehalose (10 mM) bewirkte bei *35S:AtCKX1*-transgenen Arabidopsiskeimlingen und auch bei *ahk2 ahk3 cre1*-Cytokininrezeptormutanten eine Erhöhung der Sprossmassen, während die Wildtypsprossmasse um 30 % reduziert war. Das Wurzelwachstum von *35S:AtCKX1*-transgenen Pflanzen war im Gegensatz zum Wildtyp nahezu resistent gegen exogene Trehalose. Die Untersuchungen deuten auf die Möglichkeit hin, dass Cytokinin die Kohlenhydratmobilisierung über den Tre6P-Metabolismus regulieren könnte.

Phänotypische Veränderungen aufgrund der lokalen Reduktion des Cytokiningehaltes in verschiedenen Domänen des Sprossapex von Arabidopsis durch gewebespezifische *AtCKX3*-Expression zeigten, dass Cytokinin im gesamten Sprossapikalmeristem (*STM*-Expressionsdomäne) und in Organprimordien (*ANT*-Domäne) für die Regulierung der Meristemaktivität und der Zellteilung wichtig ist. Primordienspezifische Cytokinindefizienz führte zu einer starken Reduktion der Blattgröße aufgrund der blockierten Zellteilung zu Beginn der Blattentwicklung. Der verwendete experimentelle Ansatz lieferte keine Hinweise zur Funktion von Cytokinin im Organisierenden Zentrum (*WUS*-Domäne) und in Stammzellen (*CLV3*-Domäne) des Sprossmeristems.

6 SUMMARY

Cytokinin is a phytohormone that controls numerous processes during plant development. It substantially influences sink/source relations in the whole plant by regulating assimilate metabolism and partitioning as well as cell division. However, the molecular mechanisms that link cytokinin with physiological and developmental responses of the plant are still little understood.

Cytokinin deficiency induced by overexpression of a gene encoding cytokinin-degrading cytokinin oxidase/dehydrogenase enzyme from *Arabidopsis* (*AtCKX*) results in a reduced shoot- and an enhanced root growth. The investigation of different physiological parameters in wild-type and *35S:AtCKX* transgenic tobacco revealed that despite a reduced chlorophyll content, photosynthetic capacity and efficiency as well as the content of soluble sugars were not strongly altered in cytokinin-deficient source leaves, suggesting that in cytokinin-deficient plants source strength was not limiting for shoot growth. In contrast, cytokinin-deficient shoot sink tissues exhibited strongly reduced contents of soluble sugars, decreased activities of vacuolar and cytosolic invertases and a reduced ATP content. These results strongly support a function of cytokinin in regulating shoot sink strength and its reduction may be a reason for the retarded shoot growth upon cytokinin deficiency. Transgenic root tissues contained also less soluble sugars, which however did not have negative impact on glycolysis, ATP content or root growth. This may indicate that cytokinin regulates sink activity in shoot and root in a different fashion.

In functional complementation experiments, it was tested whether the factors, which are known to regulate the sink strength and which are transcriptionally controlled by cytokinin, are limiting for plant growth under conditions of cytokinin deficiency. For example, the expression of the cell-wall invertase gene *CIN1* from *Chenopodium rubrum* in *35S:AtCKX1* transgenic *Arabidopsis* plants did not cause a reversion of the cytokinin deficiency phenotype, suggesting that this invertase isoform is not limiting under cytokinin deficiency and does not play a crucial role in mediating cytokinin responses. The expression of cyclinD3, which positively regulates G1/S transition of cell cycle, also did not cause a compensation of the cytokinin deficiency phenotype, indicating that the limiting step during cell cycle progression controlled by cytokinin might be the G2/M transition rather than the G1/S transition and suggesting that cyclinD3 is not limiting under cytokinin deficiency.

Cytokinin induces biosynthesis of trehalose-6-phosphate (Tre6P), which is indispensable for carbohydrate utilization. Accumulation of endogenous Tre6P by means of growth in the presence of exogenous trehalose (10 mM) caused an increase in shoot mass of *35S:AtCKX1* transgenic Arabidopsis seedlings and *ahk2 ahk3 cre1* cytokinin receptor mutants, whereas wild-type shoot mass was reduced by 30 %. Additionally, root growth of *35S:AtCKX1* transgenic plants was nearly resistant to trehalose in contrast to wild type. These analyses suggest that cytokinin may regulate carbohydrate mobilization via Tre6P metabolism.

Phenotypic changes due to local reduction of the cytokinin content in distinct domains of the Arabidopsis shoot apex by tissue-specific *AtCKX3* expression revealed that in the whole shoot apical meristem (*STM* expression domain) and in organ primordia (*ANT* domain), cytokinin plays an important role in regulating meristem activity and cell division. Primordia-specific cytokinin deficiency resulted in a strong reduction of leaf size due to blocked cell division during early leaf development. The used experimental approach did not provide information about cytokinin function in the organizing centre (*WUS* domain) and in stem cells (*CLV3* domain) of the shoot meristem.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Argyros, R. D., Mathews, D. E., Chiang, Y.-H., Palmer, C. M., Thibault, D. M., Etheridge, N., Argyros, D. A., Mason, M. G., Kieber, J. J. und Schaller, G. E. (2008). Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell*, **20**, 2102-2116.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. und Iturriaga, G. (2004). The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology*, **136**, 3649-3659.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. und Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 109.
- Barton, M. K. und Poethig, R. S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, **119**, 823-831.
- Bartrina y Manns, I. (2006). Molekulare Charakterisierung von *ckx* Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokinindefizienzsyndroms in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. und Harrison, B. D. (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature*, **321**, 446-449.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **62**, 293-300.
- Biemelt, S., Hajirezaei, M. R., Melzer, M., Albrecht, G. und Sonnewald, U. (1999). Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. *Planta*, **210**, 41-49.
- Blakeslee, J. J., Peer, W. A. und Murphy, A. S. (2005). Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 494-500.
- Bläsing, O. E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.-R. und Stitt, M. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 3257-3281.
- Blázquez, M., Soowal, L., Lee, I. und Weigel, D. (1997). *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, **124**, 3835-3844.
- Blázquez, M. A., Santos, E., Flores, C.-L., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J. und Gancedo, C. (1998). Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal*, **13**, 685-689.
- Boos, W., Ehmann, U., Forkl, H., Klein, W., Rimmele, M. und Postma, P. (1990). Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **172**, 3450-3461.
- Borisjuk, L., Walenta, S., Weber, H., Mueller-Klieser, W. und Wobus, U. (1998). High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *The Plant Journal*, **15**, 583-591.
- Boucheron, E., Healy, J. H. S., Bajon, C., Sauvanet, A., Rembur, J., Noin, M., Sekine, M., Riou Khamlichi, C., Murray, J. A. H., Van Onckelen, H. und Chriqui, D. (2005). Ectopic expression of *Arabidopsis* *CYCD2* and *CYCD3* in tobacco has distinct

