

Molekulare Charakterisierung des
ROCK1 Gens von *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Michael Christian Edmund Niemann

aus Bonn

2013

Diese Arbeit wurde von Juli 2008 bis März 2013 am Lehrstuhl für „Molekulare Entwicklungsbiologie der Pflanzen“ des Instituts für Biologie/Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Tomáš Werner angefertigt.

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

Disputation am: 24.06.2013

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Cytokinine | 1 |
| 1.1.1 Cytokininmetabolismus und Cytokininsignaltransduktion | 1 |
| 1.1.2 Eigenschaften der Cytokinin-abbauenden CKX Enzyme | 5 |
| 1.1.3 Cytokinintransport | 8 |
| 1.2 Identifizierung von ROCK1 als ein an der Cytokininhomeostasis beteiligtes Protein | 9 |
| 1.3 Vorkommen und Verwendung von Nukleotidzuckern in der Pflanze | 11 |
| 1.3.1 Nukleotidzuckermetabolismus | 11 |
| 1.3.2 Verwendung von Nukleotidzuckern bei der Zellwandsynthese | 14 |
| 1.3.3 Verwendung von Nukleotidzuckern bei der Proteinglykosylierung | 15 |
| 1.3.3.1 N-Glykosylierung | 15 |
| 1.3.3.2 O-Glykosylierung | 19 |
| 1.3.3.2 Glypiation | 22 |
| 1.3.4 Verwendung von Nukleotidzuckern bei der Lipidglykosylierung | 23 |
| 1.4 Eigenschaften von und Bedarf an Nukleotidzuckertransportern in Pflanzen.. | 25 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit..... | 32 |
| 2. Material und Methoden | 33 |
| 2.1 Biologisches Material | 33 |
| 2.1.1 Mikroorganismen | 33 |
| 2.1.2 Pflanzenlinien | 33 |
| 2.2 Plasmide..... | 34 |
| 2.3 Kultivierung und Selektion von Mikroorganismen..... | 35 |
| 2.4 Kultivierung, Selektion und Analyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen..... | 35 |
| 2.5 Kreuzung von Arabidopsispflanzen | 36 |
| 2.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden | 36 |
| 2.6.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 36 |
| 2.6.2 Extraktion von genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 37 |
| 2.6.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration | 37 |
| 2.6.4 Restriktionsverdau von DNA | 38 |
| 2.6.5 Dephosphorylierung von DNA Molekülen | 38 |
| 2.6.6 Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) | 38 |
| 2.6.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren | 39 |
| 2.6.8 Aufreinigung von DNA nach Behandlung mit Enzymen..... | 40 |
| 2.6.9 Ligation von DNA Fragmenten..... | 40 |
| 2.6.10 Gateway-Klonierung | 40 |
| 2.6.11 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6.12 Elektrotransformation von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> Zellen..... | 42 |
| 2.6.13 Klonierungsstrategien..... | 42 |
| 2.6.14 Sequenzierung kurzer DNA Abschnitte | 47 |
| 2.7 Bestimmung der Transkriptabundanz | 47 |
| 2.7.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe..... | 47 |
| 2.7.2 Aufreinigung und DNase I-Verdau | 48 |
| 2.7.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA..... | 48 |
| 2.7.4 quantitative PCR (qPCR) | 49 |
| 2.8 Nachweis und Analyse von Proteinen..... | 51 |
| 2.8.1 Proteinextraktion | 51 |
| 2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 51 |
| 2.8.3 Behandlung von Proteinen mit Endoglykosidase H und Peptid-N-Glykosidase F | 52 |
| 2.8.4 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)..... | 52 |
| 2.8.5 Immunoblot-Analyse..... | 52 |
| 2.8.6 Färbung von Proteinen mit Ponceau S | 54 |
| 2.9 Genotypisierung von Arabidopsispflanzen | 54 |
| 2.9.1 Extraktion von DNA aus Arabidopsispflanzen | 54 |
| 2.9.2 Genotypisierung durch CAPS und dCAPS Markeranalyse..... | 54 |
| 2.9.3 Nachweis von T-DNA Insertionen und molekulare Charakterisierung von <i>rock1-3</i> | 55 |
| 2.10 Transformation von Arabidopsis | 56 |
| 2.11 Transiente Genexpression in Tabakblättern | 57 |
| 2.12 Mikroskopischer Nachweis von GFP und mCherry durch konfokale <i>laser</i> <i>scanning</i> Mikroskopie | 57 |
| 2.13 Nachweis der β-Glukuronidaseaktivität in Geweben von Arabidopsis..... | 58 |
| 2.14 Bestimmung der CKX Enzymaktivität in Arabidopsis Proteinextrakten | 58 |
| 2.15 Analyse des Cytokininmetabolismus in Arabidopsis mittels tritiummarkierter Cytokinine | 59 |
| 2.16 Messung des Cytokiningehalts in Pflanzenmaterial..... | 60 |
| 2.17 Messung des Nukleotidzuckergehalts in Pflanzenmaterial | 60 |
| 2.18 Messung der Transportaktivität von ROCK1 in Hefemikrosomen | 61 |
| 2.19 EMS-Mutagenese von Arabidopsis-Samen | 61 |
| 2.20 <i>Next-generation sequencing</i> | 61 |
| 2.20.1 Extraktion von DNA für <i>next-generation sequencing</i> | 61 |
| 2.20.2 Probenvorbereitung, Sequenzierung und Datenanalyse | 62 |
| 2.21 Verwendete Datenbanken und Programme..... | 63 |

| | |
|---|------------|
| 3. Ergebnisse | 65 |
| 3.1 Analyse der <i>ROCK1</i> Expression | 65 |
| 3.2 Die subzelluläre Lokalisation von <i>ROCK1</i> im Endoplasmatischen Retikulum wird durch ein Dilysinmotiv vermittelt | 67 |
| 3.3 Genetische und phänotypische Analyse der <i>rock1</i> Mutanten..... | 70 |
| 3.3.1 <i>rock1-1</i> ist eine rezessive Mutation | 72 |
| 3.3.2 Der Aminosäureaustausch in <i>ROCK1</i> ^{Gly29Arg} führt zu einer verringerten Proteinabundanz | 73 |
| 3.3.3 <i>rock1-3</i> ist ein transkriptionelles Nullallel von <i>ROCK1</i> | 75 |
| 3.3.4 Der Verlust von <i>ROCK1</i> führt zu einem aktiveren Infloreszenzmeristem | 77 |
| 3.3.5 Der Verlust von <i>ROCK1</i> führt zu einem geringfügig veränderten Cytokininstatus aber keiner veränderten Cytokininsensitivität | 79 |
| 3.3.5.1 Analyse der Auswirkungen von <i>rock1</i> auf die Cytokinantwort | 79 |
| 3.3.5.2 Analyse der Auswirkungen von <i>rock1</i> auf den Cytokiningehalt | 82 |
| 3.3.6 Untersuchung der Spezifität der Suppression des Cytokindefizienzsyndroms durch <i>rock1</i> | 85 |
| 3.3.6.1 Der Verlust von <i>ROCK1</i> führt zu einem Verlust der Aktivität von CKX1, CKX2 und CKX3, nicht jedoch von CKX7 | 85 |
| 3.3.6.2 <i>rock1</i> benötigt für die Suppression des Cytokindefizienzsyndroms eine funktionierende Cytokininsignalweiterleitung | 88 |
| 3.3.6.3 Der Verlust von <i>ROCK1</i> revertiert nicht die durch Verlust der Biosynthese bewirkte Cytokindefizienz | 89 |
| 3.4 Die Überexpression von <i>ROCK1</i> beeinflusst die pflanzliche Entwicklung und teilweise auch die Cytokininsensitivität..... | 91 |
| 3.4.1 Morphologische Beschreibung der <i>35S:ROCK1</i> Pflanzen | 92 |
| 3.4.2 Der <i>35S:ROCK1</i> Sprossphänotyp wird nicht durch einen verringerten Cytokininstatus bewirkt | 92 |
| 3.4.3 <i>35S:ROCK1</i> Pflanzen haben einen erhöhten Cytokiningehalt und eine teilweise erhöhte Cytokininsensitivität | 95 |
| 3.5 Analyse des Cytokinmetabolismus nach Zugabe von tritiummarkiertem Cytokinin in <i>rock1</i> und <i>35S:ROCK1</i> Mutanten | 99 |
| 3.6 <i>ROCK1</i> transportiert im heterologen Hefesystem UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc..... | 101 |
| 3.7 Die <i>rock1</i> Mutation führt zu Veränderungen im Nukleotidzucker Gehalt..... | 102 |
| 3.8 Untersuchung der Auswirkung von <i>rock1</i> auf die Protein <i>N</i>-Glykosylierung im Allgemeinen und die von CKX1 im Besonderen | 104 |
| 3.8.1 <i>rock1</i> verändert nicht die Abundanz und <i>N</i> -Glykosylierung von CKX1 | 104 |
| 3.8.2 Die CKX1 Aktivität ist nicht abhängig von hybrider oder komplexer <i>N</i> -Glykosylierung | 106 |
| 3.9 Versuch der Komplementation von <i>rock1</i> durch heterologe UDP-GlcNAc Transporter | 107 |

| | |
|--|------------|
| 3.10 Isolierung von Suppressormutationen der durch <i>rock1-1</i> bewirkten Reversion des <i>CKX1</i> Überexpressionsphänotyps..... | 111 |
| 3.10.1 Screen und genetische Charakterisierung von Suppressormutanten von <i>rock1-1</i> | 111 |
| 3.10.2 Kartierung der Suppressormutationen in <i>riol1-1</i> und <i>riol1-2</i> | 114 |
| | |
| 4. Diskussion | 119 |
| | |
| 4.1 <i>ROCK1</i> ist ein positiver Regulator der CKX Aktivität | 119 |
| 4.1.1 Die Suppression des <i>35S:CKX1</i> Phänotyps durch <i>rock1-1</i> wirkt über die Reduzierung der CKX1 Aktivität..... | 119 |
| 4.1.2 <i>ROCK1</i> beeinflusst die Aktivität unterschiedlicher CKX Isoformen..... | 121 |
| | |
| 4.2 <i>ROCK1</i> transportiert das Substrat für eine bislang in Pflanzen nicht beschriebene Proteinmodifikation | 122 |
| | |
| 4.3 Funktionelle Nullallele von <i>ROCK1</i> führen nur zu geringfügigen morphologischen Veränderungen | 128 |
| | |
| 4.4 <i>ROCK1</i> ist an der Pollenentwicklung beteiligt..... | 131 |
| | |
| 4.5 <i>rock1-1</i> wird nicht durch einen menschlichen UDP-GlcNAc Transporter komplementiert..... | 132 |
| | |
| 4.6 Der Wurzelphänotyp von <i>35S:ROCK1</i> Pflanzen, nicht aber der Sprossphänotyp, wird durch Cytokinin beeinflusst | 134 |
| | |
| 4.7 Die Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms durch <i>rock1</i> ist von weiteren Genen abhängig | 136 |
| | |
| 5. Zusammenfassung..... | 139 |
| | |
| 6. Summary | 141 |
| | |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 143 |
| | |
| 8. Danksagung..... | 169 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 1. Chemische Strukturen verschiedener Cytokinine..... | 2 |
| Abbildung 2. Übersicht über den Cytokininmetabolismus..... | 3 |
| Abbildung 3. Struktur und Metabolismus von Nukleotidzuckern..... | 12 |
| Abbildung 4. Die <i>N</i> -Glykosylierung von Proteinen in Pflanzen..... | 16 |
| Abbildung 5. Schematische Darstellung der Struktur von Glykolipiden..... | 23 |
| Abbildung 6. Darstellung der subzellulären Lokalisation eines Teils der bekannten Umwandlungsprozesse von Nukleotidzuckern innerhalb der Pflanzenzelle..... | 31 |
| Abbildung 7. Nachweis der <i>ROCK1:ROCK1-uidA</i> Expression mittels GUS-Färbung in Geweben von Arabidopsis..... | 66 |
| Abbildung 8. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von ROCK1..... | 69 |
| Abbildung 9. Auswirkungen der in den Mutantallelenn <i>rock1-1</i> und <i>rock1-2</i> vorkommenden Mutationen auf die hypothetische Proteinstruktur von ROCK1..... | 72 |
| Abbildung 10. <i>rock1-1</i> ist eine rezessive Mutation..... | 73 |
| Abbildung 11. Auswirkungen der <i>rock1-1</i> Mutation auf die Proteinabundanz und subzelluläre Lokalisation des mutierten Proteins..... | 74 |
| Abbildung 12. Charakterisierung der <i>rock1-3</i> Mutation..... | 77 |
| Abbildung 13. Bestimmung der Infloreszenzmeristemaktivität von <i>rock1</i> Mutanten..... | 78 |
| Abbildung 14. Bestimmung der Cytokininsensitivität und des Cytokininstatus von <i>rock1</i> Pflanzen..... | 80 |
| Abbildung 15. Auswirkungen der <i>rock1</i> Mutation auf den Cytokiningehalt in Arabidopsispflanzen..... | 84 |
| Abbildung 16. Auswirkungen der <i>rock1</i> Mutation auf die Aktivität unterschiedlicher CKX Isoformen..... | 87 |
| Abbildung 17. Auswirkungen des Verlustes von <i>ROCK1</i> in Pflanzen mit verringerter Cytokininsignalweiterleitung..... | 89 |
| Abbildung 18. Der Verlust von <i>ROCK1</i> führt zu einer schwachen Suppression des durch Verlust der Cytokininbiosynthese bewirkten Cytokinindefizienzsyndroms..... | 90 |
| Abbildung 19. Morphologische Analyse der Auswirkungen der <i>ROCK1</i> Überexpression..... | 93 |
| Abbildung 20. Der Sprossphänotyp von <i>35S:ROCK1</i> Pflanzen wird nicht durch einen verringerten Cytokininstatus bewirkt..... | 94 |
| Abbildung 21. Auswirkungen der Überexpression von <i>ROCK1</i> auf den Cytokiningehalt und die Cytokininsensitivität..... | 97 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 22. Vergleich des Metabolismus von iP und iPR bei Verlust und Überexpression von <i>ROCK1</i> | 100 |
| Abbildung 23. Die Expression von <i>ROCK1</i> führt zu einer erhöhten Aufnahme von UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc in Hefemikrosomen..... | 101 |
| Abbildung 24. Vergleich der Auswirkungen von <i>rock1</i> bzw. der Überexpression von <i>ROCK1</i> auf den endogenen Nukleotidzuckergehalt..... | 103 |
| Abbildung 25. Analyse der Auswirkungen von <i>rock1-1</i> auf Proteinabundanz und Glykosylierung von CKX1..... | 106 |
| Abbildung 26. Analyse der Abhängigkeit der CKX1 Aktivität von dem Vorhandensein hybrider oder komplexer <i>N</i> -Glykosylierung auf Proteinen..... | 107 |
| Abbildung 27. Versuch der Komplementation der <i>rock1-1</i> Mutation durch den menschlichen UDP-GlcNAc Transporter SLC35A3..... | 110 |
| Abbildung 28. Übersicht über die im EMS-Mutagenese Screen identifizierten Suppressoren von <i>rock1-1 35S:CKX1</i> | 113 |
| Abbildung 29. Identifizierung der Kartierungsintervalle für die Mutationen <i>rio1-1</i> und <i>rio1-2</i> auf Chromosom 1..... | 115 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1. Funktionell charakterisierte Mitglieder der Familie der Nukleotidzuckertransporter aus Arabidopsis..... | 29 |
| Tabelle 2. Verwendete Mikroorganismen..... | 33 |
| Tabelle 3. Bei Klonierungen verwendete Ausgangsplasmide..... | 34 |
| Tabelle 4. Antibiotikakonzentration für die Selektion von Bakterien..... | 35 |
| Tabelle 5. Herbizid- bzw. Antibiotikakonzentrationen für die Selektion von Arabidopsispflanzen..... | 36 |
| Tabelle 6. Typische Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Reaktionsansatzes..... | 39 |
| Tabelle 7. Temperatur, Dauer und Abfolge der einzelnen Schritte einer PCR..... | 39 |
| Tabelle 8. Temperatur, Dauer und Abfolge der einzelnen Schritte der Gateway2 PCR..... | 41 |
| Tabelle 9. Temperatur, Dauer und Abfolge der einzelnen Schritte einer qPCR..... | 49 |
| Tabelle 10. Übersicht über die bei der qPCR verwendeten Primer..... | 50 |
| Tabelle 11. Zusammensetzung des Sammel- und Trenngelanteils der Polyacrylamidgele..... | 52 |
| Tabelle 12. Genotypisierung durch CAPS und dCAPS Markeranalyse..... | 55 |
| Tabelle 13. Primer für die molekulare Analyse von <i>rock1-3</i> | 55 |
| Tabelle 14. Primer für die Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutationen..... | 56 |
| Tabelle 15. Auswirkung von Mutationen in <i>ROCK1</i> auf den Cytokiningehalt..... | 83 |
| Tabelle 16. Cytokiningehalt in <i>35S:ROCK1</i> Pflanzen..... | 96 |
| Tabelle 17. Häufigkeit des Auftretens des revertierten <i>35S:CKX1</i> Phänotyps in der M2 Generation der im EMS <i>Screen</i> isolierten Suppressorlinien von <i>rock1-1 35S:CKX1</i> | 112 |
| Tabelle 18. Loci innerhalb des 10 Mb bis 12,5 Mb Abschnitts von Chromosom 1, die in <i>riol-1</i> und <i>riol-2</i> identische zu Aminosäureaustauschen führende Mutationen tragen..... | 117 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | | |
|------------|---|-------------------|--|
| A | Adenin | iP7G | <i>N</i> 7-glukosyliertes iP |
| Ade | Adenin | iP9G | <i>N</i> 9-glukosyliertes iP |
| Ado | Adenosin | iPRP | Isopentenyladenosinmonophosphat |
| ADP | Adenosindiphosphat | iPR | Isopentenyladenosin |
| AHK | Arabidopsis Histidinkinase | iPRMP | Isopentenyladenosinmonophosphat |
| AHP | Arabidopsis Histidinphosphotransferprotein | iPRDP | Isopentenyladenosindiphosphat |
| ALG | alpha1,2-Glycosyltransferase | iP RTP | Isopentenyladenosintriphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat | IPT | Isopentenytransferase |
| Api | Apiose | Kdo | Ketodesoxymannooctonsäure |
| APS | Ammoniumpersulfat | LB | <i>left border</i> |
| Araf | Arabinofuranose | Ler | Landsberg <i>erecta</i> |
| Arap | Arabinopyranose | LOG | lonely guy |
| ARR | Arabidopsis <i>response regulator</i> | M | Mutagenese |
| ATP | Adenosintriphosphat | Mb | Megabase |
| bp | Basenpaar | Man | Mannose |
| C | Cytosin | MES | 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure |
| CAPS | <i>cleaved amplified polymorphic sequence</i> | mRNA | <i>messenger</i> RNA |
| cDNA | <i>complementary</i> DNA | MSN | alpha-Mannosidase |
| <i>cgl</i> | <i>complex glycan less</i> | NST | <i>nucleotide sugar transporter</i> |
| CKX | Cytokininoxidase/Dehydrogenase | OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| CMP | Cytidinmonophosphat | Os | <i>Oryza sativa</i> |
| Ct | <i>cycle of threshold</i> | PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| cZ | <i>cis</i> -Zeatin | <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| cZ9G | <i>N</i> 9-glukosyliertes cZ | PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| cZOG | <i>O</i> -glukosyliertes cZ | qPCR | quantitative PCR |
| cZR | cZ-Ribosid | RB | <i>right border</i> |
| cZRMP | cZ-Ribosidmonophosphat | rev | <i>reverse</i> |
| cZRDP | cZ-Ribosiddiphosphat | Rha | Rhamnose |
| cZROG | <i>O</i> -glukosyliertes cZ-Ribosid | RNA | Ribonukleinsäure |
| cZRTP | cZ-Ribosidtriphosphat | RNase | Ribonuklease |
| cZRP | cZ-Ribosidmonophosphat | <i>ROCK1</i> | <i>REPRESSOR OF CYTOKININ DEFICENCY1</i> |
| dCAPS | <i>derived</i> CAPS | rRNA | ribosomale RNA |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | rpm | <i>rounds per minute</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | RT-PCR | reverse Transkription PCR |
| DNase | Desoxyribonuklease | Sia | Sialinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| DTT | Dithiothreitol | SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | T | Thymin |
| EMS | Ethylmethansulfonat | T-DNA | Transfer-DNA |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum | <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| EtNP | Ethanolaminphosphat | Temed | Tetramethylethylendiamin |
| F | Filialgeneration | TNK | Tage nach der Keimung |
| Fuc | Fukose | tRNA | Transfer-RNA |
| fw | <i>forward</i> | tZ | <i>trans</i> -Zeatin |
| G | Guanin | tZ9G | <i>N</i> 9-glukosyliertes tZ |
| Gal | Galaktose | tZOG | <i>O</i> -glukosyliertes tZ |
| GalA | Galacturonsäure | tZR | tZ-Ribosid |
| GalNAc | <i>N</i> -Acetylgalactosamin | tZRMP | tZ-Ribosidmonophosphat |
| GDP | Guanosindiphosphat | tZRDP | tZ-Ribosiddiphosphat |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> | tZROG | <i>O</i> -glukosyliertes tZ-Ribosid |
| GIPC | Glykosylinositolphosphorylceramid | tZRTP | tZ-Ribosidtriphosphat |
| Glc | Glukose | tZRP | tZ-Ribosidmonophosphat |
| GlcNAc | <i>N</i> -Acetylglucosamin | UGT | Uridindiphosphatglycosyltransferase |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol | <i>uidA</i> | <i>β-Glucuronidase-Gen</i> |
| GUS | β -Glucuronidase | Xyl | Xylose |
| Hyp | Hydroxyprolin | Zm | <i>Zea mays</i> |
| IPC | Inositolphosphorylceramid | | |
| iP | Isopentenyladenin | | |

1. Einleitung

1.1 Cytokinine

1.1.1 Cytokininmetabolismus und Cytokinintransduktion

Das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen werden unter anderem gesteuert durch das Wirken von Phytohormonen. Zu diesen gehört eine Gruppe natürlich vorkommender N^6 -substituierter Adeninderivate, die zusammengefasst als Cytokinine bezeichnet werden. Ursprünglich entdeckt auf Grund ihrer zellteilungsfördernden Wirkung (Miller *et al.*, 1955; Skoog *et al.*, 1965), sind heutzutage eine Vielzahl von pflanzlichen Entwicklungsprozessen bekannt, die durch Cytokinine gesteuert werden. Zu diesen gehören die Regulation der Zellproliferation und Differenzierung in Wurzel- und Sprossapikalmeristem (Werner *et al.*, 2003; Dello Ioio *et al.*, 2008a; Gordon *et al.*, 2009; Bartrina *et al.*, 2011), der Apikaldominanz (Sachs and Thimann, 1967), der Seneszenz (Gan and Amasino, 1995; Kim *et al.*, 2006), der Samengröße (Riefler *et al.*, 2006), der Nodulation in Leguminosen (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006), der Entwicklung des Leitgewebes (Yamada *et al.*, 2001; Mahonen *et al.*, 2006a; Nieminen *et al.*, 2008), der Größe der Blütenorgane (Bartrina *et al.*, 2011), der Entwicklung des weiblichen Gametophyten (Deng *et al.*, 2010; Kinoshita-Tsujimura and Kakimoto, 2011; Cheng *et al.*, 2013), die Vermittlung des Ernährungsstatus (Takei *et al.*, 2001b) und die Reaktion auf Stress (Werner *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2011). Viele dieser Prozesse werden im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen kontrolliert (Laplaze *et al.*, 2007; Dello Ioio *et al.*, 2008b; Müller and Sheen, 2008; Zhao *et al.*, 2010; Bishopp *et al.*, 2011a; Bishopp *et al.*, 2011b; Kitomi *et al.*, 2011; Marhavy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011b).

Die verschiedenen Mitglieder der Gruppe der Cytokinine unterscheiden sich chemisch sowohl hinsichtlich der Form der Seitenkette als auch auf Grund verschiedener möglicher Modifikationen am Purinring (Mok and Mok, 2001). Neben der grundlegenden Unterscheidung nach Isoprenoid- oder aromatischer Seitenkette, unterscheidet man noch je nachdem, ob die Isoprenoidseitenkette hydroxyliert ist oder nicht, die Zeatin(Z)-Typ Cytokinine und Isopentenyladenin (iP). Erstere unterteilen sich, je nach vorliegender Isoform, in *trans*-Zeatin (tZ) und *cis*-Zeatin (cZ) (Abb. 1). iP- und tZ-Typ Cytokinine sind die am häufigsten vorkommenden Formen in *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) (Sakakibara, 2006), in Mais und Reis hingegen sind dies die cZ-Typen (Izumi *et al.*, 1988; Veach *et al.*, 2003). Zeatin-Typ Cytokinine können an der

hydroxylierten Isoprenoidkette acetyliert sein oder durch Anfügen von Glukose oder Xylose *O*-glykosyliert werden. Am Purinring kann die 3-, 6- oder 9-Position mit Glukose, Ribose, Alanin oder Xylose modifiziert sein und die 2-Position mit Methylthiogruppen.

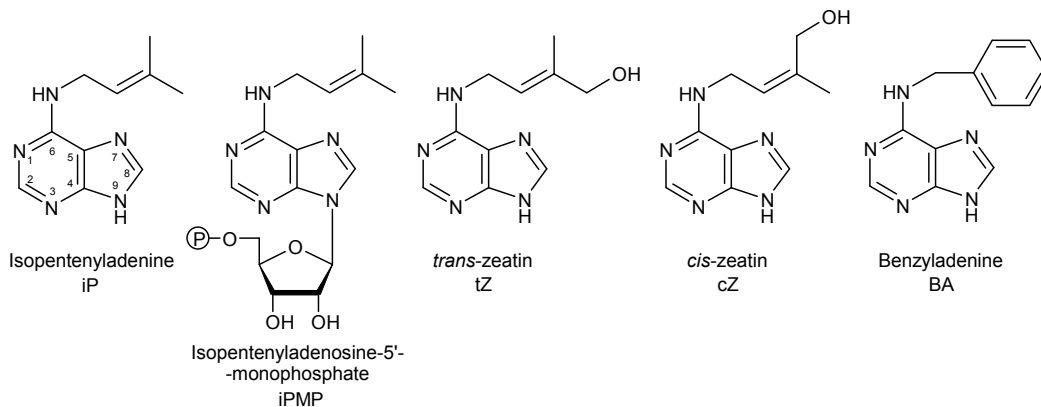


Abbildung 1. Chemische Strukturen verschiedener Cytokinine (aus Heyl *et al.*, 2006).

Die zentralen Enzyme des Cytokininmetabolismus und die diese kodierenden Genfamilien sind identifiziert (Abb. 2). Die Synthese erfolgt durch Isopentenyltransferasen, für die in Arabidopsis neun Gene kodieren (*IPT1* bis *IPT9*, (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a)). Sieben von diesen (*IPT1* und *IPT3* bis *IPT8*) synthetisieren Cytokinine, indem sie den Isoprenoidvorläufer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) auf die *N*⁶-Position von ATP oder ADP transferieren, wodurch Isopentenyladenosintriphosphat oder -diphosphat entstehen. Das von diesen IPTs verwendete DMAPP entsteht zum größten Teil im Chloroplasten (Kasahara *et al.*, 2004). Die Biosynthese von cZ-Typ Cytokinin erfolgt durch die Prenylierung von tRNAs durch *IPT2* und *IPT9* und daran anschließende Hydrolyse (Miyawaki *et al.*, 2006). Das hierfür verwendete DMAPP entsteht vermutlich größtenteils im Cytosol. Die Analyse der subzellulären Lokalisation der IPTs deutet darauf hin, dass ein Großteil der Cytokinine in Plastiden synthetisiert wird, in welchen *IPT1*, *IPT3*, *IPT5* und *IPT8* lokalisiert sind. *IPT4* ist im Cytosol und *IPT7* in den Mitochondrien. In Abhängigkeit von einer Farnesylierung kann *IPT3* auch im Kern oder Cytosol vorkommen (Galichet *et al.*, 2008). Wenig ist hingegen über die Synthese von aromatischen Cytokinin bekannt (Sakakibara, 2006).

iP-Typ Nukleotide können durch die Aktivität der Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP735A1 und CYP735A2 zu tZ-Typ Nukleotiden hydroxyliert werden (Takei *et al.*, 2004b). Diese werden deutlich stärker in der Wurzel als im Spross exprimiert.

Möglicherweise existiert daneben noch ein iP-unabhängiger Weg, der zu tZ-Typ Cytokinen führt (Åstot *et al.*, 2000).

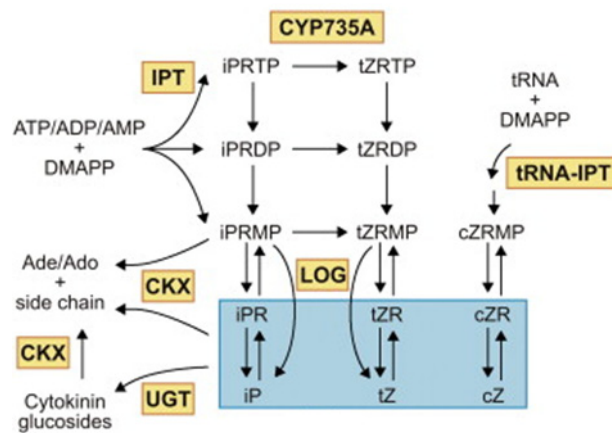


Abbildung 2. Übersicht über den Cytokininmetabolismus (modifiziert nach Werner und Schmülling, 2009).

Dargestellt sind die an Biosynthese (IPT), Hydroxylierung (CYP735A), Aktivierung (LOG), Deaktivierung (UGT) und Abbau (CKX) beteiligten Enzyme. Die Abbildung zeigt die für die Synthese verwendeten Ausgangsmoleküle (ATP, ADP, AMP, tRNA, DMAPP), die freien Cytokininbasen (iP, tZ, cZ), die jeweiligen Riboside (iPR, tZR, cZR), Mono-, Di- und Triphosphate (iPRMP, tZRMP, cZRMP, iPRDP, tZRDP, iPRTP, tZRTP) und Abbauprodukte (Ade, Ado, Isoprenoidseitenkette).

Die an den Cytokininrezeptor bindende und somit biologisch aktivste Form ist die Cytokininnucleobase (Hothorn *et al.*, 2011). Diese entsteht direkt aus dem Cytokininnucleosidmonophosphat durch die Aktivität der Phosphoribohydrolase LONELY GUY (LOG) (Kurakawa *et al.*, 2007). In Arabidopsis kodieren sieben *LOG* Gene (*LOG1* bis *LOG5*, *LOG7* und *LOG8*) für funktionelle Proteine (Kuroha *et al.*, 2009) und sind für den größten Teil der Entstehung von Nucleobasen aus Cytokininnucleotiden verantwortlich (Tokunaga *et al.*, 2012). Sie werden zum Teil in überlappenden und zum Teil spezifischen Domänen exprimiert. Insgesamt wird in jedem Gewebe der Pflanze mindestens ein Vertreter exprimiert (Kuroha *et al.*, 2009).

Neben den Nucleotiden und Nucleobasen kommen in pflanzlichen Geweben *N*- und *O*-glykosylierte Cytokine vor. Man geht davon aus, dass diese Modifikationen endgültige bzw. transiente Arten der Deaktivierung darstellen (Mok and Mok, 2001). Es wurden Enzyme identifiziert, welche die *N*-Glykosylierung an den Positionen 7 und 9 des Purinrings *in vitro* katalysieren (Hou *et al.*, 2004) und für zwei von diesen (UGT76C1 und UGT76C2) auch diese *in vivo* Funktion bestätigt (Wang *et al.*, 2011; 2013). Die *O*-Glykosylierung an der Seitenkette von *Z*-Typ Cytokinen soll ebenfalls

der Deaktivierung dienen. Gleichzeitig jedoch stellen *O*-glykosylierte Cytokinine Speicherformen dar, da diese Glykosylierung reversibel ist (Brzobohaty *et al.*, 1993). Es sind bisher eine Reihe von Zeatin-*O*-Glykosyltransferasen aus verschiedenen Pflanzen isoliert und beschrieben worden (Martin *et al.*, 1999a; b; Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003; Kudo *et al.*, 2012). Die *O*-Glykosylierung erfolgt in Arabidopsis in Cytosol und Kern (Jin *et al.*, 2012), die Speicherung von Cytokinin-*O*-Glykosiden möglicherweise in der Vakuole (Kiran *et al.*, 2012).

Die Perzeption des Cytokininsignals erfolgt in Arabidopsis über die drei membranständigen Histidinkinase-Rezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1/WOL (Hwang and Sheen, 2001; Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Die Rezeptoren sind hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und möglicherweise auch zum Teil in der Plasmamembran (Caesar *et al.*, 2011; Wulfetange *et al.*, 2011). Die Bindung der Cytokininbase erfolgt an die CHASE-Domäne im ER-Lumen oder Apoplasten und induziert Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren (Dortay *et al.*, 2006). Die Cytokininrezeptoren besitzen unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Cytokininmetaboliten (Romanov *et al.*, 2005; Romanov *et al.*, 2006; Stolz *et al.*, 2011) und unterscheiden sich in ihren Expressionsdomänen (Stolz *et al.*, 2011). Nach der Cytokininbindung folgt eine Phosphorylierungskaskade über Histidin-Phosphotransferproteine (AHP1 bis AHP5) (Hutchison *et al.*, 2006) auf eines der elf B-Typ Responseregulatorproteine (B-Typ ARR). Bei diesen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren (Sakai *et al.*, 2001), die auf solche Weise aktiviert primäre Antwortgene der Cytokininantwort anschalten (Brenner *et al.*, 2005). Unter den AHPs und B-Typ ARRs besteht eine große funktionelle Redundanz, jedoch deutet die detaillierte Analyse verschiedener Mehrfachmutanten auf spezifische Beteiligungen an bestimmten Entwicklungsschritten hin (Mason *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2008). Unter den primären Antwortgenen befinden sich auch die zehn A-Typ *ARR* Gene, welche als negative Modulatoren das Cytokinin signal regulieren (Hwang and Sheen, 2001; To *et al.*, 2004), sowie *cytokinin response factors (CRF)* (Rashotte *et al.*, 2006). Auch die A-Typ ARRs weisen eine hohe funktionelle Redundanz auf, aber auch bei diesen konnten bereits spezifische Funktionen identifiziert werden (To *et al.*, 2004; Müller and Sheen, 2008). Eine Besonderheit in diesem Signalweg stellt ein weiteres Histidin-Pseudophosphotransferprotein (AHP6) dar, welches auf dem Weg der Konkurrenz um die Phosphorylierung ohne darauffolgende Weitergabe das Cytokinin signal abschwächt

(Mahonen *et al.*, 2006a). Außerdem besitzt AHK4 ohne gebundenes Cytokinin eine Phosphataseaktivität, welche das Cytokininsignal abschaltet (Mahonen *et al.*, 2006b). Dies zeigt, dass auf mehreren Stufen der Signalweiterleitung eine Modulation des Cytokininsignals erfolgt. Neben den drei an der Cytokininbindung beteiligten Histidinkinasen spielt auch die Histidinkinase CYTOKININ INSENSITIV 1 (CKI1), welche selbst kein Cytokinin bindet, eine wichtige Rolle bei der Modulierung des Cytokininsignals bei speziellen Entwicklungsschritten (Kakimoto, 1996; Deng *et al.*, 2010).

1.1.2 Eigenschaften der Cytokinin-abbauenden CKX Enzyme

Die irreversible Deaktivierung von Cytokinen erfolgt durch Cytokininoxidasen/-dehydrogenase (CKX) Enzyme. Diese spalten die Isoprenoidseitenkette ab, so dass ein Adenin bzw. Adenosin und das Seitenketten-Aldehyd entstehen (Brownlee *et al.*, 1975). Es handelt sich um Flavinadeninindinukleotid (FAD)-abhängige Oxidoreduktasen, welche das FAD als Kofaktor kovalent gebunden haben (Bilyeu *et al.*, 2001). In Mais wurde ein möglicher natürlicher sekundärer Elektronenakzeptor identifiziert (Frébortová *et al.*, 2010), in Arabidopsis ist ein solcher bislang nicht bekannt. Die Aufklärung der Kristallstruktur eines CKX Enzyms aus Mais ergab, dass die Isoprenoidseitenkette im Inneren des Proteins gebunden wird und der Adeninring in einer trichterförmigen Vertiefung der Proteinoberfläche liegt (Malito *et al.*, 2004). Das Enzym zeigt keine Konformationsänderung nach Bindung des Substrates, sondern behält seine Struktur fast unverändert bei. Kleine Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung im Bindetrichter verschiedener CKX Enzyme werden als mögliche Ursache für unterschiedliche Substratpräferenzen verschiedener CKX Enzyme diskutiert (Galuszka *et al.*, 2007).

In Arabidopsis kodiert eine Genfamilie bestehend aus sieben Mitgliedern für Enzyme mit CKX Aktivität (*CKX1* bis *CKX7*) (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2004). In anderen Pflanzen können dies mehr sein, in Gräsern wurden oftmals bis zu elf *CKX* Gene identifiziert (Schmülling *et al.*, 2003; Mameaux *et al.*, 2011). Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass die *CKX* Gene unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden können, die zum einen orthologe Gene aus verschiedenen Pflanzenarten enthalten und zum anderen in Folge von relativ jungen Genduplikationen mehrere

paraloge Gene enthalten (Schmülling *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2010; Mameaux *et al.*, 2011).

Der Vergleich der verschiedenen CKX Proteinsequenzen zeigt, dass konservierte funktionelle Domänen existieren. Diese sind zum einen die FAD-bindende Domäne, die Substratbindungsdomäne, sowie weitere hochkonservierte Bereiche mit bislang ungeklärter Funktion (Schmülling *et al.*, 2003; Malito *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Geweben und Pflanzenarten (Gartenbohne, Mais, Tabak) ein variierender Anteil der CKX Aktivität an das Vorkommen von Mannose-Glykanen an den Proteinen gekoppelt ist (Chatfield and Armstrong, 1988; Burch and Horgan, 1989; Kaminek and Armstrong, 1990; Motyka *et al.*, 1996) und mit bioinformatischen Vorhersageprogrammen wurden für alle Arabidopsis CKX Proteine außer CKX7 *N*-Glykosylierungsstellen vorausgesagt (Schmülling *et al.*, 2003). Bei ZmCKX1 konnten in der Kristallstruktur Glycanreste identifiziert werden (Malito *et al.*, 2004). Auf Grund von Beobachtungen, dass nach Induktion von Pflanzen mit Cytokinin ein erhöhter Teil der CKX Aktivität mit glykosylierten Enzymen assoziiert ist (Motyka *et al.*, 1996; Motyka *et al.*, 2003), wird eine mögliche Funktion der *N*-Glykosylierung bei der Regulation der CKX Aktivität diskutiert. Die Deglykosylierung von heterolog hergestelltem ZmCKX1 führt zu einer Abnahme der Aktivität zwischen 10 % und 30 % (Kopečný *et al.*, 2005; Franc *et al.*, 2012). Eine detaillierte Analyse der posttranslationalen Modifikationen eines aus Pflanzen aufgereinigten CKX Enzyms wurde bislang nicht vorgenommen. Der direkte Vergleich von aus Pflanzen aufgereinigtem ZmCKX1 mit in *Picea* exprimiertem zeigt Unterschiede in der *N*-Glykosylierung (Bilyeu *et al.*, 2001).

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von an GFP fusionierten CKX Proteinen aus Arabidopsis deutet auf eine Spezialisierung der einzelnen Enzyme hin. CKX1 und CKX3 lokalisieren im Endomembransystem und der Vakuole, CKX2, CKX4 und CKX6 werden vermutlich sekretiert und CKX7 lokalisiert im Cytosol (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2009).

Die heterologe Expression führt in verschiedenen eukaryotischen Systemen (*ZmCKX1* in *Pichia pastoris*, *Physcomitrella patens*, *Yarrowia lipolytica*, *CKX2* in *Saccharomyces cerevisiae*, *CKX1* bis *AtCKX7* in Tabak, *CKX1* und *CKX3* in *Pichia pastoris*) und auch in *Escherichia coli* zu aktiven Enzymen (Houba-Herlin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2001; Malito *et al.*, 2004; Kopečný *et al.*, 2005; Frébortová *et al.*, 2007; Galuszka *et al.*, 2007; Kowalska *et al.*, 2010). Sowohl in Tabak als auch in *P. pastoris*

und *S. cerevisiae* exprimierte Arabidopsis CKX Enzyme wurden für die Bestimmung der Substratspezifität verwendet. Diese unterscheidet sich zwischen den Enzymen und ist abhängig vom pH-Wert. Es lässt sich die Tendenz erkennen, dass die sekretierten CKX Enzyme CKX2 und CKX4 die höchste Aktivität insgesamt und die höchste Aktivität gegenüber freien Cytokininbasen besitzen, während CKX3 die höchste Aktivität gegenüber iP-Nukleosidmono-, -di- und -triphosphat, das im Endomembranraum lokalisierte CKX1 gegenüber den Cytokininnukleosidmono-, -di- und -triphosphaten sowie iP9G und das cytosolische CKX7 ebenfalls gegenüber iP9G zeigen (Galuszka *et al.*, 2007; Kowalska *et al.*, 2010). Ein direkter Vergleich der absoluten Aktivität von in Pflanzen mit in anderen eukaryotischen Systemen heterolog exprimierten CKX Enzymen ist nicht möglich.

Die *CKX* Gene zeigen in Arabidopsis sich unterscheidende Expressionsmuster, wobei die Expressionsstärke insgesamt niedrig ist und die Expressionsdomänen klein. Die meisten der *CKX* Gene werden in teilungsaktivem Gewebe exprimiert (*CKX1*, *CKX2*, *CKX4*, *CKX5*) und *CKX6* vor allem im Leitgewebe (Werner *et al.*, 2003). Daneben existieren weitere kleine Expressionsdomänen, die sich zum Teil, beispielsweise in den Seitenwurzelprimordien, den Leitgeweben von Spross und Wurzel und den Seitenknospen, mit denen der *IPT* Gene überlappen, was auf eine Funktion von Cytokinin als parakrines oder autokrines Signal hinweist (Werner *et al.*, 2006). Die Expression von *CKX* Genen wird durch die exogene Gabe von Cytokinin induziert, was als Rückkopplungsschleife bei der Aufrechterhaltung der Cytokininhomöostase gedeutet wird (Brugiére *et al.*, 2003; Motyka *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2006).

Insgesamt scheinen die CKX Enzyme neben anderen redundanten Mechanismen für die Inaktivierung von Cytokinin eine Rolle bei der Feinregulation von Entwicklungsprozessen zu spielen. Unterschiede bei Substratspezifität, subzellulärer Lokalisation und Expressionsorten deuten gleichzeitig auf eine Spezialisierung einzelner CKX Enzyme hin. So zeigen *ckx3 ckx5* Arabidopsispflanzen Veränderungen im Infloreszenzmeristem und der Blütenentwicklung (Bartrina *et al.*, 2011) und in Reis hat bereits die verringerte Expression nur eines *CKX* Gens (*OsCKX2*) phänotypische Konsequenzen (Ashikari *et al.*, 2005).

Die Überexpression der verschiedenen *CKX* Gene aus Arabidopsis führt zu unterschiedlich stark ausgeprägten phänotypischen Veränderungen. Während Pflanzen, die *CKX1*, *CKX3* oder *CKX5* überexprimieren, starke Veränderungen in Spross und Wurzel zeigen, hat die Überexpression von *CKX2*, *CKX4* oder *CKX6* deutlich geringere

Auswirkungen (Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007). Dies ist überraschend, da CKX2 und CKX4 die höchste messbare Aktivität *in vitro* zeigen (Galuszka *et al.*, 2007). Die Überexpression der *CKX* Gene in Arabidopsis führt zu einer Verringerung des Cytokiningehaltes auf 30 % bis 50 % des Wildtypgehaltes und zu phänotypischen Veränderungen, die unter dem Begriff Cytokinindefizienzsyndrom zusammengefasst werden. Dieses umfasst ein kleineres Sprossapikalmersitem auf Grund der früheren Differenzierung von meristematischen Zellen, eine langsamere Entwicklung des Sprosses mit einer verspäteten Blühinduktion und kleineren Rosettenblättern. Gleichzeitig zeigen die Pflanzen ein stärkeres Wurzelwachstum und mehr Lateralwurzeln (Werner *et al.*, 2003). Die Überexpression des cytosolischen *CKX7* zeigt einen davon abweichenden Phänotyp mit stark verringertem Wurzelwachstum (Köllmer, 2009).

1.1.3 Cytokinintransport

Die in den vorherigen Abschnitten beschriebene unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von Synthese (Plastiden, Mitochondrien, Cytosol), Aktivierung (Cytosol), Perzeption (ER-Lumen, Apoplast), Speicherung (Vakuole) und Deaktivierung (ER-Lumen, Apoplast, Cytosol) sowie die unterschiedliche subzelluläre Verteilung von Cytokininen (Polanska *et al.*, 2007) weisen auf eine mögliche Bedeutung der Kompartimentierung bei der Erzeugung des Cytokininsignals hin, zeigen vor allem aber deutlich den Bedarf nach intrazellulärem Transport von Cytokininen. Intrazelluläre Cytokinintransporter sind bislang nicht beschrieben worden.

Es wird angenommen, dass Cytokinin neben der Funktion als auto- und parakrines Signal in Geweben, in denen sowohl Gene der Cytokininsynthese, als auch der -aktivierung und -signaltransduktion exprimiert werden, auch eine Funktion als Langstreckensignal hat. Es existiert ein Austausch von Cytokininen zwischen Spross und Wurzel durch Transport im Leitgewebe, bei dem hauptsächlich tZR im Xylem in den Spross und iP und iPR durch das Phloem in die Wurzel transportiert werden (Takei *et al.*, 2001b; Corbesier *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2008). Zudem wird der Gehalt an Cytokininen im Xylem aktiv über die Expressionsstärke von *IPT3* vom Vorhandensein verschiedener Makronährstoffe reguliert (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004a; Hirose *et al.*, 2008). Mikroarraydaten weisen auf eine mögliche Abregulation der Aufnahmetransporter einiger Makroelemente durch Cytokinin hin (Brenner *et al.*,

2005), so dass insgesamt Cytokinin der Vermittler in der Rückkopplungsschleife zur Kontrolle der Aufnahme von Makronährstoffen sein könnte (Hirose *et al.*, 2008). Zum anderen wurde gezeigt, dass vom Spross stammende Cytokinine an der Entwicklung des Leitbündels in der Wurzel beteiligt sind (Bishopp *et al.*, 2011b).

Solch eine Funktion als Langstreckensignal bedarf dem Ein- und Ausschleusen von Cytokinin aus der Zelle. Untersuchungen an Zellkulturen ergaben, dass sowohl ein niedrig- als auch ein hochaffiner aktiver Transport von Cytokininbasen und -ribosiden über die Plasmamembran existiert (Cedzich *et al.*, 2008). Die daran beteiligten Proteine wurden in dieser Studie nicht isoliert, es sind jedoch einige in Frage kommende Kandidaten aus anderen Studien bekannt, die neben weiteren Purinmetaboliten auch Cytokinine transportieren. Auf der Suche nach Adenintransportern wurde die Familie der Purin Permeasen (PUP) gefunden. Für das Mitglied PUP1 konnte neben dem Adenintransport ein direkter Transport von tZ gezeigt werden und bei PUP2 kompetitierten alle Cytokininbasen mit dem Adenintransport (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003). *PUP2* wird unter anderen im Phloem von Blättern exprimiert (Bürkle *et al.*, 2003). Bislang wurden keine genetische Analyse dieser Transporter *in planta* vorgenommen, so dass es für die tatsächliche Beteiligung dieser Gene am beobachteten Transport von Cytokinin über die Plasmamembran keine weitere Bestätigung gibt. Als mögliche Transporter von Cytokininribosiden kommen Mitglieder der Familie der äquilibrierenden Nucleosidtransporter (*ENT*) in Frage (Hirose *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2008). Der Verlust von *ENT8* unterdrückt den Überexpressionsphänotyp von *IPT8*. *ent8* und *ent3* Mutanten zeigen beide eine verringerte Sensitivität gegenüber iPR und tZR und eine geringere Aufnahme von iPR in die Pflanze (Sun *et al.*, 2005). Für ein Mitglied der ENT Familie aus Reis konnte nach heterologer Expression in Hefe eine Transportaktivität für Cytokininriboside nachgewiesen werden (Hirose *et al.*, 2005). Ein weiterer Kandidat ist AtENT6, dessen Adenintransport durch iPR stark kompetitiert wurde (Hirose *et al.*, 2008).

1.2 Identifizierung von ROCK1 als ein an der Cytokininhomeostasis beteiligtes

Protein

Um Gene zu identifizieren, die an der Etablierung des Cytokinindefizienzsyndrom durch die Überexpression von *CKX1* beteiligt sind, wurde von Dr. I. Bartrina ein EMS-Suppressormutagenesecscreen durchgeführt. Dadurch sollten neue am

Cytokininmetabolismus oder an der -signalweiterleitung beteiligte Komponenten identifiziert werden (Bartrina, 2006). Die isolierten Mutanten, die eine Reversion des Sprossphänotyps zeigten, wurden *repressor of cytokinin deficiency (rock)* genannt und durch Karten-gestützte Klonierung die mutmaßliche ursächliche Mutation identifiziert. Im Rahmen meiner Diplomarbeit begann ich mit der Charakterisierung des Gens *ROCK1*, welches für ein Protein mit Ähnlichkeit zu Proteinen der Familie der Nukleotidzuckertransporter kodiert (Bakker *et al.*, 2005; Niemann, 2008). Zunächst wurde die Ursächlichkeit der gefundenen Punktmutation *rock1-1* in diesem Gen für die Reversion des Phänotyps mittels Komplementation bestätigt. Es wurde das zweite Mutantenallel *rock1-2* aus einer T-DNA Insertionsbibliothek isoliert und genetisch charakterisiert. Die Auswirkungen auf den Phänotyp durch *rock1-1* und *rock1-2* im Wildtyphintergrund wurden untersucht. Die einzige deutliche morphologische Konsequenz des Verlustes von *ROCK1* ist die Bildung von mehr Blüten und Schoten. Es wurde festgestellt, dass das Allel *rock1-2* bei einer bestimmten Cytokininkonzentration zu einer geringfügig erhöhten Sensitivität des Wurzelwachstums gegenüber Cytokinin führt. Der Verlust von *ROCK1* führt zu einer Verringerung der CKX Enzymaktivität im *35S:CKX1* Hintergrund und zu einem erhöhten Cytokiningehalt. Um das bis dahin nicht beschriebene Gen weiterhin grundlegend zu charakterisieren, sollten die Expressionsdomänen innerhalb der Pflanze und die subzelluläre Lokalisation des Proteins untersucht werden. Für die Analyse der Genexpression wurde ein Reporterkonstrukt bestehend aus 2 kb des mutmaßlichen Promotorbereichs vor dem *ROCK1* Startcodon sowie dem Reportergen *uidA* kloniert. Entgegen der Erwartung auf Grund von *Microarray*-Daten wurde in den transgenen Arabidopsispflanzen eine nur schwache Reporterogenaktivität in wenigen Geweben detektiert. Die Analyse der subzellulären Lokalisation erfolgte mittels transienter Expression eines *35S:ROCK1-GFP* Konstruktes in Tabakepidermiszellen und zeigte eine Lokalisation im Golgi. Um die Auswirkungen der *ROCK1* Überexpression zu untersuchen, wurden *ROCK1* überexprimierende Pflanzen erzeugt. Die Analyse der segregierenden T2 Populationen zeigte eine dosisabhängige postembryonale Letalität in einige Linien, sowie einen Phänotyp, der sich durch verzögerte Entwicklung, kleinere Rosetten und früher einsetzende Seneszenz vom Wildtyp unterschied (Niemann, 2008).

1.3 Vorkommen und Verwendung von Nukleotidzuckern in der Pflanze

Da sowohl die anfängliche Homologiesuche auf Grundlage von Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz als auch biochemische Untersuchungen im Laufe der Arbeit Hinweise lieferten, dass es sich bei ROCK1 um einen Nukleotidzuckertransporter handeln könnte, soll im folgenden Kapitel das für diese Arbeit relevante bestehende Wissen über den Metabolismus, die Verwendung und den Transport von Nukleotidzuckern dargestellt werden.

Nukleotidzucker stellen eine hochenergetische aktivierte Form von Monosacchariden dar. Neben der Bedeutung von UDP-Glukose als Substrat für die Produktion von Stärke und Saccharose im Energiestoffwechsel der Pflanzen spielen weitere Nukleotidzucker eine große Rolle bei der Synthese der Zellwand und von Glykanen wie Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane, Polysaccharide und glykosylierte sekundäre Pflanzenmetabolite. In Pflanzen wurden bislang 30 verschiedene Nukleotidzucker identifiziert (Bar-Peled and O'Neill, 2011). Da viele der Nukleotidzucker in verschiedenen Prozessen verwendet werden, lässt die Analyse von Metabolismusmutanten nicht immer eindeutige Rückschlüsse auf die betroffenen molekularen Mechanismen zu (Bar-Peled and O'Neill, 2011). Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Nukleotidzucker bei der Synthese der primären Pflanzenzellwand, den verschiedenen Formen der Proteinglykosylierung sowie der Lipidglykosylierung verwendet werden, wobei ein besonderer Fokus auf die subzelluläre Lokalisation dieser Vorgänge gelegt wird. Da bisher davon ausgegangen wird, dass die an der Glykosylierung von Phytohormonen und Metaboliten des sekundären Pflanzenstoffwechsels beteiligten Glykosyltransferasen im Cytosol lokalisiert sind (Lim and Bowles, 2004), wird auf diese Modifikationen nicht näher eingegangen. Da es jedoch eine große Anzahl an weiteren Glykosyltransferasen im Endomembranraum gibt, deren Funktion völlig unbekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Modifikationen an Molekülen jenseits von Proteinen, Lipiden und Polysacchariden im Endomembranraum vorgenommen werden (Nikolovski *et al.*, 2012).

1.3.1 Nukleotidzuckermetabolismus

Nukleotidzucker bestehen aus einem Zuckermolekül verbunden mit einem Nucleosid- oder -monophosphat (Abb. 3A). Die Synthese der am Häufigsten vorkommenden

Nukleotidzucker (UDP-Glc, ADP-Glc, GDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Gal, UDP-GlcA, UDP-Xyl, UDP-Araf, UDP-Arap, UDP-GalA, UDP-Rha, UDP-Api, GDP-Man, UDP-Fuc, GDP-Gal, CMP-Kdo) ist weitestgehend bekannt (Bar-Peled and O'Neill, 2011).