- effects on the structural organization of the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 123-134.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M. und Simon, R.** (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **129**, 565-575.
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Burkle, L. und Schmülling, T.** (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, **44**, 314-333.
- Brownlee, B. G., Hall, R. H. und Whitty, C. D.** (1975). 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry*, **53**, 37-41.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. und 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. und Frommer, W. B.** (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **34**, 13-26.
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A. und Martienssen, R. A.** (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, **408**, 967-971.
- Cabib, E. und Leloir, L. F.** (1958). The biosynthesis of trehalose phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, **231**, 259-275.
- Chatfield, S. P., Stirnberg, P., G., F. B. und Leyser, O.** (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **24**, 159-169.
- Chaudhury, A. M., Letham, S., Craig, S. und Dennis, E. S.** (1993). *amp1* - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *The Plant Journal*, **4**, 907-916.
- Chen, C.-M.** (1997). Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum*, **101**, 665-673.
- Chen, C.-M. und Kristopeit, S. M.** (1981a). Metabolism of cytokinin : dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology*, **67**, 494-498.
- Chen, C.-M. und Kristopeit, S. M.** (1981b). Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology*, **68**, 1020-1023.
- Cho, J.-I., Lee, S.-K., Ko, S., Kim, H.-K., Jun, S.-H., Lee, Y.-H., Bhoo, S. H., Lee, K.-W., An, G., Hahn, T.-R. und Jeon, J.-S.** (2005). Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, **24**, 225-236.
- Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. und Meyerowitz, E. M.** (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*, **122**, 1567-1575.
- Cline, M.** (1991). Apical dominance. *The Botanical Review*, **57**, 318-358.

- Cline, M. G.** (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, **84**, 1064-1069.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. und Crowe, L. M.** (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, **54**, 579-599.
- D'Agostino, I. B., Deruere, J. und Kieber, J. J.** (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, **124**, 1706-1717.
- Davies, C. und Robinson, S. P.** (1996). Sugar accumulation in grape berries (Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues). *Plant Physiology*, **111**, 275-283.
- de Jager, S. M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. und Murray, J. A. H.** (2005). The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **16**, 385-396.
- Dekkers, B. J. W., Schuurmans, J. A. M. und Smeekens, S. C. M.** (2008). Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **67**, 151-167.
- del Pozo, J. C., Lopez-Matas, M. A., Ramirez-Parra, E. und Gutierrez, C.** (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*, **123**, 173-183.
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P. und Sabatini, S.** (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, **17**, 678-682.
- Deveaux, Y., Peaucelle, A., Roberts, G. R., Coen, E., Simon, R., Mizukami, Y., Traas, J., Murray, J. A. H., Doonan, J. H. und Laufs, P.** (2003). The ethanol switch: a tool for tissue-specific gene induction during plant development. *The Plant Journal*, **36**, 918-930.
- Dewitte, W. und Murray, J. A. H.** (2003). The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 235-264.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J. M. S., Jacquard, A., Kilby, N. J. und Murray, J. A. H.** (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell*, **15**, 79-92.
- Dewitte, W., Simon, S., Annette, A. A., Spencer, C. M., Margit, M., Nils, B., Carl, C., Jeroen, N., Els, P., Venkatesan, S. und James, A. H. M.** (2007). *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104**, 14537-14542.
- Dun, E. A., Ferguson, B. J. und Beveridge, C. A.** (2006). Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiology*, **142**, 812-819.
- Eastmond, P. J., van Dijken, A. J. H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D. G., Smeekens, S. C. und Graham, I. A.** (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal*, **29**, 225-235.
- Ehneß, R. und Roitsch, T.** (1997). Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *The Plant Journal*, **11**, 539-548.

- Eklöf, S., Astot, C., Blackwell, J., Moritz, T., Olsson, O. und Sandberg, G. (1997). Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 225-235.
- Elliott, R. C., Betzner, A. S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W., Gerentes, D., Perez, P. und Smyth, D. R. (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*, **8**, 155-168.
- Eschrich, W. (1980). Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **93**, 363-378.
- Estelle, M. A. und Somerville, C. (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics*, **206**, 200-206.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. und Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, **283**, 1911-1914.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmölling, T. und Frébort, I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 255-267.
- Gan, S. und Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gibson, S. I. (2004). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 253-264.
- Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B. und Frommer, W. B. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 291-300.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. und Yoshida, S. (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **134**, 1555-1573.
- Goddijn, O., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, R., de Graff, P., Poels, J., van Dun, K., Ponstein, A. S., Damm, B. und Pen, J. (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology*, **113**, 181-190.
- Godt, D. E. und Roitsch, T. (1997). Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology*, **115**, 273-282.
- Golovko, A., Sitbon, F., Tillberg, E. und Nicander, B. (2002). Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **49**, 161-169.
- Gómez, L. D., Baud, S., Gilday, A., Li, Y. und Graham, I. A. (2006). Delayed embryo development in the *ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1* mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *The Plant Journal*, **46**, 69-84.
- Gómez, L. D., Baud, S. und Graham, I. A. (2005). The role of trehalose-6-phosphate synthase in *Arabidopsis* embryo development. *Biochemical Society Transactions*, **33**, 280-282.
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y. und Traas, J. (2004). *In vivo* analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 74-87.

- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **87**, 4645-4649.
- Grennan, A. K.** (2007). The role of trehalose biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, **144**, 3-5.
- Groß-Hardt, R. und Laux, T.** (2003). Stem cell regulation in the shoot meristem. *Journal of Cell Science*, **116**, 1659-1666.
- Groß-Hardt, R., Lenhard, M. und Laux, T.** (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes and Development*, **16**, 1129-1138.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A. und Kay, S. A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, **290**, 2110-2113.
- Harms, K., Wöhner, R. V., Schulz, B. und Frommer, W. B.** (1994). Isolation and characterization of P-type H⁺-ATPase genes from potato. *Plant Molecular Biology*, **26**, 979-988.
- Hartig, K. und Beck, E.** (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*, **8**, 389-396.
- Hatzfeld, W.-D., Dancer, J. und Stitt, M.** (1990). Fructose-2,6-bisphosphate, metabolites and 'coarse' control of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase during triose-phosphate cycling in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta*, **180**, 205-211.
- Helliwell, C. A., Chin-Atkins, A. N., Wilson, I. W., Chapple, R., Dennis, E. S. und Chaudhury, A.** (2001). The *Arabidopsis* *AMPI* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell*, **13**, 2115-2125.
- Heyer, A. G., Raap, M., Schroeer, B., Marty, B. und Willmitzer, L.** (2004). Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **39**, 161-169.
- Heyl, A., Ramireddy, E., Brenner, W. G., Riefler, M., Allemeersch, J. und Schmülling, T.** (2008). The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **147**, 1380-1395.
- Heyl, A. und Schmülling, T.** (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 480-488.
- Heyl, A., Werner, T. und Schmülling, T.** (2006). Cytokinin metabolism and signal transduction. In: *Plant hormone signaling. Annual Plant Reviews* (Hedden, P. und Thomas, S., eds). Blackwell Publishing Ltd., Oxford., pp. 93-123.
- Higuchi, M., Pischke, M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M. R. und Kakimoto, T.** (2004). In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 8821-8826.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T. und 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 Physiology*, **138**, 196-206.

- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. und Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 75-83.
- Ho, L. C. (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**, 355-378.
- Hu, Y., Bao, F. und Li, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct *CycD3*-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **24**, 693-701.
- Hutchison, C. E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M. W., Maxwell, B. B., Perdue, T. D., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R. und Kieber, J. J. (2006). The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, **18**, 3073-3087.
- Hwang, I., Chen, H.-C. und Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **129**, 500-515.
- Hwang, I. und Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, **413**, 383-389.
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T. und Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 733-742.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. und Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, **409**, 1060-1063.
- Inzé, D. und De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, **40**, 77-105.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A. und Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 47-57.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. und Tsiantis, M. (2005). *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, **15**, 1560-1565.
- Ji, X., Van den Ende, W., Van Laere, A., Cheng, S. und Bennett, J. (2005). Structure, evolution, and expression of the two Invertase gene families of rice. *Journal of Molecular Evolution*, **60**, 615-634.
- Joubès, J. und Chevalier, C. (2000). Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*, **43**, 735-745.
- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 677-685.
- Kamínek, M., Motyka, V. und Ková, R. V. (1997). Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia Plantarum*, **101**, 689-700.
- Kang, J., Mizukami, Y., Wang, H., Fowke, L. und Dengler, N. (2007). Modification of cell proliferation patterns alters leaf vein architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **226**, 1207-1218.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. und Sakakibara, H. (2004). Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14049-14054.

- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H. und Mizuno, T.** (2005). Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His->Asp phosphorelay circuitry. *Plant and Cell Physiology*, **46**, 339-355.
- Kim, H. J., Ryu, H., Hong, S. H., Woo, H. R., Lim, P. O., Lee, I. C., Sheen, J., Nam, H. G. und Hwang, I.** (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 814-819.
- Kingston-Smith, A., Walker, R. und Pollock, C.** (1999). Invertase in leaves: conundrum or control point? *Journal of Experimental Botany*, **50**, 735-743.
- Kirch, T., Simon, R., Grünwald, M. und Werr, W.** (2003). The *DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *Plant Cell*, **15**, 694-705.
- Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 235-246.
- Koch, K. E.** (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 509-540.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S. und Geigenberger, P.** (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 11118-11123.
- Köllmer, I.** (2004). Regulation der *AtCKX*-Genexpression und Charakterisierung cytokinindefizienter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Diplomarbeit. Freie Universität Berlin.
- Köllmer, I.** (2009). Funktionelle Charakterisierung von *CKX7* und cytokininregulierten Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, **204**, 383-396.
- Kuiper, D.** (1993). Sink strength: established and regulated by plant growth regulators. *Plant, Cell and Environment*, **16**, 1025-1026.
- Kumaran, M. K., Bowman, J. L. und Sundaresan, V.** (2002). *YABBY* polarity genes mediate the repression of *KNOX* homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 2761-2770.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. und Kyojuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652-655.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K. und Traas, J.** (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1375-1390.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. und Jurgens, G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, **122**, 87-96.
- Leibfried, A., To, J. P. C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J. und Lohmann, J. U.** (2005). *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, **438**, 1172-1175.
- Lenhard, M., Jurgens, G. und Laux, T.** (2002). The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development*, **129**, 3195-3206.