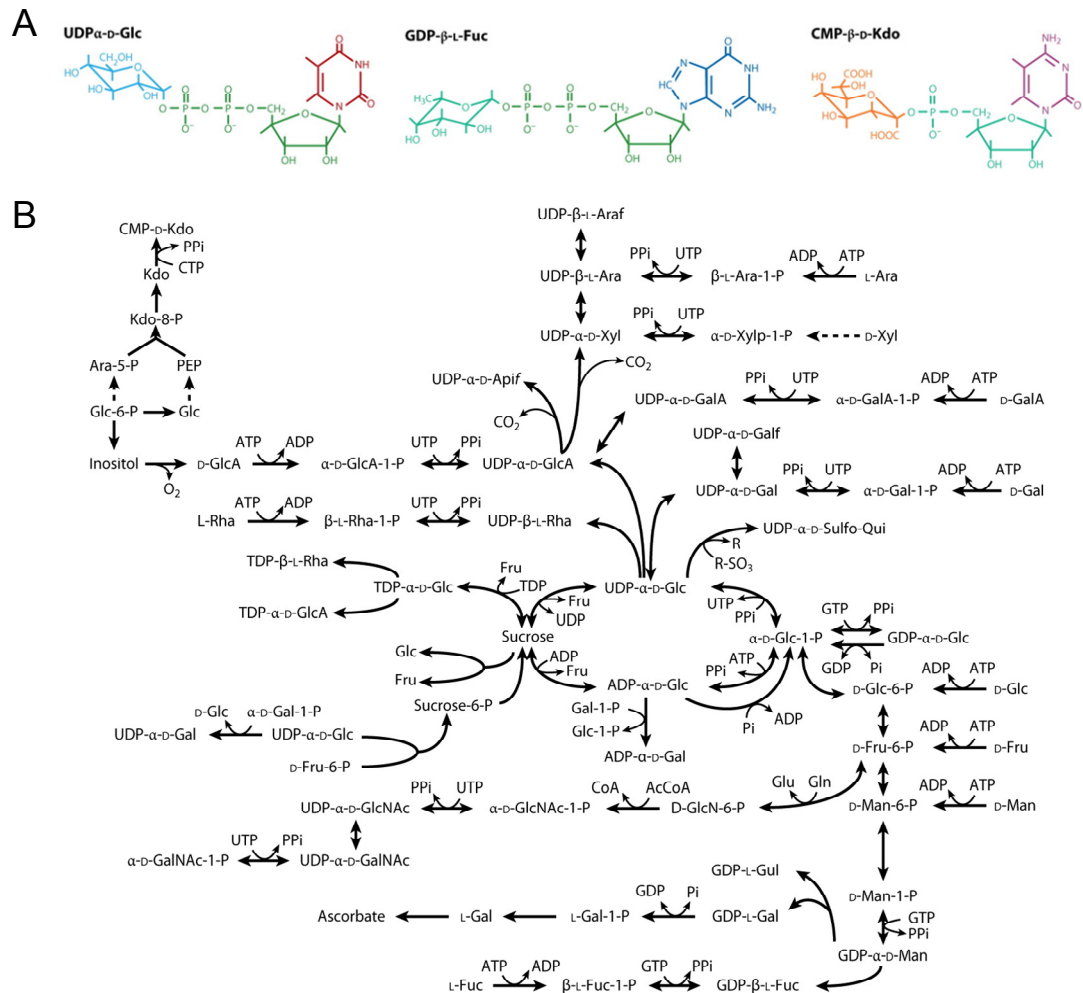


Abbildung 3. Struktur und Metabolismus von Nukleotidzuckern (Abbildungen aus Bar-Peled und O'Neill, 2011).

(A) Exemplarische Darstellung der Struktur von drei Nukleotidzuckern.

(B) Die wichtigsten Synthese- und Umwandlungswege von Nukleotidzuckern in der Pflanze.

Die Bedeutungen der Abkürzungen sind der Abkürzungstabelle am Anfang der Arbeit zu entnehmen.

Sie entstehen entweder durch die Aktivität von cytosolischen, chloroplastidären oder mitochondrialen Pyrophosphorylasen aus einem Nukleosidtriphosphat und dem jeweiligen Zucker-1-Phosphat (Yang *et al.*, 201; Kotake *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010), durch Abbau von Saccharose im Cytosol (Elling *et al.*, 1993) oder durch Umwandlung aus anderen Nukleotidzuckern in Cytosol und Lumen des

Endomembranraums (Harper and Bar-Peled, 2002; Bonin *et al.*, 2003; Wolucka and Van Montagu, 2003; Ahn *et al.*, 2006; Oka *et al.*, 2007; Bar-Peled and O'Neill, 2011; Rautengarten *et al.*, 2011) (Abb. 3B). Eine Ausnahme stellt CMP-Kdo dar, dessen Synthese in Mitochondrien durch das Anfügen eines Cytidinmonophosphats an den nichtphosphorylierten Zucker Ketodesoxymannooctonsäure (Kdo) erfolgt (Kobayashi *et al.*, 2011). Sialinsäure, die ein wichtiger Zucker für die Proteinmodifikation in Säugetieren ist, scheint in Pflanzen keine Rolle zu spielen (Zeleny *et al.*, 2006). Andererseits ist bei den nur in sehr geringen Mengen vorkommenden Zuckern der Zellwand, wie die bei dem sehr komplexen Pektin Rhamnogalacturonan II vorkommenden Acerinsäure und Dha, nicht einmal die aktivierte Form bekannt (Bar-Peled *et al.*, 2012). Von anderen Nukleotidzuckern ist wiederum nur die Existenz beschrieben, ohne aber etwas über deren Funktion zu wissen (Bar-Peled and O'Neill, 2011).

Mittels Mutantanalyse wurde versucht, die Bedeutung der einzelnen Nukleotidzucker in *Arabidopsis* zu analysieren. Es zeigte sich, dass der Ausfall der Synthese eine große Bandbreite an Konsequenzen hat. So führt der Verlust von UDP-Araf, CMP-Kdo oder UDP-GlcA zu einem pollenletalem Phänotyp (Schnurr *et al.*, 2006; Delmas *et al.*, 2008; Rautengarten *et al.*, 2011), von UDP-Api zu Zelltod (Ahn *et al.*, 2006), der von GDP-Man ist embryoletal (Lukowitz *et al.*, 2001) und der von GDP-Fuc führt zu Zwergwüchsigkeit (Reiter *et al.*, 1993). Für UDP-GlcNAc sind keine Informationen über die Konsequenzen eines vollständigen Verlustes in Pflanzen bekannt, die Reduktion des UDP-GlcNAc Gehaltes um zwei Drittel in einer konditionellen Arabidopsismutante führt zu einer Verringerung der Proteinglykosylierung mit Auswirkungen auf das Wurzelwachstum (Nozaki *et al.*, 2012). Ähnliche Beobachtungen stammen von einer Reismutante mit um 90 % reduzierten UDP-GlcNAc Gehalt (Jiang *et al.*, 2005). UDP-Glc ist der Ausgangspunkt für die Synthese der meisten anderen UDP-Zucker und es existieren mehrere Wege für die Generierung von UDP-Glc, wobei die Halbierung des UDP-Glc Gehaltes durch Verlust eines Syntheseweges zu starker Entwicklungsverzögerung und verringertem Wachstum sowie fehlerhafter Pollenentwicklung führt (Park *et al.*, 2010).

1.3.2 Verwendung von Nukleotidzuckern bei der Zellwandsynthese

Die primäre Zellwand von Arabidopsis besteht zum größten Teil aus Polysacchariden. Die Synthese des Hauptbestandteiles Cellulose, welches eine lineare Aneinanderreihung von Glukosemolekülen ist, erfolgt an der Plasmamembran durch den Cellulose-Synthasekomplex unter Verwendung von cytosolischem UDP-Glc (Guerriero *et al.*, 2010). Es wird davon ausgegangen, dass derselbe Komplex auch das Ausschleusen des wachsenden Cellulosestranges vermittelt (Guerriero *et al.*, 2010).

Weitere Polysaccharidbestandteile der Zellwand sind Hemicellulose und Pektine. Erstere bestehen zum größten Teil aus Xyloglucan, welches dasselbe Glukanrückgrat wie Cellulose besitzt, jedoch noch durch Seitenketten aus Xylose und zum Teil zusätzlich Galaktose und Fucose modifiziert ist. Ein kleiner Anteil der Hemicellulosen machen zudem Arabinoxylane aus. Diese besitzen ein Xyloserückgrat, das mit Arabinose-Seitenketten versehen ist. Ein weiterer kleiner Teil sind die Mannane, welche ein Rückgrat aus Mannose besitzen und modifiziert sind mit Galaktose (Scheller and Ulvskov, 2010). Die Synthese von Xyloglucan erfolgt am und im Golgiapparat, wobei das Glukanrückgrat im Cytosol synthetisiert wird und die Modifikationen mit Xylose, Galaktose und Fucose im Lumen des Golgi erfolgen (Davis *et al.*, 2010). Das Anfügen der Arabinosen auf Arabinoxylane erfolgt innerhalb des Golgi (Sogaard *et al.*, 2012). Die Synthese des Mannoserückgrates sowie das Anfügen der Galaktose erfolgt bei einem Teil der Mannane ebenfalls im Golgi (Davis *et al.*, 2010), bei einem anderen Teil der Mannane erfolgt das Anfügen der Galaktose im Cytosol (Verhertbruggen *et al.*, 2011).

Zu den Pektinen werden solche Polysaccharide der Zellwand gezählt, die leicht mit Säure oder Chelatoren extrahierbar sind und einen hohen Anteil an Galacturonsäure (GalUA) besitzen (Harholt *et al.*, 2010). Die einfachste Struktur ist hierbei die unverzweigte Homopolymerkette aus Galacturonsäure, welche Homogalacturonan ausmacht. Das Anhängen von Xylose oder Apiofuranose führt zur Bildung von Xylogalacturonan und Apiogalacturonan. Für die Synthese von Rhamnogalacturonan II werden an dasselbe Polysaccharidrückgrat komplexere Seitenketten angehängt, die aus bis zu 13 verschiedenen Zuckern bestehen können (Bar-Peled und O'Neill, 2012). Ein weiterer Bestandteil von Pektinen, Rhamnogalacturonan I, unterscheidet sich dadurch, dass es ein Rückgrat aus Galaktose und Rhamnose besitzt, an dem sich Galaktose- und Arabinoseseitenketten befinden (Harholt *et al.*, 2010). Die bisher als an der Synthese von Hemicellulosen und Pektinen beteiligt charakterisierten Glykosyltransferasen

lokalisieren im Golgi, weshalb die Autoren aktueller Artikel davon ausgehen, dass die Synthese im Lumen des Golgi erfolgt (Harholt *et al.*, 2010; Bar-Peled *et al.*, 2012; Driouich *et al.*, 2012)).

1.3.3 Verwendung von Nukleotidzuckern bei der Proteinglykosylierung

Es wird davon ausgegangen, dass mehr als die Hälfte aller Proteine Zuckermodifikationen tragen (Apweiler *et al.*, 1999). Man unterscheidet grundsätzlich abhängig von dem Atom der Aminosäure, über welches die Verbindung mit dem Glykan erfolgt, vier Arten von enzymatischer Proteinglykosylierung, die *N*-, *O*- und *C*-Glykosylierung sowie das Anfügen eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers.

1.3.3.1 N-Glykosylierung

Die am häufigsten vorkommende Form der Proteinglykosylierung ist die *N*-Glykosylierung, bei welcher das Glykan an ein Stickstoffatom auf der Seitenkette eines Asparagins gebunden wird. Die *N*-Glykosylierung erfolgt im Lumen von ER und Golgi und ist zwischen Tieren und Pflanzen hochkonserviert und deshalb auch die am besten untersuchte Form der Proteinglykosylierung. Da es dennoch auch Unterschiede gibt, wird im Folgenden vor allem auf die Publikationen verwiesen, die die beteiligten Komponenten in *Arabidopsis thaliana* beschreiben, auch wenn die homologen Proteine zuerst in Hefe oder Tieren beschrieben worden sind. Der erste Schritt der *N*-Glykosylierung ist das kotranslationale Übertragen des sogenannten Kernglykans, bestehend aus $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, auf das Stickstoffatom einer Asparaginseitenkette des neusynthetisierten Proteins nach dessen Eintritt in das Lumen des ERs. Dieser Vorgang erfolgt durch den Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex (Koiwa *et al.*, 2003; Lerouxel *et al.*, 2005), welcher die zu glykosylierenden Asparaginreste anhand der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr erkennt, wobei es jedoch auf Grund von sterischer Hinderung oder anderen Gründen nicht zwangsläufig zu einer Glykosylierung dieser Sequenz kommen muss (Petrescu *et al.*, 2004). Auch die Identität der mit X bezeichneten Aminosäure spielt eine Rolle für die Effizienz der Glykosylierung und es darf sich nicht um Prolin handeln (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996).

Der Vorgang der Synthese des übertragenen Kernglykans scheint hochkonserviert zu sein (Lehle *et al.*, 2006), so dass auf dieser Grundlage bereits ein großer Teil der

beteiligten enzymatischen Komponenten isoliert werden konnte. Die Synthese beginnt auf der cytosolischen Seite des ER durch das sequentielle Anfügen der Zuckerreste von Nukleotidzuckern auf eine Di-Phosphat-Dolicholbasis bis zur Zusammensetzung $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Diphosphat-Dolichol (Zhang *et al.*, 2009) (Abb. 4). Das Dolichol dient auf Grund seiner sich wiederholenden Isopren-Untereinheiten als Membrananker für das gesamte Glykan (Jadid *et al.*, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass dieses Glykan durch die Aktivität einer Flippase in das ER Lumen gebracht (Sanyal and Menon, 2009) und dort durch die Aktivität weiterer Mannosetransferasen (ALG3, ALG9 und ALG12) (Henquet *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012) und Glukosetransferasen (ALG6, ALG8, und ALG10) (Farid *et al.*, 2011) bis zum übertragenen Kernglykan erweitert wird. Als Substrate im ER-Lumen dienen in diesem Fall nicht die Nukelotidzucker GDP-Man und UDP-Glc, sondern an Dolichol-Phosphat gebundene Mannose bzw. Glukose, die ebenfalls durch einen Flippase-Mechanismus in das ER Lumen gebracht werden (Sanyal and Menon, 2010) (Abb. 4).

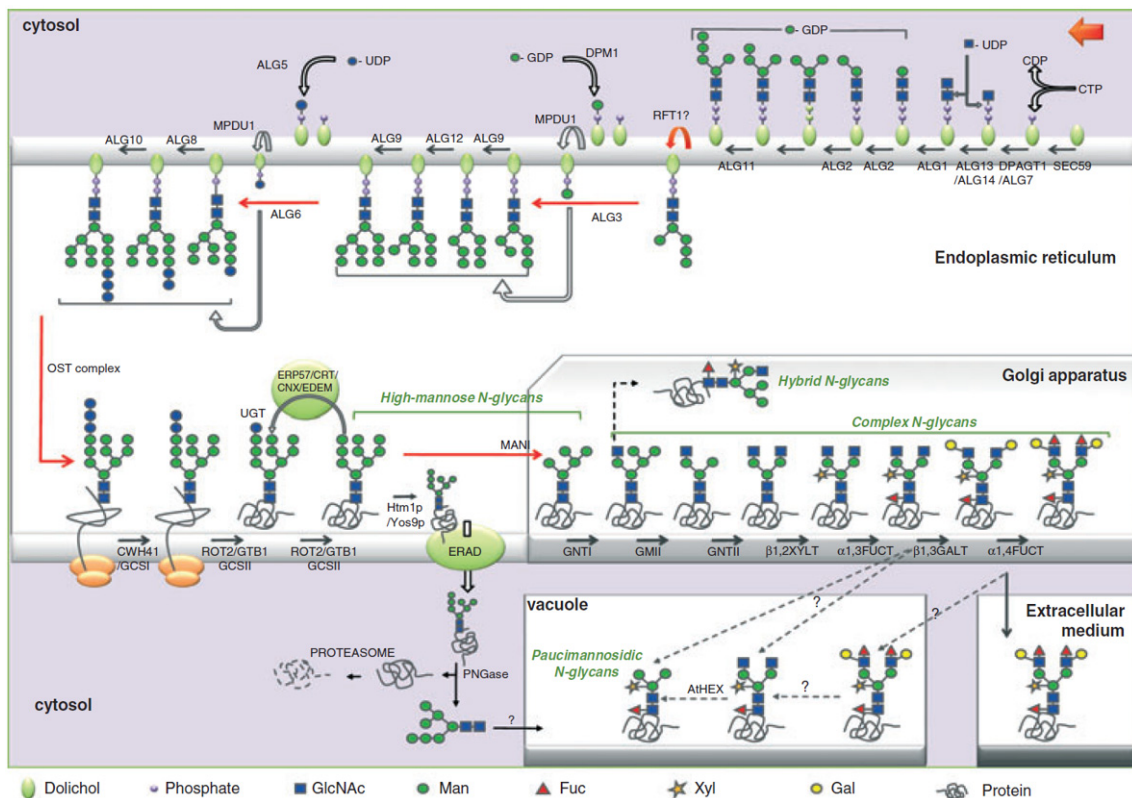


Abbildung 4. Die *N*-Glykosylierung von Proteinen in Pflanzen (aus Gomord *et al.*, 2010). Dargestellt sind die Struktur des *N*-Glykans und die an der Umwandlung der Struktur beteiligten Enzyme. Desweiteren sind dargestellt die wichtigsten Proteine, die an der kotranslationalen Übertragung des *N*-Glykans auf das Protein, an der Faltungskontrolle und der Degradation falsch gefalteter Proteine beteiligt sind, sowie die subzelluläre Lokalisation all dieser Aktivitäten. Nähere Erklärungen finden sich im Text.

Bislang wird davon ausgegangen, dass die *N*-Glykosylierung von Proteinen verschiedene Funktionen sowohl während der Ausbildung der Proteinstruktur als auch bei der späteren Proteinfunktion hat. Man nimmt an, dass die Zuckerketten bereits während der Synthese die richtige Faltung unterstützen. Im Rahmen der Qualitätskontrolle im ER (ERQC) vermitteln sie die Interaktion von unvollständig gefalteten Glykoproteinen mit den Chaperonen Calnexin (CNX) und Calreticulin (CRT) (Jin *et al.*, 2007). Das aktuelle Modell, welches vor allem auf Untersuchungen in Hefe und Tieren basiert, nimmt an, dass zunächst α -Glucosidase I und II den anfänglich übertragenen Zuckerbaum zu einem monoglucosylierten Zuckerbaum zurückbauen (Boisson *et al.*, 2001; Burn *et al.*, 2002; Gillmor *et al.*, 2002). Dieser wird durch CNX und CRT erkannt, im ER zurückgehalten und die korrekte Proteinfaltung unterstützt. Im Anschluss wird der Zuckerbaum durch α -Glucosidase II vollständig deglycosyliert, wodurch auch die Bindung der Chaperone wegfällt (Burn *et al.*, 2002). Die Proteine tragen nun sogenannte mannosereiche Glykane ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) (Abb. 4).

Weiterhin falsch gefaltete Proteine werden von dem Enzym UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) unter Verwendung des Substrates UDP-Glc wiederum monoglucosyliert und treten erneut in den CNX/CRT-Zyklus ein (Jin *et al.*, 2007). Sollte dieser Prozess nicht zu korrekt gefalteten Glykoproteinen führen, spielt die *N*-Glykosylierung im Folgenden eine Rolle bei der ER-assoziierten Degradation (ERAD). In einem bisher nicht vollständig verstandenen Mechanismus werden endgültig falsch gefaltete Glykoproteine von α -Mannosidasen erkannt und an zwei Zweigen des Glykans die terminalen Mannosemoleküle entfernt (Clerc *et al.*, 2009; Liebinger *et al.*, 2009) (Abb. 4). Die dabei entstehende Zuckerstruktur ist ein Bestandteil des Signals zum Ausschleusen des falsch gefalteten Glykoproteins aus dem ER Lumen und Abbau im Cytosol (Hong *et al.*, 2012; Hüttner *et al.*, 2012).

Es wird angenommen, dass Proteine ohne ER-Retentions- oder Rückgewinnungssignal (Andersson *et al.*, 1999) weiter zum Golgi transportiert werden (Phillipson *et al.*, 2001). Auf dem Weg dahin werden durch die Mannosidasen MSN1, MSN2 und MSN3 weitere Mannosorereste abgespalten (Kajiura *et al.*, 2009; Liebinger *et al.*, 2009). Im Golgi werden die Zuckerbäume weiter umgeformt. Die für diese Schritte notwendigen Enzyme sind in distinkten Kompartimenten des Golgi lokalisiert (Schoberer and Strasser, 2011). Zunächst wird durch die *N*-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) ein GlcNAc an einen Arm angefügt (von Schaewen *et al.*, 1993) (Abb. 4). Wird der andere Arm nicht weiter verändert, spricht man von einem Hybridglykan. Kommt es zum

weiteren Umbau durch das Entfernen weiterer Mannosereste durch die Mannosidase II (GMII) (Strasser *et al.*, 2006) spricht man von komplexen Glykanen (Abb. 4). Diese können durch das Anfügen von GlcNAc durch die *N*-Acetylglucosaminyltransferase II (GnTII) weiter verändert werden (Strasser *et al.*, 1999). Sowohl hybride wie auch komplexe Glykane können zusätzlich xylosyliert und fucosyliert werden (Strasser *et al.*, 2004). Des Weiteren kann an das äußere GlcNAc von komplexen Glykanen noch Galaktose und Fukose angefügt werden, so dass das so genannte Lewis Epitop entsteht (Leonard *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2007) (Abb. 4). Viele vakuoläre und ein Teil der Zellwandproteine von *Arabidopsis* tragen paucimannosidische Glykanstrukturen. Bei diesen sind die beiden terminalen GlcNAc-Reste durch vakuoläre und Plasmamembranständige Hexosen entfernt worden (Liebminger *et al.*, 2011) (Abb. 4). Ob diese Modifikationen an der Glykanstruktur erfolgen oder nicht, hängt zum einen davon ab, ob das entsprechende Glykoprotein das Kompartiment erreicht, in dem das modifizierende Enzym sich befindet, und zum anderen von der sterischen Erreichbarkeit dieses Glykans durch das modifizierende Enzym. Letzteres führt zum Phänomen der Heterogenität von Glykanstrukturen an verschiedenen Stellen auf demselben Protein (Elbers *et al.*, 2001).

Die Analyse von Mutanten der an der *N*-Glykosylierung beteiligten Gene ergibt ein zweigeteiltes Bild bezüglich der Auswirkungen in *Arabidopsis*. Wenn zentrale Elemente, wie die Übertragung (OST-Komplex) oder die Deglukosylierung des Kernglykans ausfallen, so dass dieses nicht mehr an den CNX/CRT-Komplex binden kann, ist dies letal (Koiwa *et al.*, 2003; Lerouxel *et al.*, 2005; Boisson *et al.*, 2001; Gillmor *et al.*, 2002; Burn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009). Schwache Allele dieser Kernkomponenten oder Mutationen in weiteren an Aufbau und der anfänglichen Prozessierung in Cytosol und im ER beteiligten Enzymen führt zu einer verringerten Proteinglykosylierung mit entsprechenden Folgen für die Proteinfaltung. Den Anstieg falsch gefalteter Proteine im ER bezeichnet man als ER Stress. Die Mutanten zeigen zum Teil eine erhöhte Salzsensitivität, Zellwanddefekte und verringertes Spross- und Wurzelwachstum (Jin *et al.*, 2007; Henquet *et al.*, 2008; Farid *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009; Jadid *et al.*, 2011; Liebminger *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu hat der Ausfall von Komponenten der weiteren Umformung in hybride und komplexe Glykane keine offensichtlichen phänotypischen Auswirkungen unter physiologischen Standardbedingungen (von Schaewen *et al.*, 1993; Strasser *et al.*, 2004; Strasser *et al.*, 2007; Liebminger *et al.*, 2011). Die Beobachtung, dass ein teilweiser Funktionsverlust

des OST-Komplexes zu einer erhöhten Salzsensitivität führt, war für Kang *et al.* (2008) Ausgangspunkt, genauer einzuschränken, welche Modifikatin des Glykans hierfür verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass die erhöhte Salzsensitivität durch alle Mutationen, die zum gleichzeitigen Verlust von Fucosylierung und Xylosylierung des Kernglykans führen, hervorgerufen wurde. Als mögliche Ursache für den Phänotyp kommt die verringerte Aktivität eines an der Cellulosesynthese beteiligten Proteins in Frage (Kang *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Arabidopsis scheint die Funktion von GnTI und somit auch komplexer *N*-Glycosylierung in Reis von größerer Bedeutung zu sein (Fanata *et al.*, 2013). Es wurde eine Reismutante identifiziert, die einen Verlust in der komplexen *N*-Glykanmodifizierung und gleichzeitig starke phänotypische Veränderungen wie das Ausbleiben der Bestockung zeigte. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Bedeutung von GnTI in Arabidopsis und Reis wird von Fanata *et al.* (2013) diskutiert und könnte in der unterschiedlichen Abundanz verschiedener Typen von *N*-Glykosylierung liegen. Während in Reis nur sehr wenige *N*-Glykosylierungen mannosereiche Glykane sind, sind es in Arabidopsisblättern ein Viertel (Leonard *et al.*, 2004, Strasser *et al.*, 2004; Strasser *et al.*, 2006, Fanata *et al.*, 2012). Leider ist eine abschließende Bewertung des tatsächlichen Vorhandenseins dieser Unterschiede nicht möglich, da eine Rettung des Phänotyps mittels Komplementation bisher nicht möglich war.

Neben den hier beschriebenen sehr häufig vorkommenden Formen der *N*-Glykosylierung von Proteinen gibt es noch weitere Arten des Anfügens von Zuckergruppen an ein Stickstoffatom eines Proteins. Eine Sonderform in Pflanzen stellt das reversible Anfügen von Glukose an ein Arginin des Proteins AtRGPI dar, welches möglicherweise eine Rolle bei der Zellwandsynthese spielt (Delgado *et al.*, 1998). Kürzlich wurde erstmals eine *N*-Glykosylierung bestehend aus nur einem GlcNAc beschrieben, deren genaue Entstehung jedoch noch nicht endgültig geklärt ist (Kim *et al.*, 2013).

1.3.3.2 *O*-Glykosylierung

Eine andere Form der Proteinglykosylierung stellt die *O*-Glykosylierung dar. Sie unterscheidet sich von der zuvor beschriebenen *N*-Glykosylierung darin, dass das Glykan an ein Sauerstoffatom des Proteins gebunden wird. Diese Bindung kann über die Seitenkette von Serin, Threonin oder Hydroxyprolin erfolgen. Zudem unterscheidet

sie sich darin, dass das Anfügen der Glykane posttranslational und jeweils nacheinander stattfindet. Eine genaue Konsensussequenz für die Vorhersage von *O*-Glykosylierungsstellen ist bislang nicht bekannt. Eine Form der *O*-Glykosylierung findet im Cytosol und eine im Lumen des Endomembranraumes statt, entsprechend unterscheiden sich sowohl die beteiligten Enzyme als auch die als Substrat in Frage kommenden Proteine.

Mit den Genen *SPINDLY* und *SECRET AGENT* wurden zwei an der nukleären und cytosolischen *O*-Glykosylierung beteiligte *O*-Glykosyltransferasen (OGTs) in *Arabidopsis* identifiziert. Beide katalysieren die kovalente Bindung von GlcNAc an Serin- und Threoninreste von Proteinen unter Verwendung von UDP-GlcNAc (Thornton *et al.*, 1999; Hartweck *et al.*, 2002). Aus Untersuchungen bei Tieren ist bekannt, dass diese Form der *O*-GlcNAc-Modifikation das modifizierte Protein auf verschiedene Weise beeinflussen kann. Dies betrifft die Stabilität (Han and Kudlow, 1997), die Interaktion mit anderen Proteinen (Roos *et al.*, 1997) oder die Aktivität (Yang *et al.*, 2001). In der Pflanze beeinflusst der Verlust des einen oder anderen der beiden Gene eine ganze Reihe unterschiedlicher Prozesse, darunter die Gibberellinsignalverarbeitung (Jacobsen and Olszewski, 1993) sowie den circadianen Rhythmus (Sothorn *et al.*, 2002) und führt bei bestimmten Entwicklungsschritten zu einer verringerten Reaktion auf exogen appliziertes Cytokinin (Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005). Die starke gleichzeitige Reduktion beider OGT-Aktivitäten ist embryonal (Hartweck *et al.*, 2002). Im Falle der Reaktion auf Cytokinin wurden zwei Transkriptionsfaktoren ermittelt, deren Funktionsfähigkeit vom Vorhandensein der *O*-GlcNAc-Modifikation abhängt (Steiner *et al.*, 2012).

Die *O*-Glykosylierung der in Pflanzen häufig vorkommenden Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine erfolgt im Lumen des Endomembranraums. Diese Strukturproteine der Zellmembran und Zellwand lassen sich unterteilen in stark glykosylierte Arabinogalactanproteine (AGP), mittelstark glykosylierte Extensine (EXT) und leicht glykosylierte Prolin-reiche Proteine (PRP) (Showalter *et al.*, 2010). Sie haben gemeinsam, dass sie an hydroxylierten Prolinseitenketten glykosyliert sind und sich auf der Außenseite der Plasmamembran befinden, unterscheiden sich jedoch nicht nur bei der Anzahl, sondern auch bei der Form der Glykanmodifikationen. Die Voraussetzung für diese Form der Proteinglykosylierung ist die Hydroxylierung der Prolinseitenkette durch Prolyl-4-hydroxylasen im ER (Velasquez *et al.*, 2011). Diese Enzyme lokalisieren in das ER und den Golgi. Die Hyp-Kontiguitätshypothese besagt, dass die Art der

Aneinanderreihung von Hydroxyprolinen ursächlich dafür ist, ob ein Arabinogalactanglykan oder ein Homoarabinoseglykan entsteht (Shpak *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2010). Die auf AGPs vorkommenden Arabinogalactanglykane sind komplexe Zuckerbäume bestehend aus einem Galaktoserückgrat, an dem sich Seitenketten bestehend aus Arabinose, Galaktose, Glucuronsäure, Fukose und Rhamnose befinden (Tan *et al.*, 2010). Die Glykosylierung scheint bei den AGPs einen großen Anteil an der Fähigkeit zum Erfüllen der jeweiligen Proteinfunktion zu haben (van Hengel and Roberts, 2002; Velasquez *et al.*, 2011) und die AGPs scheinen unter anderen eine Rolle bei so verschiedenen Prozessen wie der Zellteilung, der Musterbildung des Pflanzenkörpers und der Polleninkompatibilität zu spielen (Seifert and Roberts, 2007). Glykosylierte Proteine der Gruppe der EXT und PRP unterscheiden sich in der Sequenz der glykosylierten Domäne, tragen jedoch beide Homoarabinoseglykane (Lampert and Miller, 1971; Kieliszewski and Lampert, 1994) und die Übergänge zwischen den einzelnen Klassen sind zum Teil fließend (Showalter *et al.*, 2010). Das Ausbleiben der Glykosylierung kann zum Verlust der Proteinfunktion durch Verlust der nativen Proteinkonformation führen (Velasquez *et al.*, 2011) und sie haben oftmals eine Funktion bei der Modifikation der Zellwand und der Zellwandneubildung (Cannon *et al.*, 2008). Eine Gruppe kleiner Peptidhormone wird ebenfalls arabinosyliert (Matsubayashi, 2011).

Eine der häufigsten Formen der *O*-Glykosylierung von tierischen Membranproteinen ist die des Mucin-Typs. Dieser Oberbegriff beinhaltet den sequentiellen Aufbau einer Zuckerkette beginnend mit dem Anfügen von GalNAc auf einer Serin- oder Threoninseitenkette und erfolgt im Lumen des Golgi (Hang and Bertozzi, 2005). Im Folgenden können verschiedene Kernstrukturen durch das Anfügen von Galaktose oder GlcNAc entstehen und diese weiter durch Fukose, Galaktose oder Sialinsäure modifiziert werden (Hanisch, 2001). Trotz Berichten über Mucin-Typ Glykane auf dem Speicherprotein Glutelin in Reis (Kishimoto *et al.*, 1999) und möglichen Hinweisen auf Mucin-Typ Glykosylierung in Proteinfractionen von Reissamen (Kilcoyne *et al.*, 2009) geht die Mehrzahl der Autoren davon aus, dass diese Form der Glykosylierung in Pflanzen nicht vorkommt (Bennett *et al.*, 2012; Castilho *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Die Analyse der Ausstattung verschiedener Organismen mit Glykosyltransferasen ergab in Pflanzen keine Kandidaten, die diese Modifikation vornehmen könnten (Hashimoto *et al.*, 2009).

Im ER von Säugetieren werden darüber hinaus Proteine durch *O*-Mannosylierung, *O*-Fucosylierung, *O*-Glukosylierung und *O*-Galaktosylierung und im Golgi durch *O*-Xylosylierung modifiziert (Bennett *et al.*, 2012). Die Bedeutung dieser Glykosylierungen wird dadurch unterstrichen, dass der Ausfall in den meisten Fällen zu Krankheit führt oder letal ist. Es gibt bislang keine Hinweise, dass eine dieser Glykosylierungen auch in Pflanzen existiert.

Auch die *C*-Mannosylierung, also das Anhängen von Mannose von einem Dolichol-Mannose Donor auf ein Kohlenstoffatom von Tryptophan über eine C-C Verbindung scheint in Pflanzen nicht vorzukommen (Jadid *et al.*, 2011).

1.3.3.2 Glypiation

Eine besondere Form der Proteinglykosylierung stellt das Anfügen eines GPI-Ankers dar, auch Glypiation genannt. Es wird angenommen, dass diese bei allen Eukaryoten sehr ähnlich abläuft, jedoch sind bisher erst einige wenige der beteiligten Proteine aus *Arabidopsis* charakterisiert worden (Lalanne *et al.*, 2004; Gillmor *et al.*, 2005), weshalb im Folgenden vor allem die Erkenntnisse aus Untersuchungen in anderen Organismen beschrieben werden (Orlean and Menon, 2007). Die Kernstruktur des GPI-Ankers besteht in Pflanzen aus Ethanolaminphosphat (EtNP), drei Mannosen, Glucosamin und Inositolphosphorylceramid (IPC) (EtNPMan₃GlcNIPC (Abb. 5A) Da bislang kein GPI als Lipidbestandteil in solch einem Anker in Pflanzen isoliert worden ist, wird stattdessen von Glykosylinositolphosphorylceramid (GIPC)-Anker gesprochen (Sperling *et al.*, 2005). In Pflanzen wurde zudem an einer Mannose eine Modifikation mit Galaktose identifiziert (Oxley and Bacic, 1999). Die Synthese erfolgt am und innerhalb des ER durch das aufeinanderfolgende Anfügen der Monosaccharide und EtNP auf das IPC (Lalanne *et al.*, 2004). Die Synthese beginnt an der cytosolischen Seite der ER-Membran mit dem Anfügen von GlcNAc auf das IPC und der nachfolgenden Deacetylierung. Es wird angenommen, dass dieses Molekül in das Lumen des ER durch die Aktivität einer Flippase gelangt und dort zur Kernstruktur des GIPC-Ankers erweitert wird. Als Substrat für das Anfügen der weiteren Zuckeranteile dient Dolichol-Mannose (Jadid *et al.*, 2011). Nach der Übertragung des GIPC-Ankers auf die Zielstelle nahe dem C-Terminus des Zielproteins wird von diesen eine sich dahinter befindliche hydrophobe C-terminale Domäne entfernt und das Protein ist über den GIPC-Anker mit

der Membran assoziiert. Die Analyse des Ausfalls von GIPC-Anker tragenden Proteinen weist auf eine Funktion dieser beim Umbau der Zellwand, Wurzelwachstum und der Interaktion mit Pathogenen hin (Gillmor *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009) und der Verlust der Glypiation ist embryonal (Gillmor *et al.*, 2005). Es wurden bei verschiedenen Organismen zum Teil sehr komplexe Seitenketten an den Zuckern des GPI-Ankers identifiziert. Ob diese auch in Pflanzen existieren, in wiefern diese eine funktionelle Rolle spielen und welche davon wo im ER und Golgi angefügt werden, ist bislang nicht bekannt (Sipos *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 2009).

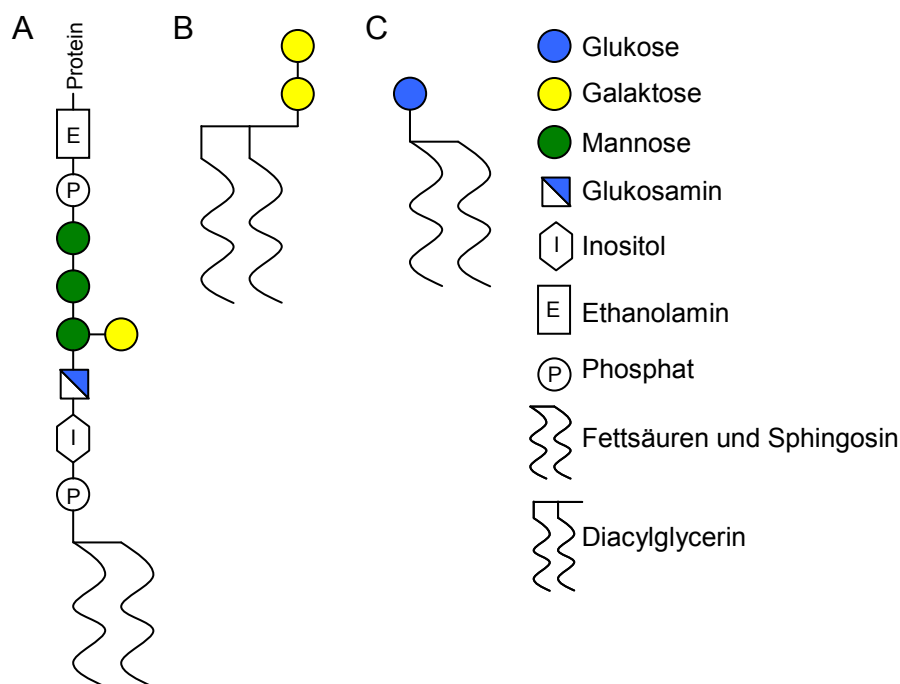


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Struktur von Glykolipiden. Beispielfhaft sind dargestellt ein Glykosylinositolphosphatidylceramid (GIPC)-Anker (A), Digalactosyldiacylglycerin (DGDG) (B) und ein Glucosylceramid aus Pflanzen (C) (nach Daten aus Oxley und Bacic, 1999; Etzler and Mohnen, 2009; Simon-Plas *et al.*, 2011)

1.3.4 Verwendung von Nukleotidzuckern bei der Lipidglykosylierung

Die Membranen der pflanzlichen Zelle bestehen aus verschiedenen Lipiden mit polaren Kopfgruppen, wobei die Zusammensetzung abhängig vom Kompartiment variiert. Ein Teil dieser polaren Lipide sind Glykolipide und für ihre Synthese werden in den meisten Fällen Nukleotidzucker verwendet.

Eine Gruppe in Pflanzen häufig vorkommender Glykolipide basiert auf Diacylglycerin, welches mit Zucker modifiziert ist. Abhängig von der Art des Zuckers unterscheidet man Monogalactosyldiacylglycerin (MGDG), welche ein Galaktosemolekül tragen,

Digalactosyldiacylglycerin (DGDG), welche zwei Galaktosemoleküle tragen (Abb. 5B) und Sulfochinovosyldiacylglycerin (SVDG), welche eine mit Sulfit modifizierte Glukose (Sulfochinovose) tragen. Diese Glykolipide stellen den größten Teil der Membranen innerhalb des Chloroplasten dar (Dörmann und Benning, 2002). Die Synthese von MGDG erfolgt zum einen an der Außenseite der inneren Hüllmembran sowie an der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten durch MGDG Synthase, welche unter Verwendung von UDP-Gal die Übertragung der Galaktose auf das Diacylglycerin synthetisiert (Kobayashi *et al.*, 2009). Im Folgenden kann DGDG durch das Anfügen von Galaktose an MGDG unter Verwendung von UDP-Gal im Chloroplasten synthetisiert werden (Kelly *et al.*, 2003). In Reis wurde gezeigt, dass eine Epimerase für die Umwandlung von UDP-Glc in UDP-Gal eine Rolle bei der Bereitstellung des Substrates spielt (Li *et al.*, 2011b). Die Synthese von SVDG erfolgt ebenfalls in den Chloroplasten. UDP-Glc wird zu UDP-Sulfochinovose umgewandelt (Shimajima und Benning, 2003), wobei das dabei verwendete UDP-Glc direkt im Chloroplasten aus Glukose-1-Phosphat synthetisiert (Okazaki *et al.*, 2009) und auf das Diacylglycerin übertragen wird (Yu *et al.*, 2002). Mutantanalysen ergaben, dass MGDG und DGDG eine wichtige Rolle bei der Thylakoidentwicklung, Photosynthese und Embryoentwicklung spielen (Kobayashi *et al.*, 2007)

Die zweite Gruppe von in Pflanzen vorkommenden Glykolipiden sind Mitglieder der strukturell vielfältigen Familie der Sphingolipide und besitzen eine Ceramidstruktur. Die Ceramide werden auf Basis der vorhandenen Kopfgruppe in die Glycosylceramide und die GIPCs (auch Phytoglycosphingolipide oder Phosphosphingolipide genannt) unterteilt (Sperling und Heinz, 2003; Berkey *et al.*, 2012). Glycosylceramide kommen vor allem auf der apoplastischen Seite der Plasmamembran vor, die Synthese erfolgt am ER unter Verwendung von UDP-Glc (Melser *et al.*, 2010). Neben dieser Kernstruktur (Abb. 5C) kommen in höheren Pflanzen auch noch mit Mannosen und Glukosen verlängerte Kernstrukturen sowie eine Kernstruktur bestehend aus Mannose und dem Ceramid vor. Die an der Synthese beteiligten Enzyme sowie die genaue Lokalisierung sind in Pflanzen nicht bekannt, in Tieren wird für die Überführung des Glycosylceramids auf die richtige Membranseite ein Flippasemechanismus diskutiert (Chalat *et al.*, 2012). Der Verlust führt zu einer veränderten Golgistruktur und verringertem Proteintransport im sekretorischen Weg. Auch die GIPCs sind vor allem in der Plasmamembran vorhanden. Während die Ceramidbasis der GIPCs mit der des GIPC-Ankers identisch ist, unterscheiden sie sich sehr in der Anzahl und Art der

möglichen Zuckermodifikation aus Glukuronsäure und Glukosamin, *N*-Acetylglukosamin oder Mannose (Sperling *et al.*, 2004). An der Synthese beteiligte Enzyme wurden bislang nicht identifiziert, da jedoch die Vorstufe IPC überraschenderweise am Golgi synthetisiert wird (Wang *et al.*, 2008), findet möglicherweise auch die GIPC-Synthese dort statt. Das Mengenverhältnis der einzelnen Sphingolipide scheint ein Signal für die Einleitung des programmierten Zelltods im Rahmen der Pathogenabwehr zu sein (Berkey *et al.*, 2012).

Eine dritte Gruppe an Glykolipiden sind Sterylglykoside, welche aus einem Sterolmolekül verbunden mit Zuckergruppen bestehen. Sie kommen in allen Membranen der Zelle vor, ihr Anteil ist insgesamt jedoch nur gering (Grille *et al.*, 2010). Der Zuckeranteil kann ein oder mehrere Molekülen Glukose, Galaktose, Glukuronsäure, Rhamnose, Ribose oder Xylose sein. Die Synthese erfolgt durch Sterolglykosyltransferasen, welche ein Nukleotidzucker auf ein Sterol übertragen. Die subzelluläre Lokalisation dieser Enzyme ist nicht abschließend geklärt, es scheint sowohl membranassoziierte Formen als auch cytosolische zu geben, wobei die Sterolglykosylierung bei Pflanzen wohl im Cytosol stattfindet (Grille *et al.*, 2010; Chaturvedi *et al.*, 2011). Die Analyse von Sterolglykosyltransferasemutanten in *Arabidopsis* deutet auf eine Bedeutung bei der Bildung der Wachsschicht in der Samenentwicklung hin (DeBolt *et al.*, 2009).

Zudem scheint *Arabidopsis* geringe Mengen einer Vorstufe des bakteriellen Lipid A bestehend aus einem GlcNAc Molekül, das zwei Fettsäuren trägt, in den Mitochondrien zu synthetisieren. Diese Vorstufe kommt in den Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten vor (Li *et al.*, 2011a). Der Ursprung des verwendeten Zuckeranteils ist nicht bekannt.

1.4 Eigenschaften von und Bedarf an Nukleotidzuckertransportern in Pflanzen

Das bereits funktional charakterisierte Protein mit der größten Sequenzähnlichkeit zu ROCK1 ist ein Nukleotidzuckertransporter des Menschen. Nukleotidzuckertransporter (*nucleotide sugar transporter*, NST) sind hydrophobe Typ III Membranproteine mit sechs bis zehn vorhergesagten Transmembrandomänen, die den Membrantransport von Nukleotidzuckern zwischen dem Cytosol und dem Lumen von ER und Golgi vermitteln. N- und C-Terminus reichen in das Cytosol (Handford *et al.*, 2006). Im Lumen von ER und Golgi dienen die Nukleotidzucker dann als Substrat für

Glykosyltransferasen bei den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Prozessen. In dem folgenden Kapitel soll zum einen die Proteinfamilie der Nukleotidzuckertransporter beschrieben, zum anderen jedoch auch auf Grundlage der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Verwendungen von Nukleotidzuckern in der Pflanze der momentan bekannte Bedarf an Transportaktivitäten dargestellt werden.

Ein früher Versuch, Transportproteine auf Grund ihrer Sequenzen zu ordnen, sortierte NSTs in die sehr große Superfamilie der *drug/metabolite transporter*, die sowohl Transportproteine aus Bakterien als auch aus Eukaryoten umfasst, ein (Jack *et al.*, 2001). Auf Grund verschiedener gemeinsamer Eigenschaften, wurden NSTs und die Triose-Phosphat-Translokator (TPT) Proteine, die in Chloroplasten an dem Export von Photosyntheseprodukten beteiligt sind (Martinez-Duncker *et al.*, 2003), zur NST/TPT Familie zusammengefasst (Ward, 2001; Knappe *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2006). In Tieren wird diese Familie als *solute carrier* Familie 35 (SLC35) bezeichnet (Ishida und Kawakita, 2004). Eine Hypothese besagt, dass diese Transporter mit zehn Transmembrandomänen aus bakteriellen Transportern mit fünf Transmembrandomänen durch Verdopplung hervorgegangen sind (Jack *et al.*, 2001). Je nach Zählweise werden im Menschen bis zu 23, in *Drosophila melanogaster* 8, in *C. elegans* 18 und in Arabidopsis mehr als 40 Proteine zu den NSTs gezählt (Goda *et al.*, 2006; Rollwitz *et al.*, 2006; He *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Es zeigte sich, dass die durch die phylogenetische Analyse begründeten Subfamilien innerhalb der NST/TPT Proteine zum Teil Proteine aus verschiedenen Organismen und zum Teil nahverwandte Proteine aus demselben Organismus enthalten. In beiden Fällen jedoch sind die meisten der identifizierten Subfamilien heterogen bezüglich des transportierten Substrates (Bakker *et al.*, 2005; Handford *et al.*, 2006; Reyes und Orellana, 2008), weshalb eine Vorhersage der Funktion meistens nicht erfolgreich ist. So transportiert ein ursprüngliche auf Grund von Sequenzähnlichkeiten den TPTs zugeordnetes Protein einen Nukleotidzucker (Rollwitz *et al.*, 2006) und identifizierte UDP-GlcNAc Transporter aus Säugetieren und Hefe zeigen weniger Sequenzidentität als NSTs aus Säugetieren mit unterschiedlichen Substraten untereinander (Freeze und Elbein, 2009). Eine Ausnahme bildet die Gruppe der GDP-Man Transporter, für die ein GDP-Bindemotiv isoliert worden ist (Baldwin *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2001).

NSTs sind Antiporter, der Transport erfolgt gegen ein Konzentrationsgefälle, ist temperaturabhängig und saturierbar (Berninsone und Hirschberg, 2000). Die ersten biochemischen Charakterisierungen des Transportes von Nukleotidzuckern führten zu

dem Schluss, dass der Transport des Nukleotidzuckers im Austausch gegen das korrespondierende Nucleosidmonophosphat erfolgt (Capasso und Hirschberg, 1984b). Inzwischen sind jedoch auch NSTs beschrieben worden, die den Nucleotidzucker gegen das Nucleosidiphosphat oder gegen einen anderen Nucleotidzucker austauschen (Muraoka *et al.*, 2007). Neben NSTs, die nur einen spezifischen Nucleotidzucker als Substrat akzeptieren (Berninsone *et al.*, 1997; Norambuena *et al.*, 2005), existieren auch solche, die zwei oder mehr verschiedene Nucleotidzucker transportieren (Hong *et al.*, 2000; Berninsone *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2001; Muraoka *et al.*, 2001; Selva *et al.*, 2001; Norambuena *et al.*, 2002; Ashikov *et al.*, 2005; Handford *et al.*, 2012). Zudem können Nucleotidzucker mit unterschiedlicher Nucleotidbase Substrat desselben Transporters sein (Liu *et al.*, 2013). Da bei anderen NSTs der Transport des entsprechenden Nucleotidzuckers durch freie Nucleosiddi- und -monophosphate gehemmt wird (Capasso und Hirschberg, 1984a), deutet dies darauf hin, dass bei diesen der Nucleotidanteil die Bindung des Nucleotidzuckers vermittelt (Handford *et al.*, 2006). Bei wiederum anderen NSTs wird von dem Zuckeranteil bestimmt, ob der Nucleotidzucker dann auch tatsächlich transportiert wird (Capasso und Hirschberg, 1984a; Chiamonte *et al.*, 2001). Bei zwei NSTs des Menschen mit hoher Sequenzähnlichkeit, aber Transportaktivität für Nucleotidzucker mit unterschiedlichen Nucleotidbasen, konnten die für die Bindung verantwortlichen Domänen identifiziert werden. Diese befinden sich in unterschiedlichen Transmembrandomänen und es konnte ein chimärer Transporter geschaffen werden, der beide Substrate transportiert (Aoki *et al.*, 2001; Takeshima-Futagami *et al.*, 2012). Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass den NSTs zugeordnete Proteine andere Substrate transportieren. Für das im ER lokalisierte Protein HUT1 von *C. elegans* mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit zu identifizierten Nucleotidzuckertransportern wurde keiner der kanonischen Nucleotidzucker als Substrat identifiziert (Dejima *et al.*, 2009). Der Ausfall des Proteins führt zu ER Stress. Die Autoren spekulieren über eine mögliche Funktion dieses Proteins bei der Bereitstellung von Komponenten für die Lipidmodifikation im ER. Desweiteren transportieren sowohl im Menschen als auch in *D. melanogaster* und *C. elegans* vermeintliche NSTs das Substrat für die Sulfatierung, 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), in das Lumen des Golgi (Kamiyama *et al.*, 2003; Bhattacharya *et al.*, 2009). Auch in Pflanzen besteht Bedarf für solch eine Aktivität (Komori *et al.*, 2009), ein PAPS-Transporter über die Golgimembran wurde bislang jedoch noch nicht identifiziert.

In den bisher darauf untersuchten Fällen bilden NSTs Homo- und Heterodimere (Puglielli und Hirschberg, 1999; Puglielli *et al.*, 1999; Gao und Dean, 2000; Maszczak-Seneczko *et al.*, 2011), wobei die Fähigkeit zur Dimerbildung zum einen die Aktivität zum anderen die subzelluläre Lokalisation beeinflussen kann (Gao und Dean, 2000; Maszczak-Seneczko *et al.*, 2011). In einem Fall wurde die Bildung eines Hexamers beschrieben (Hong *et al.*, 2000). Untersuchungen zur genauen Bestimmung der Rolle einzelner Domänen bei der Dimerbildung offenbarten bisher keine verallgemeinerbaren Mechanismen (Aoki *et al.*, 1999; Gao und Dean, 2000). Bislang ist auf Grund der Schwierigkeit, solch hydrophobe Proteine zu kristallisieren, keine Kristallstruktur eines NSTs bekannt.

In Arabidopsis wurden inzwischen für 13 Proteine aus der Familie der NSTs durch genetische und/oder biochemische Methoden gezeigt, dass diese tatsächlich Nukleotidzucker transportieren (Baldwin *et al.*, 2001; Norambuena *et al.*, 2002; Handford *et al.*, 2004; Bakker *et al.*, 2005; Norambuena *et al.*, 2005; Rollwitz *et al.*, 2006; Bakker *et al.*, 2008; Takashima *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2010; Handford *et al.*, 2012). Diese lokalisieren in den meisten Fällen in den Golgi, manchmal in ER und Golgi und in einem Fall nur ins ER. Eine genaue Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt.

Für die wenigsten NSTs konnte bislang eine genaue physiologische Funktion *in planta* zugeordnet werden. Ein Grund hierfür ist möglicherweise, dass die bislang in Arabidopsis charakterisierten NSTs eine hohe funktionale Redundanz zeigen. Für sechs der bislang identifizierten NSTs wurde eine UDP-Gal Transportaktivität beschrieben und der Verlust einzelner Gene aus dieser Gruppe hat nur im Fall von *AtUTr7* unter bestimmten Bedingungen phänotypische Konsequenzen (Handford *et al.*, 2012). Zudem wurden fünf Transporter für GDP-Man identifiziert, für die jedoch keine Informationen über den Phänotyp publiziert worden sind. Für zwei NSTs scheint eine physiologische Funktion aufgeklärt zu sein. Die Doppelmutante *atutr1 atutr3* ist pollenletal und diese beiden NSTs sind vermutlich für die Bereitstellung von UDP-Glc im ER für die Reglukosylierung im Rahmen der Qualitätskontrolle der Proteinfaltung verantwortlich (Reyes *et al.*, 2010).

Auch in Reis wurden bislang einige NSTs identifiziert. Der Ansatz, auf Grundlage von Sequenzähnlichkeit zu in Arabidopsis beschriebenen UDP-Gal Transportern homologe Gene in Reis zu suchen, führte zur Identifizierung von drei UDP-Gal und einem UDP-Glc Transporter (Seino *et al.*, 2010). Ein weiterer UDP-Glc Transporter wurde in einem vorwärtsgenetischen Screen als *brittle culm 14* identifiziert. Der Ausfall dieses Golgi-

lokalisierten *OsNST1* führt in Reispflanzen zu leichter brechenden Blättern, wahrscheinlich auf Grund von dünneren Zellwänden und einer veränderten Zusammensetzung der sekundären Zellwand, einem allgemein verringertem Wuchs und einer geringeren Fertilität (Zhang *et al.*, 2011a). Eine detaillierte Analyse der Zellwandbestandteile ergab weiterhin, dass es neben der erwarteten Reduzierung an Xyloglukanen zudem zu einer unerwarteten Verringerung der Arabinogalaktanproteine und einer ungeordneten Anordnung der Cellulosefibrillen kommt (Song *et al.*, 2011).