- Lenhard, M. und 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.
- Lichtenthaler, H. K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 47-65.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P. und Sandberg, G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, **28**, 465-474.
- Lochmanová, G., Zdráhal, Z., Konečná, H., Koukalová, S., Malbeck, J., Soucek, P., Válková, M., Kiran, N. S. und Brzobohaty, B.** (2008). Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown *Arabidopsis*: a proteomic analysis. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 3705-3719.
- Long, J. und Barton, M. K.** (2000). Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, **218**, 341-353.
- Long, J. A. und Barton, M. K.** (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development*, **125**, 3027-3035.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. und Barton, M. K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*, **379**, 66-69.
- Lorenz, K., Lienhard, S. und Sturm, A.** (1995). Structural organization and differential expression of carrot β -fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme. *Plant Molecular Biology*, **28**, 189-194.
- Lunn, J. E.** (2007). Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology*, **34**, 550-563.
- Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H. M., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.-R., Carillo, P., Hajirezaei, M.-R. und Stitt, M.** (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, **397**, 139-148.
- Mähönen, A. P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P. N. und Helariutta, Y.** (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development*, **14**, 2938-2943.
- Mayer, K. F. X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. und Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, **95**, 805-815.
- McGaw, B. A. und Horgan, R.** (1983). Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. *Phytochemistry*, **22**, 1103-1105.
- Meijer, M. und Murray, J. A. H.** (2000). The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology*, **43**, 621-633.
- Menges, M., Samland, A. K., Planchais, S. und Murray, J. A. H.** (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 893-906.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H. und Strong, F. M.** (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 1392-1392.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. und Kakimoto, T.** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*, **37**, 128-138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. und Kakimoto, T.** (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP

- isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 16598–16603.
- Miyoshi, K., Ahn, B.-O., Kawakatsu, T., Ito, Y., Itoh, J.-I., Nagato, Y. und Kurata, N.** (2004). *PLASTOCHRON1*, a timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 875-880.
- Mizukami, Y. und Fischer, R. L.** (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 942-947.
- Mok, D. W. S. und Mok, M. C.** (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 89-118.
- Mozo, T., Fischer, S., Shizuya, H. und Altmann, T.** (1998). Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Molecular and General Genetics*, **258**, 562-570.
- Müller, J., Aeschbacher, R. A., Wingler, A., Boller, T. und Wiemken, A.** (2001). Trehalose and Trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **125**, 1086-1093.
- Müller, J., Boller, T. und Wiemken, A.** (1998). Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* L. Merr.) roots. *Journal of Plant Physiology*, **153**, 255-257.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Mustroph, A.** (2005). Die Bedeutung von Fermentation, Photosynthese und Pyrophosphat für das Überleben von Pflanzen unter Sauerstoffmangel. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und 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.
- Nogué, F., Grandjean, O., Craig, S., Dennis, S. und Chaudhury, M.** (2000). Higher levels of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation*, **32**, 275-283.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K. und Sandberg, G.** (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 8039-8044.
- Oakenfull, E. A., Riou-Khamlichi, C. und Murray, A. H.** (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **357**, 749-760.
- Ongaro, V. und Leyser, O.** (2007). Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, erm134.
- Palni, L. M. S., Burch, L. und Horgan, R.** (1988). The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta*, **174**, 231-234.
- Paul, M.** (2007). Trehalose 6-phosphate. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 303-309.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D. und Zhang, Y.** (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 417-441.
- Pellny, T. K., Ghannoum, O., Conroy, J. P., Schlupepmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., Krause, K. P., Goddijn, O. und Paul, M. J.** (2004). Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal*, **2**, 71-82.

- Piazza, P., Jasinski, S. und Tsiantis, M.** (2005). Evolution of leaf developmental mechanisms. *New Phytologist*, **167**, 693-710.
- Ramon, M. und Rolland, F.** (2007). Plant development: introducing trehalose metabolism. *Trends in Plant Science*, **12**, 185-188.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J. M., Van Dijck, P. und Leyman, B.** (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology*, **63**, 195-206.
- Rashotte, A. M., Carson, S. D. B., To, J. P. C. und Kieber, J. J.** (2003). Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **132**, 1998-2011.
- Rashotte, A. M., Chae, H. S., Maxwell, B. B. und Kieber, J. J.** (2005). The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia Plantarum*, **123**, 184-194.
- Rashotte, A. M., Mason, M. G., Hutchison, C. E., Ferreira, F. J., Schaller, G. E. und Kieber, J. J.** (2006). A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 11081-11085.
- Reddy, G. V., Heisler, M. G., Ehrhardt, D. W. und Meyerowitz, E. M.** (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **131**, 4225-4237.
- Redig, P., Shaul, O., Inzé, D., Van Montagu, M. und Van Onckelen, H.** (1996). Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters*, **391**, 175-180.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, **18**, 40-54.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A. und Murray, J. A. H.** (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, **283**, 1541-1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. S. und Murray, J. A. H.** (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4513-4521.
- Rohmer, M.** (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry*, **75**, 375-388.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R. und Sinha, A. K.** (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 513-524.
- Roitsch, T., Bittner, M. und Godt, D. E.** (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, **108**, 285-294.
- Roitsch, T. und Ehneß, R.** (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*, **32**, 359-367.
- Roitsch, T. und González, M.-C.** (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*, **9**, 606-613.
- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V. und Fletcher, J. C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell*, **14**, 969-977.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. und Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 675-709.

- Rolland, F., Moore, B. und Sheen, J.** (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, **14**, 185-205.
- Ruffner, H. P., Adler, S. und Rast, D. M.** (1990). Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, **29**, 2083-2086.
- Sakakibara, H.** (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 431-449.
- Sakamoto, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Yamamoto, Y., Nagasaki, H., Inukai, Y., Sato, Y. und Matsuoka, M.** (2006). Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology*, **142**, 54-62.
- Sambrook, J. und Russel, D.** (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S. und Paul, M.** (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **100**, 6849-6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. und Smeekens, S.** (2004). Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology*, **135**, 879-890.
- Schmitz, G. und Theres, K.** (2005). Shoot and inflorescence branching. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 506-511.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E. und Bartrina y Manns, I.** (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, **116**, 241-252.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jürgens, G. und 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.
- Shimizu-Sato, S., Tanaka, M. und Mori, H.** (2009). Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, **69**, 429-435.
- Smeekens, S.** (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**, 49-81.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. und Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**, 755-767.
- Sorrell, D. A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C. und Murray, J. A. H.** (1999). Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology*, **119**, 343-352.
- Sturm, A.** (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, **121**, 1-8.
- Sturm, A., Šebková, V., Lorenz, K., Hardegger, M., Lienhard, S. und Unger, C.** (1995). Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot. *Planta*, **195**, 601-610.
- Sturm, A. und Tang, G.-Q.** (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science*, **4**, 401-407.
- Sugimoto-Shirasu, K. und Roberts, K.** (2003). "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 544-553.
- Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H. und Zuo, J.** (2005). *Arabidopsis* *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in *planta*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**, 588-603.