Tabelle 1. Funktionell charakterisierte Mitglieder der Familie der Nukleotidzuckertransporter aus Arabidopsis.

| Name | Atg-Nummer | Transportiertes Substrat | Subzelluläre Lokalisation | <i>knock out</i> Phänotyp | Referenz |
|--------------------|------------|--------------------------|---------------------------|---|---|
| <i>GONST1</i> | At2g13650 | GDP-Man | Golgi | - | Baldwin <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>GONST2</i> | At1g07290 | GDP-Man | n.d. | - | Handford <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>GONST3</i> | At1g76340 | GDP-Man ¹ | n.d. | - | Handford <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>GONST4</i> | At5g19980 | GDP-Man ¹ | Golgi | - | Handford <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>GONST5</i> | At1g21870 | GDP-Man ¹ | Golgi | - | Handford <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>AtUTr1</i> | At2g02810 | UDP-Glc UDP-Gal | ER | <i>atutr1 atutr3</i> Doppelmutante ist pollenletal | Norambuena <i>et al.</i> , 2002; Reyes <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>AtUTr2</i> | At4g23010 | UDP-Gal | ER/Golgi | - | Norambuena <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>AtUTr3</i> | At1g14360 | UDP-Glc | ER/Golgi | <i>atutr1 atutr3</i> Doppelmutante ist pollenletal | Reyes <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>AtUTr7</i> | At4g31600 | UDP-Gal UDP-Glc | Golgi | Verstärkte Bildung von Seitenwurzeln bei 2% Saccharose im Medium | Handford <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>AtNST-KT1</i> | At4g39390 | UDP-Gal | Golgi | n.d. | Rollwitz <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>AtUDP-GalT1</i> | At1g77610 | UDP-Gal | Golgi | - | Bakker <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>AtUDP-GalT2</i> | At1g76670 | UDP-Gal | Golgi | n.d. | Bakker <i>et al.</i> , 2005; Rollwitz <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>CSTLP1</i> | At5g41760 | CMP-Sia ² | - | letal | Bakker <i>et al.</i> , 2008; Takashima <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>CSTLP2</i> | At4g35335 | - | - | letal | Takashima <i>et al.</i> , 2009 |

n.d. nicht detektiert, obwohl untersucht

¹Substrat wird nur mit geringer Aktivität transportiert

²die Autoren der Publikation halten es für wahrscheinlicher, dass das native Substrat CMP-Kdo ist

Die Konsequenzen der starken Überexpression eines pflanzlichen NSTs in Pflanzen sind nicht bekannt. Im Rahmen der versuchten Etablierung einer menschlichen Glykosylierungsmaschinerie in Pflanzen wurden ein UDP-GlcNAc/GalNAc Transporter aus *C. elegans* und ein CMP-Sia Transporter aus Maus sowohl transient in Tabak, als auch stabil in *Arabidopsis* exprimiert, ohne dass phänotypische Konsequenzen beobachtet wurden sind (Castilho *et al.*, 2010; Daskalova *et al.*, 2010; Castilho *et al.*, 2012).

Neben diesen auf Basis der Sequenzähnlichkeit den NSTs zugeordneten Proteinen existieren noch weitere Transporter mit Nukleotidzuckern als Substrat. In verschiedenen Getreiden wurde ein Transportprotein für den Nukleotidzucker ADP-Glc identifiziert, das der Familie der *mitochondrial carrier* angehört (Kirchberger *et al.*, 2007). Der nächstverwandte Transporter Brittle1 aus *Arabidopsis* transportiert Adennukleotide (Kirchberger *et al.*, 2008). Und lokalisiert in der inneren Chloroplastenhüllmembran und in Mitochondrien (Bahaji *et al.*, 2011). Ein weiterer Transporter für einen Nukleotidzucker in Pflanzen, der nicht aus der Familie der NSTs stammt, ist der ABC Transporter STAR1/2 aus Reis. Dieser transportiert UDP-Glc und ist an der Detoxifizierung von Aluminium beteiligt (Huang *et al.*, 2009).

Die bisher in *Arabidopsis* und Reis charakterisierten NSTs transportieren GDP-Man, UDP-Gal oder UDP-Glc. Wie in den vorherigen Kapiteln vorgestellt, besteht für die *N*-Glykosylierung von Proteinen ein sicherer Bedarf an UDP-GlcNAc, UDP-Xyl, GDP-Fuc und UDP-Gal im Golgi, sowie für die Proteinfaltungskontrolle von UDP-Glc im ER. Für die *O*-Glykosylierung an Hydroxyprolin werden UDP-Gal, UDP-Ara, UDP-GlcA, GDP-Fuc und UDP-Rha benötigt, so fern die beteiligten Glykosyltransferasen nicht Dolichol-Verbindungen als Substrat verwenden. Der genaue Ort des Bedarfs ist nicht geklärt, da aber die benötigte Hydroxlierung von Prolin bereits im ER geschieht, könnte dort auch bereits ein Bedarf an diesen Nukleotidzuckern bestehen, falls die entsprechenden Glykosyltransferasen dort lokalisiert sind. Gleiches gilt für die Synthese von Glykosylceramiden und GIPCs. Sollten diese im Lumen des sekretorischen Systems glykosyliert werden, besteht weiterhin ein Bedarf an GDP-Man, UDP-Glc, UDP-GlcA, UDP-GlcNAc in ER oder Golgi. Hemicellulosen und Pektine wiederum benötigen mit Ausnahme von UDP-Glc, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc neben den bereits oben aufgeführten Nukleotidzuckern noch UDP-GalA, CMP-Kdo, GDP-Gal, UDP-Api, die Furanoseform von UDP-Ara sowie die bislang unbekannt aktivierten Formen von Dha und Acerinsäure (Bar-Peled *et al.*, 2012). Es wird nicht für alle diese

Nukleotidzucker eine Transportaktivität benötigt, denn zumindest die sequentielle Umwandlung von UDP-Araf, UDP-GlcA und UDP-GalA aus UDP-Xyl ist im Lumen des sekretorischen Systems möglich (Abb. 6).

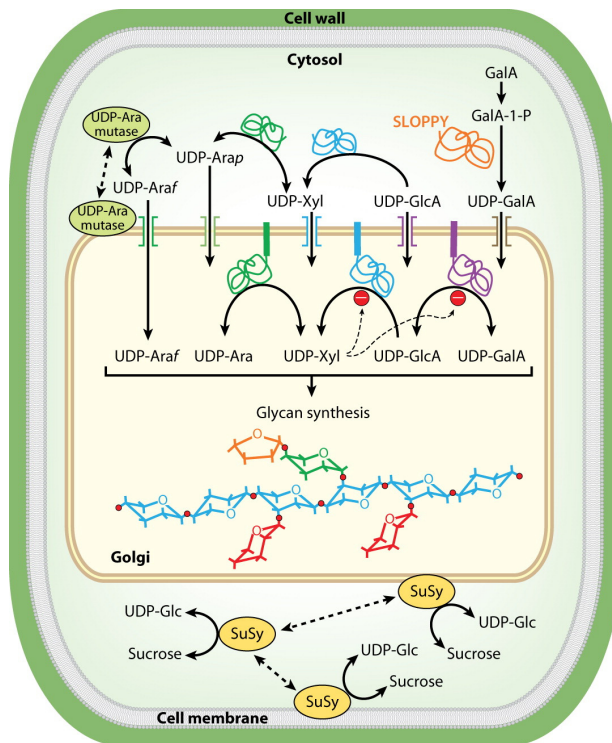


Abbildung 6. Darstellung der subzellulären Lokalisation eines Teils der bekannten Umwandlungsprozesse von Nucleotidzuckern innerhalb der Pflanzenzelle (aus Bar-Peled und O'Neill, 2011). Die Darstellung betont, dass Enzyme, die die Umwandlung von UDP-GlcA in UDP-Xyl und UDP-Ara katalysieren, sowohl innerhalb des Golgilumens als auch im Cytosol vorkommen.

Der Vergleich der drei bekannten Aktivitäten mit den mutmaßlich benötigten zeigt vor allem im Golgi einen großen theoretischen Bedarf an weiteren Transportern für Nucleotidzucker. Für UDP-Xyl, UDP-GlcA und GDP-Fuc wurde solch eine Aufnahmeaktivität in aus Pflanzen isolierten Vesikeln des sekretorischen Systems gezeigt (Hayashi *et al.*, 1988; Wulff *et al.*, 2000), ohne dass hierfür Transporter bekannt sind. Des Weiteren wurden bei dem Versuch, eine menschliche Proteinglykosylierungsmaschinerie in Pflanzen zu etablieren, festgestellt, dass eine Transportaktivität für UDP-GalNAc in Pflanzen existiert, obwohl kein Bedarf dafür bislang bekannt ist (Castilho *et al.*, 2012).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Gen *ROCK1* war in einem genetischen Screen als positiver Regulator der Cytokinindefizienz in Arabidopsis isoliert worden. Eine erste Analyse des Gens im Rahmen meiner Diplomarbeit weist auf eine Beteiligung von *ROCK1* bei der Regulation der CKX1-Aktivität hin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Gen *ROCK1* und das dadurch kodierte Protein grundlegend zu beschreiben. Ein besonderer Schwerpunkt war dabei, die Rolle von ROCK1 im Rahmen der Etablierung des Cytokinindefizienzsyndroms zu verstehen. Um Hinweise darauf zu erhalten, sollten neben der Bestimmung der Expressionsdomänen und der detaillierten Analyse der subzellulären Lokalisation folgende Fragestellungen verfolgt werden:

1. Der Verlust von *ROCK1* führt zu einer verringerten CKX1 Aktivität, jedoch nur einer geringen Zunahme des Cytokiningehaltes in den Suppressorlinien. Ist dies ausreichend für die phänotypische Reversion? Welche Konsequenzen hat der Ausfall von *ROCK1* auf Cytokinindefizienzphänotypen, die auf andere Weise zustande kommen?
2. Die Überexpression von *ROCK1* in Arabidopsis hat phänotypische Konsequenzen. Wie genau sieht dieser Phänotyp aus und kommt er auf Grund eines veränderten Cytokininstatus zustande?
3. Läßt sich mittels Messung der Transportaktivität von ROCK1 ein bekannter Nukleotidzucker als mögliches Substrat ausmachen? Kann durch Komplementation der *ROCK1* Mutante mit einem bekannten Transporter für diesen Nukleotidzucker gezeigt werden, dass diese fehlende Aktivität auch *in planta* ursächlich für die Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms ist?
4. Die Aktivität von CKX1 wird durch den Verlust von *ROCK1* verringert. Da keine Antikörper gegen CKX1 existieren, können die direkten Auswirkungen des *ROCK1* Verlusts auf das CKX1 Protein nicht in den bestehenden Linien untersucht werden. Ist es möglich, Arabidopsislinien zu etablieren, die das Cytokinindefizienzsyndrom auf Grund der Überexpression einer Fusion aus CKX1 und dem myc-Peptid zeigen? Liefert die direkte Analyse des CKX1 Proteins Hinweise auf eine Veränderung am CKX1 Protein?
5. Um den genetischen Kontext von *ROCK1* zu verstehen und weitere Komponenten des von *ROCK* vermittelten Prozesses zu identifizieren, wurde ein vorwärtsgenetischer EMS-Mutagenescreen durchgeführt. Ziel war es, Gene zu identifizieren, deren Mutation den Ausfall von *ROCK1* revertieren.

2. Material und Methoden

Viele der verwendeten Methoden wurden wie zuvor in meiner Diplomarbeit beschrieben durchgeführt (Niemann, 2008). Aus diesem Grund wurden auch Teile der Beschreibung dem Text meiner Diplomarbeit entnommen, ohne dass jeder Einzelfall gesondert gekennzeichnet wurde.

Die verwendeten Standardchemikalien stammen von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), die Chemikalien für Kultivierungsmedien von Becton, Dickinson und Company (Sparks, USA) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) und die Enzyme für molekularbiologische Arbeiten, wenn nicht anders angegeben, von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Verwendete Mikroorganismen.

| Organismus | Stamm | Genotyp | Referenz |
|----------------------------------|---------------|---|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | F- <i>endA1 hsdRJ7</i> (r_k^- , m_k^+) <i>supE44 thi-J</i> λ <i>recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)-U169 Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 | Grant <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>E. coli</i> | DH10B | F- <i>araDJ39</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 galU galK rpsL deoR</i> Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 nupG recA1 mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) | Grant <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>E. coli</i> | DB3.1 | F- <i>gyrA462 endA1 glnV44</i> Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r_B^- , m_B^-) <i>ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (<i>Sm</i> ^r) <i>xyl5</i> Δ <i>leu mtl1</i> | Bernard und Couturier, 1992 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | GV3101:pMP90 | Rif ^R , Gent ^R | Koncz und Schell, 1986 |
| <i>A. tumefaciens</i> | C58C1 (pCH32) | Rif ^R , Tet ^R | Voinnet <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 23344C | Mat α , <i>ura3</i> | Marini <i>et al.</i> , 1997 |

2.1.2 Pflanzenlinien

Sofern es nicht anders ausdrücklich erwähnt wird, handelt es sich bei den *Arabidopsis thaliana* Pflanzen um den Ökotyp Col-0.

Die als *35S:CKX1* bezeichnete Linie entspricht der mit Linie *35S:CKX1-11* aus Werner *et al.* (2003). Die als *rock1 35S:CKX1* bezeichnete Linie entspricht der mittels EMS Mutagenese erzeugten homozygoten M2 Linie #120 (Bartrina, 2006). Die als *rock1-2* bezeichnete Linie ist die vom Salk-Institut erzeugte T-DNA Insertionslinie SALK_001259 (Alonso *et al.* 2003), welche zuvor als *rock1-S1* beschrieben worden war (Niemann, 2008). Die als *rock1-3* bezeichnete Linie ist die im Rahmen des GABI-KAT Projektes erzeugte T-DNA Insertionslinie 901C01 (Rosso *et al.*, 2003). Die Linie *ARR5:uidA* entspricht der Linie *pIB1.6-TC-GUS* im Ökotyp Wassilewskija (D'Agostino *et al.*, 2000). Die als *35S:CKX2* bzw. *35S:CKX3* bezeichneten Linien entsprechen den Linien *35S:CKX2-9* bzw. *35S:CKX3-9* aus Werner *et al.* (2003). Die mit *35S:CKX7-GFP* bezeichnete Linie ist die Linie *35S:CKX7-GFP-26* (Köllmer, 2009).

Die Linien *ahk2 ahk3* und *ahk2 ahk3 cre1* sind die Linien *ahk2-5 ahk3-7* sowie *ahk2-5 ahk3-7 cre1-2* (Riefler *et al.*, 2006). Die Linie *ipt1 3 5 7* ist die Linie *atipt1 atipt3-2 atipt5-2* und *atipt7-1* (Miyawaki *et al.*, 2006). Die als *rock2* bzw. *rock3* bezeichneten Linien entsprechen der mittels EMS Mutagenese erzeugten Linie #205 bzw. #608 (Bartrina, 2006), aus denen das *35S:CKX1* Transgen durch H. Jensen rausgekreuzt wurden ist (Jensen, 2013). Die Linie *cgll-2* wurde zuvor auch als *cgll C6* beschrieben (Frank *et al.*, 2008).

Die für die transiente Expression verwendeten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen waren Wildtyppflanzen.

2.2 Plasmide

Die bei den Klonierungen in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Bei Klonierungen verwendete Ausgangsplasmide.

| Bezeichnung | Selektionsmarker in Bakterien | Selektionsmarker in Pflanzen | Referenz |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| pCB302 | Kan ^R | Basta ^R | Xiang <i>et al.</i> , 1999 |
| pCB308 | Kan ^R | Basta ^R | Xiang <i>et al.</i> , 1999 |
| pDONR221 | Kan ^R | - | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| pDONR222 | Kan ^R | - | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| pB7FWG2 | Spec ^R | Basta ^R | Karimi <i>et al.</i> , 2002 |
| pK7WGF2 | Spec ^R | Kan ^R | Karimi <i>et al.</i> , 2002 |
| pB7WGFUBQ102 | Spec ^R | Basta ^R | Tianqi Guo |
| pGWB17 | Kan ^R , Hyg ^R | Kan ^R , Hyg ^R | Nakagawa <i>et al.</i> , 2007 |
| pGWB18 | Kan ^R , Hyg ^R | Kan ^R , Hyg ^R | Nakagawa <i>et al.</i> , 2007 |
| pYEScupFLAGK | Amp ^R | - | Ashikov <i>et al.</i> , 2005 |

2.3 Kultivierung und Selektion von Mikroorganismen

Die Kultivierung von *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* erfolgte standardmäßig auf LB-Medium (25 g/l LB Fertigmedium bestehend aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl) (Bertani, 1951) bei 37°C bzw. 28°C. Für die Kultivierung auf Festmedium in Petrischalen (=Platten) wurden 15 g/l Agar hinzugegeben. Für die Selektion auf das Vorhandensein von Resistenzen wurden die Antibiotika entsprechend Tabelle 4 hinzugefügt.

Tabelle 4. Antibiotikakonzentration für die Selektion von Bakterien.

| Antibiotikum | Konzentration im Medium (µg/ml) |
|---------------|------------------------------------|
| Ampicillin | 100 |
| Kanamycin | 50 |
| Gentamycin | 25 |
| Rifampicin | 50 |
| Spectinomycin | 100 |
| Streptomycin | 50 |
| Hygromycin | 50 |

Die Kultivierung von Hefe für die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte auf YPD-Festmedium (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glukose, 15 g/l Agar) (Sherman, 1991) bei 30°C.

2.4 Kultivierung, Selektion und Analyse von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Die Kultivierung von *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte standardmäßig im Gewächshaus auf Erde oder im Kulturraum *in vitro* unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, acht Stunden Dunkelheit). Die *in vitro* Kultivierung erfolgte auf ½ MS-Festmedium (2,15 g/l MS-Salze, 0,5 g/l 2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure (MES) pH 5,7) (Murashige und Skoog, 1962) mit 10 g/l Saccharose und 7 g/l Agar. Für die Kultivierung auf hochkant stehenden Platten wurden 12 g/l Agar zu dem Medium gegeben. Für die *in vitro* Selektion wurden Herbizide bzw. Antibiotika entsprechend Tabelle 5 hinzugefügt. Die Selektion auf Phosphinotricin/BASTA-Resistenz auf Erde erfolgte durch wiederholtes Sprühen der Keimlinge mit 0,1 %iger BASTA-Lösung.

Tabelle 5. Herbizid- bzw. Antibiotikakonzentrationen für die Selektion von Arabidopsispflanzen.

| Herbizid/Antibiotikum | Konzentration im Medium in µg/ml |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Hygromycin | 15 |
| Phosphinotricin | 12 |
| Kanamycin | 50 |

Die Sterilisierung der Arabidopsisamen für die *in vitro* Kultivierung erfolgte durch Schütteln der Samen in 70 % Ethanol mit 0,1 % Triton X-100 für zehn Minuten, anschließend zweimaligen Waschen in 70 % Ethanol und Trocknung auf sterilem Filterpapier.

Die quantitative Erfassung des Wurzelphänotyps erfolgte auf Hochkantplatten. Für den Vergleich der Sensitivität des Wurzelwachstums gegenüber Cytokinin waren zum Medium jeweils gleiche Volumina entsprechend konzentriertem Cytokinins in DMSO bzw. für die Nullkontrolle nur DMSO hinzugegeben worden. Die Endkonzentration an DMSO war nie größer als 0,01 %. Die Länge der Hauptwurzel wurde zum angegebenen Zeitpunkt markiert und beim Ende der Messung die Pflanzen photographiert. Die Auswertung der Elongation der Hauptwurzel erfolgte mit Hilfe des Programms *Scion Image*. Die Bestimmung der Anzahl an gebildeten Seitenwurzeln durch Zählen aller Seitenwurzeln, die bereits die Epidermis durchbrochen hatten, unter dem Binokular.

2.5 Kreuzung von Arabidopsispflanzen

Kreuzungen von Arabidopsispflanzen wurden durchgeführt, indem bei der Mutterpflanze in Blüten mit noch geschlossenen Pollensäcken diese entfernt wurden und die Narbe mit Pollen von geöffneten Staubblättern des Kreuzungspartners bestäubt wurde (Niemann, 2008).

2.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.6.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979) modifiziert nach dem Qiagen Plasmid Purification Handbook. Kurz zusammengefasst beinhaltete dies das Pelletieren von über Nacht in

Flüssigkultur gewachsener *E. coli* Zellen, das anschließende Resuspendieren der Zellen in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A), das Aufbrechen der Zellen durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) und das Neutralisieren und Ausfällen von Proteinen und genomischer DNA mit Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5). Nach Abzentrifugieren wurden die Plasmide im Überstand durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt, pelletiert, das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und im Anschluss getrocknet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in bidestilliertem Wasser gelöst.

Das Prinzip der Gewinnung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* war dasselbe. Als zusätzlicher Schritt für das erfolgreiche Aufbrechen der Bakterien wurden die pelletierten Zellen zunächst in 10x TE pH 8 mit 150 mM NaCl₂ resuspendiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert um Zuckerketten von der Zellwand zu lösen. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert, in 250 µl P1 aufgenommen und die Zellwände durch Inkubation für 15 Minuten mit 18 µl Lysozym (50 mg/ml) bei 37°C aufgebrochen. Im Anschluss folgte das oben beschriebene Aufbrechen der Zellen und Trennen der Zellbestandteile. Der Plasmid-haltige Überstand wurde zusätzlich mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt, die Phasen durch Zentrifugieren getrennt und die sich in der oberen wässrigen Phase befindlichen Plasmide wie zuvor beschrieben mit Isopropanol gefällt und weiterbehandelt.

2.6.2 Extraktion von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolation von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* für die Klonierung des Gens *Yea4p* basiert auf dem Aufbrechen der Zellen durch Chloroform und Isoamylalkohol (Ruiz-Barba *et al.*, 2005). Eine auf Festmedium gewachsene Hefekolonie wurde in 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben. Die Mischung wurde 5 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei 4°C mit 16000 g zentrifugiert. Die in der oberen wässrigen Phase angereicherte genomische DNA wurde abgenommen.

2.6.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung erfolgte entweder auf Basis der optischen Dichte bei 260 nm mit dem NanoDrop Spektrophotometer

(ThermoScientific, Wilmington, USA) oder durch visuellen Vergleich mit einem quantitativen Standard nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid (siehe 2.6.7)

2.6.4 Restriktionsverdau von DNA

Um vorhandene DNA-Moleküle zu analysieren oder um DNA-Fragmente zu Ligieren, wurden DNA-Moleküle mit Endonukleasen sequenzspezifisch geschnitten. 10 bis 100 ng DNA wurden mit 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U/ml), bidestiliertem Wasser und der entsprechenden Menge an kompatibelem 10x Reaktionspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt. Der Ansatz wurde bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur des Restriktionsenzym für mindestens eine Stunde inkubiert.

Bestand Bedarf für die Inaktivierung der Restriktionsenzyme wegen beispielsweise einer anschließenden Ligation des DA-Moleküls wurde das Enzym entsprechend der Herstellerangaben durch Hitze deaktiviert.

2.6.5 Dephosphorylierung von DNA Molekülen

Um die ungewollte Selbstligation eines DNA-Moleküls zu vermeiden, wurde eines der zu ligierenden DNA-Moleküle dephosphoryliert. Das enzymatische Abspalten der 5'-Phosphatgruppe erfolgte durch Inkubation der DNA direkt in dem Restriktionsverdauansatz mit 2 µl *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) (1 u/µl) für 15 Minuten bei 50°C. Das CIAP Enzym wurde im Anschluss für 15 Minuten bei 65°C deaktiviert.

2.6.6 Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Sowohl für den Nachweis als auch für die Klonierung wurden DNA-Abschnitte mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Für den Nachweis von DNA-Abschnitten erfolgte die Amplifikation mit der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) und für Klonierungen mit der DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*).

Die Zusammensetzung der typischen Reaktionsansätze ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. Typische Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Reaktionsansatzes.

| | Taq-PCR | Pfu-PCR |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| Template-DNA | 0,1 – 500 ng | 0,1 – 500 ng |
| 10x Puffer | 1x | 1x |
| Polymerase | 2,5 <i>units</i> | 2,5 <i>units</i> |
| dNTPs | jedes dNTP 200 µM | jedes dNTP 200 µM |
| Vorwärtsprimer | 1,5 µM | 0,375 µM |
| Rückwärtsprimer | 1,5 µM | 0,375 µM |

Der 10x *Taq* Puffer bestand aus 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % Tween-20 und 15 mM MgCl₂ und der 10x *Pfu* Puffer aus 200 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml Nuklease-freies BSA, 1 % Triton X-100.

Der Temperaturverlauf, die Dauer und Anzahl der Wiederholungen der einzelnen Schritte wurde beim jeweiligen PCR-Ansatz den Ansprüchen an Länge des Amplikons und Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer angepasst. Die grundlegenden Schritte sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7. Temperatur, Dauer und Abfolge der einzelnen Schritte einer PCR.

| Schritt | Funktion | Temperatur | Dauer |
|--|---------------------------------|-------------------|---|
| 1 | initialer Denaturierungsschritt | 95°C | 2 Minuten |
| 2 | Denaturierung | 95°C | 30 Sekunden |
| 3 | Primer-Anlagerung | 50°C - 65 °C | 30 Sekunden |
| 4 | Elongation | 72°C 68°C | <i>Taq</i> -Polymerase: 1 Minute/kb <i>Pfu</i> -Polymerase: 2 Minuten/kb |
| 25 bis 35 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4 | | | |
| 5 | Finaler Elongationsschritt | 72°C/68°C | 10 Minuten |

2.6.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Um die Größe eines PCR-Amplifikats zu bestimmen, unterschiedlich große DNA-Moleküle von einander zu trennen oder die Konzentration von DNA-Molekülen zu bestimmen wurden diese elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid (0,3 µg Ethidiumbromid/ml Gel) sichtbar gemacht. Die DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer (1x TAE-Puffer, 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) auf 1x Pufferkonzentration verdünnt und in horizontalen Agarosegelen (0,8 % bis 4 % Agarose) unter Verwendung von TAE-Laufpuffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, pH 8, 1 mM EDTA) durch Anlegen einer elektrischen Spannung getrennt. Die Abschätzung der

Größe und Konzentration der in den jeweiligen Banden vorliegenden DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit dem parallel aufgetrennten Größenstandard Hyperladder I (Biolone USA Inc., Randolph, USA).

2.6.8 Aufreinigung von DNA nach Behandlung mit Enzymen

Die Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen erfolgte entweder nach vorheriger gelelektrophoretische Auftrennung und anschließender Elution aus dem Gel oder durch direkte Aufreinigung. Das Prinzip der Aufreinigung war in beiden Fällen die Bindung von DNA an eine Silicamembran. Im ersten Fall wurde nach der Auftrennung das entsprechende DNA-Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gemäß Herstellerprotokoll mit dem *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, Irvine, USA) eluiert. Im zweiten Fall wurde die DNA direkt mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt.

2.6.9 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Klonierung neuer DNA-Konstrukte wurden DNA-Moleküle kovalent mit Hilfe des Enzyms T4 Ligase miteinander verknüpft. Es wurden ausschließlich DNA-Moleküle mit kompatiblen überhängenden Einzelstrangenden miteinander ligiert. Das Insert wurde in drei- bis zehnfachem molaren Überschuss gegenüber dem Vektor (20-100 ng/20 µl Ansatz) eingesetzt und zusammen mit 1 Einheit T4-Ligase in 1x T4 Ligasepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) bei 16°C zwischen drei Stunden und über Nacht inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation bei 65°C für 10 Minuten.

2.6.10 Gateway-Klonierung

Die Gateway-Klonierung (Invitrogen, Carlsbad, USA) basiert auf der sequenzspezifischen Rekombination von DNA-Fragmenten bei der Integration des Bakteriophagen λ in das *E. coli* (Hartley *et al.*, 2000). Der Vorteil ist die vereinfachte Umklonierung einmal klonierter DNA-Abschnitte in weitere Zielvektoren. In dieser Arbeit wurde immer mittels einer zweistufigen PCR DNA-Fragmente mit

entsprechenden *attB1* sowie *attB2* Rekombinationssequenzen amplifiziert. Diese erfolgte durch eine Gateway1 PCR mit genspezifischen Primern, die zusätzlich einen Teil des *attB* Adapters enthielten, und einer anschließenden Gateway2 PCR auf das Gateway1 PCR-Produkt mit Primern für die vollständigen *attB* Adapter (Adapterprimer P4 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT und Adapterprimer P5 GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT). Das Temperaturprogramm der Gateway1 PCR entspricht dem einer zuvor beschriebenen Standard-PCR. Das Temperaturprogramm der Gateway2 PCR ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8. Temperatur, Dauer und Abfolge der einzelnen Schritte der Gateway2 PCR.

| Schritt | Funktion | Temperatur | Dauer |
|---|---------------------------------|------------|--------------|
| 1 | initialer Denaturierungsschritt | 95°C | 2 Minuten |
| 2 | Denaturierung 1 | 95°C | 30 Sekunden |
| 3 | Primer-Anlagerung 1 | 45 °C | 30 Sekunden |
| 4 | Elongation 1 | 68°C | 2 Minuten/kb |
| 5 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4 | | | |
| 5 | Denaturierung 2 | 95°C | 30 Sekunden |
| 6 | Primer-Anlagerung 2 | 55 °C | 30 Sekunden |
| 7 | Elongation 2 | 68°C | 2 Minuten/kb |
| 20 Wiederholungen der Schritte 5 bis 7 | | | |
| 8 | Finaler Elongationsschritt | 68°C | 10 Minuten |

Das vollständige Gateway2 Amplifikat wurde aufgereinigt und mittels einer BP-Reaktion in den *Donor*-Vektor pDONR221 oder pDONR222 kloniert, so dass ein so genannter *Entry*-Vektor entstand. Aus diesem wurde das einklonierte Fragment mittels LR-Reaktion in einen *Destination*-Vektor umkloniert.

Ein typischer BP-Reaktionsansatz (10 µl) bestand aus 1x BP-Puffer mit 300 ng *Donor*-Vektor, 40 bis 100 fmol Gateway2 PCR-Produkt und 0,5 µl BP-Clonase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Ein typischer LR-Reaktionsansatz (10 µl) bestand aus 1x LR-Puffer mit 150 ng *Entry*-Klon, 150 ng *Destination*-Vektor und 0,5 µl LR-Clonase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Beide Reaktionsansätze wurden bei 25°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µg Proteinase K und Inkubation bei 37°C für zehn Minuten abgestoppt. Die Proteinase K wurde durch Inkubation für zehn Minuten bei 68°C deaktiviert.

2.6.11 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

200 ml LB Medium wurden 1:100 mit einer frischen Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 wachsen gelassen. Die Zellen wurden auf Eis heruntergekühlt und bei 4000 g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin resuspendiert, die Zentrifugation wiederholt und die Zellen in 50 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Wiederholung der Zentrifugation und Resuspension der Zellen in 1 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin wurden sie auf 50 µl Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur Transformation erfolgte bei -80°C.

2.6.12 Elektrotransformation von *E. coli* und *A. tumefaciens* Zellen

Vor der Transformation wurde jede DNA-Lösung auf eine Dialysemembran (VSWP02500, Millipore, Billerica, USA) gegeben und für 20 Minuten gegen bidestilliertes Wasser dialysiert.

Für die Elektrotransformation von *E. coli* oder *A. tumefaciens* wurden 50 µl elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 4 µl DNA vermischt. Nach Inkubation auf Eis für eine Minute wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 1,8 kV für 3 bis 5 ms (Micro Pulser; Bio-Rad, Hercules, USA) transformiert. Sofort wurden 300 µl SOC-Medium (0,5 g/l Bacto Yeast Extrakt, 20 g/l Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose) (Hanahan, 1983) hinzugegeben und die Zellen in einem Reaktionsgefäß bei 37°C für eine Stunde (*E. coli*) bzw. 28°C für zwei Stunden (*A. tumefaciens*) inkubiert, bevor sie auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht bzw. 28°C für zwei Tage inkubiert wurden.

2.6.13 Klonierungsstrategien

Dieses Kapitel enthält detaillierte Angaben zu der Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte. Alle PCR Amplifikationen erfolgten mit *Pfu* DNA-Polymerase und die PCR-Amplifikate wurden im Anschluss mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Für Ligationen enthielten die verwendeten Primer die entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Die Präparation der Plasmide, die

Vorbereitung der Ligationen durch Restriktionsverdauung und Dephosphorylierung, die Ligationen selber bzw. die BP- und LR-Reaktionen und die Elektrotransformationen in *E. coli* erfolgten wie zuvor geschrieben. Die Sequenz aller durch Amplifikation mittels PCR erhaltener DNA-Fragmente wurde durch Sequenzierung bestätigt.

ROCK1:ROCK1-uidA für die Bestimmung der Expressionsdomänen

Für die Analyse der *ROCK1* Expression wurde mit den Primern ROCK1-A13 (CGCGGCTAGCCGGCCGTTGATTTGACTAT) und ROCK1-A14 (CGCGGCTAGCCACCTTCTTCTTCTTCTTGTC) ein 4 kb großer Bereich beginnend 1,83 kb vor dem Startcodon von *ROCK1* und endend mit dem Stoppcodon von *ROCK1* amplifiziert. Als Template hierfür diente das 16,1 kb große *SacI* Fragment des BAC-Klons MXK3, welches in pCB301 subkloniert vorlag (Dr. I. Bartina). Das Amplifikat wurde mit den in den Primern vorhandenen *NheI* Schnittstellen in die kompatiblen *XbaI* Schnittstellen des Vektors pCB308 kloniert, so dass sich eine translationale Fusion aus ROCK1 und GUS ergibt.

GFP Fusionsproteine für die subzelluläre Lokalisation von ROCK1

Um die subzelluläre Lokalisation von ROCK1 zu bestimmen, wurden verschiedene Fusionskonstrukte bestehend aus ROCK1 und GFP unter der Kontrolle verschiedener Promotoren kloniert.

Für die Klonierung des Konstruktes 35S:GFP-ROCK1 konnte auf den vorhandenen *Entry*-Vektor pDONR222-ROCK1mitStoppcodon (Niemann, 2008) zurückgegriffen werden. Aus diesem wurde das ROCK1 Fragment per LR Reaktion in den Vektor pK7WGF2 kloniert.

Für die Klonierung des Konstruktes 35S:GFP-ROCK1^{ΔKKKKKV} wurde unter Verwendung von pDONR222-ROCK1 als Template mit den Primern ROCK1-A3 (AAAAAGCAGGCTTCACCATGGCGACGGCTAACGGAGCAAA) und ROCK1ΔKKKKKV-GW-rev (AGAAAGCTGGGTGTTAGTCAATGTATGGGTATTCTG) ein ROCK1^{ΔKKKKKV} Fragment mit Stoppcodon amplifiziert. Diese wurde nach Gateway2 PCR mit P4 und P5 mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert und im Anschluss mittels LR-Reaktion in pK7WGF2 kloniert.

Für die Klonierung von ROCK1:ROCK1-GFPin wurde mit den Primern GFPinROCK1-fw (ATTAATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG) und GFPinROCK1-rev (ATTAATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA) die Sequenz von *eGFP* aus dem

Vektor pB7FWG2 amplifiziert und in die *VspI* Schnittstelle von *ROCK1* im Vektor pCB302-ROCK1:ROCK1 (Niemann, 2008) einkloniert.

Da für die Klonierung des Konstruktes ROCK1:ROCK1-GFP^{ΔKKKKKV} von dem bereits vorliegendem ROCK1:ROCK1-GFPin Konstrukt ausgegangen werden sollte, jedoch keine geeigneten Schnittstellen für den direkten Austausch des 3' Endes von *ROCK1* vorlagen, musste eine Klonierungsstrategie bestehend aus der Deletion des 3' Endes durch partiellen Verdau und Einfügen eines ebenfalls partiell verdauten verkürzten 3' Endes verwendet werden. Während dieser Klonierung wurde das *GFP* Fragment entfernt und später erneut an derselben Stelle wieder einkloniert. Hierfür wurde das Konstrukt pCB302-ROCK1:ROCK1GFPin mit *EcoRI* verdaut und die entstandenen Fragmente der Größe 6 kb, 4 kb und 0,4 kb nach Deaktivierung des Restriktionsenzym unmittelbar religiert und in *E. coli* transformiert. Ein Klon, der eine Fusion aus nur dem 6 kb und dem 4 kb Stück in richtiger Orientierung trägt, wurde isoliert, im Anschluss mit *EcoRI* erneut partiell verdaut und das nun lediglich linearisierte 10 kb Fragment isoliert. Dieses wurde im Folgenden mit *VspI* verdaut, so dass ein Fragment entsteht, das neben dem Vektorrückgrat von pCB302 noch das Fragment ROCK1:ROCK1 bis zur *VspI* Insertionsstelle von *GFP* enthält. Parallel wurde das 3' Ende von *ROCK1* mit den Primern GFPinROCK1-fw (ATTAATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG) und ROCK1ΔKKKKKV-rev (CAGAATTCTTAGTCAATGTATGGGTATTTCTGGTA) ausgehend von dem Konstrukt pCB302-ROCK1:ROCK1-GFPin als Template amplifiziert. Dem so entstandenen ca. 1,5 kb großen Amplifikat fehlt die für die sechs letzten Aminosäuren von ROCK1 kodierende Sequenz. Das für die Amplifikation verwendete Template wurde mit *VspI* und *SacI* wegverdaut, das amplifizierte Fragment mit *EcoRI* zusätzlich partiell verdaut und das 0,7 kb lange Fragment isoliert, welches die zweite Hälfte von *ROCK1* ab der *VspI* Schnittstelle besitzt und am 3' Ende um 18 Basen verkürzt ist. Dieses Fragment wurde mit dem wie zuvor beschrieben vorbereiteten Fragment aus pCB302 und dem bis zur *VspI* Schnittstelle reichenden Fragment ROCK1:ROCK1 unter Verwendung der *VspI* und *EcoRI* Schnittstellen ligiert, so dass ein um die letzten 18 Basen verkürztes ROCK1:ROCK1^{ΔKKKKKV} in die *EcoRI* Schnittstelle des Vektors pCB302 einkloniert vorliegt. Der erfolgreiche Austausch des 3' Endes wurde durch Ansequenzierung bestätigt. In die *VspI* Schnittstelle wurde im Anschluss erneut ein aus pCB302-ROCK1:ROCK1-GFPin mit *VspI* rausgeschnittenes GFP Fragment einkloniert.

Für die Klonierung von ROCK1:rock1-1-GFPin wurde mit den Primern rock1-1-1kbFragment-fw (CATCGCGAACAATACGGGTCCACG) und rock1-1-1kbFragment-rev (ATCCATGGCATTGCGC) ein ca. 1 kb großes rock1-1 Fragment aus genomischer DNA von *rock1-1* Pflanzen amplifiziert. Aus dem Konstrukt pCB302-ROCK1:ROCK1-GFPin wurde durch *NcoI* und *NruI* ein Fragment herausgeschnitten und stattdessen das 1 kb rock1-1 Fragment gerichtet einkloniert.

Für die Klonierung von 35S:GFP-rock1-1 wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus *rock1-1* Pflanzen als Template mit den Primern ROCK1-A3 (AAAAAGCAGGCTTCACCATGGCGACGGCTAACGGAGCAAA) und ROCK1-A6 (AGAAAGCTGGGTGTTACACCTTCTTCTTCTTGTC) ein rock1-1 Fragment mit Stoppcodon amplifiziert. Diese wurde nach Gateway2 PCR mit P4 und P5 mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert und im Anschluss mittels LR-Reaktion in pK7WGF2 kloniert.

myc-Fusionsproteine für die Analyse der Proteinabundanz von ROCK1

Für die Klonierung von 35S:ROCK1-myc wurde das ROCK1 Fragment aus dem *Entry*-Vektor pDONR221-ROCK1ohneStoppcodon (Niemann, 2008) durch eine LR-Reaktion in den Vektor pGWB17 kloniert.

Für die Klonierung von 35S:rock1-1-myc wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus *rock1-1* Pflanzen als Template mit den Primern ROCK1-A3 (AAAAAGCAGGCTTCACCATGGCGACGGCTAACGGAGCAAA) und ROCK1-A7 (AGAAAGCTGGGTGCACCTTCTTCTTCTTGTC) ein rock1-1 Fragment ohne Stoppcodon amplifiziert. Diese wurde nach Gateway2 PCR mit P4 und P5 mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert und im Anschluss mittels LR-Reaktion in pGWB17 kloniert.

Expression in Hefe für die Bestimmung der Transportaktivität

Für die Klonierung des Konstruktes CUP1:FLAG-ROCK1 wurde unter Verwendung des Konstruktes Salk Klon U87105 (pUNI51-ROCK1cDNA) (Niemann, 2008) als Template die ROCK1 cDNA mit Stoppcodon mit den Primern Cu-induc-fw (CATAGGTACCTGCGACGGCTAACGGAGC) und Cu-induc-rev (GTCTGAATTCTTACACCTTCTTCTTCTTGTC) amplifiziert. Das PCR-Amplifikat und der Vektor pYEScupFLAGK (Ashikov *et al.*, 2005) wurden mit *KpnI* und *EcoRI* geschnitten und das Fragment gerichtet einkloniert.

myc-CKX1 Fusionsprotein

Die Klonierung von 35S:myc-CKX1 erfolgte durch Dr. H. Weber (AG Werner, Freie Universität Berlin). Hierfür wurde die genomische Sequenz von *CKX1* amplifiziert und in pDONR221 mittels BP-Reaktion kloniert. Das *CKX1* Fragment wurde mittels LR-Reaktion in den Vektor pGWB18 kloniert.

GFP-Fusionsproteine für die Komplementation des *rock1-1 35S:CKX1* Phänotyps

Die Klonierung erfolgte in den von T. Guo (AG Werner, Freie Universität Berlin) klonierten *Destination*-Vektor pB7WGFUBQ102. Dieser Vektor unterscheidet sich in sofern von dem Vektor pB7WGF, dass der *35S* Promotor durch den *UBQ10* Promotor von Arabidopsis ausgetauscht wurden ist.

Für die Klonierung des UBQ10:GFP-Yea4p Konstruktes wurde ausgehend von genomischer DNA von *S. cerevisiae* mit den Primern Yea4p-fw (AAAAAGCAGGCTTCTGGAACCTACTAAAAGC) und Yea4p-rev (AGAAAGCTGGGTGTCATTTACTTTTCTTTATCGC) das *Yea4p* Gen amplifiziert. Dieses wurde nach Gateway2 PCR mit P4 und P5 mittels BP-Reaktion in pDONR222 kloniert und im Anschluss mittels LR-Reaktion in pB7WGFUBQ102 kloniert.

Für die Klonierung des UBQ10:GFP-SLC35A3 Konstruktes wurde ausgehend von dem Vektor pYES-SLC35A3cDNA (erhalten von Dr. A. Ashikov, Medizinische Hochschule Hannover) mit den Primern SLC35A3-fw (AAAAAGCAGGCTTCTTCGCCAACCTAAAATACG) und SLC35A3-rev-1 (CACCTTCTTCTTCTTTGCTTTAGTGGGATTTCC) die cDNA von SLC35A3 ohne das Stoppcodon amplifiziert. Im Anschluss wurden unter Verwendung dieses PCR-Amplifikats als Template mit den Primern SLC35A3-fw und SLC35A3-rev-2 (AGAAAGCTGGGTGTTACACCTTCTTCTTCTT) die letzten 15 Basen von *ROCK1* angefügt. Dieses wurde nach Gateway2 PCR mit P4 und P5 mittels BP-Reaktion in pDONR222 kloniert und im Anschluss mittels LR-Reaktion in pB7WGFUBQ102 kloniert.

Für die Klonierung des UBQ10:GFP-ROCK1 Konstruktes wurde das *ROCK1* Fragment aus dem *Entry*-Vektor pDONR221-ROCK1mitStoppcodon (Niemann, 2008) durch eine LR-Reaktion in den Vektor pB7WGFUBQ102 kloniert.

Für die Klonierung von UBQ10:GFP-SLC35A3opt wurden die Codons in der Sequenz der *SCL35A3* cDNA mit dem Programm GeneOptimizer (Raab *et al.*, 2010) für die Translation in Arabidopsis optimiert, das entsprechende DNA-Fragment wurde

synthetisiert (Life Technologies) und in den Donor-Vektor pDONR221 kloniert. Das synthetisierte DNA-Molekül beinhaltet die letzten 15 Basen von *ROCK1*. *SLC35A3opt* wurde mittels LR-Reaktion in den Vektor pB7WGFUBQ102 kloniert. Die Linkersequenz zwischen *GFP* und dem Startcodon von *SLC35A3opt* ist identisch mit der im Konstrukt pB7WGFUBQ102-ROCK1.

2.6.14 Sequenzierung kurzer DNA Abschnitte

Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG in Konstanz durchgeführt (<http://www.gatc-biotech.de>).

2.7 Bestimmung der Transkriptabundanz

Die Bestimmung der Abundanz von Transkripten erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Diese benötigt ein DNA Template, so dass die extrahierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und im Anschluss mittels qPCR quantifiziert wird.

2.7.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Extraktion von RNA aus pflanzlichen Gewebe erfolgte mit einer modifizierten TRIzol Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) wie zuvor beschrieben (Niemann, 2008). Es wurden ca. 200 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren, zu Pulver zermörsert und in ein vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml frisch angesetztem TRIzol-Reagenz (38% Phenol, 800 mM Guanidiniumthiocyanat, 400 mM Ammoniumthiocyanat, 100 mM Natriumacetat pH 5, 5% Glycerin) wurde die Probe gevortext bis sie aufgetaut war und homogen aussah. Die Zelltrümmer wurden bei 13200 rpm und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde die Probe gevortext, für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Von der oberen wässrigen Phase wurden 700 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 350 µl Isopropanol und 350 µl Hochsalzlösung (1,2 M Natriumchlorid, 800 mM Natriumcitrat) die RNA bei Raumtemperatur für zehn Minuten gefällt. Die für zehn Minuten bei 13200 rpm und

4 °C abzentrifugierte RNA wurde mit 900 µl 70%igem Ethanol gewaschen, für fünf Minuten bei 13200 rpm und 4 °C abzentrifugiert und getrocknet. Die RNA wurde bei 60°C für fünf Minuten in 20 µl RNase-freiem ddH₂O gelöst. Um die Qualität der gewonnenen RNA zu bestimmen, wurde 1 µl der Lösung mittels Elektrophorese in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und auf Vorhandensein distinkter rRNA-Banden analysiert.

2.7.2 Aufreinigung und DNase I-Verdau

Um eine Beeinflussung der cDNA-Synthese durch noch vorhandene störende Inhaltsstoffe in der extrahierten RNA zu vermeiden, wurde die RNA über eine Silica-Säule aufgereinigt. Noch vorhandene DNA-Verunreinigungen wurden mit einer DNase I Behandlung entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben. Die DNase I Behandlung erfolgte dabei nach dem ersten Waschen der auf der Säule gebundenen RNA mit Puffer RW1. Die Behandlung erfolgte mit RNase-freier DNase I (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Im Anschluss wurde die DNase I mit zum Kit gehörenden Puffer RW1 gewaschen und das Herstellerprotokoll des Kits weiter verfolgt. Die Qualität der aufgereinigten Gesamt-RNA wurde wie oben beschrieben überprüft.

2.7.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA (cDNA-Synthese) erfolgte durch das Enzym SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Die hierbei verwendeten Primer waren ein 25-mer dT-Primer (T25) sowie ein Gemisch aus neun Basen langen Primern mit zufälliger Sequenz (N9). 1 µg aufgereinigte Gesamt-RNA wurden mit 2,5 µM T25 und 4,5 µM N9 Primer sowie 5 mM von jedem dNTP in einem Gesamtvolumen von 14,5 µl vermischt, für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und danach auf Eis runtergekühlt. Im Anschluss wurden 5 mM DTT, 2,5 Einheiten der SuperScript III Reverse Transkriptase hinzugefügt und der 20 µl Reaktionsansatz auf einfache Erststrangpufferkonzentration (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) gebracht. Der Reaktionsansatz wird für fünf Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 50°C und 15 Minuten bei 70°C für das Anlagern der Primer, die reverse Transkriptionsreaktion und die Deaktivierung des Enzyms inkubiert. Für die

anschließende Verwendung als Template bei der quantitativen PCR wurde die cDNA 1:10 in bidestilliertem Wasser verdünnt.

2.7.4 quantitative PCR (qPCR)

Die Bestimmung der Transkriptabundanz erfolgte mittels quantitativer PCR (Higuchi *et al.*, 1993) unter Verwendung der cDNA als Template. Die Bestimmung der Menge an amplifizierter doppelsträngiger DNA basierte auf der Fluoreszenz von SYBR Green. Der Vergleich der Abundanz der untersuchten cDNAs erfolgte durch Vergleich der Zyklenzahl (Ct-Wert), die das Fluoreszenzsignal benötigte, um einen definierten Schwellenwert zu erreichen. Die Normalisierung der eingesetzten cDNA Menge zwischen den Proben erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Hierbei wurde die Differenz der Ct-Werte des zu bestimmenden Gens und eines parallel amplifizierten Referenzgens in den einzelnen Proben verglichen. Für aus Arabidopsis stammende Proben wurde β -Tubulin als Referenzgen verwendet (Leibfried *et al.*, 2005) und für die Proben aus Tabak α -Tubulin (Cortleven *et al.*, 2009). Unterschiede in der Fluoreszenz innerhalb der verwendeten Mikrotiterplatten wurden durch Zugabe von und Analyse der Fluoreszenz von ROX einbezogen. PCR, Auslesen der Fluoreszenz und Ermittlung der Ct-Werte erfolgte mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und der dazugehörigen Steuerungssoftware. Nach dem Abschluss der PCR-Zyklen wurde die doppelsträngige DNA denaturiert und eine Schmelzkurve durch schrittweise Erhöhung der Temperatur ausgehend von 60°C aufgezeichnet. Dadurch konnte untersucht werden, ob das detektierte Signal nur von einem Amplifikat stammt und die Identität in den verschiedenen Proben verglichen werden.

Tabelle 9. Temperatur, Dauer und Abfolge der einzelnen Schritte einer qPCR.

| Schritt | Funktion | Temperatur | Dauer |
|---|-----------------------------|---------------|--------------------------|
| 1 | Aktivierung der Immolase | 95°C | 15 Minuten |
| 2 | Denaturierung | 95°C | 15 Sekunden |
| 3 | Primer-Anlagerung | 55°C | 15 Sekunden |
| 4 | Elongation | 72°C | 15 Sekunden |
| 40 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4 | | | |
| 5 | Denaturierung | 95°C | 1 Minute |
| 6 | Schmelzkurve | 60°C bis 95°C | schrittweise Erhöhung |

Tabelle 10. Übersicht über die bei der qPCR verwendeten Primer.

| Zielgen | Primersequenz (5'-3') |
|------------------------|--|
| <i>β-Tubulin</i> | GAGCCTTACAACGCTACTCTGTCTGTC ACACCAGACATAGTAGCAGAAATCAAG |
| Tabak <i>α-Tubulin</i> | GATGTTGTGCCAAAGGATGTCA GGCTGATAGTTGATACCACACTTGAAT |
| <i>ARR4</i> | CCGTTGACTATCTCGCCT CGACGTCAACACGTCATC |
| <i>ARR5</i> | CTACTCGCAGCTAAAACGC GCCGAAAGAATCAGGACA |
| <i>ARR6</i> | GAGCTCTCCGATGCAAAT GAAAAAGGCCATAGGGGT |
| <i>ARR7</i> | CTTGGAACCAATCTGCTCTC ATCATCGACGGCAAGAAC |
| <i>ARR8</i> | CAACCCGAGAAGCCACTA ACGATGTTGCTGCGGTAT |
| <i>ARR9</i> | GATAGAGCACGTCCTAGATTTCG CTGCATCCCTACTGAAACC |
| <i>ARR1</i> | CATCACGGGCAACAACCCCA GCAAAGACTGCTGACCCGCT |
| <i>CKX1</i> | ACGACCCTCTAGCGATTCT CGGCAGTATTGATGCGTA |
| <i>CKX2</i> | GGGACAATCGTATGTCGG TCTCGTTAACGCTCTCCACT |
| <i>CKX3</i> | AATGATCGGATGTCTGCC ACCCCATATTAGCATCCTC |
| <i>IPT3</i> | GACTCTCCGTGGATATAGC CTCGTGATCTTGTTGGTTAC |
| <i>UGT76C2</i> | CAGTTTCAGAATCGGAAGCAGAG CGACTACAGCATGTAAGAACGG |
| <i>ROCK1</i> | GGCTAACGGAGCAAAGAGT CAGCGTTTGGAGATCAGAG |

Ein 20 µl PCR-Ansatz für die qPCR bestand aus 50 ng cDNA, 0,2 Einheiten Immolase Polymerase (Bioline), 1× Immolasepuffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,01% Tween-20), 0,1 mM jedes dNTPs, 300 nM jedes der beiden Primer, 2 mM MgCl₂, 50 nM ROX und 1x SYBR Green (gelöst in DMSO). Der Temperaturverlauf der PCR-Reaktion ist in Tabelle 9 dargestellt. Die Übersicht über die für den Vergleich der Abundanz der verschiedenen untersuchten Transkripte jeweils verwendeten Primer ist in Tabelle 10 zu finden.

Für die Berechnung der relativen Transkriptabundanz wurde in jedem biologischen Replikat das ΔCt des jeweiligen Referenzgens und des untersuchten Gens gebildet und der Mittelwert und die Standardabweichung aus diesen ΔCt-Werten für den jeweiligen Genotyp oder die Behandlung berechnet. Die Berechnung der Signifikanz von Unterschieden zwischen den Genotypen oder Behandlungen erfolgte ebenfalls auf Basis dieser Gruppen von ΔCt-Werten. Es wurden der ΔΔCt-Wert zwischen Wildtyp und den anderen Pflanzenlinien oder Behandlungen und daraus dann die relative

Transkriptabundanz berechnet (relative Transkriptabundanz = $2^{-\Delta\Delta Ct}$) Der mögliche Bereich der relativen Transkriptabundanz hängt ab von der Standardabweichung (s) des $\Delta\Delta Ct$ -Werts. Die der Berechnung der oberen und unteren Grenze der relativen Transkriptabundanz zu Grund liegende Formel lautet obere Grenze/untere Grenze der relativen Transkriptabundanz = $2^{-(\Delta\Delta Ct \pm s)}$ (Applied Biosystems, 2008).

2.8 Nachweis und Analyse von Proteinen

2.8.1 Proteinextraktion

Für die Extraktion der Gesamtproteine aus Arabidopsis und Tabak wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und im gefrorenen Zustand entweder durch Mörsern oder Schreddern in der MixerMill300 (Retsch, Haan) in ein feines Pulver zerkleinert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 1,5 ml bis 2 ml Extraktionspuffer (0,2 M Tris pH 7,5, 0,3% Triton X-100, Complete Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA (Roche, Basel) je 1 g Ausgangsmaterial und Inkubation für 20 Minuten auf Eis bei leichtem Schwenken extrahiert. Die extrahierten Proteine wurde durch fünf Minuten zentrifugieren bei 2000 g von den Zelltrümmern getrennt.

2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Proteinextrakt erfolgte durch die Bicinchoninsäuremethode (Smith et al., 1985). Diese basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in basischem Medium, welche dann mit Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid, BCA) einen hellblauen Komplex bilden, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann. Die Messung erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). 200 μ l Nachweisreagenz wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 10 μ l der 5 bis 20fach verdünnten Proteinextrakte inkubiert und die Absorption bei 562 nm im Synergy 2 Microplate Reader (Biotek, Winooski, USA) gemessen. Für die Erstellung der Eichgrade wurde Rinderalbumin Fraktion V (Serva, Heidelberg) verwendet.

2.8.3 Behandlung von Proteinen mit Endoglykosidase H und Peptid-N-Glykosidase F

Die Analyse des *N*-Glykosylierungsstatus von myc-CKX1 erfolgte durch Behandlung mit den Endoglykosidasen Endo H_f und Peptid-*N*-Glykosidase F (New England Biolabs, Ipswich, USA) Es wurden jeweils 1 µg Protein über Nacht mit 1000 Einheiten des jeweiligen Enzyms bei 37°C entsprechend dem Herstellerprotokoll deglykosyliert. Identische Reaktionsansätze ohne Endoglykosidasen dienten als Kontrollen.

2.8.4 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mittels denaturierender diskontinuierlicher SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem oberen Sammelgelanteil und einem unteren Trenngelanteil. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Der verwendete Laufpuffer bestand aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,2 % SDS. Die zu analysierenden Proben wurden mit 4x SDS Gelladepuffer (250 mM Tris-HCl H 6,8, 8 % SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 40 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau) auf 1x Gelladepufferkonzentration verdünnt. Für den Nachweis von myc-CKX1 wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Für den Nachweis von ROCK1-myc, GFP-ROCK1, GFP-Yea4p, GFP-SLC35A3 sowie GFP-SLC35A3opt wurden die Proben für 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA Stromstärke in einer Bio-Rad (Hercules, USA) Laufkammer und wurde gestoppt, wenn die Bromphenollauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Tabelle 11. Zusammensetzung des Sammel- und Trenngelanteils der Polyacrylamidgele.

| | Sammelgel | Trenngel |
|--------------------------------|------------------|-----------------|
| Tris-HCl pH 8 | - | 375 mM |
| Tris-HCl pH 6,8 | 125 mM | - |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid (19:1) | 4 % | 10 % |
| SDS | 0,075 % | 0,1 % |
| APS | 0,0375 % | 0,05 % |
| Temed | 0,06 % | 0,05 % |

2.8.5 Immunoblot-Analyse

Der Nachweis von myc- bzw. GFP-Epitopen erfolgte mittels Immunoblot-Analyse. Die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden hierfür elektrophoretisch auf

eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Billerica, USA) im Tank-Blot Verfahren übertragen (geblottet) (Gültekin und Heermann, 1988). Das Polyacrylamidgel wurde nach der PAGE kurz mit bidestilliertem Wasser gespült und dann für zehn Minuten in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris) äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 20 Sekunden in Methanol aktiviert, zwei Minuten in Wasser gewaschen und für fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Gel und PVDF-Membran wurden aufeinandergelegt und durch jeweils eine Lage Whatman 3MM Chr Papier (Maidstone, Groß Britannien) auf den Außenseiten unterstützt. Der Blot erfolgte über Nacht bei 4°C mit 55 mA in der Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, USA). Die Membran wurde im Anschluss mit bidestilliertem Wasser kurz gespült und unspezifische Proteinbindestellen durch Inkubation für eine Stunde mit 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20) geblockt. Im Anschluss wurde die Membran für zwei Stunden mit dem jeweiligen Primärantikörper in 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS-T inkubiert, nicht gebundener Antikörper mit PBS-T gewaschen (dreimal für jeweils fünf Minuten), danach mit dem jeweiligen Sekundärantikörper in 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS-T inkubiert und erneut wie oben beschrieben gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion in folge der Umsetzung von Luminol durch die an die Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase. Hierfür wurde das SuperSignal West pico Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet und die Chemilumineszenz auf einem CL-Xposure Film (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) festgehalten. Der Nachweis von myc erfolgte durch den Antikörper „Anti-myc Tag, clone 4A6“ (Millipore, Billerica, USA) (Verdünnung 1:2500) in Kombination mit dem Sekundärantikörper „Goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005“ (Santa-Cruz, Dallas, USA) (Verdünnung 1:5000). Der Nachweis von GFP erfolgte durch den Antikörper „GFP (FL), sc-8334“ (Santa-Cruz, Dallas, USA) (Verdünnung 1:2000) in Verbindung mit dem Sekundärantikörper „Bovine anti-rabbit IgG-HRP, sc-2370“ (Santa-Cruz, Dallas, USA) (Verdünnung 1:3000). Für die Bestimmung der Größe der detektierten Proteine wurde jeweils der Größenstandard PageRuler (prestained) (Fermentas, Sankt Leon-Rot) mit aufgetrennt und auf die Membran geblottet.

2.8.6 Färbung von Proteinen mit Ponceau S

Die Kontrolle der gleichmäßigen Übertragung der Proteine auf die Blot-Membran erfolgte durch Anfärben der Proteine mit Ponceau S vor dem Blocken der Membran (Stochaj *et al.*, 2006). Hierzu wurde die Membran in 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure inkubiert bis die gewünschte Färbung erreicht war. Im Anschluss konnte die Färbung durch Wasser gewaschen werden.

2.9 Genotypisierung von Arabidopsispflanzen

2.9.1 Extraktion von DNA aus Arabidopsispflanzen

Für die Extraktion von DNA aus Arabidopsis Gewebe für die Genotypisierung wurde ein kleines Stück Gewebe mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA) in der MixerMill300 (Retsch, Haan) zerkleinert. Danach wurden 10 µl 20%iges SDS dazugegeben, gevortext und die Zelltrümmer bei 16000 g für fünf Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. 300 µl der Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl Isopropanol gemischt und die gefällte DNA bei 16000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut bei 16000 g für zwei Minuten abzentrifugiert und getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl bidestilliertem Wasser gelöst (Glazebrook und Weigel, 2002).

2.9.2 Genotypisierung durch CAPS und dCAPS Markeranalyse

Die Genotypisierung auf Vorhandensein der mutanten Allele *rock1-1*, *rock2*, *rock3* und *cgll-2* erfolgte durch Nachweis der Punktmutationen mittels *cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS) bzw. *derived CAPS* (dCAPS) Markeranalyse (Neff *et al.*, 1998). Hierbei wurden die Punktmutation überspannende DNA-Abschnitte per PCR amplifiziert und mit Restriktionsenzymen verdaut. Das Vorhanden der Punktmutation führte zu einem Unterschied der durch den Verdau erhaltenen Fragmente bei Wildtyp und Mutante. Eine Übersicht über die verwendeten Primer und Restriktionsenzyme sowie die erwarteten Fragmentgrößen ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12. Genotypisierung durch CAPS und dCAPS Markeranalyse.

| Allel | Primersequenz (5'-3') | Restriktions- enzym | Wildtypallel / Mutantenalle (bp) ¹ | Referenz für den Marker |
|----------------|---|------------------------|---|-------------------------------|
| <i>rock1-1</i> | TTCCATATTGCTCACACTTCAGTAC AAACAGATGCCCGAGAAATCG | <i>Bsp1407I</i> | 280 / 260 + 20 | Niemann, 2008 |
| <i>rock2</i> | TGGCTCAGAAATTGGGGATA TGATGGCTTCATATAAAAATATAACCA TCTA | <i>XbaI</i> | 226 + 30 / 256 | Dr. I. Bartina |
| <i>rock3</i> | TTTTGCTGATTGTTGCTTACAG CCTATCAAGAGGAATTGAGTGAGA | <i>ApoI</i> | 595 / 459 + 136 | Jensen, 2013 |
| <i>cgl1-2</i> | CATAACCTTGTTATATTAATTGCCA AGGCCGAGTTCTGTAAATG | <i>Eco130I</i> | 228 / 204 + 24 | diese Arbeit |

¹angegeben ist die Größe der nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym erhaltenen DNA-Fragmente

2.9.3 Nachweis von T-DNA Insertionen und molekulare Charakterisierung von *rock1-3*

Die Genotypisierung der T-DNA Insertionsallele in *AHK* Genen, *IPT* Genen und *ROCK1* erfolgte durch PCR. Um die T-DNA nachzuweisen, wurde eine PCR mit einem für die T-DNA spezifischen Primer und einem genspezifischen Primer durchgeführt. Um das Wildtypallel des Gens nachzuweisen, wurde ein die Insertionsstelle überspannender Bereich amplifiziert. Eine Übersicht über die verwendeten Primerkombinationen und erwartete Amplifikatlängen ist in Tabelle 14 gegeben.

Die Sequenzen der für den Nachweis der vorhandenen Abschnitte des *ROCK1* Transkripts in *rock1-3* Pflanzen (Kapitel 3.3.3) verwendeten Primer sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13. Primer für die molekulare Analyse von *rock1-3*.

| Primernamen | Primersequenz (5'-3') |
|-------------|-------------------------|
| 1 | TGAGAAAACGACGTCCAATG |
| 2 | ATATTGACCATCATACTCATTGC |
| 3 | GTGGATTGATGTGATATCTCC |
| 4 | TGCTGTGAAAAAGATTTTCGTCT |
| 5 | GGCTAACGGAGCAAAGAGT |
| 6 | CAGCGTTTGGAGATCAGAG |
| 7 | GCTCTGATTCTCATGGCAAG |
| 8 | TAAACCCGACAGGACAGAGG |
| Actin7 fw | TACAACGAGCTTCGTGTTGC |
| Actin7 rev | TCCACATCTGTTGGAAGGTG |

Tabelle 14. Primer für die Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutationen.

| Allel | Primersequenz (5' - 3') | Amplifikatlänge (bp) | Referenz für Genotypisierungsprimer |
|----------------|--|-------------------------|--|
| <i>AHK2</i> | GCAAGAGGCTTTAGCTCCAA TTGCCCGTAAGATGTTTTCA | 778 | Riefler <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>ahk2-5</i> | GCAAGAGGCTTTAGCTCCAA GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAG CCTTGCTTCC | 650 | Riefler <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>AHK3</i> | CCTTGTTGCCTCTCGAACTC CGCAAGCTATGGAGAAGAGG | 558 | Riefler <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>ahk3-7</i> | CCCATTGGACGTGTAGACAC CGCAAGCTATGGAGAAGAGG | 450 | Riefler <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>AHK4</i> | GGGCACTCAACAATCATCAA TCCACTGATAAATCCCCTGC | 369 | Inoue <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>cre1-2</i> | ATAACGCTGCGGACATCTAC TCCACTGATAAATCCCCTGC | 394 | Inoue <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>IPT1</i> | CCACGATTCGACCCAAAGTT GCTCCAACACTTGCTCTTCC | 514 | Dr. M. Riefler |
| <i>ipt1</i> | CCACGATTCGACCCAAAGTT TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG | ca. 280 | Dr. M. Riefler |
| <i>IPT3</i> | CCAACCTGTCGTATATCATTTCGTAC AGTG TGGAGAGATTCGCCATGTGACAG | 549 | Dr. M. Riefler |
| <i>ipt3-2</i> | CCAACCTGTCGTATATCATTTCGTAC AGTG CAACACGTGGGTTAATTAAGAATT CAGTAC | ca. 370 | Dr. M. Riefler |
| <i>IPT5</i> | TGCATGACGGCTCTAAGACA TCGAGCTCTGGAACCTCCAAT | 617 | Dr. M. Riefler |
| <i>ipt5-2</i> | TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG TCGAGCTCTGGAACCTCCAAT | ca. 300 | Dr. M. Riefler |
| <i>IPT7</i> | CTACCGGATCGGGTAAGTCTC GCTACAAGATTCTCCAAGCC | 736 | Dr. M. Riefler |
| <i>ipt7-1</i> | CTACCGGATCGGGTAAGTCTC TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG | ca. 350 | Dr. M. Riefler |
| <i>ROCK1</i> | TGAGAAAACGACGTCCAATG TAAACCCGACAGGACAGAGG | 2466 | Niemann, 2008 |
| <i>rock1-2</i> | TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG TAAACCCGACAGGACAGAGG | ca. 1000 | Niemann, 2008 |
| <i>rock1-3</i> | TGAGAAAACGACGTCCAATG ATATTGACCATCATACTCATTGC | ca. 800 | diese Arbeit |

2.10 Transformation von Arabidopsis

Die Transformation von *A. thaliana* mittels *A. tumefaciens* basiert auf der Fähigkeit von *A. tumefaciens* einen auf seinem Ti (Tumor induzierendes)-Plasmid kodierten DNA-Abschnitt, die so genannte T-DNA, in befallenen Pflanzen in die Zellen einzubringen. Die von Grenzsequenzen (*left border* und *right border*) flankierte T-DNA integriert zufällig ins Pflanzengenom und die Zelle ist stabil transformiert. Die Vorgehensweise bei der Transformation entspricht einer modifizierten *floral dip* Methode (Clough und Bent, 1998). Agrobakterien mit dem zu transformierende Konstrukt wurden in einer

Vorkultur über Nacht in 20 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotika bei 28°C angezogen. Mit der Vorkultur wurde eine Transformationskultur mit 300 ml LB mit den entsprechenden Antibiotika beimpft und erneut über Nacht bei 28°C wachsen gelassen. Die Kultur wurde bei 4500 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und die Zellen anschließend in 300 ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose, 2,15 g/l MS-Salze, 0,03% Silwet L-77, pH 5,8) resuspendiert. Arabidopsispflanzen mit einem 5 cm hohen Spross wurden mit den Blüten für eine Minute in die Suspension gehalten und im Anschluss für einen Tag in einer humiden Atmosphäre unter einer Plastikhaube liegen gelassen.

2.11 Transiente Genexpression in Tabakblättern

Für die transiente Expression von Proteinen in Blättern von *Nicotiana benthamiana* (Sparkes *et al.*, 2006) wurden 1,5 ml einer über Nacht in LB Medium mit entsprechenden Antibiotika gewachsenen Kultur von Agrobakterien bei 835 g für zehn Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml frisch angesetzten Infiltrationspuffer (0,5 % Glukose, 50 mM MES, 10 mM MgCl₂, 100 µM Acetosyringon (in DMSO)) resuspendiert. Die Zellen wurden zum Wegwaschen verbliebener Antibiotika erneut für zehn Minuten zentrifugiert und in 1 ml Infiltrationspuffer resuspendiert. Die Konstrukte die kotransformiert werden sollten wurden zusammen in Infiltrationsmedium verdünnt, so dass für jedes Konstrukt die Zellen einer OD₆₀₀ von 0,05 entsprachen. Zusätzlich wurde zur Unterdrückung der posttranskriptionellen Genabschaltung zu jedem Ansatz Agrobakterien, die ein Plasmid mit einem *35S:p19* Konstrukt tragen (Voinnet *et al.*, 2003), mit einer OD₆₀₀ von 0,05 hinzugefügt. Die Unterseite von Blättern von sechs Wochen alten Tabakpflanzen wurde mit einem Skalpell leicht verletzt und mit einer Spritze die Transformationssuspension mit den Agrobakterien in das Blatt gedrückt. Bis zur Analyse wurden die Pflanzen zurück ins Gewächshaus gestellt.

2.12 Mikroskopischer Nachweis von GFP und mCherry durch konfokale *laser scanning* Mikroskopie

Der Nachweis der Fluoreszenz von GFP und mCherry erfolgte mittels dem konfokalen *laser scanning* Mikroskop TCS SP5 (Leica, Wetzlar). Das untersuchte Gewebe wurde mit dem Argon-Laser bei 488 nm bzw. dem *diode pumped solid state* (DPSS)-Laser bei

561 nm angeregt und die Fluoreszenz von GFP bzw. mCherry bei 498 bis 538 nm bzw. 600 bis 630 nm detektiert. Das bei der Analyse der subzellulären Lokalisation verwendete Markerprotein für den ER war ein Fusionskonstrukt aus dem Signalpeptid von AtWAK2, mCherry und einem C-terminalen Retentionssignal. Das Markerprotein für den Golgi bestand aus den ersten 49 Aminosäuren von GmMan1 und mCherry (Nelson *et al.*, 2007).

2.13 Nachweis der β -Glukuronidaseaktivität in Geweben von Arabidopsis

Der Nachweis der β -Glukuronidaseaktivität (GUS-Aktivität) erfolgte durch die Umsetzung des Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glukoronid (X-Gluc) zu einem blauen Farbstoff (Jefferson *et al.*, 1987). Das zu untersuchende Gewebe wurde für eine Stunde bei -20°C in 90%igem Aceton fixiert und das Aceton durch zweimaliges Waschen mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) entfernt. Das Gewebe wurde mit GUS-Reaktionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 5 mM Kalium-Ferrocyanid, 5 mM Kalium-Ferricyanid, 0,2 % Triton X-100, 1 mM X-Gluc) bei 37°C bis zum Erreichen der gewünschten Färbungsintensität inkubiert und danach das Chlorophyll durch mehrmaliges Inkubieren mit 70%igem Ethanol bei 37°C ausgewaschen. Für mikroskopische Analysen wurden optional verbliebene Farbstoffe durch Inkubation für 15 bis 30 Minuten in 0,24 M HCl in 20% Ethanol bei 57°C sowie anschließender Inkubation für 15 bis 30 Minuten in 7% NaOH in 60% Ethanol bei Raumtemperatur herausgewaschen (Malamy und Benfey, 1997). Anschließend wurde das Gewebe durch eine Ethanolserie (jeweils fünf Minuten in 40%, 20%, 10% Ethanol) bei Raumtemperatur rehydriert und zum Mikroskopieren in eine Lösung aus 25% Glycerin und 5% Ethanol überführt. Die Lichtmikroskopischen Analysen erfolgten mit dem Mikroskop Axioskop 2 plus (Zeiss, Jena).

2.14 Bestimmung der CKX Enzymaktivität in Arabidopsis Proteinextrakten

Die Bestimmung der CKX Enzymaktivität erfolgte nach einer modifizierten Endpunktmethode (Galuszka *et al.*, 2007). Aus Arabidopsiskeimlingen wurden fünf bis acht Tage nach der Keimung wie im Abschnitt 2.8.1 beschrieben die Proteine extrahiert. Der 600 μl Reaktionsansatz für die Messung der CKX Aktivität im Proteinextrakt bestand aus 50 μl (CKX2) bis 200 μl (CKX1, CKX3) Proteinextrakt, 500 μM

Elektronenakzeptor (Ferricyanid für CKX1 und CKX3, 2,6-Dichloroindophenol für CKX2), 250 μ M des jeweiligen Cytokinins gelöst in DMSO und 100 mM McIlvaine Puffer (pH 5 für CKX1 und CKX3, pH 6,5 für CKX2) (McIlvaine, 1921). Für den Nullwert der Reaktion wurde in einem Ansatz anstelle des Cytokinins lediglich DMSO hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 1 bis 2 Stunden bei 37°C im Dunkeln unter Schütteln inkubiert und im Anschluss durch Zugabe von 0,3 ml 40 %iger Trichloressigsäure abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch bei 16000 g für fünf Minuten abzentrifugiert, 850 μ l des Überstands mit 200 μ l 2 % 4-Aminophenol in 6 % Trichloressigsäure versetzt und für 2 Minuten reagieren lassen. Die Menge der entstandenen Schiff'schen Base wurde durch Messen der Absorption bei 352 nm bestimmt unter Verwendung der Nullkontrolle der Reaktion als Blankwert. Die Proteinkonzentration im Extrakt wurde wie in Abschnitt 2.8.2 beschrieben bestimmt und der erhaltene Absorptionswert auf die jeweilige eingesetzte Proteinmenge bezogen.

2.15 Analyse des Cytokininmetabolismus in Arabidopsis mittels tritiummarkierter Cytokinine

Die Analyse des Metabolismus von exogen applizierten iP bzw. iPR erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Lukáš Spíchal (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien). Es wurden 200 mg acht Tage alter Arabidopsis Keimlinge für 2 Stunden in $\frac{1}{2}$ MS mit 0,1 % Saccharose mit 39 nM tritiummarkiertem iP bzw. iPR (32 Ci/mmol) inkubiert. Die Keimlinge wurden zweimal mit Wasser gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Extraktion der tritiummarkierten Metaboliten erfolgte nach Zugabe von 1 ml eisgekühlten Bielecki-Lösung (60 % Methanol, 25 % Chloroform, 10 % Wasser, 5 % Formalinsäure) (Bielecki, 1964) durch Schreddern in Gegenwart eines Eisenkügelchens mit der MixerMill300 (Retsch, Haan), gefolgt von Sonifizieren für drei Minuten auf Eis und 30 Minuten Rotation im Kühlschrank. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren für drei Minuten bei 21000 g abgetrennt und der Überstand gesammelt. Die pelletierten Zelltrümmer wurden durch Vortexen in 1 ml Bielecki-Lösung gefolgt von 30 Minuten Rotation im Kühlschrank erneut extrahiert, abzentrifugiert und die beiden Extrakte vereint.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte über Festphasenaufreinigung mit einem Kationenaustauscher. Die verwendete Säule (Varian Bond Elut-SCX 100 mg 1 ml,

Agilent, Santa Clara, USA) wurde mit 2 ml 100 % Methanol aktiviert, mit 2 ml 50 % Methanol mit 2 % Formalinsäure äquilibriert, dann die Extrakte gebunden und im Anschluss zunächst mit 2 ml Bielecki-Lösung und danach mit 2 ml 100 % Methanol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 60 % Methanol mit 40 % 4 M Ammoniak.

Die Probe wurde im Vakuumevaporator bei 40°C eingedampft, in 500 µl 10 % Methanol gelöst und für 3 Minuten sonifiziert. 50 µl der Proben wurden mit 50 µl 5 mM Natriumhydrogencarbonat (pH 9,6) vermischt und mit alkalischer Phosphatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 2 Stunden bei 37°C dephosphoryliert. 5 µl der Proben wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem 2695 Separation Module (Waters, Milford, USA) in einem linearen Methanolgradient von 3 % bis 100 % aufgetrennt und jeweils 75 µl Fraktionen mit dem LKB FRAC 100 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gesammelt. Die Fraktionen wurden jeweils mit 4 ml Scintillationslösung (Ecolite(+), MP Biomedicals, Solon, USA) versetzt und im Scintillationszähler (LS 6500, Beckman Coulter, Brea, USA) gemessen. Die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurde durch Vergleich mit dem Auftrennungsverhalten der Standards Adenosin, Adenin, iP7G, iP9G, iP, iPR diesen jeweils zugeordnet und die Radioaktivität in den entsprechenden Fraktionen aufsummiert.

2.16 Messung des Cytokiningehalts in Pflanzenmaterial

Die Messung des Cytokiningehalts in Pflanzengewebe erfolgte durch Dr. O. Novák (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien). Die verwendete Methode basierte auf der Aufreinigung der Cytokinine durch Festphasenextraktion gekoppelt mit einem Immunoaffinitätsaufreinigungsschritt, Auftrennung mittels HPLC und anschließender massenspektrometrischer Messung (Novák *et al.*, 2008).

2.17 Messung des Nukleotidzuckerhalts in Pflanzenmaterial

Die Messung des Nukleotidzuckerhalts erfolgte durch Dr. T. Herter (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm). Die Messung basierte auf einer Trennung mit einer Phasenumkehr-HPLC und anschließender massenspektrometrischen Messung durch Ionenpaarchromatographie (Rautengarten *et al.*, 2011)

2.18 Messung der Transportaktivität von ROCK1 in Hefemikrosomen

Die Messung der Transportaktivität von ROCK1 im heterologen System Hefe erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Angel Ashikov (Medizinische Hochschule Hannover). *S. cerevisiae* (BY4741) wurde mit dem Konstrukt pYEScupFLAGK-ROCK1cDNA bzw. dem leeren Kontrollvektor transformiert. Die Expression von *FLAG* bzw. dem *FLAG-ROCK1* Fusionskonstrukt wurde wie zuvor beschrieben induziert und die mikrosomale Fraktion durch differentielle Ultrazentrifugation isoliert. Die Messung der Transportaktivität von ROCK1 erfolgte durch Inkubation der Mikrosomen mit tritiummarkierten Nukleotidzuckern, wegwaschen nicht aufgenommener Radioaktivität, Abfiltrieren der Vesikel und Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität mittels Scintillationszähler (Ashikov *et al.*, 2005).

2.19 EMS-Mutagenese von Arabidopsis-Samen

Für den Screen auf Suppressormutationen von *rock1-1* wurden ca. 50000 Samen der Linie *rock1-1 35S:CKX1* mit Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisiert (Kim *et al.*, 2006). Die Samen wurden zunächst über Nacht bei 4°C in 25 ml 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) eingeweicht. Am nächsten Tag wurde der Phosphatpuffer erneuert und die Samen zusammen mit 0,2 % EMS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei Raumtemperatur mit leichtem Schütteln für 14 Stunden inkubiert. Die Samen wurden im Anschluss zehnmal mit Wasser gewaschen und unmittelbar auf Erde ausgesät.

2.20 Next-generation sequencing

2.20.1 Extraktion von DNA für next-generation sequencing

Für die Kartierung des *riol* Gens wurden die mittels EMS Suppressorscreen isolierten Linien #261 und #1067 mit *rock1-1 35S:CKX1* rückgekreuzt, in der F2 Generation Pflanzen mit *riol* Phänotyp isoliert. Für die Kartierung mittels *next-generation sequencing* wurde in der aus diesen Pflanzen erzeugten F3 Generation die DNA aus 70 bzw. 59 Pflanzen isoliert. Hierbei wurde von jeder F3 Linie dieselbe Menge Pflanzenmaterial genommen so dass sich in der Summe 10 g ergeben haben und die DNA aus allen Linien zusammen extrahiert. Hierzu wurde das Material unter Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert, mit 30 ml vorgewärmten Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol,

1 % SDS) gemischt und für zehn Minuten bei 65°C inkubiert. Es wurden 5 ml 5 M Kaliumacetat hinzugegeben, die Lösung für 20 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss für 20 Minuten bei 3300 g und 4°C zentrifugiert. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden nach Zugabe von 10 ml Isopropanol für zehn Minuten auf Eis gefällt und für 15 Minuten wie zuvor abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet, in 0,5 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert und verbliebene RNA durch Zugabe von 100 µg RNase für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die DNA wurde aufgereinigt durch Zugabe von 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) und anschließender Zentrifugation für zehn Minuten bei 16000 g und 4°C. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 0,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Zum Fällen der DNA wurde die obere Phase mit 50 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 350 µl Isopropanol gemischt und wie zuvor für 15 Minuten zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in bidestilliertem Wasser gelöst. Quantität und Qualität der extrahierten DNA wurden durch Vergleich mit dem quantitativen Größenstandard HyperLadder I (Bioline, London, Großbritannien) nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 0,8 % Agarosegel überprüft. Es wurden DNA-Proben mit einer Konzentration von 150 bzw. 190 ng/µl DNA und einer Gesamtmenge von 13,7 bzw. 19,6 µg DNA für die Sequenzierung verwendet.

2.20.2 Probenvorbereitung, Sequenzierung und Datenanalyse

Die Erzeugung der beiden Sequenzierungsbibliotheken sowie die Sequenzierungen auf einer Hiseq2000 Plattform (Illumina, San Diego, USA) erfolgten durch die Firma BGI (Hong Kong, China). Es wurden jeweils durch Ansequenzierung der Fragmente von beiden Enden (*paired-end*) 90 Basen lange Sequenzen erzeugt. Die angeforderte Mindestdatenmenge je Sequenzierung betrug 8 GB.

Die Zuordnung der Sequenzen in das Arabidopsisgenom sowie die Isolierung der Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) und Bestimmung der Allelhäufigkeit erfolgte durch Dr. K. Schneeberger (Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) mittels der Software SHOREmap (Schneeberger *et al.*, 2009). In die Kopplungsanalyse für die Bestimmung des Kartierungsintervalls wurden alle SNPs einbezogen, die aus einem Austausch von

Cytosin zu Thymin oder Guanin zu Adenin bestanden, mindestens durch zwanzig Sequenzen bestätigt wurden und nur in einer von beiden Mutanten vorkamen.

2.21 Verwendete Datenbanken und Programme

Für die Suche nach Sequenzinformationen wurden die Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)* und der *Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>)* (Huala *et al.*, 2001) verwendet.

Die Schaffung eines Konsens aus Vorhersagen der Anzahl und Lage von TMDs in ROCK1 sowie die Berechnung des Hydrophobizitätsplots erfolgte durch das Programm TmMultiCon der ARAMEMNON-Datenbank (Schwacke *et al.*, 2003). Die graphische Darstellung dieser Daten erfolgte mit Hilfe des Programms TOPO2 (*Sequence Analysis and Consulting Service, Universität von Kalifornien, San Francisco, USA; <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>*). Die Generierung der dCAPS Primer für den Nachweis der *cgl1-2* Mutation erfolgte mit Hilfe des Programms dCAPS Finder 2.0 (Neff *et al.*, 2002). Die Messung der Wurzelelongation erfolgte mit *Scion Image Beta 4.0.2* (Scion Image, Frederick, USA). Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels *Microsoft Office Excel 2003* (Redmond, Washington (USA)). Die Auswertung der Bilder aus der konfokalen Mikroskopie erfolgte mittels der LAS AF Software (Leica Microsystems, Wetzlar). Die Photographien am Mikroskop wurden mit der Software *AxioVision Release 4.6* und die Photographien am Binokular mit der Software *Olympus DP-Soft 3.2* gemacht. Die Bearbeitung von Bildern erfolgte mit *Corel Photo-Paint 12* (Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der *ROCK1* Expression

Die Analyse der Expressionsdomänen eines Gens ist ein zentraler Bestandteil der molekularen Charakterisierung und liefert womöglich Hinweise auf von dem Gen beeinflusste Prozesse. Für eine erste Annäherung wurden in meiner Diplomarbeit existierende Microarray-Daten mit Hilfe des *electronic Fluorescent Pictograph* (eFP)-Browser (Winter *et al.*, 2007) analysiert. Diese Analyse ergab, dass es sich um ein breit und mittelstark exprimiertes Gen handelt und dessen Expression durch keinen Stimulus stark verändert wird. Die Transkriptabundanz ist im Sprossapex nach der Blühinduktion, in der jungen Blüte und dem Pollen ungefähr doppelt so hoch wie in den Rosettenblättern und während der Samenentwicklung temporär fast um die Hälfte verringert. Da diese Daten kaum nähere Aussagen über die Expression auf zellulärer Ebene zulassen, wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit ein Reportergenkonstrukt bestehend aus einer *eGFP-uidA* Fusion unter der Kontrolle von 1,95 kb des *ROCK1* Promotors unmittelbar vor dem *ROCK1* Startcodon kloniert (Niemann, 2008). Entgegen der Erwartung auf Grund der Microarray-Daten zeigten die untersuchten Linien allesamt nur eine schwache GUS-Aktivität.

Aus diesem Grund habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit ein neues Reportergenkonstrukt bestehend aus 1,83 kb genomischer Sequenz unmittelbar vor dem *ROCK1* Startcodon und der gesamten genomischen Sequenz des *ROCK1* Gens bis zum Stoppcodon sowie dem *uidA* Gen kloniert und stabile Arabidopsislinien generiert. In der T1 Generation wurden elf Pflanzen auf GUS-Aktivität hin untersucht und zehn von diesen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster in Blättern und Blütenständen. Die Linien 3 und 8 wurden auf Grund der Segregation des Selektionsmarkergens als Einfachinsertionslinien charakterisiert und für die detaillierte Analyse der Reportergenexpression verwendet. Im Gegensatz zu dem in meiner Diplomarbeit verwendeten Reporterkonstrukt war in den *ROCK1:ROCK1-uidA* Pflanzen in den meisten Geweben eine starke Genexpression detektierbar (Abb. 7). Die *ROCK1* Expression begann bereits während der Keimung und zeigte dabei ein Maximum entlang der späteren Leitbündel (Abb. 7A). Kurz nach der Keimung wurde *ROCK1* sowohl im Spross als auch in der Wurzel des Keimlings exprimiert (Abb. 7B).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung nahm die Expression in den Keimblättern wieder

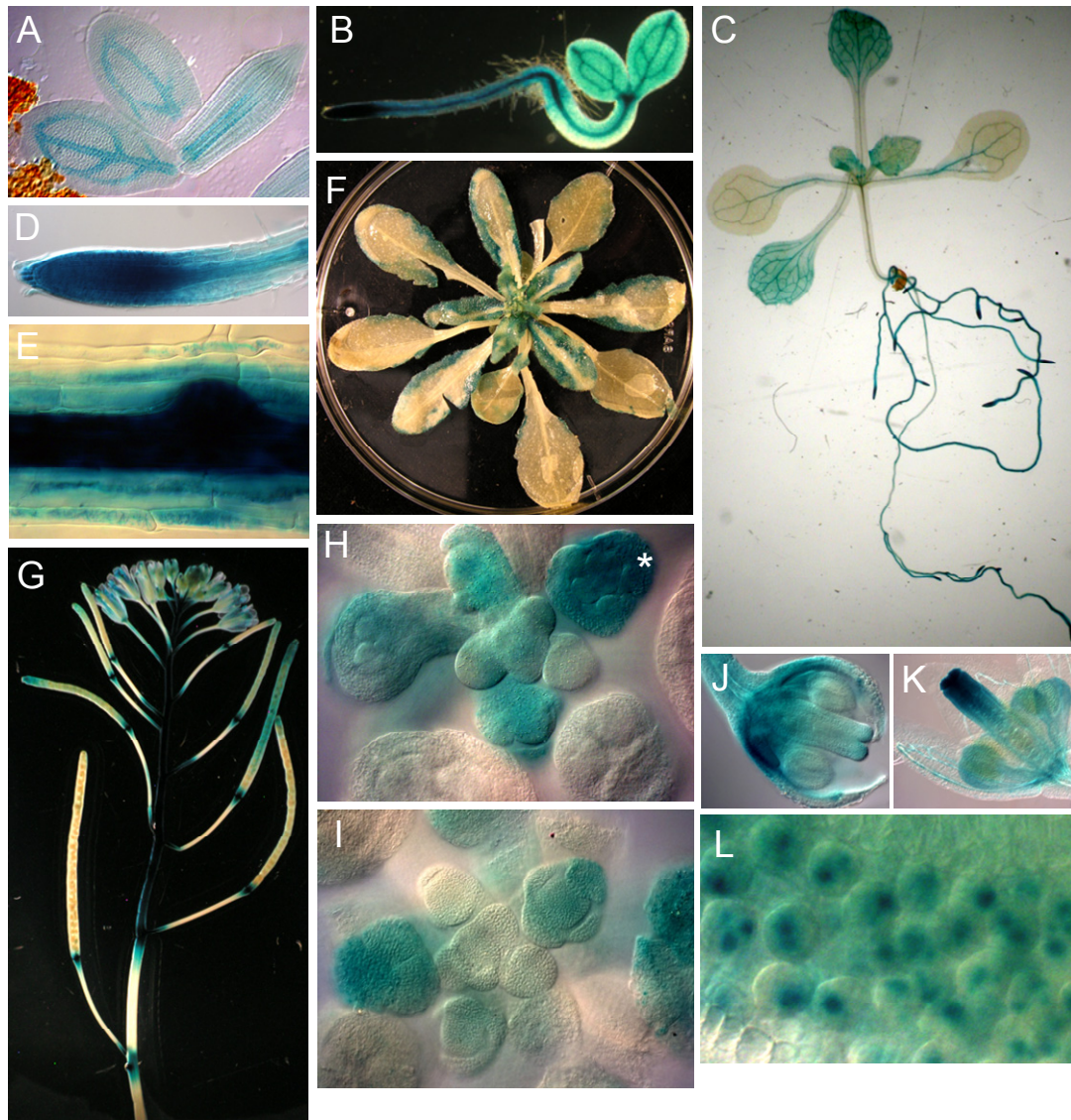


Abbildung 7. Nachweis der *ROCK1:ROCK1-uidA* Expression mittels GUS-Färbung in Geweben von Arabidopsis.

- (A) Keimling 7 Stunden nach dem Einbetten des Samens in Wasser bei permissiver Temperatur.
 (B) Keimling 1 Tage nach der Keimung (TNK).
 (C) Keimling 8 TNK.
 (D) Wurzelapikalmeristem.
 (E) Wurzel mit Seitenwurzprimordium.
 (F) Rosettenblätter und Blütenstand kurz nach dem Schossen.
 (G) Sprossapex mit Blüten und Schoten.
 (H) und (I) Aufsicht auf die Infloreszenzmeristeme von zwei Pflanzen aus derselben Linie. Der Stern in (H) markiert eine Blüte im Stadium 5 (Smyth *et al.*, 1990).
 (J) und (K) Blüte im Stadium 7 bzw. Stadium 10 (Smyth *et al.*, 1990).
 (L) Ausschnitt aus den Antheren mit Pollen.

ab und neu entstehende Blätter zeigten die stärkste GUS-Färbung an den basalen Rändern (Abb. 7C). Das stärkste Signal konnte zu diesem Zeitpunkt in jungem Wurzelgewebe detektiert werden mit Maxima in der Zellteilungszone des Wurzelmeristems von Haupt- und Seitenwurzeln (Abb. 7D) und den auswachsenden

Wurzelprimordien (Abb. 7E). Zum Zeitpunkt des Schossens war bei jungen Blättern ein unregelmäßiges flächiges GUS-Signal zu sehen, das mit zunehmendem Alter der Rosettenblätter an die Blattränder wanderte (Abb. 7F). Bei den ältesten Blättern war lediglich ein Signal entlang der basalen Hälfte des Blattrandes zu erkennen.

Die *ROCK1:ROCK1-uidA* Expression konnte auch in verschiedenen Geweben des generativen Sprosses nachgewiesen werden. Zu diesen gehörten der apikale Bereich des Stängels, die Spitzen junger Schoten und die Abszissionszone der Schoten (Abb. 7G). Auch im Infloreszenzmeristem war die GUS-Aktivität nachweisbar. Die Expression war im Meristem selber sowie den Blütenprimordien bis zum Stadium 5 (Smyth *et al.*, 1990) vorhanden (Abb. 7H). Das Reporterkonstrukt war jedoch nicht in allen Pflanzen gleich aktiv (Abb. 7I). In Blüten im Stadium 7 war die GUS-Aktivität erneut detektierbar, ein Expressionsmaximum befand sich im Blütenboden (Abb. 7J). In späteren Blütenstadien war die stärkste GUS-Färbung an der Spitze des Gynoeceums und in den wachsenden Petalen vorhanden (Abb. 7K). In den reifen Antheren konnte eine starke GUS-Aktivität in den Pollen nachgewiesen werden (Abb. 7L).

3.2 Die subzelluläre Lokalisation von ROCK1 im Endoplasmatischen Retikulum wird durch ein Dilysinmotiv vermittelt

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins ROCK1-GFP konnten GFP-Signale im Golgi detektiert werden (Niemann, 2008). Um zu untersuchen, ob die bei ROCK1 vorhandene C-terminale Reihung an Lysinen im nativen Protein als ER-Retentionssignal funktioniert (Cosson und Letourneur, 1994), wurde die *GFP* Sequenz vor *ROCK1* kloniert und unter die Kontrolle des *35S* Promotors gestellt. Bei transienter Expression in Tabak konnten netzartige GFP-Signale detektiert werden (Abb. 8A). Der Vergleich mit den Signalen eines kotransformierten Markerproteins für das ER zeigte eine Überlagerung. Die Signale eines Markerproteins für den Golgi hingegen zeigten fast keine Überlagerung mit dem GFP-Signal von GFP-ROCK1 (Abb. 8A). Somit ist das Fusionsprotein GFP-ROCK1 im Gegensatz zu dem Fusionsprotein ROCK1-GFP im ER lokalisiert, was darauf hinweist, dass das Dilysinmotiv als ER-Retentionssignal dient.

Sortierungssignale können sich sowohl am C-Terminus als auch am N-Terminus eines Proteins befinden. Um die Maskierung möglicher N-terminaler Sortierungssignale ausschließen zu können und die ER-Lokalisation von ROCK1 zu bestätigen, wurde eine

Fusion aus *ROCK1* und einem sich intern befindlichen *GFP* kloniert. In dem so entstandenen Fusionsprotein *ROCK1-GFPin* befindet sich das *GFP* Protein zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne von *ROCK1* (entsprechend der Vorhersage gemäß Kapitel 3.3). Um eine Überladung des Sortierungssystems in Folge zu starker Expression zu verhindern, wurde das Konstrukt unter die Kontrolle des nativen *ROCK1* Promotors gestellt. Die transiente Expression von *ROCK1:ROCK1-GFPin* in Tabak ergab sehr schwache netzartige *GFP*-Signale, die erst sechs Tage nach der Inokulierung detektierbar waren (Abb. 8B). Das Muster der Signale ähnelte sehr stark dem Muster des im vorherigen Experiment verwendeten ER-Markerproteins. Um zu überprüfen, ob *ROCK1-GFPin* auch in Arabidopsis im ER lokalisiert, wurde *ROCK1:ROCK1-GFPin* in *rock1-1* Pflanzen transformiert. Die Verwendung des mutanten Genotyps sollte verhindern, dass es in Folge der zusätzlichen Kopie von *ROCK1* zu Überexpressionsartefakten kommt. Aus den selektierten Pflanzen wurden stabile Linien mit einer Insertion isoliert und das Wurzelmeristem auf Vorhandensein des *GFP*-Signals hin untersucht. Es zeigte sich erneut das netzartige Muster sowie ein perinukleäres Signal, was typisch für eine ER-Lokalisierung ist (Abb. 8C).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das Einfügen des *GFP* Proteins die Struktur von *ROCK1* beeinflusste und deshalb das ER-lokalisierte Fusionsprotein nicht funktional war, wurde versucht, *rock1-1 35S:CKX1* Pflanzen mit *ROCK1:ROCK1-GFPin* zu komplementieren. Alle 23 isolierten T1 Pflanzen zeigten das typische durch die Überexpression von *CKX1* hervorgerufene Cytokinindefizienzsyndrom (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei *ROCK1-GFPin* um ein funktionelles Protein handelt.

Um zu untersuchen, ob das C-terminale Dilysinmotiv für die Lokalisierung von *ROCK-GFPin* im ER verantwortlich ist, wurden die letzten sechs Aminosäuren deletiert. Die transiente Expression des so entstandenen Konstrukts *ROCK1:ROCK1-GFPin^{AKKKKKV}* in Tabak führte zu einem schwachen *GFP*-Signal. Dieses befand sich hauptsächlich in beweglichen kleinen Strukturen (Abb. 8D). Das Muster der Signale ähnelte sehr stark dem Signalmuster des zuvor verwendeten Golgi-Markerproteins (Abb. 8A). Daneben waren noch sehr schwache netzartige Signale vorhanden, die dem bekannten Muster des ER-Markerproteins ähneln. Ein ähnliches Muster wurde auch in mit *ROCK1:ROCK1-GFPin^{AKKKKKV}* transformierten *rock1-1* Arabidopsispflanzen detektiert (Abb. 8E). Die *GFP*-Signale deuteten also sowohl bei transienter Expression in Tabak als auch bei

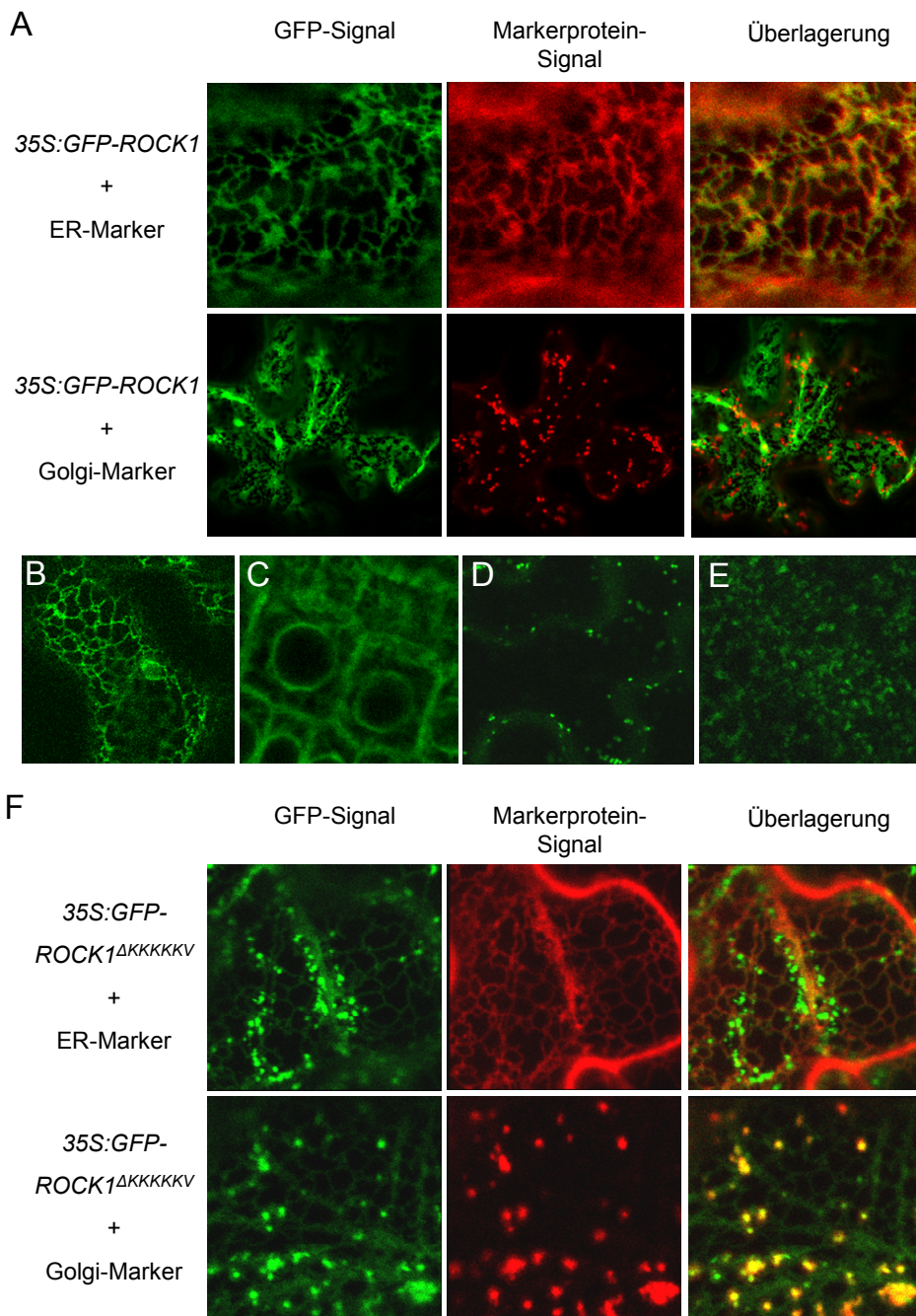


Abbildung 8. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von ROCK1.
(A) Vergleich der Lokalisation von GFP-ROCK1 und Markerproteinen in Blattepidermiszellen nach transienter Expression von *35S:GFP-ROCK1* in Tabak; 6 Tage nach der Inokulierung (TNI).
(B) GFP-Signal in Blattepidermiszellen nach transienter Expression von *ROCK1:ROCK1-GFPin* in Tabak; 6 TNI.
(C) GFP-Signal in Wurzelzellen einer mit *ROCK1:ROCK1-GFPin* transformierten *rock1-1* Arabidopsispflanze.
(D) GFP-Signal in Blattepidermiszellen nach transienter Expression von *ROCK1:ROCK1-GFPin^{AKKKKKV}* in Tabak; 6 TNI.
(E) GFP-Signal in Wurzelzellen einer mit *ROCK1:ROCK1-GFPin^{AKKKKK}* transformierten *rock1-1* Arabidopsispflanze.
(F) Vergleich der Lokalisation von GFP-ROCK1^{AKKKKKV} und Markerproteinen in Blattepidermiszellen nach transienter Expression von *35S:GFP-ROCK1^{AKKKKKV}* in Tabak; 6 TNI.

Untersuchung stabiler Linien in Arabidopsis auf eine ER-Lokalisation von ROCK1 und eine Golgi Lokalisation für das C-terminal verkürzte Protein hin.

Um die subzelluläre Lokalisation des C-terminal verkürzten ROCK1 genau bestimmen zu können, wurde für den besseren Vergleich mit Markerproteinen *GFP* vor *ROCK1^{AKKKKKV}* kloniert und unter die Kontrolle des *35S* Promotors gestellt. Aus den vorherigen Experimenten war bekannt, dass eine N-terminale Fusion die Lokalisation von ROCK1 nicht beeinflusst. Die transiente Expression von *35S:GFP-ROCK1^{AKKKKKV}* in Tabak führte zu starken GFP-Signalen in punktförmigen beweglichen Strukturen und zusätzlichen schwachen netzartigen Signalen (Abb. 8F). Die starken punktförmigen Signale überlappten mit den Signalen eines kotransformierten Markerproteins für den Golgi, die schwachen netzartigen Signale mit denen eines kotransformierten Markerproteins für das ER (Abb. 8F). Somit lässt sich sagen, dass es sich bei ROCK1 um ein im ER-lokalisiertes Protein handelt, dessen subzelluläre Lokalisation stark, jedoch nicht ausschließlich, von der Funktionsfähigkeit eines C-terminalen Dilysinmotivs abhängt.

Interessanterweise führte auch die Transformation mit *ROCK1:ROCK1-GFPin^{AKKKKKV}* zu einer Komplementation des Phänotyps von *rock-1 35S:CKX1* Pflanzen. Alle 15 selektierten T1 Pflanzen zeigten das Cytokinidefizienzsyndrom (Daten nicht gezeigt). Dies ist entweder ein Hinweis darauf, dass bereits eine geringe Abundanz des funktionsfähigen ROCK1 Proteins im ER für die Komplementation ausreicht oder dass es für die Komplementation des Cytokinidefizienzsyndroms unerheblich ist, ob ROCK1 im ER oder im Golgi lokalisiert.

3.3 Genetische und phänotypische Analyse der *rock1* Mutanten

In der TAIR-Datenbank sind für den Locus *At5g65000* zwei Genmodelle annotiert (Abb. 9A). Sie unterscheiden sich dadurch, dass im zweiten Genmodell Intron 5 nicht rausgespleist wird, wodurch ein sich ein im Intron befindliches Stoppcodon zu einem verkürzten Protein mit einem anderen C-Terminus führt. Genmodell 1 wird von vier der sechs für diesen Locus verfügbaren cDNAs unterstützt und Genmodell 2 von den anderen zwei. Keiner der sechs *expressed sequence tags* (ESTs), die den sich unterscheidenden Bereich überspannen, unterstützt Genmodell 2. Da die mRNA, die dem Genmodell 1 entspricht, deutlich stärker in der Pflanze vorzukommen scheint, beziehen sich alle der folgenden Analysen auf Genmodell *At5g65000.1*. Abbildung 9

gibt einen Überblick über die zuvor in meiner Diplomarbeit teilweise charakterisierten Allele *rock1-1* und *rock1-2* (Niemann, 2008).

Bei *rock1-1* handelt es sich um das zunächst isolierte Suppressorallel von *35S:CKX1* (Bartrina, 2006), welches eine Punktmutation im ersten Exon von *ROCK1* trägt. Das durch *rock1-1* kodierte Protein hat an Position 29 anstelle eines Glycins ein Arginin. Entsprechend seiner hypothetischen Funktion als Transportprotein handelt es sich bei *ROCK1* um ein sehr hydrophobes Protein (Abb. 9B). Ein wichtiges Strukturmerkmal von Transportproteinen sind Transmembrandomänen (TMD). Mehrere TMDs zusammen formen die Transportpore durch die Membran. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob der Aminosäureaustausch Auswirkungen auf die Struktur der TMDs von *ROCK1* hat, wurde die Transmembrandomänenstruktur von *ROCK1* mit bioinformatischen Methoden vorhergesagt und die Position der veränderten Aminosäure darin bestimmt. Die genaue Vorhersage von Lage und Anzahl der TMDs unterscheidet sich je nach verwendetem Vorhersagealgorithmus und schwankt zwischen sechs und zehn vorhergesagten TMDs. Deshalb wurde der in der ARAMEMNON-Datenbank vorhandene TmMultiCon-Algorithmus, der einen Konsens aus dem Ergebnis mehrerer Programme schafft (Schwacke *et al.*, 2003), verwendet. Dieser sagt für *ROCK1* zehn TMDs vorher (Abb. 9B). Dies stimmt mit den wenigen bisher experimentell erhaltenen Topologieinformationen für NSTs überein, die von einer geraden Anzahl an TMDs ausgehen (Handford *et al.*, 2006). Auf Grund des Vorhandenseins eines Dilysin-Retentionssignals am C-Terminus wird davon ausgegangen, dass dieser sich im Cytosol befindet (Cosson und Letourneur, 1994). Die Verortung des von der Mutation betroffenen Gly29 zeigt, dass sich dieses innerhalb der ersten vorhergesagten TMD befindet (Abb. 9C). Der Austausch des leicht hydrophoben Glycins durch das stark hydrophile Arginin verringert die Hydrophobizität dieses sonst 21 Aminosäure langen hydrophoben Abschnitts des Proteins. Möglicherweise bildet dieser Bereich des von *rock1-1* kodierten Proteins in der Folge keine TMD mehr aus. Denkbar wäre auch, dass die Funktion als Signalanker für die Lokalisation in der ER-Membran gestört ist und es in der Folge zu einer Fehllokalisation kommt.

Als weitere Mutante am Locus *At5g65000* wurde die T-DNA Insertionsmutante *rock1-2* aus der SALK-Sammlung identifiziert, welche eine T-DNA Insertion im ersten Intron trägt (Abb. 9A) (Niemann, 2008). Die molekulare Analyse ergab, dass die T-DNA Insertion herausgespleist wird und eine um das zweite und dritte Exon verkürzte mRNA entsteht, ohne dass es zu einer Verschiebung im Leseraster kommt (Niemann, 2008). Es

kann folglich ein kürzeres Protein entstehen, dem unter anderen drei TMDs fehlen (Abb. 9C) und das in Folge dessen womöglich eine andere Orientierung der TMDs in der Membran besitzt.