- Sung, S.-J. S., Xu, D.-P. und Black, C. C. (1989). Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiology*, **89**, 1117-1121.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. und Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 107-113.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C. und Mizuno, T. (2000). Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 2486-2489.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P. und Huala, E. (2007). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, gkm965.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E. und Harter, K. (2001). Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, **294**, 1108-1111.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2004a). *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1053-1062.
- Takei, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2004b). *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 41866-41872.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. und Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, **45**, 1028-1036.
- Taya, Y., Tanaka, Y. und Nishimura, S. (1978). 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **271**, 545-547.
- To, J. P. C., Haberer, G., Ferreira, F. J., Deruere, J., Mason, M. G., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R. und Kieber, J. J. (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, **16**, 658-671.
- Tucker, M. R. und Laux, T. (2007). Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology*, **17**, 403-410.
- Turgeon, R. (1989). The sink-source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 119-138.
- Tymowska-Lalanne, Z. und Kreis, M. (1998). Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta*, **207**, 259-265.
- Tymowska-Lalanne, Z. und Kreis, M. (1998). The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research*, **28**, 71-117.
- Uhde-Stone, C., Zinn, K. E., Ramirez-Yanez, M., Li, A., Vance, C. P. und Allan, D. L. (2003). Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, **131**, 1064-1079.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Mourrain, P., Palauqui, J.-C. und Vernhettes, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, **16**, 651-659.
- Vernoux, T., Autran, D. und Traas, J. (2000). Developmental control of cell division patterns in the shoot apex. *Plant Molecular Biology*, **43**, 569-581.

- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P. und Wobus, U. (1995). Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell*, **7**, 1835-1846.
- Weber, H. und Roitsch, T. (2000). Invertases and life beyond sucrose cleavage. *Trends in Plant Science*, **5**, 47-48.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F. und Meyerowitz, E. M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, **69**, 843-859.
- Werner, T., Holst, K., Pors, Y., Guivarc'h, A., Mustroph, A., Chriqui, D., Grimm, B. und Schmülling, T. (2008). Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2659-2672.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. und Schmülling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, **8**, 371-381.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. und 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. und Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 10487-10492.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T. und Aeschbacher, R. A. (2000). Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **124**, 105-114.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. und Provart, N. J. (2007). An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, **2**, e718.
- Winter, H. und Huber, S. C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 253-289.
- Xu, J., Avigne, W. T., McCarty, D. R. und Koch, K. E. (1996). A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism: evidence from a maize invertase gene family. *Plant Cell*, **8**, 1209-1220.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T. und Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 1017-1023.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. und Ori, N. (2005). *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*, **15**, 1566-1571.
- Yang, S., Yu, H., Xu, Y. und Goh, C. J. (2003). Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid *DSCKX1*. *FEBS Letters*, **555**, 291-296.
- Zatloukal, M., Gemrotová, M., Dolezal, K., Havlíček, L., Spíchal, L. und Strnad, M. (2008). Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**, 9268-9275.
- Zhang, K., Diederich, L. und John, P. C. L. (2005). The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosinephosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiology*, **137**, 308-316.

- Zhang, K., Letham, D. S. und John, P. C. L.** (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta*, **200**, 2-12.
- Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D. S., McKinney, S. A. und Higgins, T. J. V.** (1995). The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. *Planta*, **196**, 84-94.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. und Grissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, **136**, 2621-2632.

8 VERZEICHNIS DER ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Werner, T., Holst, K., Pors, Y., Guivarc'h, A., Mustroph, A., Chriqui, D., Grimm, B. und Schmülling, T. (2008). Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2659-2672.

Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. und Schmülling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, **8**, 371-381.

9 LEBENSLAUF

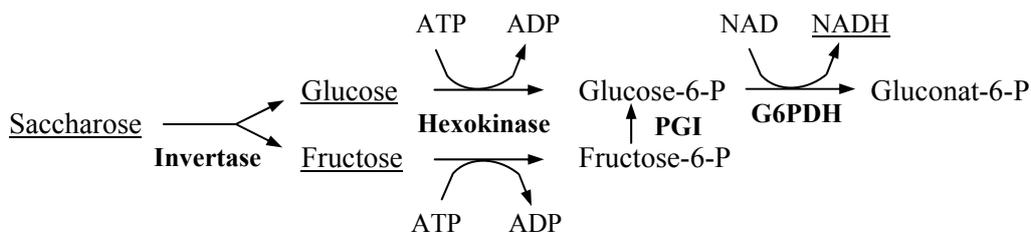
Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 ANHANG

10.1 Messprinzipien der optisch-enzymatischen Tests

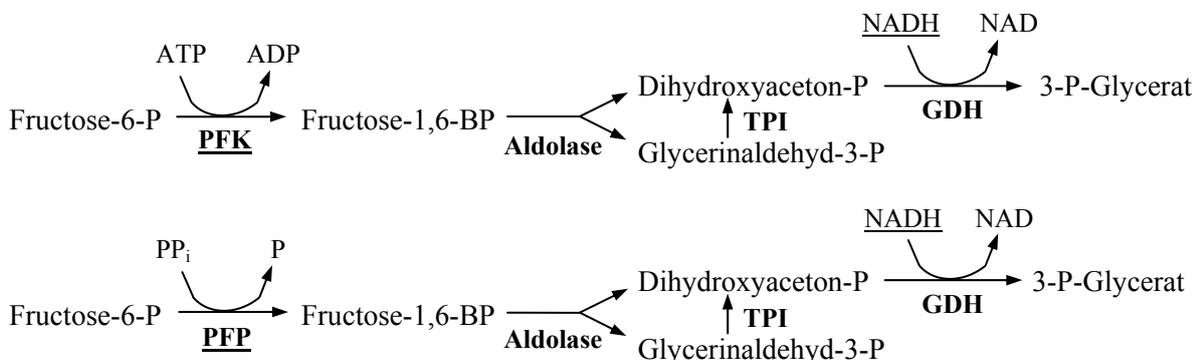
Bestimmung der Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose:

Die Umsetzung der jeweiligen Kohlenhydrate wurde an die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-Reaktion gekoppelt und die daraus resultierende NADH-Bildung photometrisch gemessen. Nach dem Reaktionsstart durch Zugabe von Hexokinase entstand pro Molekül Glucose ein Molekül NADH. Nach darauffolgender Zugabe von Phosphoglucose-Isomerase (PGI) wurde pro Fructose-Molekül ein Molekül NADH gebildet. Zuletzt entstanden nach Invertase-Zugabe pro Molekül Saccharose zwei Moleküle NADH.