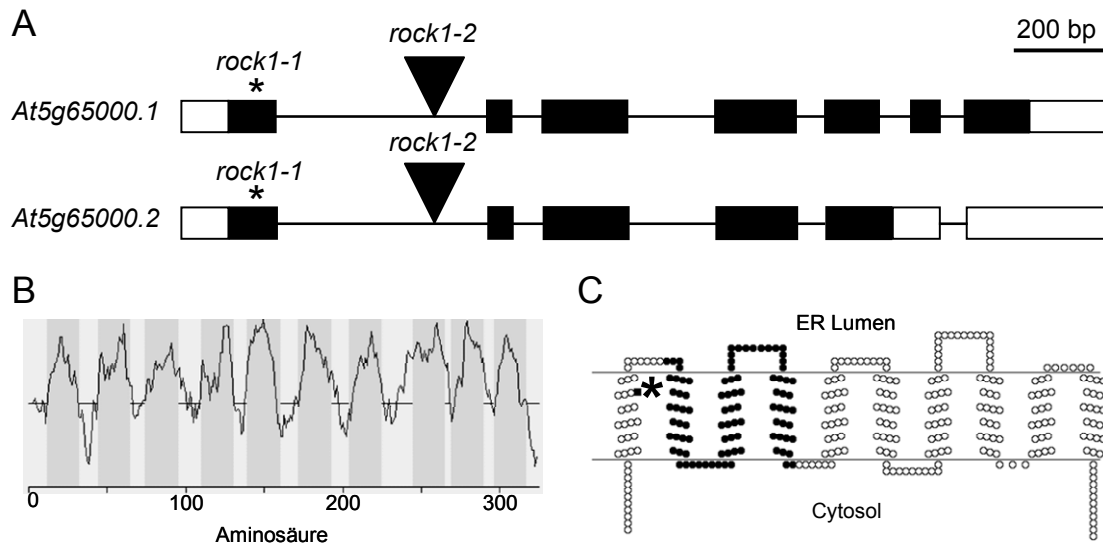


Abbildung 9. Auswirkungen der in den Mutantenallelen *rock1-1* und *rock1-2* vorkommenden Mutationen auf die hypothetische Proteinstruktur von ROCK1.

(A) Darstellung der zwei Genmodelle am Locus *At5g65000* und der Position des Basenaustauschs (Stern) bzw. der T-DNA Insertion (Dreieck) in *rock1-1* bzw. *rock1-2*.

(B) Hydrophobizitätsplot des ROCK1 Proteins basierend auf der Eisenberg-Skala (Eisenberg *et al.*, 1984). Die Vorhersage der zehn dunkelgrau hinterlegten Transmembrandomänen (TMDs) erfolgte auf Grundlage der Konsensanalyse durch den TmMultiCon-Algorithmus (Schwacke *et al.*, 2003).

(C) Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur basierend auf den Hydrophobizitätswerten aus (B) durch das Programm TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2>). Die von der Mutation in *rock1-1* betroffene Aminosäure befindet sich in der ersten vorhergesagten TMD und ist mit einem Stern markiert. Die zusammenhängenden schwarz markierten Aminosäuren fehlen im von *rock1-2* kodierten Protein (Niemann, 2008).

3.3.1 *rock1-1* ist eine rezessive Mutation

Pflanzen, die heterozygot für *rock1-1* und das *35S:CKXI* Transgen waren, zeigten einen intermediären Phänotyp zwischen dem der homozygoten *35S:CKXI* Pflanzen und der *rock1-1 35S:CKXI* Suppressorlinie (Niemann, 2008). Um zu untersuchen, ob dies auf Grund einer semidominanten Natur der *rock1-1* Mutation oder eines Dosiseffekts des *35S:CKXI* Transgens zustande kommt, wurde die genaue Natur der *rock1-1* Mutation bestimmt. Hierfür wurde die homozygote Linie *rock1-1 35S:CKXI* mit der homozygoten Linie *35S:CKXI* gekreuzt, so dass letztendlich eine F2 Population analysiert werden konnte, die nur für *rock1-1*, nicht aber für das *35S:CKXI* Transgen segregierte. Die 49 untersuchten F2 Pflanzen zeigten nur zwei phänotypische Klassen,

eine bestehend aus 28 kleinen und eine aus 21 großen Pflanzen. Die Genotypisierung mittels dCAPS Marker zeigte, dass alle 21 großen Pflanzen homozygot für *rock1-1* und alle kleinen Pflanzen entweder heterozygot für *rock1-1* (22 Pflanzen) oder wildtypisch für *ROCK1* (6 Pflanzen) waren. Die Bestimmung des Rosettendurchmessers bestätigte, dass kein signifikanter Unterschied zwischen für *rock1-1* homozygoten und heterozygoten Pflanzen vorhanden war (Abb. 10). Folglich handelt es sich bei der *rock1-1* Mutation um ein rezessives Allel. Der zuvor beobachtete Unterschied entstand vermutlich durch einen Dosiseffekt des *35S:CKX1* Transgens, das im hemizygoten Zustand zu einer schwächeren Ausprägung des *35S:CKX1* Phänotyps führte.

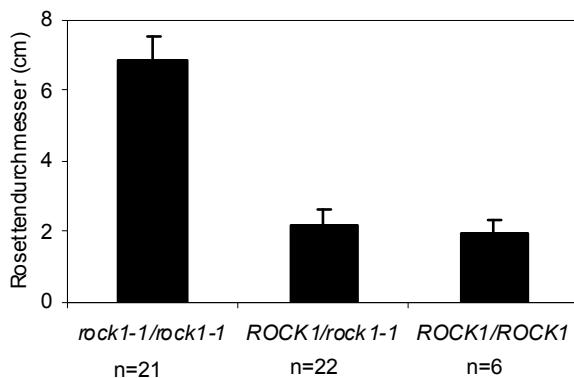


Abbildung 10. *rock1-1* ist eine rezessive Mutation.

Rosettendurchmesser von auf Erde angezogenen Pflanzen der F2 Generation der Kreuzung *rock1-1 35S:CKX1* x *35S:CKX1 30 TNK*. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *ROCK1/rock1-1* und *ROCK1/ROCK1* Pflanzen (t-Test, $p > 0,05$).

3.3.2 Der Aminosäureaustausch in *ROCK1^{Gly29Arg}* führt zu einer verringerten Proteinabundanz

Der Funktionsverlust von *ROCK1* durch den Aminosäureaustausch in *rock1-1* kann mehrere Ursachen haben. Um erste Hinweise zu erhalten, ob diese Mutation den Transportmechanismus selber oder generelle Eigenschaften des Proteins betrifft, wurde die Abundanz sowie subzelluläre Lokalisation des mutierten Proteins verglichen. Ein unmittelbarer Nachweis des *ROCK1* Proteins ist auf Grund eines fehlenden Antikörpers nicht möglich. Daher wurden Fusionskonstrukte aus *ROCK1* bzw. *rock1-1* und der Sequenz für vier myc-Peptide kloniert und diese transient unter Kontrolle des *35S* Promotors in Tabakblättern exprimiert. Die Gesamtproteine wurden extrahiert und die Abundanz von *ROCK1-myc* und *ROCK1^{Gly29Arg}-myc* mittels Immunoblot verglichen. In beiden Proben wurde ein gleichgroßes Signal bei ca. 45 kDa detektiert (Abb. 11A).

Dies ist nur sehr geringfügig größer als die theoretisch berechnete Proteingröße der Fusionsproteine von 42,5 kDa (35 kDa des ROCK1 + 7,5 kDa des Gateway-Linkerpeptid und vierfachen myc-Peptids). Die Stärke des Signals von ROCK1^{Gly29Arg}-myc war deutlich geringer als die des fusionierten Wildtypproteins. Auch wenn nur ein Drittel der ROCK1-myc Probe aufgetragen war, ergab dies noch ein stärkeres Signal als die ROCK1^{Gly29Arg}-myc Probe (Abb. 11A).

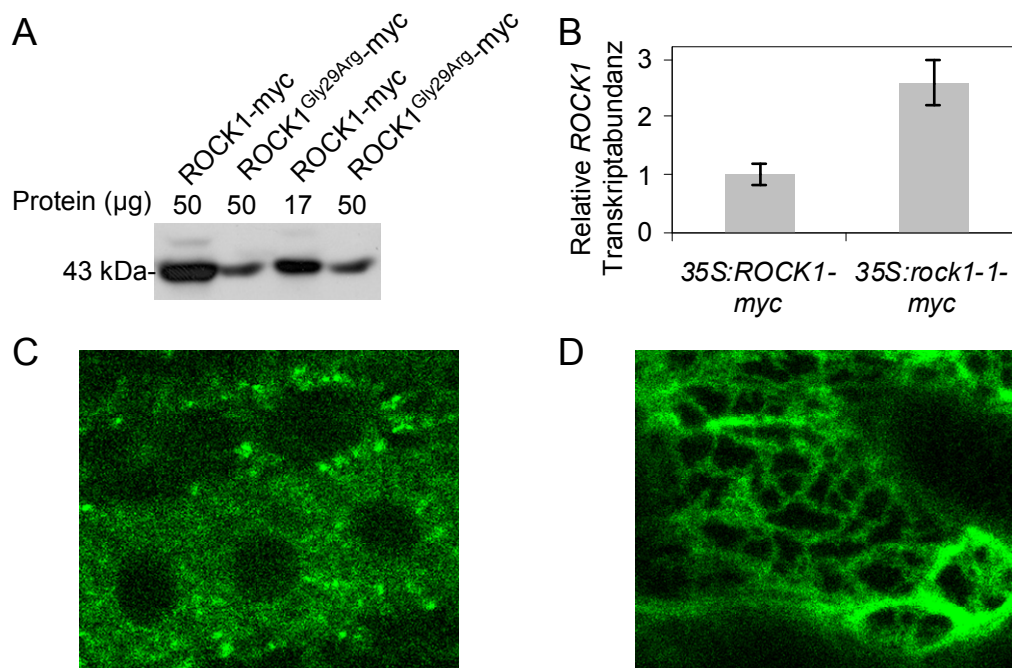


Abbildung 11. Auswirkungen der *rock1-1* Mutation auf die Proteinabundanz und subzelluläre Lokalisation des mutierten Proteins.

(A) Immunoblotanalyse für den Vergleich der Proteinmenge von ROCK1-myc und ROCK1^{Gly29Arg}-myc nach transienter Expression in Tabakblättern. Drei Tabakblätter wurden 3 TNI jeweils halbiert und aus den drei Blatthälften zusammen die Proteine extrahiert. Es wurden 50 µg bzw. 17 µg der extrahierten Proteine in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und das myc-Peptid immunologisch mit einem anti-myc Antikörper nachgewiesen.

(B) Vergleich der Transkriptlevel von *ROCK1-myc* und *rock1-1-myc* nach transienter Expression in Tabakblättern. Die RNA wurde aus den bei (A) übriggebliebenen drei Blatthälften zusammen extrahiert. Die Bestimmung der Transkriptabundanz erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR) und die Abundanz der transgenen Transkripte wurde jeweils gegen die des β -*Tubulin* Transkripts normalisiert. Gezeigt sind Mittelwert \pm obere und untere Grenze der relativen Transkriptabundanz (Applied Biosystems, 2008) basierend auf vier technischen Replikaten der qPCR.

(C) GFP-Signal in Wurzelzellen einer mit *ROCK1:rock1-1-GFP* transformierten *rock1-1* Arabidopsis Pflanze.

(D) GFP-Signal in Blattepidermiszellen in Tabak nach transienter Expression von *35S:GFP-rock1-1*; 3 TNI.

Um zu untersuchen, inwieweit eine unterschiedliche Abundanz der Transkripte zu diesem Unterschied in der Proteinabundanz beiträgt, wurde zusätzlich die RNA aus den transformierten Tabakblättern isoliert. Der Vergleich der Abundanz der transgenen Transkripte mittels quantitativer PCR zeigte, dass mehr als doppelt so viel vom *rock1-1-myc* Transkript vorhanden war (Abb. 11B). Dies zeigt, dass der in *rock1-1* vorliegende Austausch einer Aminosäure die Abundanz des ROCK1 Proteins stark verringert.

Dies muss jedoch nicht die einzige Ursache für die Verringerung der ROCK1 Funktion in *rock1-1* Pflanzen sein. Denkbar wäre ebenfalls, dass eine veränderte subzelluläre Lokalisation einen großen Einfluss hat. Um dies zu untersuchen, wurde *GFP* intern in *rock1-1* einkloniert (siehe 3.2) und unter die Kontrolle des nativen *ROCK1* Promotors gestellt. Dieses Konstrukt wurde in *rock1-1* Arabidopsismutanten transformiert und stabile Linien isoliert. Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte ein sehr schwaches flächiges GFP-Signal, bei dem es sich möglicherweise um das ER handelte, sowie ein etwas stärkeres Signal in punktförmigen Strukturen (Abb. 11C). Die punktförmigen Strukturen waren bei der Expression von *ROCK1:ROCK1-GFPin* nicht aufgetreten. Somit unterscheidet sich die subzelluläre Lokalisation von *ROCK1^{Gly29Arg}-GFPin* teilweise von der von *ROCK1-GFPin*.

Um ein stärkeres Fluoreszenzsignal zu erhalten, wurde *GFP* vor *rock1-1* kloniert und unter der Kontrolle des *35S* Promotors transient in Tabak exprimiert. Es wurde ein netzförmiges schwaches Fluoreszenzsignal detektiert (Abb. 11D). Diese Struktur ähnelt dem in einem vorherigen Experiment bei der Verwendung eines ER-Markerproteins erhaltenen Fluoreszenzsignal. Die stärkeren punktförmigen Signale, wie sie bei der Expression von *ROCK1:rock1-1-GFPin* in Arabidopsis detektiert worden waren, waren nicht vorhanden.

3.3.3 *rock1-3* ist ein transkriptionelles Nullallel von *ROCK1*

Die bislang isolierten *ROCK1* Mutanten tragen entweder eine Punktmutation, die lediglich zu einer Verringerung der ROCK1 Abundanz führte (*rock1-1*), oder eine T-DNA Insertion im Intron, die den Verlust eines Teils des ROCK1 Proteins bewirkte (Niemann, 2008). Um eine definitive Aussage über die Auswirkungen des Verlustes von *ROCK1* treffen zu können, wurde eine weitere Mutantenlinie isoliert, die möglichst ein funktionelles Nullallel von *ROCK1* trägt. Für die T-DNA Insertionslinie 901C01 aus der GABI-KAT Sammlung (Li *et al.*, 2003) war eine Insertion im zweiten Exon

annotiert. Es konnte mittels PCR eine T-DNA Insertion im erwarteten Bereich des *ROCK1* Locus bestätigt und homozygote Pflanzen isoliert werden. Die homozygoten *rock1-3* Pflanzen zeigten einen mit *rock1-2* vergleichbaren Phänotyp, welcher aus keinen offensichtlichen morphologischen Veränderungen in der vegetativen Phase, jedoch einer erhöhten Infloreszenzmeristemaktivität (Kapitel 3.3.4) bestand.

Der genaue Insertionsort der T-DNA wurde mittels Sequenzierung analysiert. (Abb. 12A). Durch PCR Amplifikation ausgehend von einem vorwärtsgerichteten Primer im ersten Exon von *ROCK1* und einem Primer in der linken Grenze der T-DNA wurde der Übergangsbereich zwischen T-DNA und genomischer DNA amplifiziert, sequenziert und die Insertion der T-DNA im zweiten Exon von *ROCK1* bestätigt. Zwischen der genomischen Sequenz von *ROCK1* und dem Beginn der T-DNA befinden sich 14 zusätzliche Basen unbekanntes Ursprungs (Abb. 12A). Bei der Amplifikation des mutmaßlichen Übergangsbereichs hinter dem Insertionsort mit Primern, die in der rechten Grenze der T-DNA und im dritten Exon von *ROCK1* bindeten, wurde ein Amplifikat erhalten, das ca. 1,7 kb größer als erwartet war (nicht gezeigt). Die Sequenzierung des Amplifikats ausgehend von einem *ROCK1* spezifischen Primer zeigte, dass die genomische Sequenz von *ROCK1* direkt hinter dem Insertionsort unverändert war. In der inserierten Sequenz schließt sich auf dieser Seite des Insertionsortes zunächst eine um 2 Basen verkürzte linke T-DNA Grenze an. Danach folgen ca. 700 weitere Basen der T-DNA und darauf dann mindestens 400 Basen eines anderen Bereichs der T-DNA in umgedrehter Orientierung. Die weitere Struktur der zusätzlichen T-DNA ist nicht bekannt, auf Grund der erhaltenen Größe des Amplifikats wird jedoch nach 1,7 kb die rechte Grenze der anderen T-DNA erwartet.

Um zu untersuchen, ob die Insertion der T-DNAs im zweiten Exon zu dem erwarteten Verlust des vollständigen *ROCK1* Transkripts führte, wurde der Bereich vor, über und nach der Insertionsstelle aus Wildtyp und *rock1-3* RNA mittels RT-PCR amplifiziert. Diese Analyse ergab, dass der Bereich des *ROCK1* Transkripts vor der Insertionsstelle in Wildtyp und *rock1-3* vorhanden war, während ein Abschnitt, der über die Insertionsstelle reichte, nur im Wildtyp amplifiziert wurde (Abb. 12B). Somit unterbricht die inserierte T-DNA entsprechend der Erwartung die Bildung des *ROCK1* Transkripts. Eine schwache Amplifikation des *ROCK1* Transkriptabschnitts hinter der Insertionsstelle konnte detektiert werden. Möglicherweise handelte es sich hierbei um ein chimäres Transkript, welches aus der inserierten T-DNA in den *ROCK1* Locus hinein abgelesen wird. Somit lässt sich sagen, dass die T-DNA Insertion in der *rock1-3*

Mutante die Bildung des *ROCK1* Transkriptes unterbricht und es sich somit um ein funktionelles Nullallel von *ROCK1* handelt. Da die *rock1-3* Mutante erst spät im Verlauf dieser Arbeit isoliert wurde, wurde sie in die meisten weiteren Analysen nicht mit einbezogen.

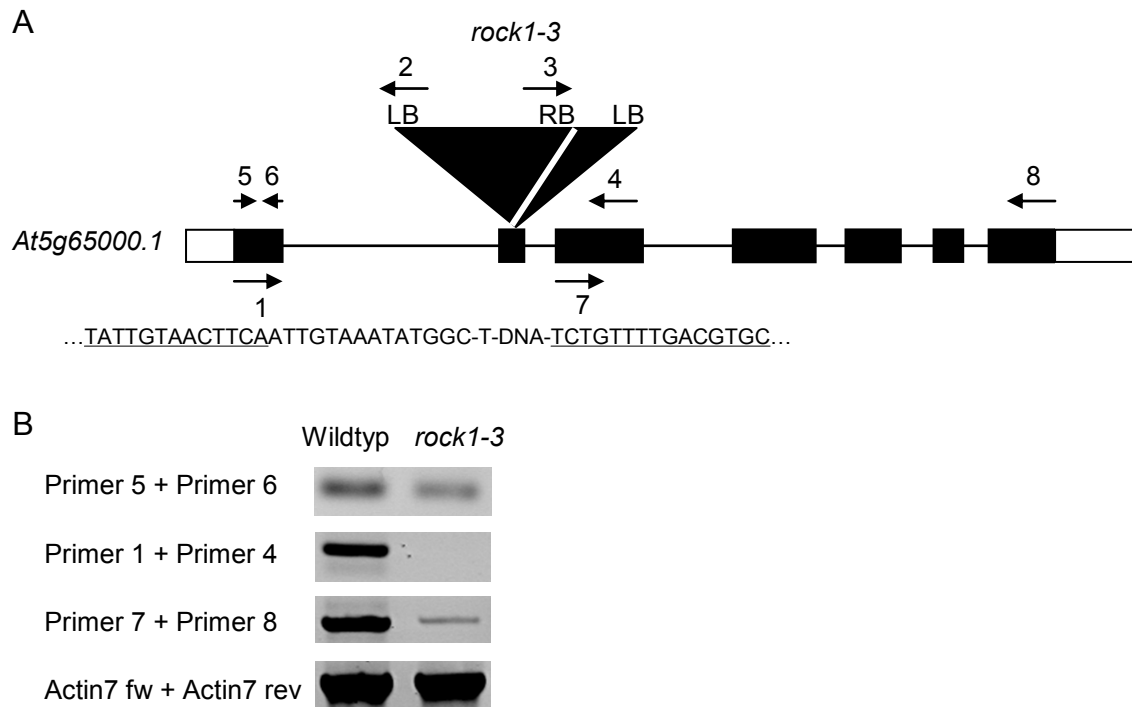


Abbildung 12. Charakterisierung der *rock1-3* Mutation.
(A) Übersicht über die Lage der T-DNA Insertion in der Linie *rock1-3* und der für die molekulare Charakterisierung verwendeten Primer (nummerierte Pfeile). Für die genaue Bestimmung des Insertionsortes der T-DNA wurde der Übergangsbereich 5' und 3' des vermuteten Insertionsortes mit den Primerpaar 1 und 2 bzw. 3 und 4 amplifiziert und die Amplifikate ansequenziert. Die unterstrichenen Bereiche innerhalb der angegebenen Sequenz sind die sich an den Insertionsort anschließenden kodierenden Bereiche von *ROCK1*, die nicht unterstrichenen Basen sind unbekanntem Ursprungs.
(B) Nachweis des Vorhandenseins von Bereichen des *ROCK1* Transkripts in Wildtyp und *rock1-3* mittels RT-PCR. Die Lage der verwendeten Primern ist in (A) dargestellt. Als Kontrolle wurde das Transkript des *Actin7* Gens amplifiziert.

3.3.4 Der Verlust von *ROCK1* führt zu einem aktiveren Infloreszenzmeristem

Die genaue Untersuchung der Auswirkungen der *rock1* Mutationen auf das Pflanzenwachstum unter Standardbedingungen ergab, dass die Anzahl der während des Lebenszyklus am Hauptspross gebildeten Schoten höher war als beim Wildtyp (Niemann, 2008). Um eine Aussage über die Bedeutung von *ROCK1* bei der Regulation der Infloreszenzmeristemaktivität treffen zu können, wurde die Frequenz der Blütenbildung in den *rock1* Mutanten untersucht. Hierzu wurde die Anzahl der

gebildeten Schoten und Blüten fünf, sechs und sieben Wochen nach der Keimung (WNK) bestimmt. Die *rock1* Mutanten trugen am Beginn des Messzeitraums zwischen 15 % und 35 % und zum Ende des Messzeitraums zwischen 45 % und 55 % mehr Schoten als der Wildtyp (Abb. 13A). Zwischen fünf und sechs WNK betrug die Zunahme der Blüten pro Tag durchschnittlich beim Wildtyp 3,2 und bei den *rock1* Mutanten 4,2. Somit führte der Verlust von *ROCK1* zu einer um ca. 32 % erhöhten Frequenz der Blütenbildung. Um zu untersuchen, ob *ROCK1* neben der Initiation von Blütenprimordien auch an der Regulation des Wachstums des Hauptsprosses beteiligt ist, wurde die Wachstumsrate des Hauptsprosses bestimmt. Das Längenwachstum könnte ein weiterer Hinweis auf ein aktiveres Meristem sein. Zu Beginn des Messzeitraums fünf WNK hatten die *rock1* Pflanzen entweder einen gleichlangen oder um 5 % längeren Hauptspross als der Wildtyp (Abb. 13B). Sieben WNK war der Hauptspross zwischen 17 % und 23 % länger als beim Wildtyp.

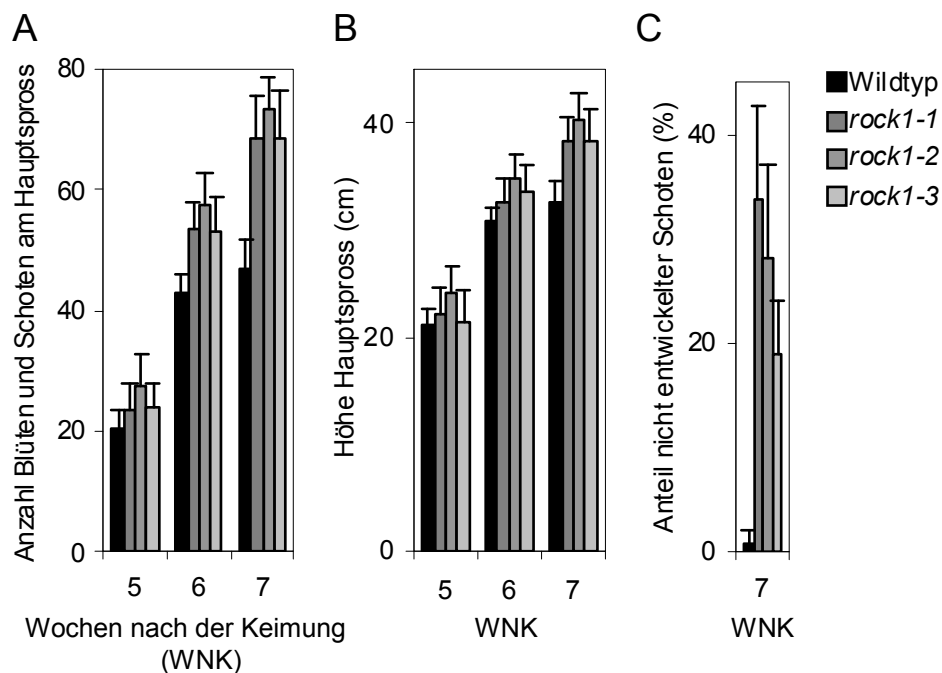


Abbildung 13. Bestimmung der Infloreszenzmeristemaktivität von *rock1* Mutanten.

(A) Anzahl der Blüten und Schoten im Zeitverlauf. Es wurden jeweils alle Blüten zwischen Stadium 13 und 18 (Smyth *et al.*, 1990) und Schoten des Hauptsprosses gezählt.

(B) Höhe des Hauptsprosses im Zeitverlauf.

(C) Der Anteil nicht vollständig entwickelter Schoten an der Gesamtzahl der Blüten und Schoten des Hauptsprosses.

Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben, $n \geq 20$. Alle Werte der *rock1* Mutanten unterscheiden sich signifikant vom Wildtyp, mit Ausnahme der Werte von *rock1-1* und *rock1-3* in (B) 5 WNK (t-Test, $p < 0,05$).

Durchschnittlich wuchs der Hauptspross des Wildtyps im Zeitraum zwischen fünf und sechs WNK täglich um 1,39 cm, der der *rock1* Mutanten zwischen 1,51 und 1,77 cm. Hieraus ergibt sich eine zwischen 9 % und 27 % erhöhte Rate des Längenwachstums in den *rock1* Mutanten. Sowohl die Anzahl neu gebildeter Blüten als auch das Längenwachstum des Hauptsprosses nahmen ab dem Zeitpunkt 6 WNK ab. Diese Abnahmen fielen beim Wildtyp deutlich stärker aus als bei den *rock1* Linien. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass der Verlust von *ROCK1* sowohl zu einer erhöhten Initiation von Blütenprimordien als auch einem größeren Längenwachstum führte, wobei die Auswirkungen auf ersteren Prozess stärker waren.

Bei den *rock1* Mutanten traten vermehrt Blüten auf, deren Gynoeceum sich nicht über das Stadium zum Zeitpunkt der Pollinierung hinaus entwickelte. Während beim Wildtyp weniger als 1 % der Blüten eine abgebrochene Entwicklung zeigten, waren dies in den *rock1* Mutanten zwischen 19 % und 34 % (Abb. 13C).

3.3.5 Der Verlust von *ROCK1* führte zu einem geringfügig veränderten Cytokininstatus aber keiner veränderten Cytokininsensitivität

3.3.5.1 Analyse der Auswirkungen von *rock1* auf die Cytokinantwort

rock1-1 revertierte das durch *CKX1* Überexpression hervorgerufene Cytokinundefizienzsyndrom im Spross fast vollständig. Die morphologischen Auswirkungen auf den Wildtypphänotyp waren jedoch nur sehr schwach und beschränkten sich auf die Aktivität des generativen Sprossmeristems. Deshalb stellt sich die Frage, wie hoch die Beteiligung von *ROCK1* an der Regulation Cytokinabhängiger Entwicklungsprozesse ohne gleichzeitige Überexpression von *CKX1* ist. Eine Möglichkeit, die Cytokininsensitivität in Pflanzen zu untersuchen, ist die Reaktion des Wurzelwachstums auf die exogene Gabe von Cytokinin zu vergleichen. Cytokinin hemmt das Längenwachstum der Hauptwurzel und die Entstehung von Seitenwurzeln (Werner et al., 2001). Bei den Mutanten *rock1-1* und *rock1-2* und dem Wildtyp wurde das Ausmaß der Beeinflussung dieser beiden Entwicklungsprozesse durch exogen hinzugefügtes Cytokinin verglichen. In allen drei Linien führte eine steigende Konzentration exogenen Cytokinins zu einem verringerten Wachstum der Hauptwurzel und weniger Seitenwurzeln (Abb. 14A und B), wobei kein Unterschied im Ausmaß der Sensitivität bei den drei Linien festzustellen war. Somit lässt sich sagen, dass der

Verlust von *ROCK1* keine Auswirkungen auf die generelle Regulation des Wurzelwachstums durch Cytokinin in Arabidopsis hatte.

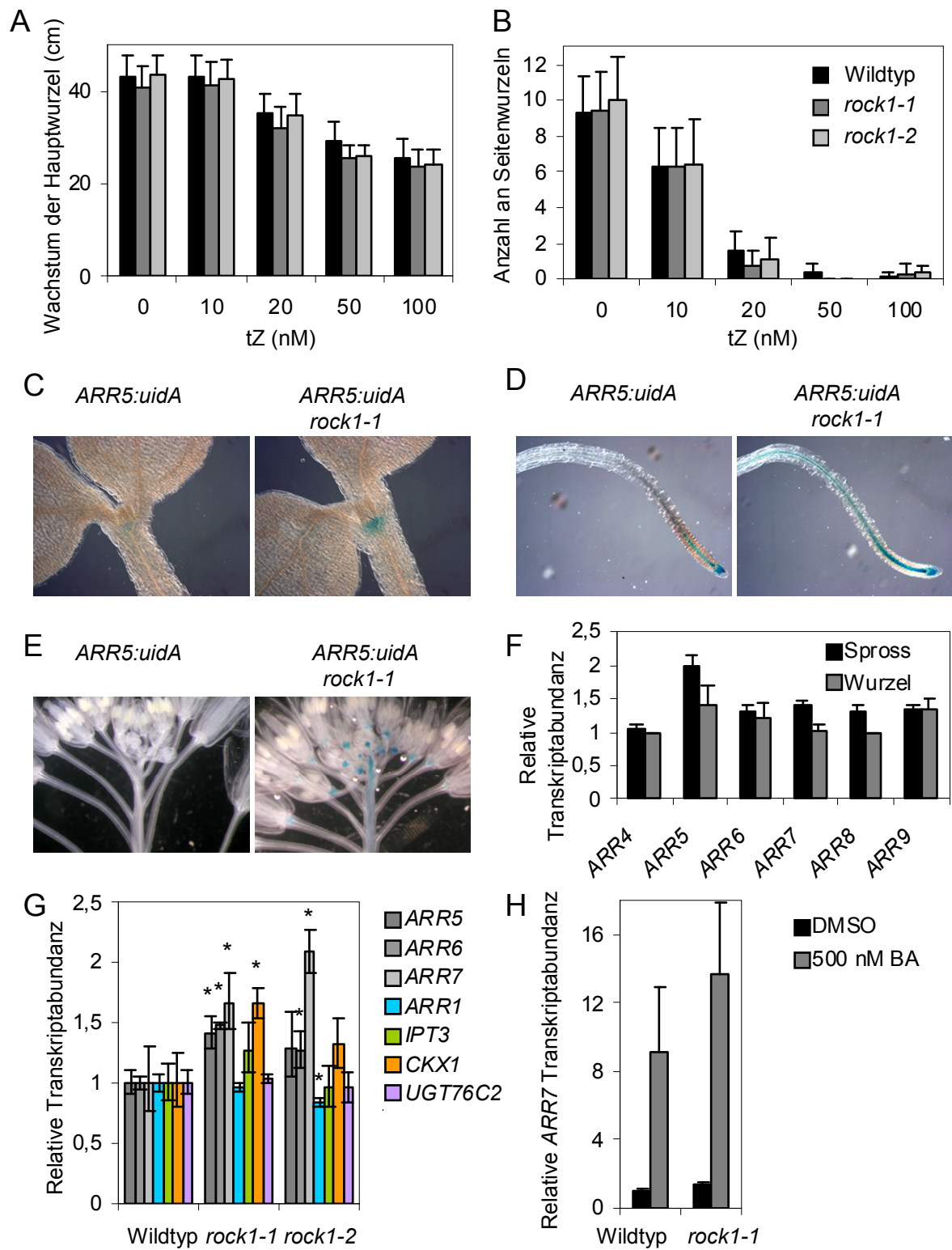


Abbildung 14. Bestimmung der Cytokininsensitivität und des Cytokininstatus von *rock1* Pflanzen.

Da die Reversion des Cytokinindefizienzsyndroms durch *rock1-1* in der Wurzel deutlich schwächer als im Spross war (Niemann, 2008), wurden der Cytokininstatus der *rock1* Pflanzen mit einer Methode untersucht, die auch Aussagen über den Status im Spross zuließ. Diese basierte auf der Analyse der Expression von Cytokininreportergenen, deren Expression durch Cytokinin induziert wird. Zunächst wurde als Reporter ein *uidA* Gen verwendet, welches unter der Kontrolle des Promotors von *ARR5*, einem zur Gruppe der A-Typ *ARR* Regulatoren gehörenden Gens, steht (D'Agostino *et al.*, 2000). Die *rock1-1* Mutation wurde in die *ARR5:uidA* Arabidopsislinie eingekreuzt und doppelt homozygote Pflanzen isoliert. Für den Vergleich der *ARR5:uidA* Expression wurde eine Reihe histologischer GUS-Färbungen durchgeführt, um Zeitpunkte zu finden, an denen es noch zu keiner Sättigung des Signals gekommen war. Es zeigten sich bei *rock1-1* in Spross- und Wurzelapex des Keimlings sowie im Blütenstand eine deutlich stärkere GUS-Färbung als im Wildtyp Hintergrund (Abb. 14C, D und E).

Eine unmittelbarere Methode, die Expression cytokininregulierter Gene zu untersuchen, ist die Messung der Transkriptmenge durch quantitative PCR (qPCR). Zunächst wurde

Zu Abbildung 14.

(A) Reaktion der Hauptwurzel auf exogen appliziertes tZ zwischen Tag 2 und Tag 9 nach der Keimung und **(B)** Anzahl der Seitenwurzeln 9 TNK. $n \geq 25$. Bei keiner Cytokininkonzentration ist ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *rock1* Mutanten vorhanden (t-Test, $p < 0,05$).

(C) und **(D)** Vergleich der GUS-Aktivität in *ARR5:uidA* und *rock1-1 ARR5:uidA* Keimlingen 2 TNK. Am Sprossapex (C) und im Leitbündel der Wurzel (D) sind im *rock1-1* Hintergrund nach 1 Stunde Färbung eine stärkere GUS-Aktivität detektierbar.

(E) Vergleich der GUS-Aktivität in Infloreszenzen von *ARR5:uidA* und *rock1-1 ARR5:uidA* Pflanzen. Im *rock1-1* Hintergrund ist im Stängel, jungen Blüten und Blütenböden nach 3 Stunden Färbung eine stärkere GUS-Aktivität detektierbar.

(F) qPCR Analyse der Auswirkungen von *rock1-1* auf die Transkriptabundanz von A-Typ *ARR* Genen in Spross und Wurzel von Keimlingen 9 TNK. Angegeben ist die relative Transkriptabundanz \pm obere und untere Grenze der relativen Transkriptabundanz in *rock1-1* bezogen auf den Wildtyp basierend auf drei technischen Replikaten der qPCR-Reaktion (Applied Biosystems, 2008).

(G) qPCR Analyse des Expressionsniveaus verschiedener Gene der primären Cytokininantwort und des Cytokininmetabolismus in Sprossen von *rock1* und Wildtyp 9 TNK. Es wurden je Genotyp vier biologische Replikate einbezogen und β -*Tubulin* als Referenztranskript verwendet. Angegeben sind die relative Transkriptabundanz \pm obere und untere Grenze der relativen Transkriptabundanz (Applied Biosystems, 2008). Die Sterne markieren signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$).

(H) Vergleich der *ARR7* Expression nach Induktion mit 500 nM Benzyladenin in Sprossen von Wildtyp und *rock1-1* 9 TNK. Es wurden je Genotyp drei biologische Replikate einbezogen und β -*Tubulin* als Referenztranskript verwendet. Angegeben sind die relative Transkriptabundanz \pm obere und untere Grenze der relativen Transkriptabundanz (Applied Biosystems, 2008).

in *rock1-1* und Wildtypkeimlingen die Transkriptmenge von A-Typ *ARR* Genen in Spross und Wurzel getrennt voneinander verglichen. Es zeigte sich, dass die *rock1-1* Mutation im Spross zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von *ARR5* bis *ARR9* um 40 % bis 100 % verglichen mit dem Wildtyp führte (Abb. 14F). Die von *ARR4* war unverändert. In der Wurzel hatten *ARR5*, *ARR6* und *ARR9* ein um 20 % bis 40 % erhöhtes Transkriptlevel, *ARR4*, *ARR7* und *ARR8* blieben unverändert. Dies zeigte, dass *rock1-1* in Spross und Wurzel den Cytokininstatus erhöht, der Einfluss auf den Spross jedoch größer ist. Aus diesem Grund wurde sich im Folgenden auf die Analyse der Auswirkungen von *rock1* auf den Spross fokussiert. Eine unabhängige Bestimmung der Transkriptmengen im Spross von *rock1-1* und *rock1-2* Keimlingen bestätigte die Zunahme der Transkriptabundanz von *ARR5*, *ARR6* und *ARR7* um 30 % bis 100 % des Wildtypwerts (Abb. 14G). Um zu untersuchen, ob Mechanismen der Cytokininhomöostase aktiviert worden waren, wurde auch die Expression von Vertretern von Genen, die an der Synthese (*IPT3*), dem Abbau (*CKX1*), der Glykosylierung (*UGT76C2*) und der Signalweiterleitung (*ARR1*) von Cytokinen beteiligt sind, untersucht. Lediglich *CKX1* zeigte in den Mutanten ein um 30 % bis 60 % höheres Transkriptlevel, die Abundanz der Transkripte der anderen Gene war unverändert.

Um zu untersuchen, ob *rock1* neben dem Einfluss auf den Cytokininstatus des Sprosses auch Auswirkungen auf die Cytokininsensitivität hat, wurde die Induzierbarkeit von *ARR7* durch Cytokinin im Spross mittels qPCR untersucht. In nicht induzierten *rock1-1* Sprossen war die Transkriptabundanz von *ARR7* 34 % höher als im Wildtyp. Nach der Induktion mit 500 nM Benzyladenin war sie um 42 % höher als im Wildtyp (Abb. 14H). Dies ergibt eine nicht signifikante leicht erhöhte Zunahme um das 9,6-fache in *rock1-1* verglichen mit dem 9,1-fachen im Wildtyp.

3.3.5.2 Analyse der Auswirkungen von *rock1* auf den Cytokinengehalt

Die Überexpression von *CKX1* führte zu einer starken Verringerung des Cytokinengehaltes (Werner et al., 2003). Die *rock1-1 35S:CKX1* Pflanzen, die eine starke phänotypische Reversion des Sprossphänotyps hin zum Wildtypphänotyp zeigten, enthielten überraschenderweise in einer ersten Messung lediglich 11 % mehr Cytokinin als die *35S:CKX1* Pflanzen, was weniger als ein Drittel des Cytokinengehalts des Wildtyps war (Tab. 15, Experiment 1; Niemann, 2008). Auch eine zweite Messung

des Cytokiningehalts ergab ähnlich schwache Auswirkungen von *rock1-1* auf den Gesamtzytokiningehalt. Während in den *35S:CKX1* Keimlingen 44 % des Gesamtzytokiningehaltes des Wildtyps vorlagen, betrug dieser in *rock1-1 35S:CKX1* Keimlingen mit 46 % des Wildtypgehalts lediglich 4 % mehr (Tab. 15, Experiment 2). Da *rock1* möglicherweise stärkere Auswirkungen auf den Cytokininstatus im Spross als in der Wurzel hat (Kapitel 3.3.5.1), wurde der Cytokiningehalt im Spross von Keimlingen verglichen. Es zeigte sich, dass dieser in den *35S:CKX1* Sprossen noch stärker verringert war als bei Messung des gesamten Keimlings und lediglich 4 % des Wildtyps betrug (Tab. 15, Experiment 3). Im Vergleich dazu war der Cytokiningehalt in den *rock1-1 35S:CKX1* Sprossen mit 19 % des Wildtypwertes fast fünfmal höher. Diese Messungen bestätigten also, dass der Cytokiningehalt in *rock1-1 35S:CKX1* Pflanzen weiterhin stark reduziert ist. Gleichzeitig zeigte sich aber, dass *rock1-1* im *35S:CKX1* Hintergrund zu einer starken Erhöhung des Cytokiningehalts im Spross führte, während diese Erhöhung im ganzen Keimling deutlich schwächer ausfiel. Da *rock1* zu einer erhöhten Aktivität des generativen Sprossmeristems führte (Kapitel 3.3.4), wurde auch im Sprossapex der Cytokiningehalt verglichen. Dieser war in den *35S:CKX1* Pflanzen auf 21 % des Wildtypgehalts verringert. *rock1-1* führte dazu, dass der Cytokiningehalt sich in *35S:CKX1* mehr als verdoppelt und 45 % des Wildtypgehalts erreichte. Somit lässt sich sagen, dass *rock1-1* im Spross der Pflanze stärkere Auswirkungen auf den in Folge der Überexpression von *CKX1* reduzierten Cytokiningehalt hat als in der Wurzel. Bei Vorliegen von *rock1* ohne die gleichzeitige Überexpression von *CKX1* war der Cytokiningehalt in allen vier Experimenten zwischen 8 % und 44 % höher als beim Wildtyp, ohne dass klare gewebeabhängige Unterschiede zu erkennen gewesen wären (Tab. 15).

Tabelle 15. Auswirkung von Mutationen in *ROCK1* auf den Cytokiningehalt.

| | Experiment 1 | Experiment 2 | Experiment 3 | Experiment 4 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>35S:CKX1</i> | 27 | 44 | 4 | 21 |
| <i>rock1-1 35S:CKX1</i> | 30 | 46 | 19 | 45 |
| <i>rock1-1</i> | 119 | 144 | 117 | 113 |
| <i>rock1-2</i> | 138 | 139 | 108 | 135 |

Angegeben ist der relative Anteil der Summe aller gemessenen Cytokininmetaboliten vom tZ-, cZ- und iP-Typ bezogen auf den Wildtyp (in Prozent).

Verwendetes Material: Experiment 1, ganze Keimlinge 7 TNK; Experiment 2 ganze Keimlinge 9 TNK; Experiment 3, Sprosse von Keimlingen 10 TNK; Experiment 4, Blütenstände vier Wochen alter Pflanzen inklusive Blüten bis Stadium 15 (nach Smyth *et al.*, 1990).

Die genauere Analyse der Veränderungen bei den verschiedenen Cytokininmetaboliten ergab, dass die Zunahme des Gesamtzytokiningehaltes nicht auf Grund der gestiegenen Konzentration von einigen wenigen Metaboliten oder Gruppen von Metaboliten bewirkt wurde, sondern dass es bei den meisten Metaboliten zu einem Anstieg kam (Abb. 15). Am häufigsten wurden Zunahmen bei den Ribosiden, N9-Glukosiden und Cytokininnukleotiden gemessen. Ein weiterer beobachteter Trend ist eine stärkere Zunahme bei den tZ- und iP-Metaboliten als bei den cZ-Metaboliten. Beispielsweise war die Konzentration von cZOG im *35S:CKX1* Hintergrund durch *rock1-1* nicht erhöht und im Wildtyphintergrund sogar durch *rock1* verringert worden (Abb. 15).

Die biologisch aktiven freien Cytokininbasen zeigten hingegen geringere Veränderungen. Während der Vergleich der Messung der Infloreszenzen von *35S:CKX1* und *rock1-1 35S:CKX1* bei allen Cytokininbasen eine Steigerung bedingt durch *rock1* zeigte, waren diese beim Vergleich von *rock1* mit dem Wildtyp unverändert. Im Spross

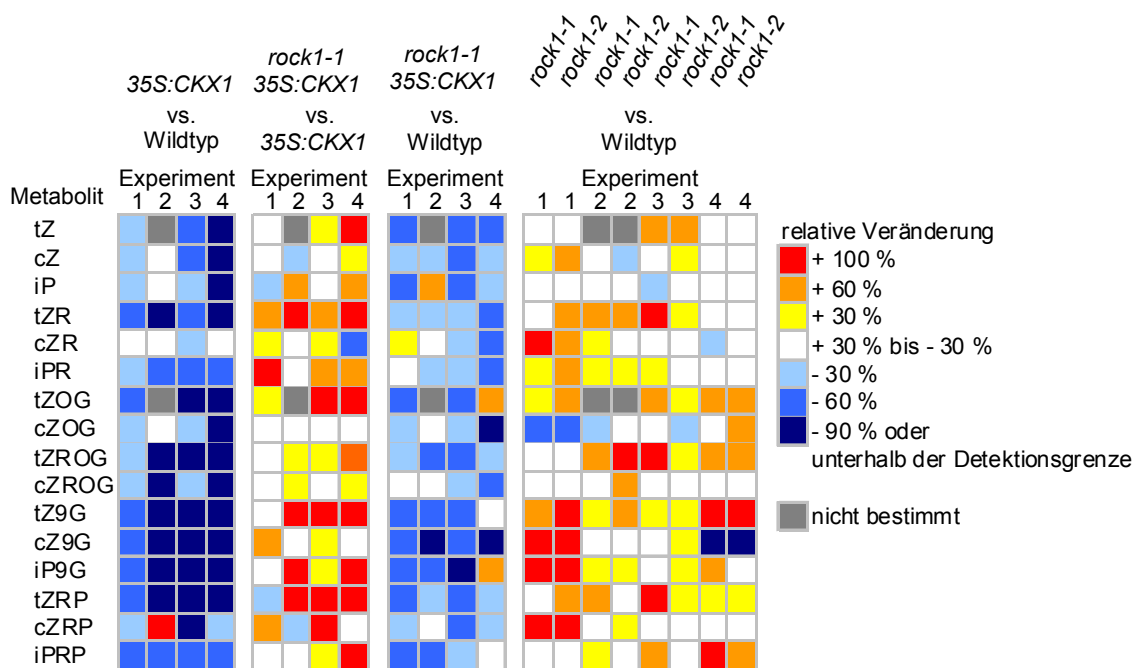


Abbildung 15. Auswirkungen der *rock1* Mutation auf den Cytokiningehalt in Arabidopsispflanzen.

Der Cytokiningehalt von Mutantpflanzen wurde in unabhängigen Experimenten bestimmt und mit dem in Wildtyppflanzen bzw. *35S:CKX1* Pflanzen verglichen. Es wurden verschiedene Gewebe analysiert: Experiment 1, ganze Keimlinge 7 TNK; Experiment 2 ganze Keimlinge 9 TNK; Experiment 3, Sprosse von Keimlingen 10 TNK; Experiment 4, Blütenstände vier Wochen alter Pflanzen einschließlich Blüten im Stadium 15. Es handelt sich jeweils um die relative Darstellung des Mittelwerts von jeweils drei technischen Replikaten der Cytokininmessungen bezogen auf Wildtyp oder *35S:CKX1* (in Prozent). Die vollständigen Namen der Cytokininmetabolite können dem Abkürzungsverzeichnis am Beginn der Arbeit entnommen werden.

war von den Cytokininbasen tZ sowohl beim Vergleich von *35S:CKX1* mit *rock1-1 35S:CKX1* als auch beim Vergleich von Wildtyp mit *rock1* erhöht. iP hingegen blieb unverändert oder war geringfügig verringert (Abb. 15).

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der gesteigerte tZ Gehalt ursächlich für den gesteigerten Cytokininstatus im Spross und möglicherweise die Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms durch *rock1-1* ist.

3.3.6 Untersuchung der Spezifität der Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms durch *rock1*

Der Verlust von *ROCK1* revertiert das durch Überexpression von *CKX1* bewirkte Cytokinindefizienzsyndrom. Mit Hilfe eines genetischen Ansatzes wurde untersucht, an welcher Stelle der Regulation und Vermittlung der Cytokininaktivität *ROCK1* beteiligt ist. Hierzu wurde *rock1* in Pflanzenlinien eingekreuzt, die auf Grund von Veränderungen bei Abbau, Wahrnehmung oder Synthese von Cytokininen ein Cytokinindefizienzsyndrom zeigen, und untersucht, ob dieses revertiert wird.

3.3.6.1 Der Verlust von *ROCK1* führt zu einem Verlust der Aktivität von CKX1, CKX2 und CKX3, nicht jedoch von CKX7

Es existieren sieben Isoformen der CKX Enzyme in Arabidopsis mit Unterschieden in den Expressionsdomänen, der Substratspezifität und der subzellulären Lokalisation (Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007; Köllmer, 2009). CKX1 bis CKX6 haben gemein, dass für sie eine Lokalisation oder ein Transport durch das sekretorische System vorhergesagt und gezeigt worden ist (Werner *et al.*, 2003). Die Ausnahme bildet CKX7, welches im Cytosol lokalisiert (Köllmer, 2009). Letzteres unterscheidet sich zudem von den anderen Isoformen darin, dass die Überexpression einen konträren Einfluss auf das Wurzelwachstum hat. Bei der Auswahl der Isoformen, bei denen die Konsequenzen der *rock1* Mutation auf den Überexpressionsphänotyp untersucht wurden, sollte ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Eigenschaften abgedeckt werden. CKX2 lokalisiert im Apoplasten (Werner *et al.*, 2003), hat bei *in vitro* Messungen eine sehr hohe Enzymaktivität (Galuszka *et al.*, 2007), *35S:CKX2* Pflanzen zeigen jedoch einen vergleichsweise milden Cytokinindefizienzphänotyp (Werner *et al.*, 2003). CKX1 und CKX3 hingegen lokalisieren im ER und der Vakuole

(Werner et al., 2003), sie zeigen nur eine niedrige Aktivität *in vitro* (Galuszka et al., 2007), die Überexpression der Gene führt jedoch zu einem starken Cytokinindefizienzphänotyp (Werner et al., 2003). Zudem wurde CKX7 auf Grund der oben erwähnten Eigenschaften untersucht.

In allen Fällen wurde das Allel *rock1-1* in die verschiedenen CKX Überexpressionslinien eingekreuzt und doppelt homozygote Linien isoliert. Es zeigte sich, dass *rock1-1* die Auswirkungen der Überexpression von CKX2 und CKX3 auf den Spross fast vollständig revertiert (Abb. 16A und B). Der durch CKX7 Überexpression bewirkte Wurzelphänotyp wird jedoch nicht revertiert (Abb. 16C und D). Um auszuschließen, dass in den untersuchten Linien die phänotypische Reversion durch eine verringerte Expression des 35S:CKX1, 35S:CKX2 bzw. 35S:CKX3 Transgens nach Einkreuzung von *rock1-1* zustande kommt, wurde die Transkriptmenge des jeweiligen Transgens mittels qPCR verglichen. Es zeigte sich, dass hierbei keine signifikanten Unterschiede existieren (Abb. 16E). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *rock1-1* die CKX Aktivität im Rohextrakt von 35S:CKX1 Pflanzen verringert (Niemann, 2008). Der verwendete CKX Enzymassay wurde optimiert und die Abhängigkeit der CKX Aktivität von der *rock1-1* Mutation in allen drei revertierten Linien untersucht. Es zeigte sich, dass *rock1-1* in allen drei Linien zu einer stark verringerten CKX Aktivität führt. Das Ausmaß der Reduktion unterschied sich zwischen den Isoformen, CKX1 und CKX3 wurden fast bis bzw. bis zum Wildtypniveau reduziert (Abb. 16F).

Zu Abbildung 16.

(A) und (B) *rock1-1* führt zu einer phänotypischen Reversion des durch CKX2 oder CKX3 Überexpression hervorgerufenen Cytokinindefizienzsyndroms. (A) Phänotyp und (B) Quantifizierung des Rosettendurchmessers von auf Erde angezogenen homozygoten Linien 17 TNK. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, $n \geq 15$. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp, t-Test, $p < 0,05$.

(C) und (D) Die *rock1-1* Mutation revertiert den durch CKX7-GFP Überexpression hervorgerufenen Wurzelphänotyp nicht. (C) Phänotyp von *in vitro* angezogenen Arabidopsiskeimlingen 9 TNK. (D) Messung des Wachstums der Hauptwurzel zwischen Tag 2 und 9 nach der Keimung. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, $n \geq 9$.

(E) Die Transkriptmenge des jeweiligen CKX Transgens wird durch die *rock1-1* Mutation nicht beeinflusst. Die Bestimmung der Transkriptabundanz erfolgte mittels qPCR und wurde gegen die Transkriptmenge von β -Tubulin normalisiert. Gezeigt sind die relative Transkriptabundanz \pm obere und untere Grenze basierend auf dem Mittelwert von drei technischen Replikaten der qPCR-Reaktion.

(F) Die relativen CKX Aktivitäten sind in allen drei revertierten CKX Überexpressionslinien im Vergleich zur jeweiligen Ausgangslinie reduziert. Es wurde die CKX Aktivität in Proteinextrakten von Keimlingen unter Verwendung von iP9G (CKX1) bzw. iP (CKX2 und CKX3) als Substrat bestimmt. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung relativ zum Wildtyp, $n = 3$.

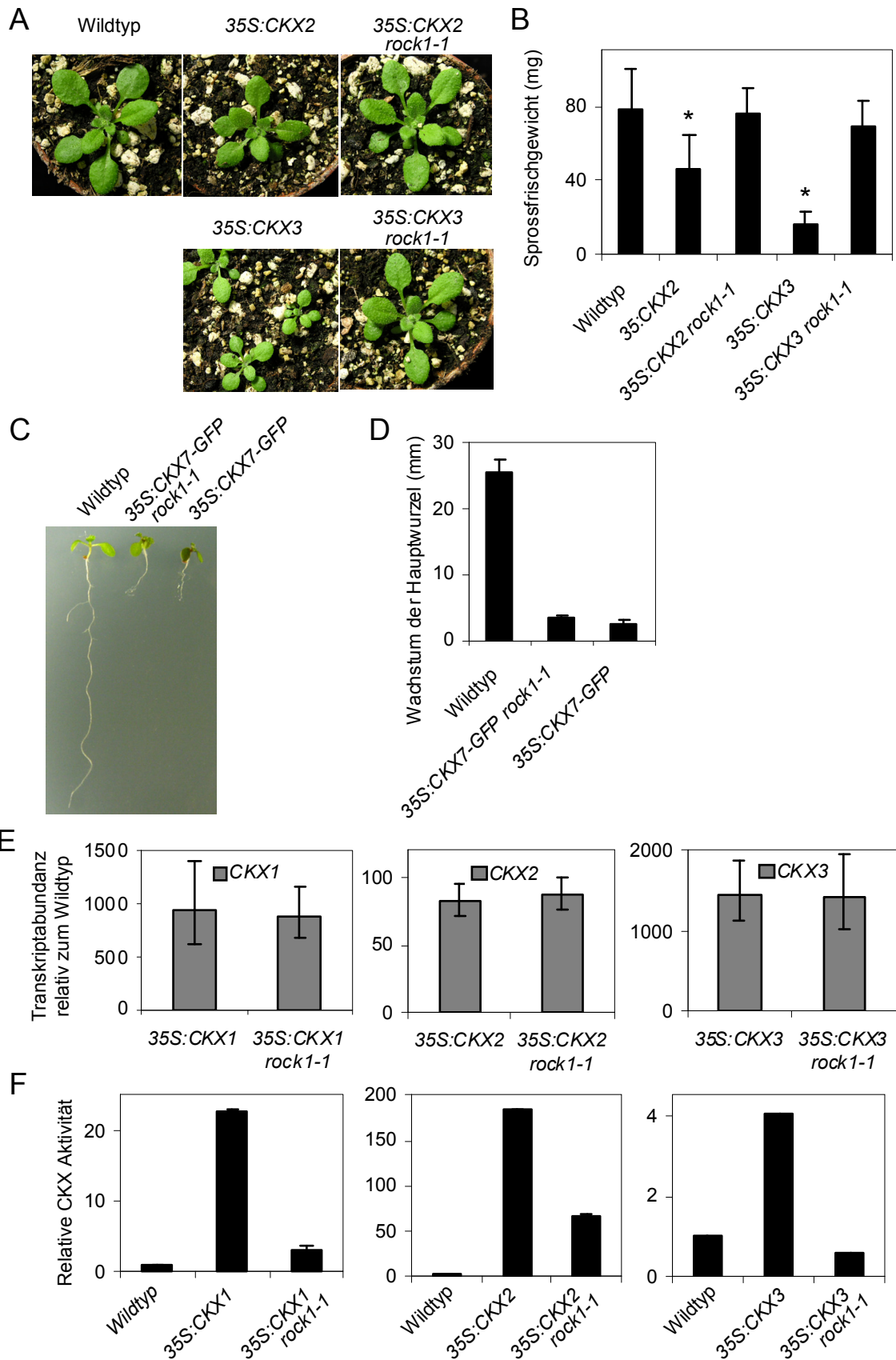


Abbildung 16. Auswirkungen der *rock1* Mutation auf die Aktivität unterschiedlicher CKX Isoformen.

Bei CKX2 hingegen war noch ein Drittel der erhöhten Aktivität der Ausgangslinie vorhanden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Konsequenzen des Ausfalls von *ROCK1* auf CKX1, CKX2 und CKX3 ähnlich sind. Es kommt zum Verlust der erhöhten CKX Aktivität, was einhergeht mit der Reversion des Cytokinindefizienzphänotyps. Der *CKX7* Überexpressionsphänotyp hingegen wird nicht revertiert.

3.3.6.2 *rock1* benötigt für die Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms eine funktionierende Cytokininsignalweiterleitung

Die vorherigen Ergebnisse deuten auf eine direkte Beteiligung von ROCK1 an der Regulation der CKX Enzyme, die sich im sekretorischen System befinden, hin. Die Lokalisierung der Cytokininrezeptoren innerhalb des ERs und der Plasmamembran weist auf die Bedeutung dieser Kompartimente für die Cytokininsignalverarbeitung hin (Wulfetange *et al.*, 2011). Unterschiedliche Kombinationen an Mutantenallelen von Cytokininrezeptorgen führen zu unterschiedlichen Ausprägungen des Cytokinindefizienzsyndroms (Riefler *et al.*, 2006). Um herauszufinden, ob *ROCK1* einen über die Regulation bestimmter CKX Isoformen hinausgehenden Einfluss auf die Cytokininwirkung hat, wurde untersucht, ob *rock1* auch das Cytokinindefizienzsyndrom im Spross der Rezeptormutanten revertiert. *rock1-2* wurde in den *ahk2 ahk3* Hintergrund (Riefler *et al.*, 2006) eingekreuzt. Pflanzen mit dieser Allelkombination der Rezeptormutationen entwickeln auf Grund von verringerter Zellteilung kleinere Rosettenblätter, haben aber ein unverändertes Plastochron und blühen zur selben Zeit wie Wildtyppflanzen. Zusätzlich wurde *rock1-2* in den *ahk2 ahk3 cre1* Hintergrund eingekreuzt, welcher ein stärkeres Cytokinindefizienzsyndrom sowohl in Form einer noch kleineren Rosette als auch einer verspäteten Blühinduktion zeigt. Homozygote Linien wurden isoliert und der Sprossphänotyp untersucht. Es zeigte sich, dass die *rock1* Mutation im *ahk2 ahk3* Hintergrund zu sich schneller entwickelnden Pflanzen führte (Abb. 17A), die im Vergleich mit den *ahk2 ahk3* Pflanzen ein um 39 % erhöhtes Frischgewicht besaßen (Abb. 17B). Dennoch besaßen die *ahk2 ahk3 rock1-2* Pflanzen weiterhin nur die Hälfte des Frischgewichtes des Wildtyps. Im *ahk2 ahk3 cre1* Hintergrund führte *rock1-2* zu keiner sichtbaren Veränderung des Sprossphänotyps (Abb. 17C) und die Messung des Frischgewichts ergab keine Veränderung zur Ausgangslinie *ahk2 ahk3 cre1-2* (Abb. 17D).

Der Verlust von *ROCK1* revertierte teilweise die Auswirkungen des Verlusts von zwei Cytokininrezeptoren auf den Sprossphänotyp, bei Abwesenheit aller drei Cytokininrezeptoren hatte *rock1-2* jedoch keinen Effekt. Die Auswirkungen des Verlustes von *ROCK1* traten also nur auf, wenn zumindest eine rudimentäre Cytokininsignalweiterleitung vorhanden war. Dies deutet darauf hin, dass *rock1* durch diese und nicht nach der Perzeption des Cytokininsignals wirkt.

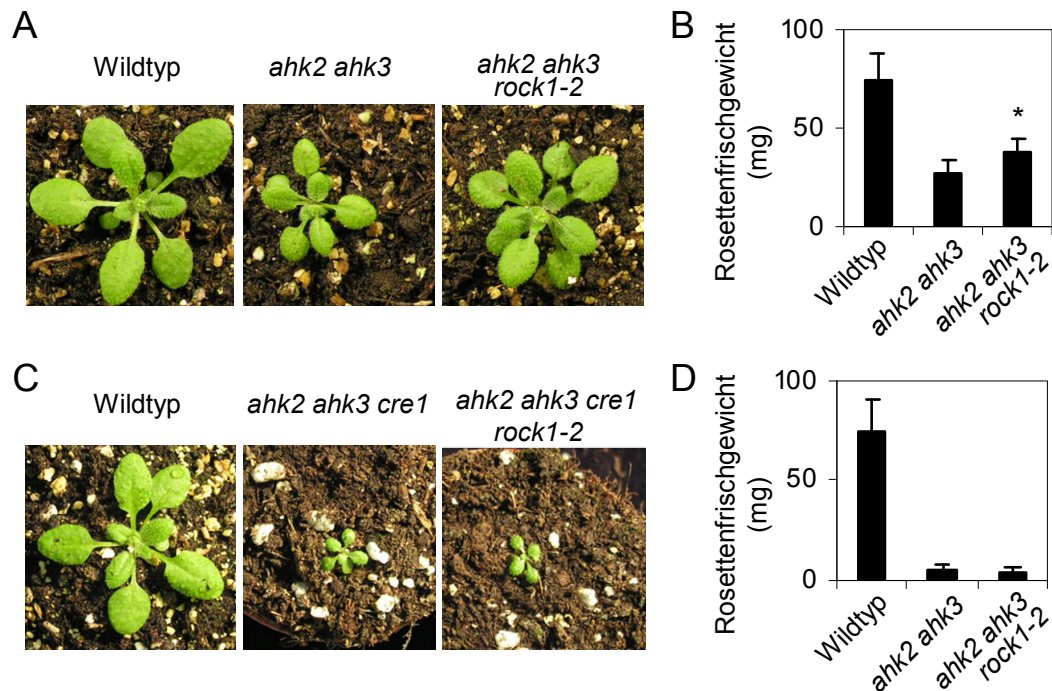


Abbildung 17. Auswirkungen des Verlustes von *ROCK1* in Pflanzen mit verringerter Cytokininsignalweiterleitung.

(A) und (B) Untersuchung der Auswirkung des Verlustes von *ROCK1* im *ahk2 ahk3* Hintergrund. (A) Vergleich des Phänotyps und (B) Bestimmung des Frischgewichtes der Rosette von auf Erde angezogenen Pflanzen 21 TNK.

(C) und (D) Untersuchung der Auswirkung des Verlustes von *ROCK1* im *ahk2 ahk3 cre1* Hintergrund. (C) Vergleich des Phänotyps und (D) Bestimmung des Frischgewichtes der Rosette von auf Erde angezogenen Pflanzen 20 TNK.

Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung, $n \geq 12$. Der Stern markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den mutanten Linien (t-Test, $p < 0,05$).

3.3.6.3 Der Verlust von *ROCK1* revertiert nicht die durch Verlust der Biosynthese bewirkte Cytokinindefizienz

Die vorherigen Experimente haben gezeigt, dass der Verlust von *ROCK1* vor der Perzeption des Cytokininsignals wirkt und dass eine mögliche Ursache für den erhöhten Cytokininstatus die Verringerung der Aktivität von CKX Enzymen ist. Der gleichzeitige Verlust mehrerer Cytokininsynthesegene (*IPT*) führte wie die Überexpression von *CKX*

Genen zu einem verringerten Cytokiningehalt und zu Pflanzen, die das Cytokinindefizienzsyndrom zeigen. *ipt3 ipt5 ipt7* Pflanzen haben unter anderem den typischen kleinen Rosettendurchmesser und ein verlängertes Plastochron (Miyawaki *et al.*, 2006). Der zusätzliche Verlust von *IPT1* verstärkt diese phänotypische Veränderung (Miyawaki *et al.*, 2006). Es wurden die Auswirkungen von *rock1* auf das Cytokinindefizienzsyndrom der *ipt* Mutanten untersucht, um weitere Hinweise auf die Wirkungsweise von *ROCK1* bei der Modifikation des Cytokininstatus zu erhalten.

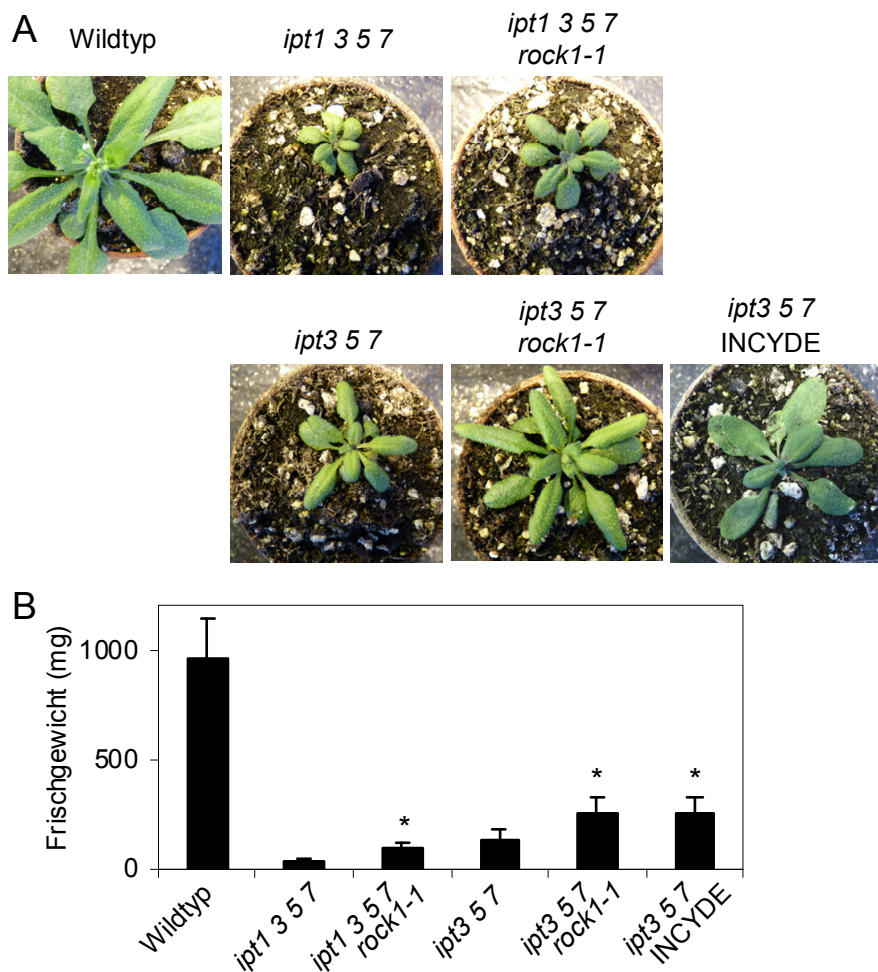


Abbildung 18. Der Verlust von *ROCK1* führt zu einer schwachen Suppression des durch Verlust der Cytokininbiosynthese bewirkten Cytokinindefizienzsyndroms.

(A) Vergleich des Phänotyps von Pflanzen des Wildtyps mit dem von *ipt* Mehrfachmutanten mit oder ohne zusätzlicher *rock1-1* Mutation 26 TNK. Für die Bestimmung des Anteils der CKX Aktivität am Phänotyp von *ipt3 ipt5 ipt7 rock1-1* wurde *ipt3 ipt5 ipt7* mit INCYDE, einem chemischen Inhibitor der CKX Aktivität, behandelt.

(B) Bestimmung des Frischgewichtes des Sprosses von auf Erde angezogenen Pflanzen 26 TNK, $n \geq 9$. Der Stern markiert signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen *ipt* Linien mit und ohne *rock1-1* bzw. mit INCYDE Behandlung (t-Test, $p < 0,05$).

rock1-1 wurde in die *ipt1 ipt3 ipt5 ipt7* Vierfachmutante eingekreuzt und mittels Genotypisierung die stabile Vierfachmutante *ipt3 ipt5 ipt7 rock1-1* und die Fünffachmutante *ipt1 ipt3 ipt5 ipt7 rock1-1* isoliert. Der Vergleich des Phänotyps von Pflanzen dieser Linien mit dem der entsprechenden Ausgangslinien und des Wildtyps zeigte eine Vergrößerung des Sprosses durch *rock1-1* (Abb. 18A).

Obwohl *rock1-1* das Frischgewicht des Sprosses von *ipt1 ipt3 ipt5 ipt7* um 155 % und von *ipt3 ipt5 ipt7* um 91 % erhöhte (Abb. 18B), war der Spross viel kleiner als beim Wildtyp. Die Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms war deutlich schwächer als in den *35S:CKX* Linien und somit scheint *rock1* primär Auswirkungen auf die Aktivität der CKX Enzyme zu haben. Um zu analysieren, ob die teilweise Suppression des *ipt* Mutantenphänotyps durch eine verringerte CKX Aktivität verursacht werden konnte, wurden die *ipt3 ipt5 ipt7* Pflanzen mit INCYDE, einem chemischen Inhibitor der CKX Aktivität (Zatloukal *et al.*, 2008), behandelt. Dies führte zu Pflanzen mit größeren Rosettenblättern (Abb. 18A) und einer signifikanten Zunahme des Frischgewichtes (Abb. 18B). Die Auswirkungen von INCYDE und *rock1-1* auf *ipt3 ipt5 ipt7* unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 18B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beobachtete Zunahme des Frischgewichtes in der Linie *ipt3 ipt5 ipt7 rock1-1* zum größten Teil durch eine Verringerung der CKX Aktivität bewirkt wurde.

3.4 Die Überexpression von *ROCK1* beeinflusst die pflanzliche Entwicklung und teilweise auch die Cytokininsensitivität

Die Analyse von Funktionsverlustmutanten kann Hinweise auf die Bedeutung eines Gens für physiologischen Prozesse und die pflanzliche Entwicklung liefern. Das Vorhandensein von Genen mit teilweise redundanter Funktion begrenzt diese Erkenntnismöglichkeit jedoch. Dieses Problem der Funktionsmaskierung spielt bei der Analyse der Konsequenzen einer gezielten Überexpression eines Gens keine Rolle. Somit kann dieser komplementäre Ansatz Hinweise auf die biochemische Aktivität des Genproduktes liefern, lässt gleichzeitig jedoch nur eingeschränkte Aussagen über die Entwicklungsprozesse zu, an denen das Gen selber beteiligt ist.

3.4.1 Morphologische Beschreibung der 35S:ROCK1 Pflanzen

Die Überexpression des *ROCK1* Gens unter der Kontrolle des starken 35S Promotors des Tabakmosaikvirus führte zu Pflanzen mit verringertem Wachstum der Rosettenblätter, verfrüht einsetzender Blattseneszenz und in den stärksten Linien zu einer dosisabhängigen Letalität im frühen Keimlingsstadium (Niemann, 2008). Um untersuchen zu können, inwieweit der *ROCK1* Überexpressionsphänotyp mit einem veränderten Cytokininstatus zusammenhängt, wurden stabile Überexpressionslinien etabliert. Die Linien *35S:ROCK1-10* und *35S:ROCK1-17* zeigten die stärksten phänotypischen Veränderungen ohne Ausbildung einer dosisabhängigen Letalität. Der Vergleich der Abundanz des *ROCK1* Transkripts in Wildtyp und *35S:ROCK1-10* mittels qPCR zeigte eine ca. 300-fache Erhöhung in der transgenen Linie (Abb. 19A). Die Überexpression von *ROCK1* hatte Auswirkungen auf die Entwicklung von Spross und Wurzel. Beide *35S:ROCK1* Linien zeigten ein geringeres Wachstum der Rosettenblätter sowie eine verfrüht einsetzende Blattseneszenz (Abb. 19B). Die Erscheinungsform des Sprosses war verändert, da im Vergleich zum Wildtyp weniger als ein Drittel der axillären Seitensprosse gebildet wurden (Abb. 19C). Die Auswirkungen der *ROCK1* Überexpression auf die Zahl der vom Hauptspross abzweigenden Seitensprosse waren deutlich geringer (Abb. 19D). Die Sprosse wuchsen langsamer (Abb. 19B) und bildeten bis zum Blühzeitende ein Drittel weniger Blüten als der Wildtyp (Abb. 19E). *In vitro* war das Wachstum der Hauptwurzel um ca. 10 % verringert (Abb. 19F) und es wurden ca. 15 % weniger Seitenwurzeln gebildet (Abb. 19G).

3.4.2 Der 35S:ROCK1 Sprossphänotyp wird nicht durch einen verringerten Cytokininstatus bewirkt

Die in Kapitel 3.3.6 beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass der Verlust von *ROCK1* zu einer Verringerung der CKX Aktivität führt. Es ist folglich denkbar, dass ein Teil des mutanten Phänotyp von *35S:ROCK1* Pflanzen durch eine erhöhte CKX Aktivität und eine dadurch bedingte Cytokinindefizienz bewirkt wird. Um dies zu untersuchen, wurden die *35S:ROCK1* Pflanzen mit INCYDE, einem chemischen Inhibitor der CKX Aktivität (Zatloukal *et al.*, 2008), behandelt und die Auswirkungen

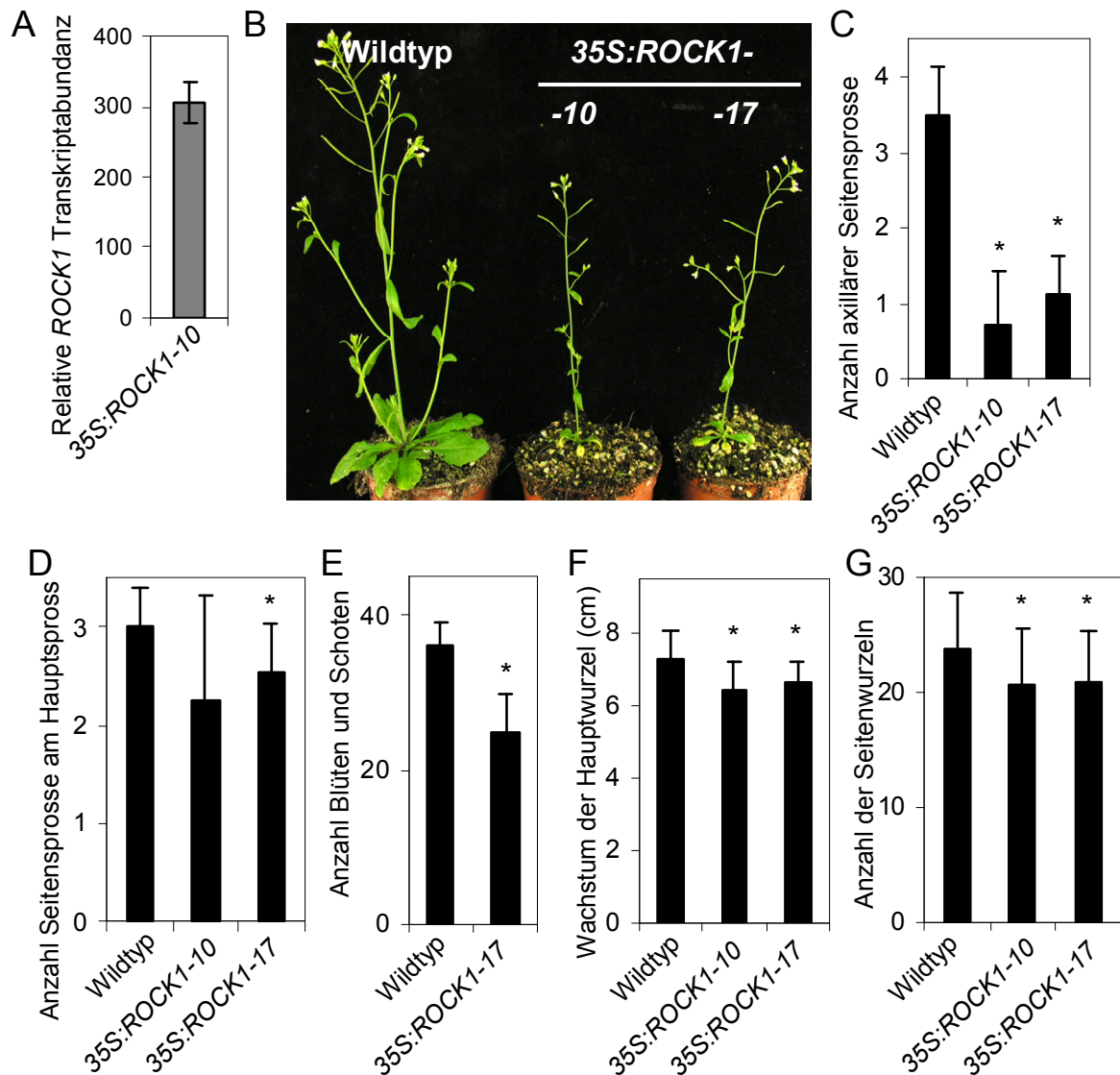


Abbildung 19. Morphologische Analyse der Auswirkungen der *ROCK1* Überexpression.

(A) Vergleich der Abundanz des *ROCK1* Transkriptes in der Linie *35S:ROCK1-10* mit dem Wildtyp mittels qPCR. Es wurden je Genotyp vier biologische Replikate einbezogen und β -*Tubulin* als Referenztranskript verwendet. Angegeben sind der Mittelwert \pm obere und untere Grenze der relativen Transkriptabundanz (Applied Biosystems, 2008).

(B) Sprossphänotyp von auf Erde angezogenen Pflanzen des Wildtyps und der Linien *35S:ROCK1-10* und *-17* 32 TNK.

(C) und (D) Anzahl der bis zum Blühzeitende gebildeten axillären Seitensprosse (C) bzw. vom Hauptspross abzweigenden Seitensprosse (D) bei Wildtyp und den beiden *35S:ROCK1* Linien. $n \geq 12$.

(E) Anzahl gebildeter Blüten und Schoten zum Blühzeitende bei Wildtyp und *35S:ROCK1-17*. $n \geq 12$.

(F) Wachstum der Hauptwurzel bei Wildtyp und den beiden *35S:ROCK1* Linien zwischen dem 4. und dem 14. TNK. $n \geq 20$.

(G) Anzahl an von der Hauptwurzel abgehenden Seitenwurzeln bei Wildtyp und den *35S:ROCK1* Linien 14 TNK. $n \geq 20$.

In (C) bis (D) sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Sterne in (C) bis (D) markieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp (t-Test, $p < 0,05$).

auf den mutanten Sprossphänotyp untersucht. Während der Cytokinindefizienzphänotyp im Spross der als Kontrolle mit untersuchten *35S:CKX1* Pflanzen durch die Behandlung fast vollständig unterdrückt wurde, waren die phänotypischen Veränderungen der *35S:ROCK1* Pflanzen unverändert vorhanden (Abb. 20A). Dies deutet darauf hin, dass der Sprossphänotyp der *35S:ROCK1* Pflanzen nicht durch eine erhöhte CKX Aktivität bewirkt wird.

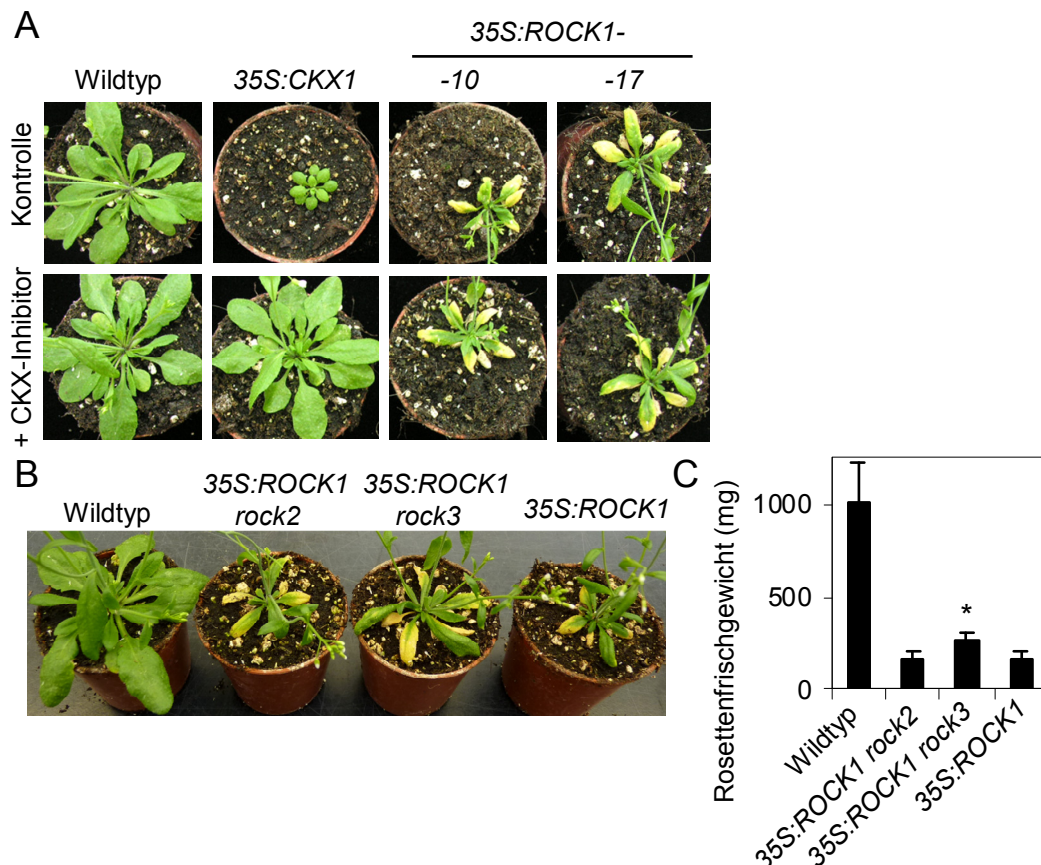


Abbildung 20. Der Sprossphänotyp von *35S:ROCK1* Pflanzen wird nicht durch einen verringerten Cytokininstatus bewirkt.

(A) Untersuchung der Auswirkungen von INCYDE, einem chemischen Inhibitors der CKX Aktivität, auf die Ausbildung des *35S:ROCK1* Phänotyps. Die behandelten Pflanzen wurden ab 5 TNK alle zwei Tage bis zum Beginn des Sprossens mit 10 μ M INCYDE gesprüht.

(B) Auswirkungen von *rock2* bzw. *rock3* auf den *35S:ROCK1* Phänotyp. Gezeigt sind homozygote Pflanzen 32 TNK.

(C) Vergleich des Rosettenfrischgewichtes von auf Erde angezogenen Pflanzen 32 TNK. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen, $n = 14$. Der Stern markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den Linien, die ein *35S:ROCK1* Transgen tragen (t-Test, $p < 0,05$).

Auf Grund des vorherigen Ergebnisses kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass der *35S:ROCK1* Phänotyp durch Cytokinindefizienz hervorgerufen wird. Deshalb wurde genetisch untersucht, ob Suppressormutationen der Cytokinindefizienz Einfluss

auf den *35S:ROCK1* Phänotyp haben. Die dominant aktiven Formen *rock2* und *rock3* der Cytokininrezeptoren AHK2 bzw. AHK3 unterdrücken effektiv das durch *CKX1* Überexpression hervorgerufene Cytokinindefizienzsyndrom (Bartrina, 2006; persönliche Mitteilung Dr. I. Bartina und H. Jensen). *35S:ROCK1* Pflanzen wurden mit *rock2* bzw. *rock3* Pflanzen gekreuzt und der Phänotyp von doppelt homozygoten Linien untersucht. Die beiden Linien *35S:ROCK1 rock2* und *35S:ROCK1 rock3* zeigten einen sich deutlich vom Wildtyp unterscheidenden Phänotyp, der annähernd identisch mit dem der *35S:ROCK1* Linie in Bezug auf verfrühte Seneszenz sowie Rosettengröße war (Abb. 20B). Die Messung des Rosettenfrischgewichts ergab für *rock2* keinerlei Einfluss auf den *35S:ROCK1* Phänotyp, während *rock3* zu einer geringen jedoch signifikanten Zunahme führte (Abb. 20C). Dennoch lag das Rosettenfrischgewicht der *35S:ROCK1 rock3* Pflanzen weiterhin deutlich näher an dem der *35S:ROCK1* Linie als an dem des Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass der Sprossphänotyp der *35S:ROCK1* Linien nicht auf Grund eines verringerten Cytokininstatus hervorgerufen wurde.

3.4.3 *35S:ROCK1* Pflanzen haben einen erhöhten Cytokiningehalt und eine teilweise erhöhte Cytokininsensitivität

Komplementär zu der Analyse, ob der *35S:ROCK1* Phänotyp durch einen verringerten Cytokininstatus hervorgerufen wird, wurde der Cytokiningehalt in den *35S:ROCK1* Pflanzen bestimmt. Der Gesamtgehalt an Cytokininmetaboliten des tZ-, cZ- und iP-Typs betrug bei Messung im gesamten Keimling in den *35S:ROCK1* Linien zwischen 97 % und 119 % des Wildtypniveaus und war tendenziell leicht erhöht (Tab. 16, Experiment 1 und 2). Da die stärksten beobachteten phänotypischen Veränderungen den Spross betrafen, wurde der Cytokiningehalt im Spross von Keimlingen verglichen. Dies zeigte ebenfalls eine leichte Erhöhung des Cytokiningehaltes gegenüber dem Wildtyp (Tab. 16, Experiment 3). Es ist bekannt, dass *rock1* Mutationen die Aktivität des Infloreszenzmeristems erhöht, die *35S:ROCK1* Pflanzen besitzen hingegen weniger Schoten am Ende ihres Lebenszyklus. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob bei diesem Aspekt des *35S:ROCK1* Phänotyps Cytokinin eine Rolle spielen könnte, wurde der Cytokiningehalt in den Blütenständen von *35S:ROCK1* Pflanzen gemessen. Die Messung ergab, dass in den Blütenständen der *35S:ROCK1* Pflanzen ein um 29 % bis 61 % höherer Cytokiningehalt als beim Wildtyp vorhanden war (Tab. 16, Experiment 4).

Tabelle 16. Cytokiningehalt in *35S:ROCK1* Pflanzen.

| | Experiment 1 | Experiment 2 | Experiment 3 | Experiment 4 |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>35S:ROCK1-10</i> | 97 | 107 | 114 | 129 |
| <i>35S:ROCK1-17</i> | 118 | 119 | 120 | 161 |

Angegeben ist der relative Anteil der Summe aller gemessenen Cytokininmetaboliten vom tZ-, cZ- und iP-Typ bezogen auf den Wildtyp (in Prozent).

Verwendetes Material: Experiment 1, ganze Keimlinge 7 TNK; Experiment 2 ganze Keimlinge 9 TNK; Experiment 3, Sprosse von Keimlingen 10 TNK; Experiment 4, Blütenstände vier Wochen alter Pflanzen inklusive Blüten bis Stadium 15 (nach Smyth *et al.*, 1990).

Die Überexpression von *ROCK1* hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen Cytokininmetabolite. Das Nukleosid und Nukleotid von iP lag in den *35S:ROCK1* Pflanzen bei sechs bzw. fünf von acht Messungen in einer um mindestens 30 % höheren Konzentration als beim Wildtyp vor (Abb. 21A). Bei iPR zeigten fünf der Messungen sogar eine Steigerung von über 60 %. Andere Metabolite, wie die freien Basen tZ, cZ und iP sowie das Ribosid cZR zeigten lediglich bei der Hälfte der Messungen einen um mindestens 30 % höheren Wert als der Wildtyp. Auffällig ist die deutliche Erhöhung der Konzentration an Ribosiden in den Blütenständen der

Zu Abbildung 21.

(A) Auswirkungen der *ROCK1* Überexpression auf den Cytokiningehalt in Arabidopsispflanzen. Der Cytokiningehalt von Mutantpflanzen wurde in unabhängigen Experimenten bestimmt und mit dem in Wildtyppflanzen verglichen. Es wurden verschiedene Gewebe analysiert: Experiment 1, ganze Keimlinge 7 TNK; Experiment 2 ganze Keimlinge 9 TNK; Experiment 3, Sprosse von Keimlingen 10 TNK; Experiment 4, Blütenstände vier Wochen alter Pflanzen einschließlich Blüten im Stadium 15. Es handelt sich jeweils um die relative Darstellung des Mittelwerts von jeweils drei technischen Replikaten der Cytokininmessungen bezogen auf den Wildtyp (in Prozent). Die vollständigen Namen der Cytokininmetabolite können dem Abkürzungsverzeichnis am Beginn der Arbeit entnommen werden.

(B) qPCR Analyse des Expressionsniveaus verschiedener Gene der primären Cytokininantwort und des Cytokininmetabolismus in Sprossen von *35S:ROCK1* und Wildtyp 9 TNK. Es wurden je Genotyp vier biologische Replikate einbezogen und *β-Tubulin* als Referenztranskript verwendet. Angegeben sind die relative Transkriptabundanz ± obere und untere Grenze der relativen Transkriptabundanz (Applied Biosystems, 2008). Die Sterne markieren signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$).

(C) Auswirkungen exogen applizierten Cytokinins auf das Sprosswachstum von *35S:ROCK1* und Wildtyppflanzen. Mittelwert und Standardabweichung des Frischgewichts des Sprosses von *in vitro* angezogenen Pflanzen 10 TNK. Es wurde jeweils das Gewicht einer Gruppe aus mindestens sechs Pflanzen zusammen bestimmt, $n \geq 8$ Gruppen.

(D) Reaktion der Hauptwurzel auf exogen appliziertes tZ zwischen Tag 4 und Tag 14 nach der Keimung und (E) Anzahl der Seitenwurzeln 14 TNK. $n \geq 17$. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den *35S:ROCK1* Linien (t-Test, $p < 0,05$).

35S:ROCK1 Pflanzen (Abb. 21A). Interessanterweise sind anders als bei *rock1* die meisten *O*- und *N*-Glukoside fast unverändert.

Um zu untersuchen, ob der erhöhte Cytokiningehalt zu einem erhöhten Cytokininstatus im Spross führt, wurde das Expressionslevel von Genen der primären Cytokininantwort

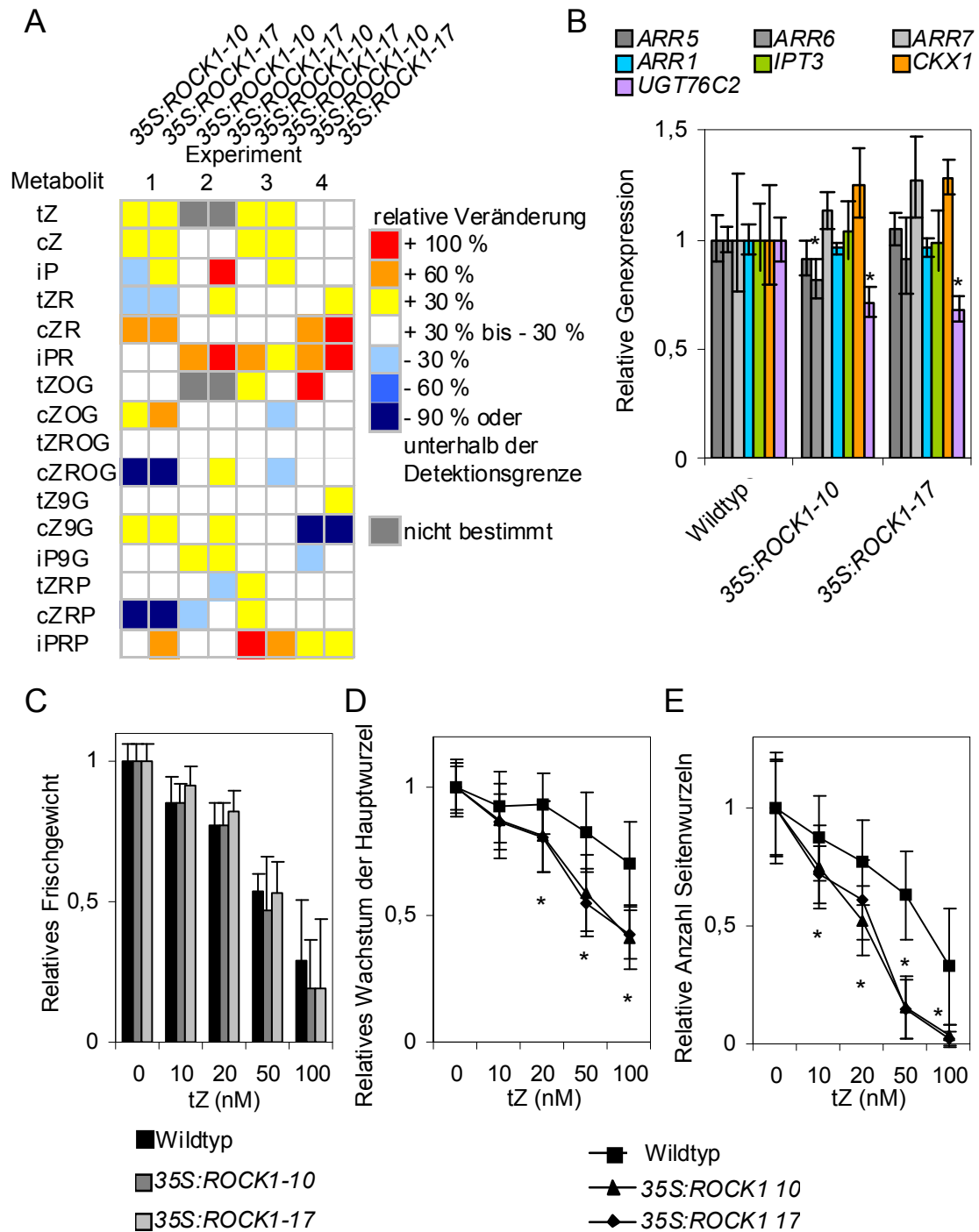


Abbildung 21. Auswirkungen der Überexpression von *ROCK1* auf den Cytokiningehalt und die Cytokininempfindlichkeit.

und am Cytokininmetabolismus beteiligter Gene im Spross mittels qPCR bestimmt. Keines der untersuchten Gene zeigte in den *35S:ROCK1* Pflanzen ein um mehr als 50 % vom Wildtyp abweichendes Expressionsniveau (Abb. 21B). Der größte signifikante Unterschied wurde bei dem Gen *UGT76C2* mit einer Verringerung um 32 % gemessen. Dieses kodiert für eine UDP-Glukose Glykosyltransferase, die an der *N*-Glukosylierung von Cytokinin beteiligt ist. Der einzige weitere signifikante Unterschied in der Transkriptabundanz wurde für *ARR6* gemessen, welche in der Linie *35S:ROCK1-10* um 20 % verringert war. Dies deutet darauf hin, dass im Keimlingsstadium der leicht erhöhte Cytokiningehalt zu keinem erhöhten Cytokininstatus im Spross der *35S:ROCK1* Pflanzen führt.

Ergänzend wurde die Reaktion des Sprosswachstums auf exogenes Cytokinin untersucht. Es zeigte sich, dass auch wenn die *35S:ROCK1* Pflanzen unter Kontrollbedingungen bereits nur ungefähr die Hälfte des Frischgewichtes des Wildtyps besaßen, dennoch beide Genotypen gleichermaßen durch Cytokinin im Wachstum des Sprosses gehemmt wurden (Abb. 21C). Der Spross von *35S:ROCK1* Pflanzen hatte also eine mit dem Wildtyp vergleichbare Cytokininsensitivität. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Sprossphänotyp nicht durch einen erhöhten Cytokininstatus bewirkt wurde.

Das verringerte Wurzelwachstum in den *35S:ROCK1* Linien könnte bedeuten, dass in den Wurzeln ein höherer Cytokininstatus vorliegt. Deshalb wurde die Reaktion des Wachstums der Hauptwurzel und der Bildung von Lateralwurzeln auf die Gabe exogenen Cytokinins bei den *35S:ROCK1* Linien und dem Wildtyp verglichen. Es zeigte sich, dass bei *35S:ROCK1* Pflanzen beide untersuchten Prozesse stärker als beim Wildtyp durch exogenes Cytokinin gehemmt wurden (Abb. 21D und E). Über den gesamten getesteten Bereich an Cytokininkonzentrationen reagierten die *35S:ROCK1* Pflanzen beim Wachstum der Hauptwurzel fast doppelt so stark wie der Wildtyp. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 100 nM tZ ist das Wachstum der Hauptwurzel in den *35S:ROCK1* Linien um 59 % reduziert, beim Wildtyp lediglich um 30 %. Die *35S:ROCK1* Pflanzen bildeten bei 100 nM tZ fast keine Seitenwurzeln mehr aus, der Wildtyp noch 63 % verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Bei beiden untersuchten Entwicklungsprozessen sind *35S:CKX1* Pflanzen resistenter gegenüber der Gabe exogenen Cytokinins (Werner et al., 2001). Dies könnte ein Hinweis auf einen erhöhten Cytokininstatus in der Wurzel sein, der bei den *35S:ROCK1* Pflanzen zu dem veränderten Wurzelphänotyp führte.

Der durch das Konstrukt *35S:ROCK1* hervorgerufene Phänotyp trat interessanterweise ebenfalls in *35S:ROCK1-GFP* Pflanzen auf (Daten nicht gezeigt). Die Maskierung des C-terminalen Dilysinmotivs von ROCK1 führt zu einer hauptsächlich Lokalisierung des Fusionsproteins im Golgi. Auch in den *35S:ROCK1-GFP* Pflanzen konnte entsprechend der Erwartung ein GFP-Signal in sehr beweglichen punktförmigen Strukturen, wie sie von Golgi-lokalisierten Proteinen bekannt sind, detektiert werden. Dies könnte ein möglicher Hinweis darauf sein, dass es für die Ausbildung des Überexpressionsphänotyps unwichtig ist, ob die erhöhte Abundanz an ROCK1 Proteinen im ER oder Golgi vorliegt.

3.5 Analyse des Cytokininmetabolismus nach Zugabe von tritiummarkiertem Cytokinin in *rock1* und *35S:ROCK1* Mutanten

rock1 hat einen negativen Einfluss auf die Aktivität verschiedener CKX Proteine und *rock1* Pflanzen hatten einen erhöhten Cytokiningehalt. Im Gegensatz dazu scheint der durch die Überexpression von *ROCK1* hervorgerufene Phänotyp nicht mit einem Cytokininmangel in Folge einer erhöhten CKX Aktivität in Zusammenhang zu stehen. Die *35S:ROCK1* Pflanzen hatten stattdessen sogar ebenfalls einen leicht erhöhten Cytokiningehalt. Aus diesem Grund wurde verglichen, ob in den Mutanten verschiedene an der Umwandlung von Cytokinin beteiligte Aktivitäten auf dieselbe Weise verändert oder unterschiedlich stark waren. Dies geschah über den Vergleich der Umwandlungsrate von exogen zugegebenem Cytokinin in verschiedene Cytokininmetabolite und Abbauprodukte.

Hierzu wurden Keimlinge des Wildtyps und der Linien *rock1-2* und *35S:ROCK1* mit tritiummarkiertem iP und iPR für zwei Stunden inkubiert und der Anteil der verschiedenen radioaktiv markierten Cytokininmetabolite und Abbauprodukte an der Gesamtheit der extrahierten Radioaktivität gemessen. Um eine bessere Auftrennung zu erreichen, wurden die Proben zuvor dephosphoryliert. Bei Gabe von iP war bereits nach zwei Stunden 56 % bzw. 58 % der aus dem Wildtyp und den *35S:ROCK1* Pflanzen extrahierten Radioaktivität in die Abbauprodukte Adenin und Adenosin überführt worden (Abb. 22A). Auch in den *rock1-2* Pflanzen war mit 40 % bereits ein großer Anteil des iP abgebaut worden, jedoch ist dies deutlich weniger als in den anderen Genotypen. Beim Wildtyp waren 26 % der extrahierten Radioaktivität *N7*- und *N9*-Glukoside von iP. Bei *rock1-2* war dieser Anteil mit 36 % signifikant mehr und in

den *35S:ROCK1* Pflanzen mit 18 % signifikant weniger. Beim Wildtyp machten iP, iPR und die iPRP lediglich 6 % der Radioaktivität aus, während dies in *rock1-2* und *35S:ROCK1* mit 11 % bzw. 12 % doppelt so viel war (Abb. 22A). Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass in *rock1-2* weniger Abbau vorhanden war, dafür aber eine erhöhte *N*-Glukosylierung, die jedoch am Ende den verringerten Abbau nicht vollständig kompensieren konnte. In den *35S:ROCK1* Pflanzen hingegen war der Abbau unverändert, jedoch die *N*-Glukosylierung verringert, was in der Summe zu ebenfalls mehr freier Cytokininbase, -ribosid oder -nukleotid führte.

Der Vergleich der Umwandlung von iPR zwischen den Mutanten führte zu einem teilweise anderen Ergebnis. Abbau und *N*-Glukosylierung waren geringer als bei iP. Der Anteil der Abbauprodukte an der extrahierten Radioaktivität unterschied sich nicht zwischen den drei Genotypen und machte ca. 40 % aus (Abb. 22B). Bei den *N*-Glukosiden war derselbe Trend zwischen den Genotypen wie bei iP zu beobachten. In *rock1-2* wurde ein signifikant höherer Anteil in *N*-Glukoside umgewandelt als im Wildtyp und in *35S:ROCK1* ein signifikant niedrigerer. Dies führte jedoch bei iP, iPR und die iPRP zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Genotypen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den *rock1-2* und *35S:ROCK1* Pflanzen unterschiedliche Mechanismen zu der Erhöhung des Cytokiningehalts führen.

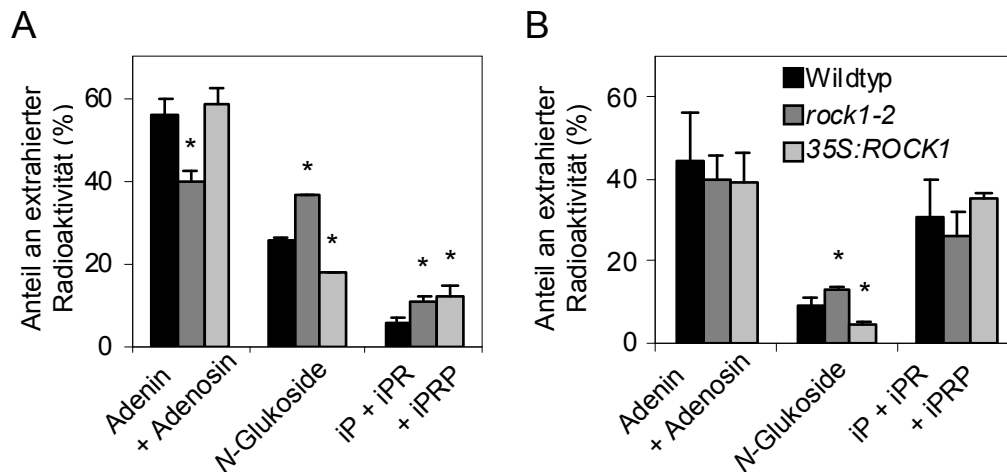


Abbildung 22. Vergleich des Metabolismus von iP und iPR bei Verlust und Überexpression von *ROCK1*.

Keimlinge wurden für 2 Stunden mit tritiummarkiertem iP (**A**) bzw. iPR (**B**) inkubiert und im Anschluss die Cytokinine extrahiert, für bessere Auftrennung dephosphoryliert, mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgetrennt und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen gemessen. Durch Vergleich der Retentionszeit mit Cytokininstandards wurde die Radioaktivität den Metaboliten zugeordnet. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen basierend auf drei technischen Replikaten. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp (t-Test, $p < 0,05$).

3.6 ROCK1 transportiert im heterologen Hefesystem UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc

Da ROCK1 eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Nukleotidzuckern besitzt, wurde die Fähigkeit von ROCK1 getestet, verschiedene Nukleotidzucker im heterologen System Hefe zu transportieren. Hierfür wurde eine transkriptionelle Fusion aus der 5' gelegenen Sequenz für das FLAG-Peptid und der *ROCK1* cDNA kloniert und in einem Hefeexpressionsvektor unter die Kontrolle eines kupferinduzierbaren Promotors gestellt (Ashikov *et al.*, 2005). Das Fusionskonstrukt wurde in Hefe exprimiert, die mikrosomale Fraktion bestehend aus ER- und Golgi-Vesikeln isoliert und die Messung der Aufnahme von tritiummarkierten Nukleotidzuckern in diese Vesikel durchgeführt. Beim Test von acht kommerziell erhältlichen und chemisch stabilen Nukleotidzuckern zeigte sich, dass sowohl die Aufnahme von UDP-GlcNAc als auch von UDP-GalNAc in die Hefemikrosomen bei Expression von *ROCK1* um das Dreifache bzw. mehr als Siebenfache zunimmt (Abb. 23). Eine Zunahme von 26 % besteht auch bei UDP-Glc, doch ist diese verglichen mit den anderen Substraten sehr gering. Die beiden GDP-Zucker GDP-Fukose und GDP-Mannose zeigen bei Überexpression von *ROCK1* eine um 47 % bzw. 30 % verringerte Aufnahme. Zusammen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc um die nativen Substrate von ROCK1 in der Pflanze handelt.

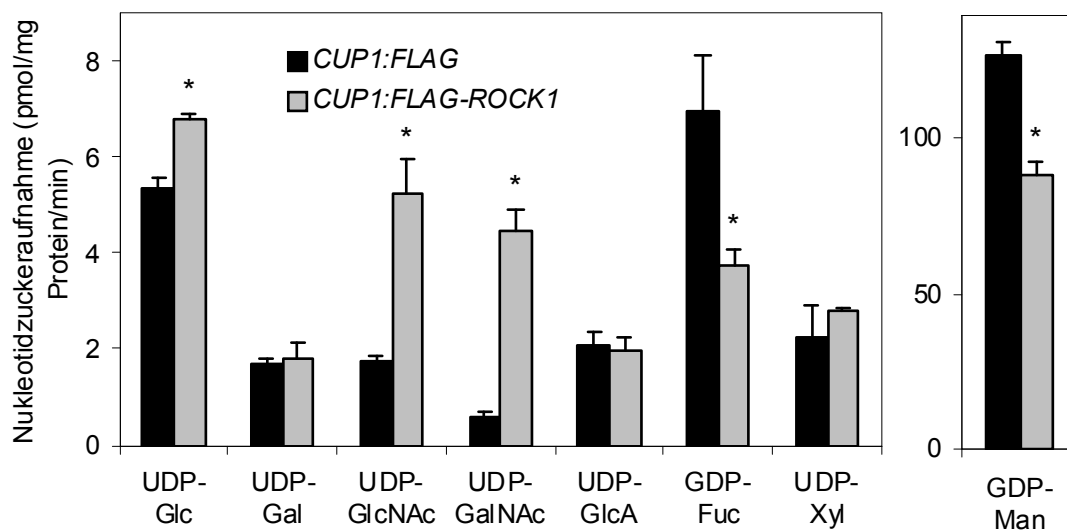


Abbildung 23. Die Expression von *ROCK1* führt zu einer erhöhten Aufnahme von UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc in Hefemikrosomen.

Aufnahme von verschiedenen tritiummarkierten Nukleotidzucker in mikrosomale Vesikel von Hefe nach Induktion der Expression von *FLAG* bzw. *FLAG-ROCK1*. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler. $n \geq 3$. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$).

3.7 Die *rock1* Mutation führt zu Veränderungen im Nukleotidzuckergehalt

Da ROCK1 die beiden Nukleotidzucker UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc transportieren kann, wurde der Gehalt der Nukleotidzucker in Geweben von *rock1* und *35S:ROCK1* Pflanzen bestimmt. Dies könnte Hinweise darauf liefern, ob ROCK1 *in planta* dieselben Substrate transportiert. Bei dieser Messung kann nicht zwischen der cytosolischen und der lumenalen Fraktion der Nukleotidzucker unterschieden werden. Einige Autoren gehen jedoch davon aus, dass der lumenale Anteil der Nukleotidzucker am Gesamtgehalt eher gering ist, da der Zuckeranteil des Nukleotidzuckers direkt nach dem Transport in das Lumen auf die Zielstruktur übertragen werden würde (Toma *et al.*, 1996). Somit reflektieren die gemessenen Werte höchstwahrscheinlich die cytosolische Nukleotidzuckerkonzentration.

Die Messung der Nukleotidzucker, für die chemisch stabile Standards kommerziell erhältlich waren, basierte auf einer Ionenpaarchromatographie (*ion pair chromatography*, IPC)-gekoppelter Massenspektrometrie (MS)-Analyse. Neben dem gesamten Keimling wurden die Nukleotidzuckergehalte im Spross des Keimlings sowie den Blütenständen gemessen.