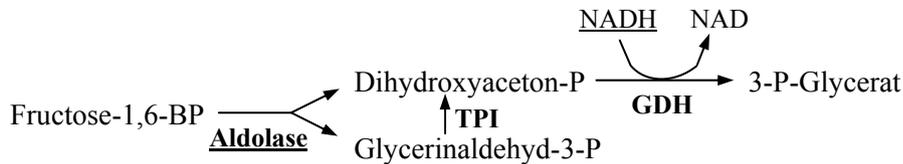
Bestimmung der Aktivität von PFK und PFP:

Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte durch die Kopplung der Fructose-1,6-bisphosphat-Bildung durch PFK bzw. PFP mit der Aldolase-, der Trisosephosphat-Isomerase (TPI)- und der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH)-Reaktion. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von ATP bzw. PP_i wurde der NADH-Verbrauch photometrisch gemessen, das heißt die Abnahme der Extinktion pro min.



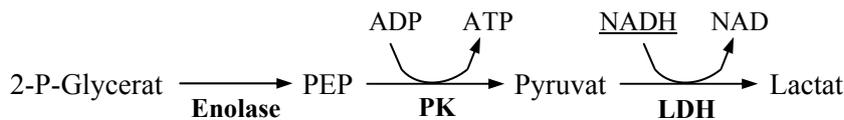
Bestimmung der Aldolase-Aktivität:

Für die Bestimmung der Aldolase-Aktivität wurde die Reaktion an die TPI- und die GDH-Reaktion gekoppelt. Nach dem Reaktionsstart durch Zugabe des Substrates Fructose-1,6-bisphosphat wurde der NADH-Verbrauch photometrisch gemessen.



Bestimmung der Enolase-Aktivität:

Die Bestimmung der Enolase-Aktivität erfolgte durch Kopplung der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Bildung mit der Pyruvat-Kinase (PK)- und der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Reaktion. Nach Start der Reaktion durch Zugabe des Substrates 2-Phosphoglycerat wurde der NADH-Verbrauch photometrisch gemessen.



10.2 Primer

Tabelle 13: Oligonukleotide für die Herstellung von Klonierungsfragmenten mittels PCR. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und Start- bzw. Stoppcodons sind fett dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierungsstellen
CIN1-5'-ClaI	<u>GCATCGATCTCCTAGGCTTCTGCCCGGGCTTCT</u> <u>GGGTACCTATTCATGGCTTCCATAAGTT</u>	<i>ClaI, BlnI, Cfr9I, Acc65I</i>
CIN1-3'-SacI	<u>GCGAGCTCCTTGTCGACCTTGGATCCATTTGA</u> <u>GTTAAGCAATAGAAGC</u>	<i>SacI, SalI, BamHI</i>
CycD3-5'-Bsp1407I-A	<u>CATGTACAATGGCGATTCGGAAGGAGGA</u>	<i>Bsp1407I</i>
CycD3-5'-Cfr9I	<u>CACCCGGGATGGCGATTCGGAAGGAGGA</u>	<i>Cfr9I</i>
CycD3-3'-SalI-A	<u>CGGTCGACCGATTATGGAGTGGCT</u>	<i>SalI</i>
LFY-5'-AvrII	<u>GACCTAGGCGGATCCATTTTTCGCAAAG</u>	<i>AvrII</i>
LFY-3'-SmaI	<u>GACCCGGGTAATCTATTTTTCTCTCTCTCTCT</u>	<i>SmaI</i>
ANT-5'-AvrII	<u>GACCTAGGCTCCTTCGGGTAATTATGTGA</u>	<i>AvrII</i>
ANT-3'-KpnI	<u>GCGGTACCGGTTTCTTTTTTTGGTTTCTG</u>	<i>KpnI</i>
STM-5'-AvrII	<u>TACCTAGGTGATATGTAACGGAC</u>	<i>AvrII</i>
STM-3'-KpnI	<u>ACGGTACCTCTTCTTTTCTCTCACT</u>	<i>KpnI</i>

Fortsetzung der Tabelle 13

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierungsstellen
WUS-5'- <i>AvrII</i>	GACCTAGGTCCAATATAATCGACTAAAGTT	<i>AvrII</i>
WUS-3'- <i>KpnI</i>	GCGGTACCGTGTGTTTGATTTCGACTTTT	<i>KpnI</i>
CLV3-5'- <i>AvrII</i>	GACCTAGGCTCATTGCATTTTCCAGGC	<i>AvrII</i>
CLV3-3'- <i>SmaI</i>	GACCCGGGTTAGAGAGAAAGTGACTGAGTGA	<i>SmaI</i>
CLV3-5'- <i>SacI</i>	GAGAGCTCCCTTGACCTAATCTCTTGTTG	<i>SacI</i>
CLV3-3'- <i>Sall</i>	GAAGTCGACGTTTTCTTAATATGTGTGTTTTT	<i>Sall</i>