Viele der Nukleotidzucker waren im Sprossgewebe von *rock1* Pflanzen leicht erhöht. Der nicht unterscheidbare Gehalt an UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc war in den verschiedenen Geweben zwischen 30 % und 97 % höher als im Wildtyp (Abb. 24A). Die größten Veränderungen traten jedoch mit Zunahmen um 49 % bis 116 % bei GDP-Fuc und um 20 % bis 104 % bei UDP-GalA auf. Es zeigte sich deutlich, dass *rock1* Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Nukleotidzuckergehalts der Zelle hat.

Die Messung des Gehalts der einzelnen Nukleotidzucker in den gleichen Geweben in *35S:ROCK1* Pflanzen zeigte ebenfalls Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 24B). Während viele der Nukleotidzucker im Spross leicht erhöht waren, waren sie in den Infloreszenzen leicht verringert. Die stärksten Unterschiede kamen in diesen Mutanten in Form einer Erhöhung bei ADP-Glc bei vier von fünf Messungen vor (bis zu + 91 %). Der relative Gehalt an UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc war hingegen kaum verändert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Veränderungen bei *ROCK1* zu unterschiedlich starken Veränderungen im endogenen Gehalt verschiedener Nukleotidzucker führen. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es sich bei dem von ROCK1 transportiertem Substrat um ein Nukleotidzucker handeln könnte. Der Gehalt an UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc war neben anderen Nukleotidzuckern in Geweben von *rock1*

Pflanzen erhöht, was darauf hindeutet, dass der ROCK1 vermittelte Transport dieser Metaboliten eingeschränkt sein könnte.

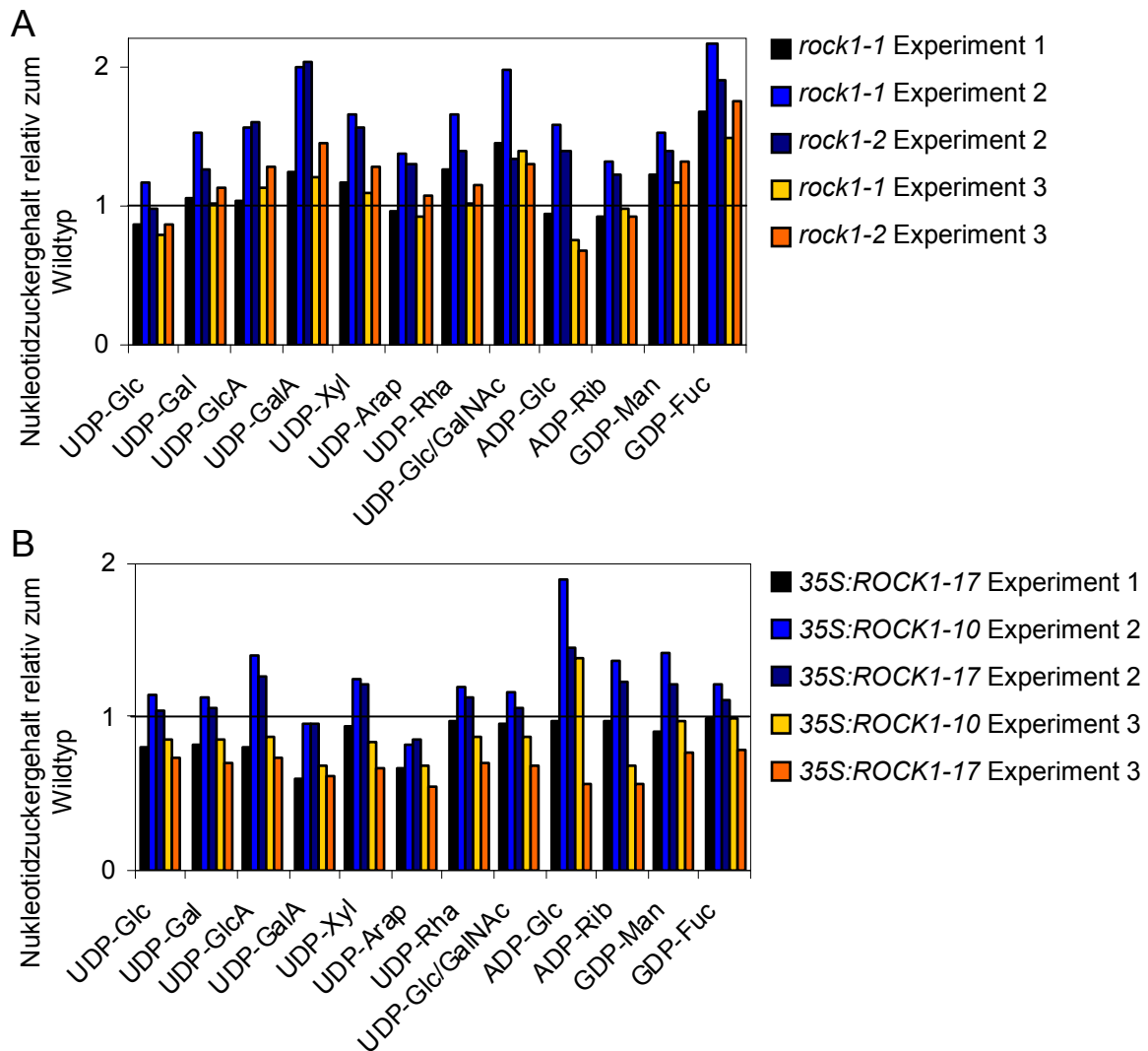


Abbildung 24. Vergleich der Auswirkungen von *rock1* bzw. der Überexpression von *ROCK1* auf den endogenen Nukleotidzuckergehalt.

(A) Vergleich der *rock1* Mutanten mit dem Wildtyp.

(B) Vergleich der *ROCK1* Überexpressionslinien mit dem Wildtyp.

In Experiment 1 wurden ganze Keimlingen 10 TNK, in Experiment 2 Sprosse 10 TNK und in Experiment 3 Blütenstände bis einschließlich Blüten im Stadium 18 analysiert. Es ist jeweils der Mittelwert des Gehalts relativ zum Wildtyp angegeben. Der Mittelwert basiert in Experiment 1 auf vier technischen Wiederholungen der Extraktion, Auftrennung und Messung einer biologischen Probe und in den Experimenten 2 und 3 auf zwei technischen Wiederholungen der Extraktion, Auftrennung und Messung einer biologischen Probe. Die vollständigen Namen der Nukleotidzucker können dem Abkürzungsverzeichnis am Beginn der Arbeit entnommen werden.

3.8 Untersuchung der Auswirkung von *rock1* auf die Protein *N*-Glykosylierung im Allgemeinen und die von CKX1 im Besonderen

Die eigenen experimentellen Daten zeigen zum einen eine Abhängigkeit der CKX Aktivität von einem intakten *ROCK1* Gen (Kapitel 3.3.6.1) und zum anderen eine Aktivität für ROCK1 als Nukleotidzuckertransporter (Kapitel 3.7). Diese deuten zusammen mit publizierten Hinweisen auf eine Bedeutung der Proteinglykosylierung für die CKX Aktivität (Motyka *et al.*, 1996; Franc *et al.*, 2012) auf eine mögliche Funktion von ROCK1 bei der Glykosylierung von CKX hin. Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, ob es sich bei CKX1 tatsächlich um ein Glykoprotein handelt, und ob die *rock1* Mutation direkte Auswirkungen auf die *N*-Glykosylierung oder auf die Proteinabundanz von CKX1 hat. Für die Synthese der mannosereichen Glykane werden keine Nukleotidzucker im ER-Lumen benötigt und für das bei der Reglukosylierung im Rahmen der Faltungskontrolle benötigte UDP-Glc sind Transporter bekannt. Da jedoch für die Modifizierung zu hybriden und komplexen Glykanen Nukleotidzucker benötigt werden, wurde mit genetischen Mitteln analysiert, in wie fern das Vorhandensein hybrider oder komplexer *N*-Glykane eine Voraussetzung für die Aktivität von CKX1 ist.

3.8.1 *rock1* verändert nicht die Abundanz und *N*-Glykosylierung von CKX1

Um den Glykosylierungsstatus und die Proteinabundanz von CKX1 analysieren zu können, wurde zunächst eine neue transgene Pflanzenlinie, in der ein Fusionskonstrukt aus *CKX1* und einem immunologisch nachweisbaren myc-Epitop exprimiert wird, etabliert. In der T1 Generation konnte eine *35S:myc-CKX1* Pflanze isoliert werden, die eine leicht verzögerte Entwicklung und ein geringfügig verringertes Rosettenwachstum verglichen mit dem Wildtyp zeigte (nicht gezeigt). Es wurde *rock1-1* eingekreuzt, stabile Linien etabliert und das Sprossfrischgewicht verglichen. Dieses war in der Linie *35S:myc-CKX1* um 24 % geringer und unterschied sich damit signifikant vom Wildtyp (Abb. 25A). Durch *rock1-1* wurde dieser signifikante Unterschied zum Wildtyp supprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten phänotypischen Veränderungen in den *35S:myc-CKX1* Pflanzen durch eine erhöhte CKX1 Aktivität bewirkt werden, die durch *rock1-1* supprimiert wird.

Um Hinweise auf die Ursache der Reduzierung der CKX1 Aktivität durch *rock1-1* zu erhalten, wurde das myc-CKX1 Fusionsprotein in Keimlingen beider Linien mittels

Immunoblot nachgewiesen und die Abundanz verglichen. In beiden Linien war ein gleich starkes Signal bei etwas unter 100 kDa detektierbar (Abb. 25B), was deutlich größer als die erwartete Größe von ca. 67 kDa (64,9 kDa CKX1 + 2 kDa myc-Peptid und Linker) war. Dies deutet darauf hin, dass *rock1-1* keinen Einfluss auf die Abundanz von CKX1 hat.

Um zu untersuchen, ob es sich bei CKX1 um ein *N*-glykosyliertes Protein handelt und ob *rock1-1* einen Einfluss auf die Form der *N*-Glykosylierung hat, wurde der Gesamtproteinextrakt aus *35S:myc-CKX1* und *35S:myc-CKX1 rock1-1* Keimlingen mit den Enzymen Endoglycosidase H (Endo H) bzw. Peptid-*N*-Glycosidase F (PNGase F) verdaut und die Größe von myc-CKX1 mittels Immunoblot analysiert. Endo H schneidet spezifisch zwischen den ersten beiden GlcNAc Molekülen von mannosereichen und einigen hybriden Glykanen und PNGase F schneidet zwischen der Asparaginseitenkette des Proteins und dem ersten GlcNAc von mannosereichen, hybriden und komplexen Glykanen (Maley *et al.*, 1989). PNGase F kann nicht schneiden, wenn das erste GlcNAc des Glykans über eine α 1-3 Verbindung mit Fucose verknüpft ist. Es zeigte sich, dass in beiden Linien beide Endoglykosidasen zu einer identischen Verringerung der detektierten Proteingröße von myc-CKX1 um ca. 6 kDa führten (Abb. 25C). Somit lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei CKX1 um ein *N*-glykosyliertes Protein handelte. Da die Behandlung bei beiden Endoglykosidasen zu einer identischen Verringerung der Proteingröße führte, musste es sich dabei entweder um mannosereiche oder hybride Glykane handeln, nicht jedoch um komplexe Glykane. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass darüber hinaus noch fukosylierte komplexe Glykane auf CKX1 vorhanden waren, die durch die verwendeten Enzyme nicht abgetrennt werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *rock1-1* keinen Einfluss auf die Abundanz von CKX1 hatte und zu keiner Veränderung bei der Modifikation von CKX1 mit mannosereichen oder hybriden Glykanen führte.

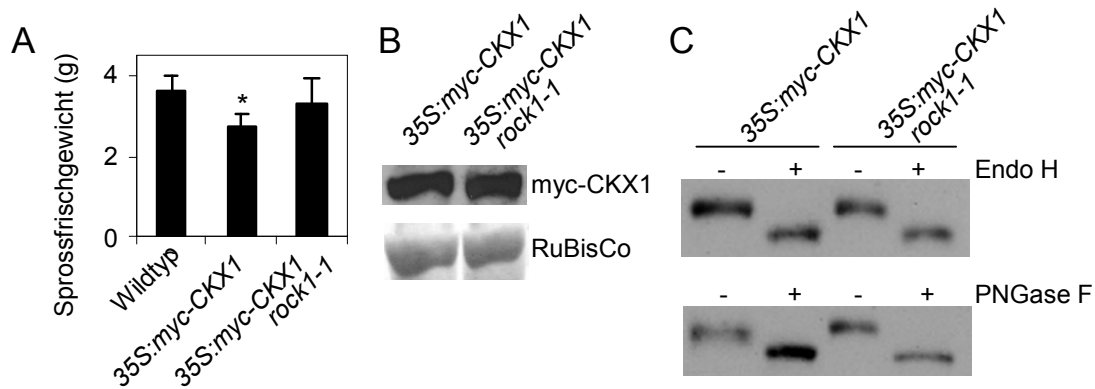


Abbildung 25. Analyse der Auswirkungen von *rock1-1* auf Proteinabundanz und Glykosylierung von CKX1.

(A) Etablierung einer stabilen *35S:myc-CKX1* Linie sowie Suppression des Phänotyps durch *rock1-1*. Das Sprossfrischgewicht wurde 32 TNK gemessen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, $n \geq 9$. Der Stern markiert einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (t-Test, $p < 0,05$).

(B) Immunoblotanalyse für den Vergleich der Abundanz von myc-CKX1 im Wildtyp und *rock1-1* Hintergrund. Es wurden jeweils 30 μg der extrahierten Proteine in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und das myc-CKX1 mit einem anti-myc Antikörper nachgewiesen. Als Beladungskontrolle ist die Färbung der großen Untereinheit von RuBisCo mit Ponceau S nach Blotten der Proteine auf die PVDF-Membran gezeigt.

(C) Immunoblotanalyse für den Vergleich der Größe von aus *35S:myc-CKX1* und *35S:myc-CKX1 rock1-1* Keimlingen isoliertem myc-CKX1 nach Verdau mit EndoH bzw. PNGase F. Nach dem Verdau wurden jeweils 30 μg der extrahierten Proteine in einem 8 %igen SDS Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und das myc-CKX1 immunologisch mit einem anti-myc Antikörper nachgewiesen.

3.8.2 Die CKX1 Aktivität ist nicht abhängig von hybrider oder komplexer N-Glykosylierung

Die Ergebnisse der im vorherigen Kapitel dargestellten Experimente deuteten darauf hin, dass CKX1 im Wildtyp und *rock1* Hintergrund entweder mannosereiche Glykane oder hybride Glykane trägt. Für die Umformung von mannosereiche in hybride Glykane bedarf es unter anderem der Aktivität des Enzyms *N*-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), welches UDP-GlcNAc als Substrat verwendet. Da zuvor gezeigt worden war, dass ROCK1 auch UDP-GlcNAc transportieren kann (Kapitel 3.6), wurde die Bedeutung von hybriden Glykanen oder eventuellen komplexen Glykanen für die CKX1 Aktivität genetisch untersucht.

Hierzu wurde die *35S:CKX1* Linie mit der *complex glycan less1-2* (*cgll-2*) Mutante gekreuzt, welche eine Mutation im Gen für die GnTI trägt, die zu einem vollständigem Funktionsverlust des Proteins führt. In *cgll-2* Pflanzen können folglich keine hybride und komplexe Glykane entstehen (von Schaeven *et al.*, 1993). Die F2 Generation wurde auf Vorhandensein des *35S:CKX1* Transgens auf Grundlage der

Hygromycinresistenz vorselektiert. Alle 39 Pflanzen der Kreuzungspopulation besaßen den Cytokinindefizienzphänotyp. Unter Verwendung eines dCAPS Markers konnte das Vorhandensein homozygoter *cgl1-2* Pflanzen in dieser Population bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und es wurde eine für die *cgl1-2* Mutation sowie das *35S:CKX1* Transgen doppelt homozygote Linie für den direkten Vergleich des Phänotyps mit der Ausgangslinie isoliert. Sowohl die Linie *35S:CKX1* als auch die Linie *35S:CKX1 cgl1-2* zeigten den identischen Cytokinindefizienzphänotyp (Abb. 26). Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivität von CKX1 nicht von der Existenz von hybriden oder komplexen Glykanen in der Pflanze abhängt. Dies deutet darauf hin, dass *ROCK1* keine funktionsrelevante Rolle bei der *N*-Glykosylierung von CKX1 spielt.



Abbildung 26. Analyse der Abhängigkeit der CKX1 Aktivität von dem Vorhandensein hybrider oder komplexer *N*-Glykosylierung auf Proteinen. Es sind die Phänotypen des Wildtyps, der Linien *35S:CKX1*, *35S:CKX1 cgl1-2* sowie *cgl1-2* von links nach rechts 38 TNK zu sehen.

3.9 Versuch der Komplementation von *rock1* durch heterologe UDP-GlcNAc Transporter

ROCK1 transportiert im heterologen System Hefe sowohl UDP-GlcNAc als auch UDP-GalNAc. Beide Nukleotidzucker kommen in Pflanzen vor, jedoch sind bislang nur für UDP-GlcNAc Prozesse bekannt, bei denen dieses als Substrat verwendet wird. Deshalb sollte zunächst für UDP-GlcNAc untersucht werden, ob im *rock1-1* Hintergrund der Verlust der Transportaktivität ins ER die Ursache für die Suppression des Cytokinindefizienzphänotyps ist. Hierbei konnte darauf zurückgegriffen werden, dass

mit SLC35A3 und Yea4p aus Mensch bzw. Hefe bereits zwei NSTs mit UDP-GlcNAc Transportaktivität beschrieben worden waren (Ishida *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2000). Während Yea4p im ER von Hefe lokalisiert, handelt es sich bei SLC35A3 um ein Golgiprotein. Es wurden für beide Gene jeweils Fusionskonstrukte aus dem 5' gelegenen *GFP* Gen und der cDNA des jeweiligen Transporters kloniert und unter die Kontrolle des konstitutiven *UBQ10* Promotors von *A. thaliana* gestellt. Für die Lokalisation im ER wurde an die *SLC35A3* cDNA noch das Dilysin-Retentionssignal von *ROCK1* angefügt. Als Kontrolle wurde ein *UBQ10:GFP-ROCK1* Konstrukt kloniert.

Diese Konstrukte wurden zunächst transient in Tabak exprimiert. Sowohl bei Expression von *GFP-ROCK1* als auch von *GFP-SLC35A3*, nicht aber von *GFP-Yea4p* konnte mittels konfokaler Mikroskopie zwei Tage nach der Inokulierung ein GFP-Signal im ER detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses war bei *GFP-SLC35A3* schwächer als bei *GFP-ROCK1*. Auch vier Tage nach der Inokulierung konnte bei der Expression von *GFP-Yea4p* kein Signal detektiert werden.

Alle drei Konstrukte wurden in *rock1-1 35S:CKX1* Arabidopsispflanzen transformiert. Sechs von neun auf Erde selektierten T1 Pflanzen der Transformation mit *UBQ10:GFP-ROCK1* zeigten eine vollständige Komplementation zum *35S:CKX1* Phänotyp (Abb. 27A). Dies zeigte die Eignung des verwendeten Promotors und der N-terminalen Fusion mit GFP für die Komplementation. Im Gegensatz dazu zeigte keine von jeweils 50 bzw. 20 untersuchten T1 Pflanzen der Linien *UBQ10:GFP-SLC35A3* und *UBQ10:GFP-Yea4p* Ansätze einer phänotypischen Komplementation (Daten nicht gezeigt). Auch die Untersuchung der T2 Generation ausgesuchter Pflanzen führte zu keinem Hinweis auf eine phänotypische Komplementation. Während sich das GFP-ROCK1 Fusionsprotein in den komplementierten Pflanzen sowohl mittels konfokaler Mikroskopie (Abb. 27C) als auch durch Immunoblot Analyse (Daten nicht gezeigt) nachweisen ließ, war dies für GFP-SLC35A3 und GFP-Yea4p in keiner der getesteten Linien möglich.

Auf Grundlage des vorherigen Ergebnisses konnte nicht unterschieden werden, ob die Komplementation ausgeblieben war, weil in *rock1* Pflanzen eine andere Transportaktivität als die für UDP-GlcNAc fehlt oder aber weil die heterologen Transporter nicht ausreichend vorhanden waren. Um die Proteinexpression zu verbessern, wurde die Codonzusammensetzung der Sequenz von *SLC35A3* für die Translation in Arabidopsis optimiert (Streatfield, 2007). Die codonoptimierte cDNA

Sequenz *SLC35A3opt* wurde mitsamt dem kodierenden Bereich für das Dilysinmotiv von *ROCK1* synthetisiert und das Konstrukt *UBQ10:GFP-SCL35A3opt* kloniert. Nach transienter Expression von *UBQ10:GFP-SLC35A3opt* in Tabakblättern konnte ein GFP-Signal im ER detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das Konstrukt wurde in *rock1-1 35S:CKX1* Arabidopsispflanzen transformiert und die selektierten T1 Pflanzen auf Vorhandensein der phänotypischen Komplementation hin untersucht. Keine von 90 untersuchten T1 Pflanzen zeigte den *35S:CKX1* Phänotyp. Einige Pflanzen wiesen eine leicht verzögerte Entwicklung und ein geringfügig verringertes Wachstum der Rosettenblätter auf (beispielhafte Linien 2 bis 4, Abb. 27B). Eine Pflanze zeigte ein deutlich verringertes Rosettenwachstums (Linie 1, Abb. 27B), während der weiteren Entwicklung unterschied sich jedoch der Phänotyp der Pflanze deutlich vom *35S:CKX1* Phänotyp.

Um herauszufinden, ob das GFP-SCL35A3opt Protein in den Pflanzen nachweisbar war und ob die beobachteten phänotypischen Veränderungen bei den T1 Pflanzen mit der Proteinabundanz korrelierten, wurden die Rosettenblätter mit dem konfokalen Mikroskop auf Vorhandensein des GFP-Signals hin untersucht. Die meisten der untersuchten Pflanzen zeigten ein deutliches GFP-Signal (Abb. 27C). Die Stärke des GFP-Signals korrelierte nicht mit der Stärke der phänotypischen Veränderungen. So zeigten die Linien 2 und 4, welche ein verringertes Rosettenwachstum besaßen, nur ein sehr schwaches GFP-Signal. Die Linie 41 hingegen, die von der Ausgangslinie phänotypisch nicht zu unterscheiden war, hatte ein deutlich stärkeres GFP-Signal. Die Linie 1, welches die stärksten phänotypischen Abweichungen zeigte, hatte ein deutlich schwächeres Signal als Linie 3, welche viel geringere phänotypische Veränderungen zeigte. Das GFP-Signal war bei einigen Linien deutlich stärker als bei einer durch das Konstrukt *UBQ10:GFP-ROCK1* vollständig phänotypisch komplementierten Pflanze (Abb. 27C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der menschliche UDP-GlcNAc Transporter SLC35A3 nach der Codonoptimierung im ER von stabil transformierten *rock1-1 35S:CKX1* Pflanzen detektiert werden konnte. Das Vorhandensein führte jedoch zu keiner Komplementation der *rock1-1* Mutation. Dies deutet darauf hin, dass das mögliche Fehlen einer UDP-GlcNAc Transportaktivität ins ER nicht die primäre Ursache für den *rock1* Phänotyp ist.

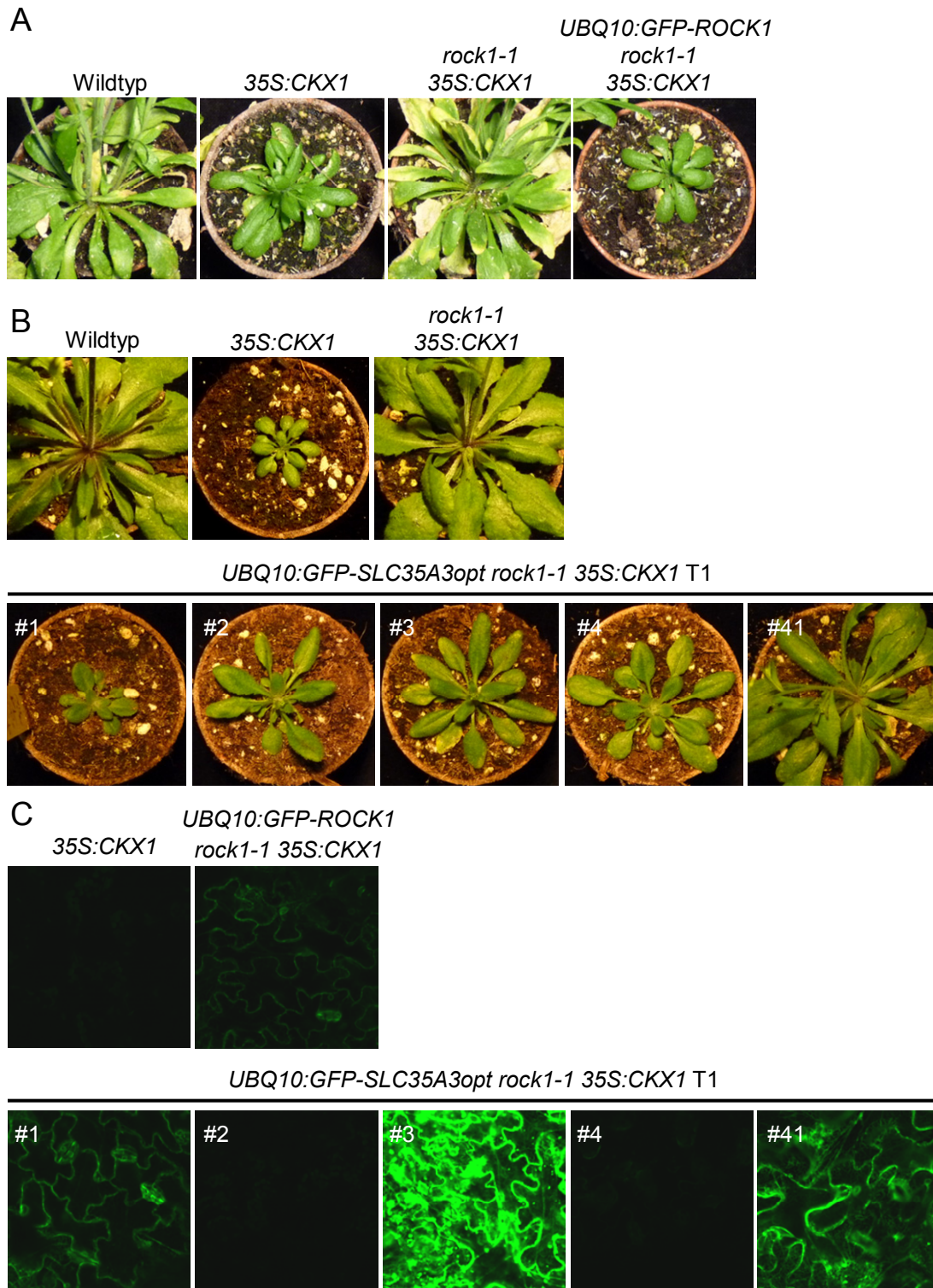


Abbildung 27. Versuch der Komplementation der *rock1-1* Mutation durch den menschlichen UDP-GlcNAc Transporter SLC35A3.

(A) Das Konstrukt *UBQ10:GFP-ROCK1* komplementiert die *rock1-1* Mutation im 35S:CKX1 Hintergrund.

(B) Repräsentative Auswahl von Phänotypen von auf Erde selektierten T1 Pflanzen der Transformation von *UBQ10:GFP-SLC35A3opt* in *rock1-1 35S:CKX1*.

(C) Vergleich der GFP-Signalstärke in Blättern der in (A) und (B) gezeigten Pflanzen. Die Aufnahmen erfolgten mittels konfokaler Mikroskopie bei gleicher Anregungs- und Aufnahmestärke und identischer Vergrößerung.

3.10 Isolierung von Suppressormutationen der durch *rock1-1* bewirkten Reversion des *CKX1* Überexpressionsphänotyps

3.10.1 Screen und genetische Charakterisierung von Suppressormutanten von *rock1-1*

Die Analyse der *rock1* Mutanten zeigte einen Einfluss von *ROCK1* auf die Aktivität der CKX-Enzyme ohne Hinweise auf den molekularen Mechanismus zu liefern. Aus diesem Grund wurde ein genetischer Screen durchgeführt, um Gene zu isolieren, die in einem Wirkungsgefüge mit *ROCK1* stehen. Ziel war es, Mutanten zu isolieren, bei denen die Suppressoraktivität von *rock1-1* verloren gegangen ist und die in Folge dessen den *35S:CKX1* Cytokinindefizienzphänotyp zeigen. Hierfür wurden ca. 25000 Samen der Linie *rock1-1 35S:CKX1* mit EMS mutagenisiert, in der M1 Generation ca. 5000 Pflanzen auf Erde angezogen und die Phänotypen auf dominante Mutationen hin untersucht, ohne dass geeignete Kandidaten gefunden worden sind. Für die Bestimmung der Mutagenesefrequenz wurde das Auftreten embryoletaler Mutationen in den Schoten der M1 Pflanzen gezählt (Weigel und Glazebrook, 2006). In lediglich 9 von 50 Schoten von jeweils verschiedenen Pflanzen war keine rezessive embryoletale Mutation aufgetreten. Statistisch ergibt sich so eine Frequenz von 1,7 embryoletalen Mutationen je mutagenisiertem diploiden Genom. Dies entspricht einer ausreichenden Mutagenesefrequenz für einen genetischen Screen (Weigel und Glazebrook, 2006).

Die Samen von 1500 M1 Pflanzen wurden gesammelt. Bei ca. 1000 Linien wurden in der M2 Generation jeweils mindestens 20 Pflanzen auf das Vorkommen des Cytokinindefizienzsyndroms hin untersucht. In Kandidatenlinien wurde der veränderte Phänotyp sowohl in der M2 Generation erneut getestet und auch bei den isolierten Mutantepflanzen in der M3 Generation bestätigt. Um auszuschließen, dass bei den Mutanten nicht in Folge von Fremdpollinierung oder Samenkontaminierung das *ROCK1* Wildtypallel vorhanden war, wurden potentielle Kandidaten mittels des dCAPS Markers auf *rock1-1* Homozygotie getestet. Es konnten sechs unabhängige Linien isoliert werden, in denen die Auswirkungen von *rock1-1* auf die Ausprägung des *35S:CKX1* Transgens vollständig oder in den meisten Teilaspekten revertiert waren und die im Folgenden als *rock is over (rio)* Mutanten bezeichnet werden. Alle sechs Linien zeigten den kleinen Rosettendurchmesser mit der typischen abgerundeten Blattform der *35S:CKX1* Linie (Abb. 28A und B). Die Linien 261 und 1067 zeigten bezüglich Rosettenentwicklung, Blattform, Blühzeitpunkt und Größe der Infloreszenz einen von

der *35S:CKXI* Linie fast nicht zu unterscheidenden Phänotyp. Die phänotypischen Veränderungen der Linie 1045 beinhalteten dieselben Aspekte, wie sie von *35S:CKXI* Pflanzen bekannt sind, diese waren jedoch zum Teil stärker ausgebildet, so dass die Pflanzen eine deutlich kleinere Rosette und noch weniger Blüten hatten (Abb. 28B). Die Linien 142, 1134 und 1213 zeigten ebenfalls die für *35S:CKXI* Pflanzen typische Rosettenentwicklung bis zur Blühinduktion. Die Linien 142 und 1134 bildeten jedoch stabilere Stängel und mehr Blüten aus und zeigten zusätzlich in der späteren Entwicklung eine starke Anthocyanbildung in den Rosettenblättern. Die Linie 1213 hatte ebenfalls eine etwas größere Infloreszenz.

Für eine rezessive Mutation wird erwartet, dass eine aus acht M2 Pflanzen den revertierten Mutantenphänotyp zeigt. Eine dominante Mutation würde in der M2 in drei von acht Pflanzen das Auftreten der phänotypischen Reversion bewirken. Die Häufigkeit des Auftretens des revertierten *35S:CKXI* Phänotyps war bei drei isolierten Linien deutlich geringer als es für eine rezessive Mutation mit 1:7 erwartet werden würde (Tab. 17). Die Ursache hierfür war möglicherweise die hohe Sterblichkeit der revertierten Pflanzen bei suboptimalen Wachstumsbedingungen. Das Segregationsverhältnis weist auf die rezessive Natur aller isolierten Mutationen hin.

Tabelle 17. Häufigkeit des Auftretens des revertierten *35S:CKXI* Phänotyps in der M2 Generation der im EMS Screen isolierten Suppressorlinien von *rock1-1 35S:CKXI*.

| Linie | Anzahl Pflanzen mit <i>35S:CKXI</i> Phänotyp / Gesamtzahl untersuchte Pflanzen | Segregationsverhältnis |
|-------|---|------------------------|
| 142 | 2 / 33 | 1:15,5 |
| 261 | 2 / 45 | 1:21,5 |
| 1045 | 4 / 38 | 1:8,5 |
| 1067 | 4 / 36 | 1:8 |
| 1134 | 2 / 28 | 1:13 |
| 1213 | 5 / 36 | 1:6,2 |

Für die Linien 261, 1045 und 1067, welche eindeutig den *35S:CKXI* Phänotyp zeigten, erfolgte eine genaue Bestimmung der Natur der Mutation. Hierfür wurde jeweils eine M3 Pflanze mit revertiertem Phänotyp mit der Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKXI* rückgekreuzt und der Phänotyp der F1 Generation bestimmt. In allen drei Linien zeigten die F1 Pflanzen den *rock1-1 35S:CKXI* Phänotyp (nicht gezeigt), was bestätigte, dass es sich jeweils um rezessive Mutationen handelte.

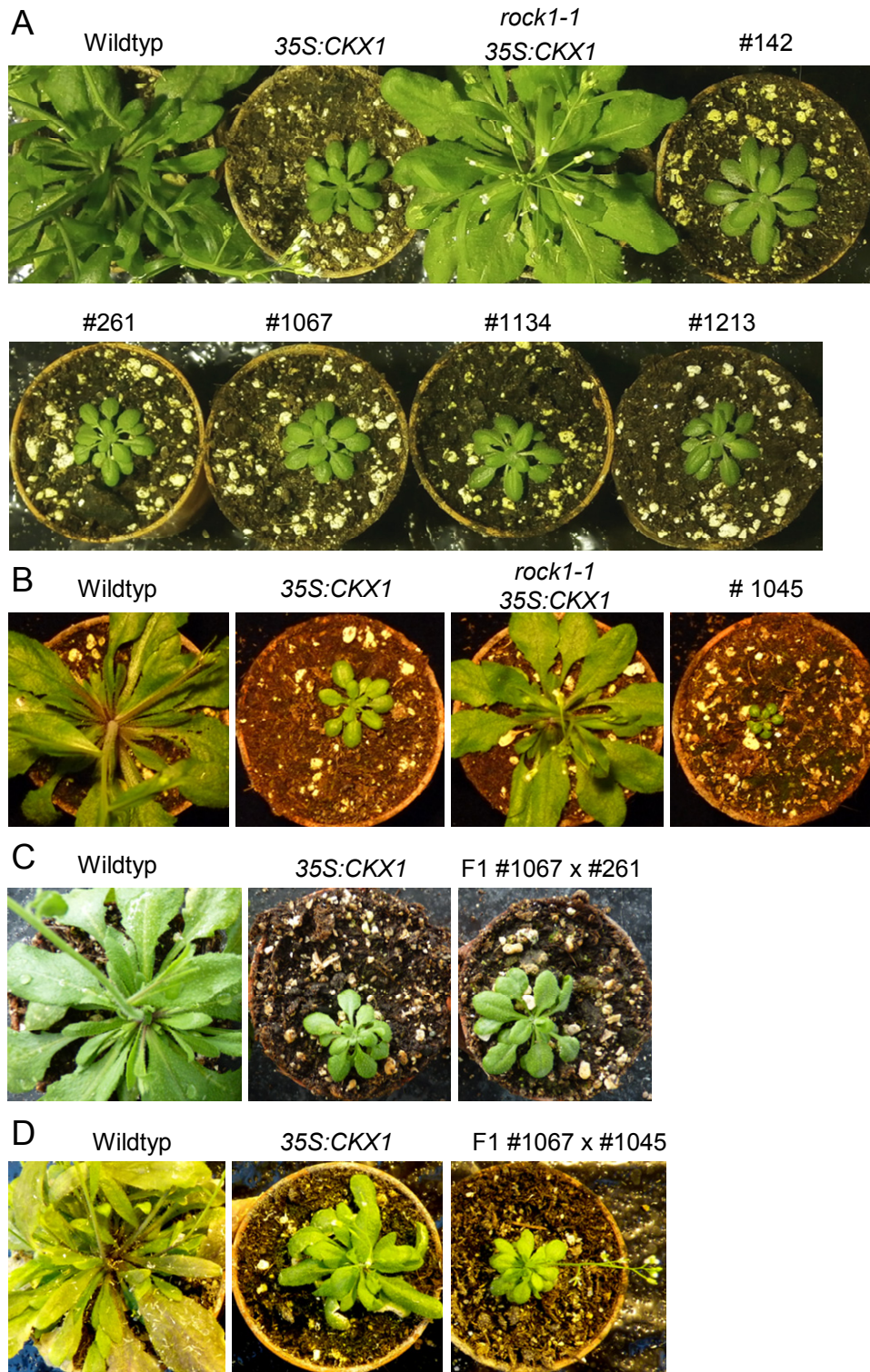


Abbildung 28. Übersicht über die im EMS-Mutagenese Screen identifizierten Suppressoren von *rock1-1 35S:CKX1*.

(A) Vergleich des Phänotyps von auf Erde gewachsenen Suppressorlinien in der M4 Generation mit der Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKX1*, dem gesuchten Phänotyp der *35S:CKX1* Linie und dem Wildtyp 32 TNK.

(B) Vergleich der über den bekannten Cytokindefizienzphänotyp hinausgehenden Linie 1045 mit der Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKX1* und dem Cytokindefizienzphänotyp von *35S:CKX1* 28 TNK.

(C) und (D) Vergleich des Phänotyps der F1 Pflanzen aus der Kreuzung Linien 1067 und 261 bzw. 1067 und 1045 jeweils mit dem des Wildtyps und dem der *35S:CKX1* Linie.

Für die weitere Charakterisierung der Suppressorlinien 261, 1045 und 1067 wurde ein Komplementationstest durchgeführt, um herauszufinden, ob die ursächlichen Mutationen dasselbe Gen betreffen. Alle sechs analysierten F1 Pflanzen der Kreuzung der Linie 261 mit der Linie 1067 zeigten den Cytokinindefizienzphänotyp (Abb. 28C), so dass geschlussfolgert werden kann, dass es sich hierbei um allelische Mutationen handelt. Das Einkreuzen der Linie 1045 in die Linie 1067 führte ebenfalls zu Pflanzen mit Cytokinindefizienzphänotyp. Interessanterweise entsprach dies jedoch nicht dem Phänotyp der *35S:CKX1* Linie bzw. der Linie 1067, sondern dem stärkeren Phänotyp der Linie 1045 (Abb. 28D). Somit ist die Mutation in Linie 1045 dominant über die Mutation in Linie 1067. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ursächliche Suppressormutation in allen drei Linien dasselbe Gen betrifft. Da diese drei Mutanten derselben Komplementationsgruppe angehören, wird Linie 261 als *rio1-1*, Linie 1067 als *rio1-2* und Linie 1045 als *rio1-3* bezeichnet.

Um sicherzugehen, dass es sich bei den *rio1* Mutanten nicht um eine weitere Mutation in *rock1-1* oder dem *35S:CKX1* Transgen handelte, wurden diese beiden Loci in *rio1-1* und *rio1-2* sequenziert. Es wurden keine weiteren Mutationen festgestellt.

3.10.2 Kartierung der Suppressormutationen in *rio1-1* und *rio1-2*

Für die Identifizierung des *rio1* Gens wurde kein klassischer Kartierungsgestützter Klonierungsansatz basierend auf der Kreuzung mit einem anderen Ökotyp gewählt. Der Grund hierfür war, dass dieser Ansatz sehr umständlich wäre, da für die Kartierungspopulation zunächst Pflanzen ausgewählt werden müssten, die sowohl das *35S:CKX1* Transgen als auch die *rock1-1* Mutation tragen und zudem noch den *rio* Phänotyp zeigen. Letzteres ist auf Grund der Maskierung des Cytokinindefizienzsyndroms durch den Heterosiseffekt zusätzlich problematisch. Stattdessen wurde ein Ansatz gewählt, der das Vorhandensein von Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) zwischen der Suppressorlinie und der Ausgangslinie in Folge der EMS Mutagenese ausnutzte. Die Identifizierung von neuen SNPs, Kopplungsanalyse und Isolierung potentieller Kandidatenmutationen erfolgte durch Resequenzierung der mutierten Genome mittels der *next-generation sequencing* (NGS) Technologie (Abe *et al.*, 2012).

Um die Kartierungspopulation zu erzeugen, wurden die beiden Mutanten zunächst mit der Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKX1* zurückgekreuzt und in der F2 Population die

Pflanzen mit *rio* Phänotyp isoliert. Im Falle von *rio1-1* wurden 70 und von *rio1-2* 59 dieser Pflanzen in die F3 Generation gebracht und jeweils in einem Ansatz aus allen Keimlingen gleichzeitig die DNA isoliert. Es wurde eine Sequenzierungsbibliothek erstellt und die Genome unter Verwendung der Illumina HiSeq2000 Plattform sequenziert. Um das Annotieren entlang des Arabidopsisgenoms zu vereinfachen, wurden die kurzen Genomabschnitte der Sequenzierungsbibliothek von beiden Seiten ansequenziert. Es wurden für *rio1-1* 103,6 Millionen und für *rio1-2* 102,9 Millionen jeweils 90 Basen lange Sequenzen erzeugt. Das Zusammenfügen dieser Sequenzen zum Arabidopsisgenom ergab eine durchschnittliche Anzahl an Sequenzen je Base von ca. 53 für *rio1-1* und ca. 55 für *rio1-2*. Für die Kopplungsanalyse von *rio1* mit SNPs wurden mittels der Software SHOREmap (Schneeberger *et al.*, 2009) alle SNPs ermittelt, die durch einen Cytosin zu Thymin oder Guanin zu Adenin Basenaustausch entstanden waren, nur in einem von beiden Genomen vorkamen und eine Mindestabdeckung von 20 Sequenzen hatten. Mit Hilfe dieser SNPs konnte in beiden Genomsequenzierungen ein genomischer Bereich identifiziert werden, in dem bei jedem SNP in mehr als 90 % der Sequenzen die mutierte Base auftrat. Entsprechend der Erwartung an allelische Mutationen überlappte dieses Kartierungsintervall in beiden Genomsequenzierungen und lag jeweils auf Chromosom 1 zwischen ca. 10 Mb und ca. 12,5 Mb vom Beginn des Chromosoms entfernt (Abb. 29).

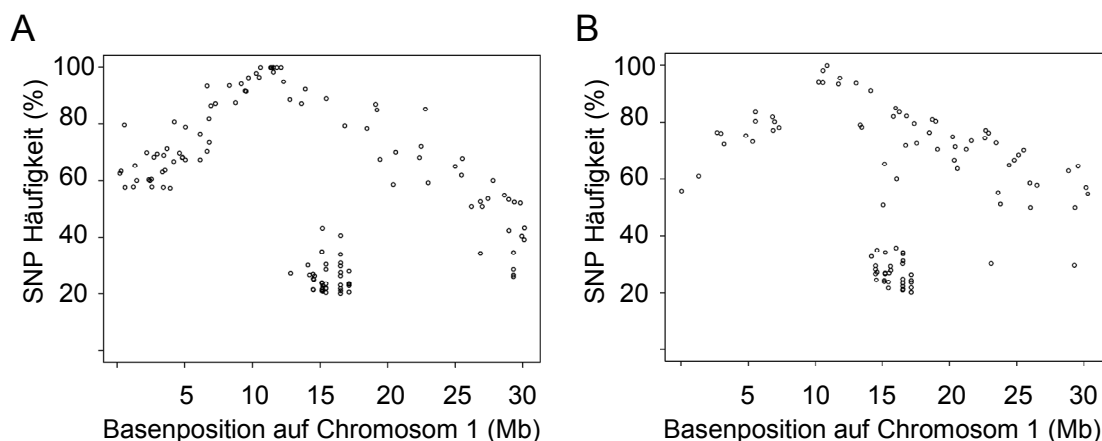


Abbildung 29. Identifizierung der Kartierungsintervalle für die Mutationen *rio1-1* und *rio1-2* auf Chromosom 1.

Dargestellt ist die Häufigkeit des Auftretens der durch die EMS-Mutagenese erzeugten und mittels NGS identifizierten SNPs auf Chromosom 1 in *rio1-1* (A) und *rio1-2* (B). Bei den als Punkte dargestellten SNPs handelt es sich um C zu T oder G zu A Basenaustausche, die nur in jeweils einer der beiden Mutanten vorkamen und die durch mindestens 20 Sequenzierungen abgedeckt waren.

In dem so identifizierten Kartierungsintervall befinden sich ca. 600 Genloci. Die ursächliche Mutation musste in allen für die Sequenzierung verwendeten Pflanzen homozygot vorliegen und es ist am wahrscheinlichsten, dass die Mutationen in beiden Mutanten an unterschiedlichen Positionen innerhalb desselben Genlocus liegen. Deshalb wurden zunächst alle Positionen, an denen nur in einer Mutante ein Basenaustausch vorlag, untersucht. Auf Grund von möglichen Fehlern bei der Sequenzierung, wurden alle neuen SNPs mit einer Frequenz von mehr als 90 % miteinbezogen. Solche traten in *riol-1* an elf und in *riol-2* an sieben Genloci auf. Vier der Basenaustausche führten in *riol-1* zu einem Aminosäureaustausch in kodierten Proteinen, jedoch keiner in *riol-2*. Entgegen der Erwartung an allelische Mutationen konnte kein Locus identifiziert werden, der in beiden Mutanten einen SNP trägt.

Auch wenn die hohe durchschnittliche Anzahl an Sequenzierungsläufen je Position von über 50 für eine generell hohe Abdeckung spricht, können dennoch Bereiche des Genoms auf Grund der Sequenzzusammensetzung vollkommen unsequenziert bleiben (Dohm *et al.*, 2008). In *riol-1* kommen zwölf und in *riol-2* vier solche Bereiche innerhalb der Sequenzierung des 10 Mb bis 12,5 Mb Intervalls von Chromosom 1 vor. Um zu untersuchen, ob diese die gesuchten Mutationen verbergen könnten, wurde untersucht, ob am selben Locus in der einen Mutante ein SNP und in der anderen Mutante eine Sequenzierungslücke auftraten. Dies war nicht der Fall. Es fielen bei dieser Analyse jedoch zwei kodierende Bereiche auf, die in beiden Mutanten nicht sequenziert worden waren. Dies betrifft zum einen den Locus *Atlg27780*, der für ein Transposables Element kodiert und zum anderen den Locus *Atlg32670*, der für ein Protein mit unbekannter Funktion kodiert. Für letzteres Genmodell lag keine Bestätigung in Form von cDNA oder EST Daten vor, so dass es sich bei beiden Loci um unwahrscheinliche Kandidaten für *riol* handelte.

In beiden Mutanten kamen viele gemeinsame SNPs vor. Die naheliegende Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass die in diesem EMS Screen verwendete Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKX1* aus einem vorherigen EMS Screen hervorgegangen war. Da jedoch Fälle bekannt sind, wo es in zwei unabhängigen Mutanten zu einem Basenaustausch an derselben Position kam (Cuperus *et al.*, 2010), kann ein identischer SNP nicht als ursächliche Mutation ausgeschlossen werden. Die Loci, die in *riol-1* und *riol-2* identische zu Aminosäureaustauschen führende Mutationen innerhalb der kodierenden Bereiche tragen, sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18. Loci innerhalb des 10 Mb bis 12,5 Mb Abschnitts von Chromosom 1, die in *riol-1* und *riol-2* identische zu Aminosäureaustauschen führende Mutationen tragen.

| Locus | Annotierte Genfunktion ^a |
|------------------|--|
| <i>Atlg27240</i> | Paired amphipathic helix (PAH2) superfamily protein |
| <i>Atlg29025</i> | Calcium-binding EF-hand family protein |
| <i>Atlg29820</i> | Magnesium transporter CorA-like family protein |
| <i>Atlg29940</i> | Encodes a subunit of RNA polymerase 1 (aka RNA polymerase A) |
| <i>Atlg30820</i> | CTP synthase family protein |
| <i>Atlg30870</i> | Peroxidase superfamily protein |
| <i>Atlg31770</i> | ATP-binding cassette 14 (ABCG14) |
| <i>Atlg33612</i> | Leucine-rich repeat (LRR) family protein |
| <i>Atlg34560</i> | Protein of unknown function (DUF1184) |

^a die Genfunktion entspricht der Bezeichnung in der TAIR Datenbank.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels Identifizierung von neuen SNPs durch NGS und Kopplungsanalyse ein ca. 2,5 Mb großes Kartierungsintervall für *riol* identifiziert werden konnte. Die Suche nach der ursächlichen Mutation innerhalb dieses Intervalls ergab mögliche Kandidaten, jedoch keinen starken Hinweis auf die Identität des *riol* Gens.

4. Diskussion

4.1 *ROCK1* ist ein positiver Regulator der CKX Aktivität

4.1.1 Die Suppression des *35S:CKX1* Phänotyps durch *rock1-1* wirkt über die Reduzierung der CKX1 Aktivität

Die Mutation *rock1-1* wurde isoliert in einem EMS-Mutagenese Screen nach Suppressormutanten des durch *CKX1* Überexpression bewirkten Cytokinundefizienzphänotyps. Im Spross wurde das Cytokinundefizienzsyndrom fast vollständig revertiert, in der Wurzel zum Teil (Niemann, 2008). Es stellte sich die Frage nach der Rolle des mutmaßlichen Nukleotidzuckertransporters *ROCK1* bei der Modifikation des Cytokininstatus in Pflanzen. Die Messung des Cytokiningehalts in ganzen Keimlingen hatte ergeben, dass der Verlust von *ROCK1* in *35S:CKX1* Pflanzen nur zu einer geringen Steigerung führte (Kapitel 3.3.5.2; Niemann, 2008). Kann so eine geringe Steigerung bereits zu einer Reversion des Cytokinundefizienzphänotyps führen? Da die Suppression durch *rock1-1* im Spross deutlich stärker war als in der Wurzel, wurde untersucht, wie stark sich der Cytokiningehalt im Spross durch *rock1-1* verändert. Zum einen ergab dies, dass die Überexpression von *CKX1* zu einer deutlich stärkeren Verringerung des Cytokiningehalts im Spross als in der Wurzel führte (Kapitel 3.3.5.2). Vor allem zeigte diese Untersuchung jedoch, dass der Cytokiningehalt im Spross von *35S:CKX1* Keimlingen durch *rock1-1* von 5 % auf 19 % des Wildtypgehalts fast verfünffacht wurde. Die Überexpression von *CKX3* unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors *PYK10* führt zur Ausbildung des Cytokinundefizienzphänotyps in der Wurzel ohne jedoch signifikante Veränderungen im Spross hervorzurufen (Werner *et al.*, 2010). Gleichzeitig haben diese Pflanzen jedoch im Spross einen im Vergleich zum Wildtyp um 70 % verringerten Cytokiningehalt. Im Spross von *35S:CKX3* Pflanzen, der die typischen Merkmale des Cytokinundefizienzsyndroms trägt, war der Gehalt um 88 % verringert (Werner *et al.*, 2010). Dies deutet auf die Existenz eines niedrigen Grenzwertes an Cytokinin, das für eine unveränderte Entwicklung des Sprosses benötigt wird, hin. Dadurch könnte die Suppression des Cytokinundefizienzsyndroms im Spross der *35S:CKX1* Pflanzen durch *rock1* trotz im Vergleich mit dem Wildtyp weiterhin verringertem Cytokiningehalt erklärt werden. Somit geht das Ausmaß der Suppression des

Cytokinindefizienzphänotyps in Spross und Wurzel mit dem Ausmaß der Steigerung des Cytokinidgehalts durch *rock1-1* in dem jeweiligen Gewebe einher.

Auch die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen bezüglich des Cytokininstatus in Spross und Wurzel der *rock1* Mutanten unterstützen die Einschätzung, dass die Rolle von *ROCK1* bei der Modifikation des Cytokininstatus im Spross größer ist als in der Wurzel. Der Vergleich der Cytokininsensitivität der Wurzelentwicklung ergab keine Unterschiede zwischen *rock1* Mutanten und Wildtyp (Kapitel 3.3.5.1). Im Spross hingegen wurde eine wenn auch nur geringe Erhöhung der Transkriptabundanz der Cytokininantwortgene gemessen (Kapitel 3.3.5.1). In der Wurzel fiel diese Erhöhung geringer aus.

Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass die Erhöhung des Cytokininstatus durch einen verringerten Abbau von Cytokinen durch CKX Enzyme zu Stande kommt. Zunächst zeigte sich bei der direkten Messung der CKX Aktivität, dass diese in *35S:CKX1* Pflanzen durch *rock1* verringert worden war (Niemann, 2008 und Kapitel 3.3.6.1). Zweitens zeigte die Analyse der Umwandlung exogen applizierten iP_s, dass auch in *rock1-2* Keimlingen ohne *35S:CKX1* Transgen eine verringerte CKX Aktivität verglichen mit dem Wildtyp vorliegt (Kapitel 3.5). Drittens ist das Ausmaß der Reversion der Cytokinindefizienz durch *rock1*, wenn diese auf andere Weise bewirkt ist, nur sehr gering. Die Kreuzung mit Cytokininrezeptormutanten zeigte, dass *rock1* die Cytokinindefizienz in Folge der verringerten Cytokininsignalweiterleitung kaum supprimiert (Kapitel 3.3.6.2). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *rock1* einen Einfluss auf die Cytokininrezeptoren hat, jedoch wäre dieser dann sehr viel schwächer als der Einfluss auf CKX Enzyme. Dass *rock1* zu gar keinen Veränderungen beim Sprossphänotyp der Rezeptortriplemutanten führte, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Ursache für die supprimierende Wirkung von *rock1* auf das Cytokinindefizienzsyndrom beim Cytokinidgehalt angesiedelt ist. *ROCK1* könnte ein Cytokinintransporter sein und die Suppression des Cytokinindefizienzphänotyps durch eine Veränderung bei der subzellulären Verteilung von Cytokinen innerhalb der Zelle bewirkt werden. Entsprechend würden auch andere Mutationen, die zu einem reduzierten Cytokinidgehalt führen, supprimiert werden. Dass *rock1* Mutationen, die zu einer verringerten Biosynthese führen, nicht supprimiert (Kapitel 3.3.6.3), deutet darauf hin, dass *rock1* keinen Einfluss auf einen allgemein reduzierten Cytokinidgehalt hat. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei *ROCK1* um einen

Cytokinintransporter handelt. Stattdessen scheint *rock1* zum größten Teil direkt durch die Reduktion der CKX Aktivität zu wirken.