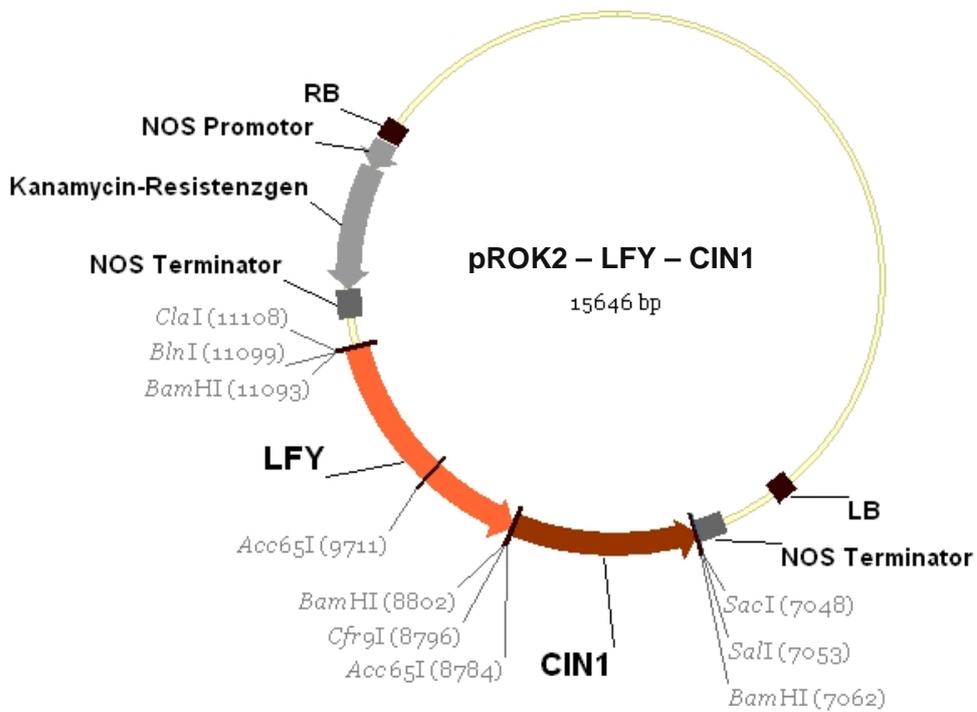
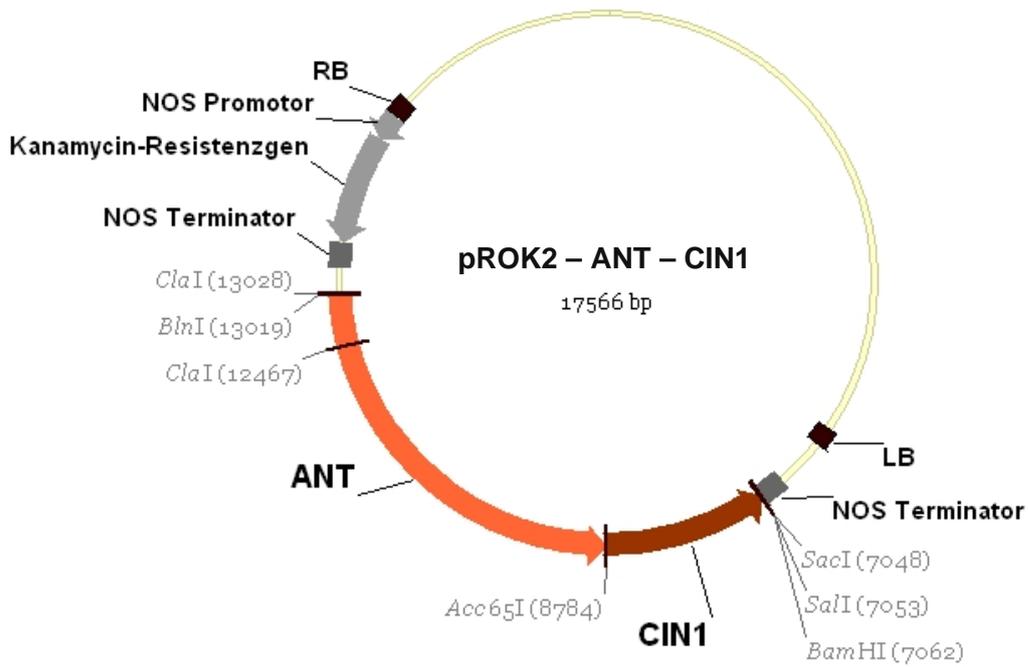
Tabelle 14: Sequenzierprimer.

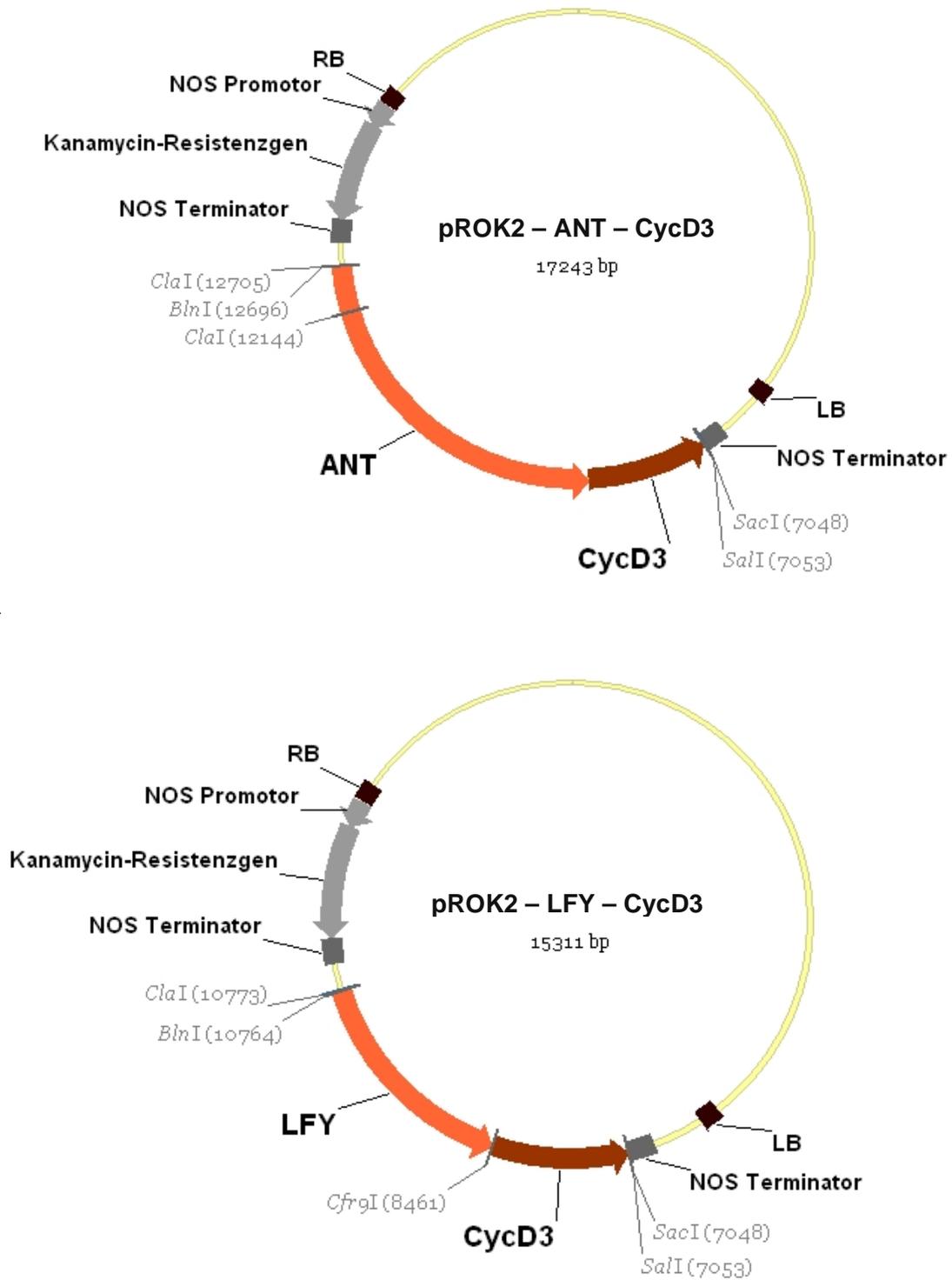
Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Locus / GenBank Accession
pROK2-4487-5'	GAAAACGCGCTACAGTCT	
CIN1-419-5'	GGACTTGACCCAAATTATG	X81792
CIN1-810-5'	AGCATGTACTCAAAGTTAGC	X81792
CIN1-1221-5'	CAGCACAGGCAGATGTAG	X81792
promANT-4197-5'	AAAGAAGAGAAGCAGAAACC	ANT: At4g37750
promLFY-2252-5'	GAAAAAGAGAGTGATAGAGAGAG	LFY: At5g61850
CycD3-558-5'	CGCTCATTATGGCTTCTC	At4g34160
CycD3-893-5'	TACTCTCGAGTGGAAGATGC	At4g34160

Tabelle 15: Oligonukleotide zur semiquantitativen RT-PCR-Analyse.

mRNA	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Locus / GenBank Accession
CIN1	CIN1-419-5'	GGACTTGACCCAAATTATG	X81792
	CIN1-3'	CCTCACTCGAAGACTCATTAGC	X81792
CycD3	CycD3-893-5'	TACTCTCGAGTGGAAGATGC	At4g34160
	pROK2-5919-3'	ATAATCATCGCAAGACCG	
CKX3 transgen	CKX3 A5	GAAATAACATCACTAGCGGTCCT	At5g56970
	GFP-618-3'	GGCAGATTGTGTGGACAGGTA	U70495
CKX3 gesamt	CKX3 A3 (5')	CTCGGCTAAAGACGGAGTTG	At5g56970
	CKX3 A2 (3')	TCAAAAGCCTCCCAATTGTC	At5g56970
STM	STM-59-5'	ATGGTCCGATGTGTCCTATG	At1g62360
	STM-632-3'	CGTTGAAGGAAGACCATAGC	At1g62360
CLV3	CLV3-UTR-5'	CCTTCATGATGCTTCTGGTC	At2g27250
	CLV3-246-3'	G TTCACATGATGGTGCAACG	At2g27250
WUS	WUS-ISH-F	AGGCTGAGACAGTTCGGAAA	At2g17950
	WUS-ISH-R	CACCACTACCACCGTTGATG	At2g17950
ANT	ANT-92-5'	GAGGTAGAGGAGGTAGAGAAGC	At4g37750
	ANT-635-3'	CCAGTGATGCAGCTAGATTG	At4g37750
LFY	LFY-190-5'	GCGAAGATAGCGGAGTTAGG	At5g61850
	LFY-675-3'	ACTACCTCCGTTGCCGTTAT	At5g61850
Actin2	Actin2/7-F	TACAACGAGCTTCGTGTTGC	At5g09810
	Actin2/7-R	GATTGATCCTCCGATCCAGA	At5g09810

10.3 Vektorkarten





10.4 T-DNA-Insertion CKX3-trangener Linien

Tabelle 16: Segregationsanalyse und Anzahl der T-DNA-Insertionen der charakterisierten transgenen Linien.

Es wurde die Segregation der Hygromycinresistenz der T2- bzw. der T3-Generation der in Abschnitt 3.5 charakterisierten Linien analysiert und daraus die wahrscheinliche Anzahl der chromosomalen Insertionsstellen der T-DNA abgeleitet.

Transgene Linie	Segregationsverhältnis Hygromycin-resistent: Hygromycin-sensitiv	Wahrscheinliche Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen
<i>STM:CKX3-GFP-6</i> ^a	3,1:1	1
<i>STM:CKX3-GFP-16</i> ^a	10:1	2
<i>WUS:CKX3-GFP-14</i> ^a	23,5:1	2
<i>WUS:CKX3-GFP-19</i> ^a	5,2:1	1
<i>CLV3:CKX3-GFP-5</i> ^a	2:1	1
<i>CLV3:CKX3-GFP-45</i> ^b	2,2:1 bis 11,8:1	2
<i>ANT:CKX3-GFP-5</i> ^b	2,3:1 bis 3,4:1	1
<i>ANT:CKX3-GFP-6</i> ^b	7,3:1 bis 24:1	2
<i>LFY:CKX3-GFP-21</i> ^b	2,4:1 bis 8,9:1	2
<i>LFY:CKX3-GFP-22</i> ^b	2,3:1 bis 3,9:1	1

^a T2-Generation

^b Linien der T3-Generation (keine Information über das Segregationsverhältnis in der T2-Generation vorhanden)