4.1.2 *ROCK1* beeinflusst die Aktivität unterschiedlicher CKX Isoformen

Die Verringerung der CKX Aktivität durch *rock1* ist nicht spezifisch für CKX1, sondern beeinflusst mindestens auch die Aktivität von CKX2 und CKX3 (Kapitel 3.3.6.1). Diese drei Isoformen haben gemein, dass sie alle Proteine des sekretorischen Weges der Zelle sind (Werner *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wird die Aktivität des cytosolischen CKX7 (Köllmer, 2009) wahrscheinlich nicht durch *rock1* reduziert. Dies spricht dafür, dass die Beeinflussung der CKX Aktivität im Lumen des Endomembranraums stattfindet, auf Grund der subzellulären Lokalisation von *ROCK1* womöglich bereits im ER (Kapitel 3.2).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass *ROCK1* über diese drei untersuchten Isoformen hinaus Einfluss auf die Aktivität weiterer CKX Isoformen haben könnte, kommt von der Analyse des *rock1* Phänotyps. *rock1* Pflanzen besaßen nach 7 Wochen ca. 40 % mehr Blüten und Schoten als der Wildtyp (Kapitel 3.3.4). Auch *ckx* Mutanten zeigen unter anderen eine gesteigerte Bildung von Blüten und Schoten, wobei die stärkste Zunahme bei *ckx3 ckx5* Pflanzen mit einer Steigerung um 40 % auftrat (Bartrina *et al.*, 2011). Die Abhängigkeit der Aktivität von CKX3 von *ROCK1* wurde in dieser Arbeit gezeigt, die von CKX5 nicht untersucht. Die vergleichbaren quantitativen Auswirkungen von *rock1-2* bzw. *ckx3 ckx5* auf die Aktivität des generativen Sprossmeristems sprechen jedoch dafür, dass *ROCK1* auch die Aktivität von CKX5 beeinflusst. Entsprechend war der Cytokiningehalt in Blütenständen von *rock1* Pflanzen erhöht (Kapitel 3.3.5.2). Während jedoch *ckx3 ckx5* zu fast einer Versechsfachung des Gehaltes an tZ- und iP-Typ Cytokinen führt (Bartrina *et al.*, 2011), ist der Gehalt dieser Cytokine durch *rock1* lediglich um maximal 45 % erhöht (Kapitel 3.3.5.2). Dies lässt entweder den Schluss zu, dass die Zunahme um 45 % bereits für die Ausbildung des Infloreszenzphänotyps ausreichend ist, oder aber, dass *rock1* die Meristemaktivität über einen von CKX unabhängigen Weg kontrolliert. Gleichzeitig deuten die Unterschiede im Cytokiningehalt auf die Existenz einer *ROCK1*-unabhängigen CKX Aktivität von CKX3 und CKX5 hin. Daneben existieren weitere Hinweise auf die *ROCK1*-unabhängige CKX Aktivität. Zum einen führte *rock1-1* in den 35S:CKX1 bzw. 35S:CKX2 Pflanzen zwar zu einer deutlichen Verringerung der CKX Aktivität, dennoch

war diese weiterhin noch um 60 % bzw. sogar sechszigfach erhöht gegenüber dem Wildtyp (Kapitel 3.3.6.1). Zum anderen war der Abbau von exogen appliziertem iP in *rock1-2* Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp reduziert, dennoch wurden noch immer fast 40 % des applizierten iP innerhalb von zwei Stunden abgebaut (Kapitel 3.5). Es ist nicht völlig auszuschließen, jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die CKX Aktivität in den *rock1-2* Keimlingen nur von CKX7 stammte.

4.2 ROCK1 transportiert das Substrat für eine bislang in Pflanzen nicht beschriebene Proteinmodifikation

Die Messung des Transports von Nukleotidzuckern durch ROCK1 im heterologen System Hefe hat ergeben, dass ROCK1 eine starke Transportaktivität für UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc besitzt, wobei der relative Transport verglichen mit dem Hintergrund für UDP-GalNAc deutlich höher war (Kapitel 3.6). Daneben wurde noch eine schwache Transportaktivität für UDP-Glc detektiert. Der Golgi UDP-GlcNAc Transporter SLC35A3 des Menschen (Ishida *et al.*, 1999) zeigt die größten Sequenzähnlichkeit mit ROCK1, wenn man den Sequenzvergleich auf Proteine mit beschriebener Funktion begrenzt. Der Ausfall des homologen Gens in Rindern verursacht eine Fehlentwicklung der Wirbel (Thomsen *et al.*, 2006), möglicherweise wegen veränderter *O*- und *N*-Glykosylierung von Proteinen. Obwohl die Vorhersage des von einem NST transportierten Substrats auf Basis von Sequenzähnlichkeiten als nur sehr begrenzt möglich gilt (Freeze und Elbein, 2009), scheinen in diesem Fall die Transporter mit der ähnlichsten Sequenz auch eine ähnliche Substratspezifität zu besitzen.

In Pflanzen wurde bislang für keines der beiden Substrate ein Transporter beschrieben. Wie in der Einleitung dargelegt, besteht in Pflanzen ein bekannter lumenaler Bedarf an UDP-GlcNAc für die Bildung komplexer *N*-Glykane und einfacher *N*-GlcNAc-Modifikationen auf Proteinen (Schoberer und Strasser, 2011; Kim *et al.*, 2013) und ein vermuteter Bedarf für die Bildung von GIPCs (Sperling *et al.*, 2004). Die am besten untersuchte Verwendung von UDP-GlcNAc stellt die Modifikation von *N*-Glykanen mit GlcNAc dar. Die Verwendung von UDP-GalNAc in pflanzlichen Glykanen ist nicht bekannt, obwohl das Vorkommen des Nukleotidzuckers belegt ist (Alonso *et al.*, 2010) und die Existenz einer Transportaktivität für UDP-GalNAc in Pflanzenzellen nachgewiesen worden ist (Castilho *et al.*, 2012).

Da der Verlust von *ROCK1* zu einer Verringerung der CKX Aktivität führte (Kapitel 3.3.6.1), war die naheliegende Vermutung, dass das von ROCK1 transportierte UDP-GlcNAc bzw. UDP-GalNAc für die Modifizierung von CKX Proteinen verwendet wird. Für CKX Proteine wurde gezeigt, dass diese sowohl bei Expression in heterologen Systemen (Malito *et al.*, 2004; Kopečný *et al.*, 2005; Franc *et al.*, 2012) als auch in Pflanzen (Chatfield und Armstrong, 1988; Burch und Horgan, 1989; Kaminek und Armstrong, 1990; Motyka *et al.*, 1996; Motyka *et al.*, 2003) zum Teil *N*-glykosyliert sind. Zudem wurde von Motyka *et al.* (2003) eine mögliche regulatorische Rolle der *N*-Glykosylierung bei der subzellulären Lokalisation und Enzymaktivität von CKX Proteinen in Tabak diskutiert. Dies basierte auf dem Ergebnis, dass nach Induktion mit Cytokinin der größte Anteil der gestiegenen CKX Aktivität mit sekretierten Concanavalin A (Con A)-bindenden Formen von CKX assoziiert war (Motyka *et al.*, 2003). Con A bindet vor allem mannosereiche und hybride Glykane und mit sehr geringer Affinität auch komplexe Glykane (Brewer und Bhattacharyya, 1988). Der Anstieg von Con A-gebundenen sekretierten CKX Proteinen ist jedoch überraschend, da erwartet werden würde, dass die *N*-Glykane auf den sekretierten Formen von CKX bei der Passage durch den sekretorischen Weg in komplexe *N*-Glykane umgebaut werden würden. Diese würden dann kaum mehr von Con A gebunden werden. Zudem wurde gezeigt, dass auch innerhalb der Zellen die CKX Aktivität in Folge erhöhter Cytokininbiosynthese stieg, der Anteil der intrazellulären Con A-bindenden CKX Formen jedoch unverändert blieb (Motyka *et al.*, 2003).

Daher wurde die mögliche Rolle der *N*-Glykosylierung bei der Regulation der Aktivität von CKX1 genauer untersucht. Zunächst wurde getestet, ob es sich auch bei CKX1 um ein Glykoprotein handelt und ob *rock1-1* die *N*-Glykosylierung verändert. Die Analyse von myc-CKX1 mit Endoglycosidase H und Peptid-*N*-Glycosidase F zeigte die Existenz von *N*-Glykosylierungen (Kapitel 3.8.1). Dies stimmt mit der bioinformatischen Vorhersage von potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen auf CKX1 überein (Schmülling *et al.*, 2003). Bei der Analyse waren jedoch zwischen Wildtyp und *rock1-1* Hintergrund keine Unterschiede bezüglich Glykosylierungsstatus und Proteinabundanz von myc-CKX1 zu erkennen. In beiden Hintergründen kam es bei beiden verwendeten Enzymen zu einer identischen Verringerung der Größe von myc-CKX1. Dies weist auf das Vorhandensein von mannosereichen oder hybriden Glykanen hin. Eine genaue Unterscheidung zwischen diesen war jedoch mit dieser Methode nicht möglich, so dass es sein kann, dass myc-CKX1 im Wildtyphintergrund, nicht aber im *rock1* Hintergrund,

hybride Glykane trägt und diese eine Rolle bei der Regulation der CKX Aktivität spielen. Bei einem Gewicht von ca. 2 kDa für ein typisches mannosereiches Glykan deutet die Verringerung um ca. 6 kDa auf drei besetzte *N*-Glykosylierungsstellen anstelle der fünf für CKX1 vorhergesagten *N*-Glykosylierungsstellen hin. Der erste Schritt bei der Umwandlung von mannosereiche in hybride oder komplexe *N*-Glykane ist das Anfügen von GlcNAc durch das Enzym GnTI unter Verwendung von UDP-GlcNAc (von Schaewen *et al.*, 1993). Zwar hat in Arabidopsis der Ausfall von GnTI (*cgli*) und der damit einhergehende Verlust von hybriden und komplexen *N*-Glykanen unter physiologischen Bedingungen keine offensichtlichen morphologischen Konsequenzen (von Schaewen *et al.*, 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Abwesenheit komplexer *N*-Glykane die Fähigkeit der Pflanze, auf Salzstress zu reagieren, einschränkt (Kang *et al.*, 2008). Als mögliche Ursache wird die fehlende *N*-Glykosylierung mit hybriden oder komplexen Glykanen von Proteinen, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, diskutiert. Untersuchungen in Reis haben zudem ergeben, dass das Vorhandensein hybrider oder komplexer Glykane in dieser Pflanze auch unter physiologischen Bedingungen nötig ist (Fanata *et al.*, 2013). Daher wurde untersucht, ob das vollständige Fehlen von hybriden und komplexen *N*-Glykanen Auswirkungen auf die Ausbildung des *35S:CKX1* Phänotyps hat. Es zeigte sich, dass die *cgli* Mutation keine Auswirkungen auf den *35S:CKX1* Phänotyp hatte (Kapitel 3.8.2). Somit lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der Modifikation von CKX1, an der *ROCK1* beteiligt ist, nicht um hybride oder komplexe *N*-Glykane handelt. Gleichzeitig schließt dieses Ergebnis aus, dass andere Proteine, die eventuell an der Regulation der CKX Aktivität beteiligt sind, diese *N*-Glykane für ihre Aktivität benötigen. Zudem erweitert dieses Ergebnis zuvor publizierte Ergebnisse, die zeigten, dass ZmCKX1, eine apoplastische CKX Isoform von Mais (Galuszka *et al.*, 2005), die die höchste Sequenzähnlichkeit mit CKX2 aus Arabidopsis zeigt, trotz gezielter Mislokalisierung in das Cytosol weiterhin aktiv ist (Kopečný *et al.*, 2006). Ob die Aktivität des cytosolischen und apoplastischen ZmCKX1 identisch war, konnte dabei jedoch nicht direkt verglichen werden.

Dass keine Größenunterschiede bei der Immunoblotanalyse von myc-CKX1 im Wildtyp und *rock1-1* Hintergrund detektiert worden waren (Kapitel 3.8.1), spricht dafür, dass die mögliche Modifikation nur ein geringes Molekulargewicht hat. Kürzlich wurde eine Form von lumenaler Proteinglykosylierung in Arabidopsis beschrieben, die aus nur einem UDP-GlcNAc besteht und damit dieser Erwartung entsprechen würde (Kim *et*

al., 2013). Eine nähere Analyse der Funktion dieser Modifikation liegt bisher nicht vor. Bei Tieren wurden mit der lumenalen *O*-Fucosylierung (Wang *et al.*, 2007) sowie *O*-GalNAcylierung (Hang und Bertozzi, 2005) vieler Proteine und der *O*-Glukosylierung sowie *O*-GlcNAcylierung von Notch (Sakaidani *et al.*, 2011; Takeuchi *et al.*, 2012) bislang eine deutlich größere Vielfalt an Formen der *O*-Glykosylierung von Proteinen entdeckt als in Pflanzen. Diese haben Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation, Proteinstabilität, Enzymaktivität und Proteininteraktion (Naim und Lentze, 1992; Hang und Bertozzi, 2005; Wang *et al.*, 2007; Sakaidani *et al.*, 2011; Takeuchi *et al.*, 2012). Es ist deshalb denkbar, dass auch in Pflanzen weitere bislang nicht beschriebene Proteinmodifikationen vorkommen, zumal auch in Organismen mit intensiver untersuchter *O*-Glykosylierung als bei Pflanzen weiterhin neue Formen der *O*-Glykosylierung gefunden werden, so beispielsweise bei *Drosophila* und Maus das Anfügen von GlcNAc im ER Lumen auf eine extrazelluläre Proteindomäne (Sakaidani *et al.*, 2011; Sakaidani *et al.*, 2012). Zudem ist die Funktion vieler Glykosyltransferasen in Pflanzen noch nicht geklärt. Die hypothetische kleine Modifikation von CKX1 besteht vermutlich aus nur einem oder einigen wenigen Zuckern und enthält mindestens GlcNAc oder GalNAc. Im tierischen System häufig für den indirekten Nachweis von Glykosylierungen verwendete Methoden, wie Lektin-Blotanalyse (Gravel, 2002) oder der Nachweis von Zuckerepitopen mit Antikörpern (Liu *et al.*, 2004), sind mit Ausnahme der bereits gut charakterisierten und häufig verwendeten Bindung an die Lektine Con A und *wheat germ agglutinin* (WGA) in Pflanzen bislang nicht etabliert oder anfällig für falschpositive Ergebnisse (Zeleny *et al.*, 2006; Reaves *et al.*, 2011). Stattdessen sollte für die Isolierung der Modifikation, für die ROCK1 das Substrat transportiert, der direkte Nachweis mittels Massenspektrometrie erfolgen. Hierzu könnte das myc-CKX1 Fusionsprotein aus Pflanzen aufgereinigt werden und zum einen der Peptidfingerabdruck aus Wildtyp und *rock1* Hintergrund verglichen werden, um möglicherweise den Ort der Modifikation auf dem Protein identifizieren zu können (Wilson *et al.*, 2009). Zum anderen könnte die Zusammensetzung der jeweils auf dem Protein vorkommenden *N*- und *O*-Glykane direkt analysiert werden (Morelle und Michalski, 2007).

Die gesuchte Modifikation könnte auf verschiedene Arten Einfluss auf die CKX Aktivität haben. Zum einen kann sie die effiziente Ausbildung der Struktur der CKX Proteine beeinflussen, wobei nicht korrekt gefaltete Proteine inaktiv wären und letztendlich im Rahmen der ER-assoziierten Proteindegradation abgebaut werden

würden (Hüttner *et al.*, 2012). Zwar hat die Bestimmung der Proteinabundanz von myc-CKX1 im *rock1* Hintergrund keine Unterschiede zum Wildtyp gezeigt (Kapitel 3.8.1), es konnte bei dieser Analyse jedoch möglicherweise nicht zwischen richtig gefalteten aktiven und ungefalteten inaktiven Proteinen unterschieden werden.

Da keine genaueren Daten für die drei identifizierten Substrate von ROCK1 bezüglich der Kinetik des Transports vorhanden sind, wäre es auch denkbar, dass der gemessene niedrige Transport von UDP-Glc eine Bedeutung für die CKX Aktivität hat. Es ist bekannt, dass UDP-Glc im ER eine Rolle als Substrat bei der Reglukosylierung von Proteinen im Rahmen der Proteinfaltung spielt (Jin *et al.*, 2007). Die unvollständige Faltung in Folge eines Mangels an Substrat würde zur Ausschleusung und Degradation des Proteins führen. Bislang sind zwei Transporter für UDP-Glc, UTr1 und UTr3, identifiziert worden, deren gleichzeitiger Ausfall pollenletal ist (Reyes *et al.*, 2010). Da *ROCK1* im Pollen exprimiert wird (Kapitel 3.1), könnte es redundant wirken. Es stellt sich die Frage, ob das Auftreten eines letalen Pollenphänotyps in *utr1 utr3* Mutanten gegen eine Rolle von ROCK1 bei der Bereitstellung von UDP-Glc für die Proteinfaltung spricht. Um die Beteiligung von ROCK1 an der Proteinqualitätskontrolle im ER experimentell zu überprüfen, sollte zum einen untersucht werden, ob ER-Stress in *rock1* Pflanzen vorliegt. Dies könnte entweder durch die Analyse der Expression von Genen für ER-Chaperone oder durch die Analyse des Wuzelwachstums von *rock1* oder *utr1 rock1* Pflanzen unter Salzstressbedingungen untersucht werden (Kang *et al.*, 2008). Zusätzlich sollte untersucht werden, ob myc-CKX1 im *rock1* Hintergrund eine verringerte Proteinstabilität aufweist und schneller abgebaut wird.

Ein anderer denkbarer Einfluss wären Auswirkungen der Modifikation auf die enzymatische Aktivität. Von CKX Enzymen ist bekannt, dass die Substratbindung in einer trichterförmigen Vertiefung erfolgt (Malito *et al.*, 2004) und die Bedeutung kleinerer Unterschiede in der Struktur des Trichters bezüglich der Substratbindung wird als mögliche Ursache für die unterschiedliche Substratspezifitäten der verschiedenen CKX Isoformen diskutiert (Galuszka *et al.*, 2007). Es ist denkbar, dass die unbekannte Modifikation Einfluss auf die Ladungsstruktur des Bindetrichters von CKX1 hat und das Fehlen zu einer schwächeren Bindung des Cytokinins führt. Das Gleiche gilt für die Bindung des bislang nicht identifizierten sekundären Elektronenakzeptors der katalytischen Reaktion von CKX Enzymen. Der mögliche Einfluss von Glykosylierungen auf die Substratbindung (Boraston *et al.*, 2001; Le Roy *et al.*, 2007) und enzymatische Aktivität (Naim und Lentze, 1992; Miller *et al.*, 1996; Nagai *et al.*,

1997) ist lange bekannt. Es könnte sein, dass diese Modifikation im Falle von CKX Enzymen der Feinregulation der CKX Aktivität in bestimmten Geweben wie beispielsweise dem Infloreszenzmeristem dient.

Auch wenn es nur wenig wahrscheinlich ist, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Modifikation, für die das von ROCK1 transportierte Substrat verwendet wird, um eine Lipidmodifikation anstelle einer Proteinmodifikation handelt. Die CKX Aktivität wäre dann von dem Vorhandensein bestimmter Lipidmetaboliten beeinflusst. Von Untersuchungen aus Tieren ist bekannt, dass die Zusammensetzung von Membranbereichen aus unterschiedlichen Lipidmetaboliten Einfluss auf die Aktivität von Enzymen hat, die sich in diesen Bereichen befinden (Brignac-Huber *et al.*, 2011) und auch in Arabidopsis existieren Hinweise auf die Bedeutung bestimmter Lipidmetaboliten für die Funktion von Proteinen (Chao *et al.*, 2011). Von GIPCs ist bekannt, dass sie GlcNAc enthalten können (Sperling *et al.*, 2004).

Für ROCK1 konnte ein für die Lokalisation im ER verantwortliches Dilysinmotiv identifiziert werden (Kapitel 3.2). Die zuvor beschriebene Lokalisation von ROCK1-GFP im Golgi (Niemann, 2008) kam vermutlich durch eine Maskierung dieses Motivs durch das GFP. Ähnliche Fälle sind aus der Literatur bekannt (Kabuss *et al.*, 2005; Lee und Cooley, 2007). Einen weiteren Hinweis auf die Funktion des C-Terminus von ROCK1 als ER-Retentionssignal lieferte die ER-Lokalisation eines Fusionsproteins aus dem menschlichen Golgitransporter SLC35A3 und dem C-Terminus von ROCK1. Es kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieses menschliche Protein in Pflanzen nicht auch von alleine im ER lokalisieren würde. Im Gegensatz zu ROCK1 befinden sich die meisten anderen bislang charakterisierten NSTs von Pflanzen im Golgi (Baldwin *et al.*, 2001; Handford *et al.*, 2004; Bakker *et al.*, 2005; Rollwitz *et al.*, 2006; Handford *et al.*, 2012). Das Vorhandensein einer speziellen Domäne zur Vermittlung der ER Lokalisation macht es wahrscheinlich, dass die mutmaßliche Proteinmodifikation im ER stattfindet. Darüber hinaus ist es denkbar, dass in einigen Geweben von Arabidopsis ein ROCK1 Protein vorkommt, welches dem Genmodell *At5g65000.2* entspricht. Dieses hätte einen anderen C-Terminus und kein erkennbares ER-Retentionssignal, so dass dieses womöglich im Golgi lokalisiert wäre.

4.3 Funktionelle Nullallele von *ROCK1* führen nur zu geringfügigen morphologischen Veränderungen

Um Hinweise auf Entwicklungsprozesse zu erhalten, an denen *ROCK1* beteiligt ist, bedurfte es funktionellen Nullallelen von *ROCK1*. Die Analyse der Auswirkungen der *rock1-1* Mutation ergab, dass diese zu einer Verringerung der ROCK1 Proteinabundanz und einer teilweise veränderten subzellulären Lokalisation führte (Kapitel 3.3.2). Es ist bekannt, dass die Länge der ersten TMD für den effizienten Einbau der zweiten TMD von Bedeutung ist (Ota *et al.*, 2000). Da das durch die Mutation eingefügte Arginin eine stark hydrophile Aminosäure ist, könnte es sein, dass der korrekte Einbau der ersten und womöglich auch zweiten TMD in die Membran gestört ist. Die falsche Faltung und darauf folgende Degradation könnten die Ursache für die geringere Proteinabundanz des mutierten Proteins sein. Auch wenn die beobachtete verringerte Proteinabundanz als Ursache für die verringerte Funktion nahelegt, können weitere andere Ursachen nicht ausgeschlossen werden. Es ist von anderen Typ-II Transmembranproteinen bekannt, dass bei diesen die ersten TMD als Signalsequenz für die Fortführung der Proteinsynthese an der ER-Membran dient (Goder und Spiess, 2001). Möglicherweise ist diese Funktion der ersten TMD bei $ROCK1^{Gly29Arg}$ gestört, so dass ein Teil der Proteine nicht die ER-Membran erreicht. $ROCK1^{Gly29Arg}$ -GFPin zeigte Veränderungen bei der subzellulären Lokalisation (Kapitel 3.3.2). Eine weitere Möglichkeit wäre der Verlust von Interaktionen von ROCK1 mit anderen Proteinen. Vor allem die Bedeutung einer möglichen Interaktion von NSTs mit Glykosyltransferasen wird als Grundlage für die Kanalisierung bestimmter Glykosylierungsreaktionen diskutiert (Seifert *et al.*, 2002; Sprong *et al.*, 2003; Nguema-Ona *et al.*, 2006; Rosti *et al.*, 2007; Handford *et al.*, 2012). Diese Untersuchungen lassen keine abschließende Aussage darüber zu, ob die verringerte Proteinabundanz, eine teilweise veränderte subzelluläre Lokalisation oder ein kompletter Verlust der Transportaktivität des $ROCK1^{Gly29Arg}$ Proteins ursächlich für die Suppression des Cytokinidefizienzsyndroms in *35S:CKX1* Pflanzen war.

Durch die Isolierung des transkriptionellen Nullallels *rock1-3* war die Analyse der Konsequenzen eines sicheren vollständigen *ROCK1* Verlusts möglich (Kapitel 3.3.3). *rock1-3* Pflanzen zeigten keine phänotypischen Veränderungen im Spross, die über die bei *rock1-1* und *rock1-2* vorhandenen hinausgingen (Kapitel 3.3.4). Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde ein Screen publiziert, in dem in der SALK T-DNA Insertionssammlung nach Mutanten mit veränderter Pollenentwicklung gesucht worden war (Dobritsa *et al.*, 2011). Für die hierbei isolierte Mutante *thin-exine 2-1* (*tex2-1*)

wurde eine Deletion von sieben Basenpaaren in *ROCK1*, die zum Abbruch der Translation nach 29 Aminosäuren führt, als ursächlich identifiziert. Über den Pollenphänotyp hinaus wurden keine weiteren phänotypischen Veränderungen bei den *tex2-1* Pflanzen beschrieben. Dies unterstützt die Annahme, dass die bei *rock1-2* und *rock1-3* beobachteten milden phänotypischen Konsequenzen nicht durch eine verbleibende Restaktivität von ROCK1 bedingt werden, sondern es sich auch bei diesen beiden Allelen um vollständige Funktionsverluste handelt. Da alle drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten *rock1* Allele quantitativ vergleichbare Auswirkungen auf die Aktivität des Infloreszenzmeristems hatten (Kapitel 3.3.4), kann geschlossen werden, dass auch *rock1-1* ein starkes Mutantenallel ist.

ROCK1 spielt folglich also keine zentrale Rolle bei der vegetativen Entwicklung der Pflanze unter physiologischen Bedingungen. Da es unwahrscheinlich ist, dass es eine spezielle Modifikation für die ausschließliche Regulation der CKX Enzyme gibt, stellt sich zum einen die Frage, ob es Hinweise auf weitere Proteine gibt, die die fragliche Modifikation tragen und zum anderen, warum ein teilweiser Funktionsverlust bei diesen Proteinen nicht zu phänotypischen Veränderungen führt.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass regulierende Mechanismen existieren, die Veränderungen an durch *ROCK1* beeinflussten Proteinen kompensieren. Im Fall der verringerten Aktivität der CKX Enzyme dürfte die Existenz eines zweiten Deaktivierungsmechanismus für biologisch aktive Cytokinine in Form der *N*-Glykosylierung sein (Mok und Mok, 2001). Tatsächlich war der Anteil an *N*-glukosylierten Cytokininin in *rock1* Pflanzen höher als im Wildtyp (Kapitel 3.3.5.2) und es wurde bei Gabe von exogenem iP in den *rock1-2* Pflanzen ein signifikant größerer Teil als beim Wildtyp in *N*-glukosylierte Formen umgewandelt (Kapitel 3.5). Unterstützt wird die Annahme, dass die Verringerung der CKX Aktivität durch andere Regulatoren der Cytokininhomöostase kompensiert werden kann, dadurch, dass der gleichzeitige Verlust von *CKX2* bis *CKX7*, außer den erwähnten Veränderungen bei generativem Sprossmeristem und Blütenentwicklung, zu keinen dramatischen morphologischen Veränderungen im Spross führt (persönliche Mitteilung Dr. I. Bartrina).

Die Auswirkungen auf andere Proteine, die durch das Substrat von ROCK1 modifiziert sind, könnten zudem dadurch geringer ausfallen, da weitere Transporter mit überschneidender Substratspezifität in ER oder Golgi existieren und somit den Verlust von ROCK1 zum Teil kompensieren könnten. Ein Transporter für UDP-GlcNAc oder

UDP-GalNAc im Golgi ist bisher zwar nicht identifiziert worden, der Bedarf zumindest für UDP-GlcNAc besteht jedoch auf Grund der Lokalisation von GnTI und GnTII im Golgi (Schoberer und Strasser, 2011). Grundsätzlich ist zudem ein retrograder Austausch von Nukleotidzuckern mit dem Golgi denkbar, so dass der Verlust des Substrates in einem der Kompartimenten dadurch ausgeglichen werden könnte. Dieser Vorgang wurde in *Drosophila* gezeigt, wo es jeweils einen GDP-Fuc Transporter in ER und Golgi gibt, die Einzelmutanten nur schwache Konsequenzen haben, die Doppelmutante beider Transporter jedoch den Verlust der GDP-Fuc Synthese phänokopiert (Ishikawa *et al.*, 2010). Die vorhandene basale lumenale Menge des Substrates von ROCK1 kann dann, wenn die anderen betroffenen Proteine bessere Substrate für die Glykosyltransferase darstellen als die CKX Enzyme, für die Modifikation dieser Proteine auch in Abwesenheit von ROCK1 ausreichend sein. Dies wäre vergleichbar mit den bei verschiedenen Proteinen unterschiedlich stark auftretenden Auswirkungen auf die *N*-Glykosylierung in Folge der Verringerung der UDP-GlcNAc Biosynthese (Nozaki *et al.*, 2012) oder des Ausfalls einer Untereinheit des Oligosaccharyltransferasekomplexes (Lerouxel *et al.*, 2005). Darüber hinaus könnte die *rock1* Mutation unter Stressbedingungen zusätzlich limitierend wirken, wie es für die *cgl1* Mutation gezeigt worden war (Kang *et al.*, 2008). Die Analyse des *rock1* Phänotyps unter verschiedenen Stressbedingungen könnte Hinweise auf weitere Proteine liefern, die mit dem von ROCK1 transportierten Substrat modifiziert werden.

Kürzlich wurde berichtet, dass der Ausfall von hybriden und komplexen Glykanen in Reis zu einer verringerten Cytokininsensitivität führt und die Autoren mutmaßen, dass die Cytokininrezeptoren negativ beeinflusst werden (Fanata *et al.*, 2013). Es ist von anderen Rezeptoren bekannt, dass *N*-Glykosylierungen sowohl bei der korrekten Faltung von Rezeptorproteinen als auch bei der Interaktion von Rezeptor und Substrat eine Rolle spielen (Møller *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 2007). Es ist nicht davon auszugehen, dass *rock1* auf ähnliche Weise wie *cgl1* Auswirkungen auf die Cytokininrezeptoren hat, da der Cytokininstatus durch *rock1* in *Arabidopsis* erhöht und nicht wie durch *cgl1* in Reis verringert wird. Unabhängig davon kommt es zu einer geringfügigen Suppression des *ahk2 ahk3* Phänotyps durch *rock1* (Kapitel 3.3.6.2). Obwohl vieles darauf hindeutet, dass *rock1* primär durch die Verringerung der CKX Aktivität wirkt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *ROCK1* auch die Cytokininrezeptoren beeinflusst. Die betroffene Modifikation wäre jedoch eine andere als die in *cgl1* Reismutanten.

4.4 *ROCK1* ist an der Pollenentwicklung beteiligt

Die Isolierung des *tex2-1* Allels, welches zu einer dünneren Exinschicht auf dem Pollen und einem Verlust des geordneten Exinmusters führt, deutet auf eine Rolle von *ROCK1* bei der Pollenentwicklung hin (Dobritsa *et al.*, 2011). Die Expressionsanalyse hatte gezeigt, dass *ROCK1* auch in Pollen exprimiert wurde (Kapitel 3.1). Auch bei *rock1-1*, *rock1-2* und *rock1-3* Pflanzen wurden Veränderungen bei der Pollenentwicklung beobachtet, diese jedoch nicht weiter untersucht. Die Exinschicht ist die äußere Schutzhülle des Pollens und besteht aus einer bislang nicht vollständig bekannten Mischung aus Phenolen, Fettsäuren und Alkanen (Ariizumi und Toriyama, 2011). Für die geordnete Synthese ist die vorherige Ausbildung der sogenannten Primexinschicht nötig, welche vor allem aus Polysacchariden besteht. Cytokinin spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Pollen und der Ausfall der Cytokininsignalweiterleitung führt zu weniger und schlechter keimenden Pollen (Kinoshita-Tsujimura und Kakimoto, 2011). Die Auswirkungen eines erhöhten Cytokininstatus auf die Pollenentwicklung, wie er in *rock1* Pflanzen vorliegt, wurden bislang nicht untersucht. Es ist möglich, dass die Auswirkungen von *rock1* auf die Pollenentwicklung ein Hinweis auf weitere durch *ROCK1* beeinflusste Proteine ist. Da *ROCK1* Nukleotidzucker transportiert, könnte *ROCK1* jedoch auch direkt an der Bereitstellung von Substraten für die Synthese der Primexinschicht beteiligt sein (Dobritsa *et al.*, 2011). Die Messung der Nukleotidzucker hatte ergeben, dass in *rock1* Keimlingen der Gehalt vieler Nukleotidzucker verändert war (Kapitel 3.7). Die Veränderung des Gehaltes an Nukleotidzuckern kann negative Auswirkungen auf die Pollenentwicklung haben (Geserick und Tenhaken, 2013). Interessanterweise existieren zwischen verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis* Unterschiede bezüglich der Ausprägung des *tex2* Phänotyps. Dobritsa *et al.* (2011) fanden bei der Analyse eines weiteren im Ökotyp Landsberg *erecta* vorliegenden *tex2* Allels, dass dieses drastischere Konsequenzen auf die Pollenentwicklung hat. Es kommt in Folge eines Zusammenziehens des Cytoplasmas in den Mikrosporen zu einer kompletten Unterbrechung der Pollenentwicklung, was zu sterilen Pflanzen führt. Was genau in diesem Ökotyp die Ursache für den Abbruch der Pollenentwicklung ist, ist nicht bekannt.

4.5 *rock1-1* wird nicht durch einen menschlichen UDP-GlcNAc Transporter komplementiert

Im heterologen System Hefe wurde gezeigt, dass ROCK1 eine Transportaktivität für UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc sowie eine schwache Transportaktivität für UDP-Glc besitzt (Kapitel 3.6). Um zu überprüfen, ob Veränderungen beim Transport von UDP-GlcNAc ursächlich für die Auswirkungen der *rock1-1* Mutation sind, wurde zuerst versucht, die *rock1-1 35S:CKX1* Pflanzen mit einem UDP-GlcNAc Transporter zu komplementieren. Der menschliche Transporter SLC35A3 zeigte nach Optimierung der Codons für die Expression in Arabidopsis eine hohe Proteinabundanz. Der *rock1-1 35S:CKX1* Phänotyp wurde jedoch nicht durch diesen UDP-GlcNAc Transporter komplementiert (Kapitel 3.9).

Dies kann verschiedene Gründe haben. Die naheliegende Erklärung ist, dass die Suppression des *35S:CKX1* Phänotyps durch *rock1-1* nicht die Folge eines verringerten UDP-GlcNAc Transports ist. Dennoch kann der verringerte UDP-GlcNAc Transport nicht völlig als Ursache ausgeschlossen werden. Es kann sein, dass das menschliche Protein in Pflanzen nur eine eingeschränkte Funktionalität besitzt. Untersuchungen haben gezeigt, dass menschliche Enzyme mit identischer Funktion in Pflanzen eine verringerte Aktivität besitzen können (Henquet *et al.*, 2010). Zudem lokalisiert SLC35A3 im Menschen im Golgi, in Arabidopsis jedoch bedingt durch den anfusionierten C-Terminus von ROCK1 im ER. Es existieren Beispiele, bei denen die unterschiedliche Dicke der Biomembranen in diesen Kompartimenten die Funktionalität von Proteinen beeinflussen (Killian, 1998). Eine weitere Möglichkeit ist, dass für eine erfolgreiche Komplementation nativ vorkommende Interaktionen mit Glykosyltransferasen von Bedeutung sein könnten (Handford *et al.*, 2012). Auf die Bedeutung der Kanalisierung von Transport und Einbau von Nukleotidzuckern in die Zielstruktur weisen Untersuchungen über die Auswirkungen des Ausfalls bestimmter UDP-Glukose-4-Epimerasen (UGE), welche die Umwandlung von UDP-Glc in UDP-Gal synthetisieren, hin. *uge4* verringert die Galaktosylierung von Xyloglukanen und Arabinogalaktanproteinen, nicht aber die von Galaktolipiden (Seifert *et al.*, 2002) und Pektinen (Nguema-Ona *et al.*, 2006).

ROCK1 zeigte neben einer Transportaktivität für UDP-GlcNAc noch eine deutlich höhere Transportaktivität für UDP-GalNAc. Obwohl bislang keine Funktion für UDP-GalNAc in Pflanzen bekannt ist, wurde in Pflanzen eine UDP-GalNAc Transportaktivität festgestellt (Castilho *et al.*, 2012), wobei die Spezifität dieser auf

Grund des nicht bekannten Transportproteins nicht bekannt ist. Aus diesem Grund ist es notwendig, zu untersuchen, ob die Expression eines Transporters mit UDP-GalNAc Transportaktivität zu einer Komplementation führt. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre der menschliche Transporter SLC35A2, der zusätzlich auch UDP-Gal transportiert (Segawa *et al.*, 2002). Auch in Trypanosomen, wo ebenfalls kein bekannter Bedarf für UDP-GalNAc besteht, existiert mit dem Transporter TbNST4 ein NST, der neben GDP-Man sowohl UDP-GlcNAc als auch UDP-GalNAc transportiert (Liu *et al.*, 2013). Die Autoren der Studie erklären diese breite Substratspezifität mit einer geringen Stringenz bei der Erkennung des transportierten Substrates. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass eine Verringerung des Transports aller drei identifizierten Substrate von ROCK1 die Ursache für die Suppression des *35S:CKX1* Phänotyps durch *rock1-1* ist. Es ist weiterhin denkbar, dass beim Transport durch ROCK1 ein Austausch gegen einen anderen Nukleotidzucker von Nöten ist (Muraoka *et al.*, 2007). Dies könnte erklären, warum der Ausfall von *ROCK1* nicht nur den Gehalt an UDP-GlcNAc oder UDP-GalNAc in Arabidopsis, sondern auch den an GDP-Fuc veränderte (Kapitel 3.7). Zudem wurde bei Expression von *ROCK1* signifikant weniger GDP-Fuc in Hefemikrosomen aufgenommen (Kapitel 3.6). Möglich wäre ein Austausch von UDP-GlcNAc und/oder UDP-GalNAc gegen GDP-Fuc beim Transportvorgang. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei ROCK1 um einen Transporter mit breiter Substratspezifität handelt, der Nukleotidzucker mit Purin- und Pyrimidinanteil transportieren kann (Liu *et al.*, 2013).

Trotz der Identifizierung von UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc als Substrate von ROCK1 kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass ROCK1 weitere Substrate transportiert und der fehlende Transport von einem von diesen ursächlich für die Verringerung der CKX Aktivität ist. Beispielsweise konnte, obwohl das Vorkommen von CMP-Sia in Pflanzen kritisch diskutiert wird (Zeleny *et al.*, 2006), durch Komplementation einer mutanten Säugetierzelllinie ein Nukleotidzuckertransporter aus Arabidopsis mit CMP-Sia Transportaktivität isoliert werden (Bakker *et al.*, 2008). Der direkte Vergleich der Aktivität mit einem bekannten CMP-Sia Transporter aus der Maus ergab jedoch, dass der CMP-Sia Transport bei dem NST aus Arabidopsis deutlich geringer ist. Somit besteht weiterhin die Möglichkeit, dass das für die CKX1 Aktivität relevante Substrat von ROCK1 ein nicht getesteter Nukleotidzucker ist oder aber einer anderen chemischen Klasse angehört. In der Zukunft sollten weitere Substanzen darauf hin untersucht werden, ob sie von ROCK1 transportiert werden können.

4.6 Der Wurzelphänotyp von 35S:ROCK1 Pflanzen, nicht aber der Sprossphänotyp, wird durch Cytokinin beeinflusst

Um weitere Hinweise auf die physiologische Funktion von *ROCK1* zu erhalten, wurden die Auswirkungen einer starken Überexpression auf die Pflanze untersucht. Eine vergleichbare Analyse mit dem Ziel der starken Überexpression eines Nukleotidzuckertransporters wurde meines Wissens bislang nicht veröffentlicht. Die Überexpression von *ROCK1* hatte starke Auswirkungen auf die Entwicklung des Sprosses und geringere Auswirkungen auf die Wurzel (Kapitel 3.4.1). Die beobachtete frühere Blattseneszenz sowie die verringerte Anzahl an axillären Seitensprossen und gebildeter Blüten könnten Hinweise auf einen verringerten Cytokininstatus sein (Gan und Amasino, 1995; Werner *et al.*, 2003). Mehrere Ergebnisse sprechen jedoch klar gegen einen verringerten Cytokininstatus als Ursache für den *35S:ROCK1* Sprossphänotyp. Zum einen führten weder der chemische CKX Inhibitor *INCYDE* noch die konstitutiv aktiven Cytokininrezeptorallele *rock2* und *rock3* zu einer deutlichen phänotypischen Reversion (Kapitel 3.4.2). Zum anderen zeigte die Messung der Umwandlung exogen appliziertem Cytokinins keine Veränderung beim Abbau (Kapitel 3.5) und die Bestimmung des Cytokininstatus durch Vergleich der Abundanz von Cytokininantwortgenen ergab ebenfalls kaum Veränderungen (Kapitel 3.4.3). Stattdessen war der Cytokiningehalt sowohl im Spross als auch im gesamten Keimling von *35S:ROCK1* Pflanzen leicht erhöht (Kapitel 3.4.3). Somit lässt sich deutlich sagen, dass der Sprossphänotyp von *35S:ROCK1* Pflanzen nicht durch einen verringerten Cytokininstatus hervorgerufen wurde. Da die Erhöhung der aktiven Cytokinine zu einer Verzögerung der Seneszenz führt (Gan und Amasino, 1995; Kuroha *et al.*, 2009) und die Transkriptabundanz primärer Cytokininantwortgene nicht erhöht war, ist ein erhöhter Cytokininstatus als Ursache für die phänotypischen Veränderungen jedoch ebenfalls unwahrscheinlich.

Die Überexpression von *ROCK1* führte zu einer verringerten Elongation der Hauptwurzel und weniger Seitenwurzeln (Kapitel 3.4.1). Die Bestimmung der Cytokininsensitivität der Wurzelentwicklung in *35S:ROCK1* Pflanzen zeigte, dass diese sensitiver gegenüber exogen appliziertem Cytokinin waren (Kapitel 3.4.3). Diese Veränderungen gleichen denen in Pflanzen mit einem erhöhtem Cytokiningehalt (Kuderova *et al.*, 2008). Zusammen mit dem in *35S:ROCK1* Pflanzen gemessenen erhöhten Cytokiningehalt (Kapitel 3.4.3) und dem höheren Anteil an iP, iPR und iPRP nach exogener Gabe von iP (Kapitel 3.5) deutet dies darauf hin, dass der *35S:ROCK1*

Wurzelphänotyp durch einen erhöhten Cytokininstatus bedingt sein könnte. Als Ursache für die erhöhte Cytokininsensitivität in den *35S:ROCK1* Wurzeln kommt eine verringerte Fähigkeit der Deaktivierung von Cytokininen durch *N*-Glykosylierung in Betracht. Die Messung der Transkriptabundanz von *UGT76C2*, einer der an der *N*-Glukosylierung von Cytokininen beteiligten Glykosyltransferase (Hou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011), ergab eine signifikante Verringerung in *35S:ROCK1* Sprossen (Kapitel 3.4.3). Zudem zeigte sich, dass ein signifikant geringerer Anteil exogen appliziertem iP und iPR als im Wildtyp *N*-glukosyliert wurde (Kapitel 3.5). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Störung des UDP-Glc Haushaltes liegen, welches als Substrat für die *N*-Glukosylierung von Cytokininen dient. Die Nukleotidzuckermessung hat jedoch für UDP-Glc keine Veränderung gezeigt (Kapitel 3.7).

Aus den vorliegenden Daten lassen sich keine eindeutigen Hinweise auf die Ursachen für die beim *35S:ROCK1* Spross beobachteten phänotypischen Veränderungen ableiten. Denkbar wäre, dass der regulierte Transport bestimmter Nukleotidzucker in das Lumen von ER und Golgi in Folge eines verschobenen Transports anderer Nukleotidzucker gestört wird. Dies könnte zu Veränderungen bei Proteinmodifikationen und Proteinaktivität führen. Die Auswirkungen auf den cytosolischen Gehalt an Nukleotidzuckern wären entsprechend gering und nur schwer zu detektieren. Möglicherweise ist hierbei auch die Aktivität vieler NSTs als Antiporter von Nukleotidzucker und korrespondierendem Nukleotidmonophosphat beteiligt (Abeijon *et al.*, 1993). Der Verlust von zwei an der Umwandlung von Nukleotiddiphosphate in Nukleotidmonophosphate beteiligten Enzymen (Wolf *et al.*, 2007) und die Verringerung des Gehaltes bestimmter Nukleotidzucker (Rautengarten *et al.*, 2011) haben drastische Auswirkungen auf die frühe Keimlingsentwicklung. Die Bedeutung der Feinregulation des Nukleotidzuckergehalts zeigt sich auch darin, dass viele an der Umwandlung beteiligte Enzyme durch Rückkopplungsschleifen oder andere Nukleotidzucker inhibiert werden (Molhoj *et al.*, 2003; Pattathil *et al.*, 2005; Oka *et al.*, 2007). Für eine eher unspezifische Störung des Nukleotidzuckerhaushalts als Ursache für den *35S:ROCK1* Sprossphänotyp könnte auch sprechen, dass die genaue subzelluläre Lokalisation des überexprimierten Transporters nicht entscheidend zu sein scheint. Der *35S:ROCK1* Phänotyp wird ebenfalls durch das *35S:ROCK1-GFP* Transgen hervorgerufen, welches für ein Golgi-lokalisiertes Fusionsprotein kodiert (Kapitel 3.4.3).

4.7 Die Suppression des Cytokinindefizienzsyndroms durch *rock1* ist von weiteren Genen abhängig

Bei der Suche nach Genen, die an der Suppression des *35S:CKX* Phänotyps durch *rock1-1* beteiligt sind, konnten Suppressormutanten von *rock1-1* isoliert werden. Zielphänotyp war der klar definierte *35S:CKXI* Phänotyp, der aus einer Verringerung des Rosettendurchmessers, einer charakteristischen Blattform, einem verlängertem Plastochron und einer deutlich kleineren Infloreszenz besteht. Es wurden insgesamt sechs Suppressormutanten isoliert (Kapitel 3.10.1). In zwei von diesen waren alle Aspekte des *35S:CKXI* Phänotyps im Spross fast vollständig wieder hergestellt und in einer trat sogar ein vermutlich stärkerer Cytokinindefizienzphänotyp als in der *35S:CKXI* Linie auf. In drei weiteren Linien wurden die Auswirkungen von *rock1-1* auf die vegetative Rosettenentwicklung supprimiert, andere Aspekte der pflanzlichen Entwicklung nach der Blühinduktion wiesen jedoch Unterschiede auf. In letztgenannten Fällen sind womöglich Gene betroffen, die in nur einem Teil der Sprossgewebe an der Suppression des *35S:CKXI* Phänotyps durch die *rock1-1* Mutation beteiligt sind. Die Komplementationstests der ersten drei Linien ergaben, dass in diesen die ursächlichen Mutationen dasselbe Gen betrafen (*rio1*). Die zweite Gruppe, bestehend aus Mutanten mit einer teilweisen Suppression von *rock1-1*, wurde nicht auf Allelie hin untersucht. Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Suppression der CKX Aktivität durch *rock1-1* weitere Gene benötigt werden. Der Unterschied im Ausmaß der Suppression zwischen den zwei Gruppen an erhaltenen Mutanten deutet darauf hin, dass daran mindestens zwei Gene beteiligt sind. Die Anzahl der möglichen identifizierten Mutanten in einem saturierten genetischen Screen hängt von der Anzahl der in Frage kommenden betroffenen Zielgene ab. Die Berechnung der für einen saturierten Screen notwendigerweise untersuchten Pflanzen basiert auf Schätzungen bezüglich der potentiellen Zielgene (Jürgens *et al.*, 1991). Der Fakt, dass drei Allele von *rio1* isoliert wurden waren, deutet darauf hin, dass die Anzahl der an dem Prozess, der zur Verringerung der CKX Aktivität durch den Verlust von *ROCK1* führt, beteiligten Gene gering ist. Wenn man nur die vollständige phänotypische Reversion im Sprossphänotyp als Zielphänotyp in Betracht zieht, deutet die ausschließliche Isolierung von drei Allelen von *rio1* darauf hin, dass die Isolierung von Mutationen in weiteren Genen unwahrscheinlich und der Screen somit gesättigt ist. Einschränkend muss hierbei dennoch beachtet werden, dass unterschiedliche Loci unterschiedlich leicht mutagenisiert werden (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984), so dass noch weitere vollständige

Suppressormutationen beim Durchsuchen einer größerer Anzahl an M2 Linien gefunden werden könnten. Da nicht bekannt ist, in wie weit in der zweiten Gruppe an unvollständigen Mutanten ebenfalls allelische Mutationen vorhanden sind, können keine weiteren Rückschlüsse auf die Saturierung des Screens nach Suppressormutanten von Teilaspekten des *rock1-1* Phänotyps gezogen werden.

Um die die ursächliche Mutation in den beiden allelischen Linien *rio1-1* und *rio1-2* zu identifizieren, wurden diese kartiert. Die hierfür erstellten Kartierungspopulationen basierten auf einer Kreuzung der jeweiligen *rio1* Mutante mit der Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKX1* (Kapitel 3.10.2). Die Eingrenzung des Kartierungsintervalls erfolgte durch die Analyse der Kopplung neuer durch die EMS-Mutagenese eingeführter SNPs mit der Mutation. Die Isolierung und Analyse der SNPs erfolgte durch Resequenzierung der Genome mittels der *next generation sequencing* Illumina Technologie (Hartwig *et al.*, 2012). Dieser Ansatz wurde gewählt, weil die geeigneten Pflanzen der Kartierungspopulation nicht nur den Cytokinindefizienzphänotyp zeigen, sondern auch homozygot für *rock1-1* sein mussten. Bei Verwendung eines anderen Ökotyps für die Erzeugung der Kartierungspopulation hätten zunächst geeignete F2 Pflanzen isoliert werden müssen, was durch das zusätzliche Auftreten von Heterosis- (Bartrina, 2006) und Dosiseffekten des *35S:CKX1* Transgens (Kapitel 3.3.1) erschwert worden wäre.

Die verwendete Größe der Kartierungspopulation und erhaltene durchschnittliche Anzahl an Sequenzinformationen je Position war deutlich höher als in einem vergleichbaren Ansatz in Reis (Abe *et al.*, 2012) und das in den beiden *rio1* Mutanten jeweils eingegrenzte ca. 2,5 Mb große Kartierungsintervall lag in einem überlappenden Bereich von Chromosom 1. Bei der sich anschließenden Suche nach möglichen Kandidatengen für *rio1* wurden sowohl eindeutig neue, da nur in einer von beiden Mutantenlinien vorhandene, SNPs identifiziert, als auch in beiden Mutantenlinien identische SNPs. Dies zeigt den Nachteil der Verwendung einer zuvor bereits mit EMS mutagenisierten Linie, wie *rock1-1 35S:CKX1*, für die neuerliche Mutagenese, da nicht zuordbar ist, wann diese identischen SNPs entstanden sind. Es konnten unter den eindeutig neuen SNPs keine identifiziert werden, die in beiden *rio1* Linien dasselbe Gen betreffen. Mögliche Ursachen hierfür können sein, dass die Annotation des betroffenen Gens fehlt oder unvollständig ist, dass eine bislang unbekannte miRNA betroffen ist oder dass die Mutationen Auswirkungen auf regulatorische Elemente wie Promotor oder Chromatinstruktur haben. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass es in beiden Linien unabhängig zu einer Mutation in derselben Position des Genoms

gekommen war. Das Auftreten solch eines Falls ist aus der Literatur bekannt (Cuperus *et al.*, 2010). Dieses ist umso eher möglich, wenn wie in diesem Fall alle identifizierten vollständigen Suppressormutationen dasselbe Gen betrafen. Dass die ursächlichen Mutationen in beiden Linien tatsächlich durch unabhängige Mutationsereignisse entstanden sind, wird durch die hohe Anzahl an jeweils nur in einer Linie vorkommenden neuen SNPs unterstützt. Für die Identifizierung des *riol* Gens sollte untersucht werden, ob die gemeinsamen SNPs, die im Vergleich zum Referenzgenom identifiziert worden waren, tatsächlich alle auch in der Ausgangslinie *rock1-1 35S:CKX1* vorkommen. Dies kann durch Resequenzierung des Genoms mit einer niedrigen Anzahl an Sequenzinformationen je Position erfolgen. Eine andere Möglichkeit wäre der Versuch, *riol* durch Komplementation mit transformationskompetenten künstlichen Chromosomen zu verorten (Liu *et al.*, 1999). Alternativ könnte das Kartierungsintervall durch klassische Markeranalyse in einer durch Kreuzung mit einem anderen Ökotyp entstandenen Kartierungspopulation weiter eingegrenzt werden. Die Identifizierung von *RIO1* und den weiteren *RIO* Genen wird weitere Hinweise auf die physiologische Funktion von *ROCK1* in Pflanzen liefern.

5. Zusammenfassung

Das Gen *ROCK1* war in einem genetischen Screen in *Arabidopsis thaliana* als positiver Regulator der Cytokinindefizienz identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde *ROCK1* molekular charakterisiert und die Rolle von *ROCK1* bei der Cytokininhomöostase untersucht.

Die Untersuchung der *ROCK1* Expressionsdomänen durch das Reportergenkonstrukt *ROCK1:ROCK1-uidA* hat ergeben, dass *ROCK1* in Spross und Wurzel vor allem in jungem teilungsaktivem Gewebe exprimiert wird. Die detaillierte Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte, dass es sich bei *ROCK1* um ein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierendes Protein handelt. Der Verlust eines C-terminalen Dilysinmotivs führte zur fast vollständigen Lokalisation im Golgi.

Der Vergleich des Cytokiningehalts in *rock1-1 35S:CKX1* mit *35S:CKX1* Pflanzen ergab, dass dieser im Spross deutlich stärker erhöht war als in der Wurzel. Es ist möglich, dass diese Zunahme die Ursache für die phänotypische Reversion war. *rock1* verringerte die CKX Aktivität und supprimierte den Cytokinindefizienzphänotyp bei den Linien *35S:CKX1*, *35S:CKX2* und *35S:CKX3*, nicht jedoch bei *35S:CKX7-GFP*. *rock1* hatte nur geringe Auswirkungen auf den Cytokinindefizienzphänotyp von Mutanten mit verringerter Cytokininperzeption oder -synthese. Dies deutet darauf hin, dass *ROCK1* den Cytokininstatus primär durch die Verringerung der Aktivität von CKX Enzymen beeinflusst. Der Verlust von *ROCK1* im Wildtyphintergrund führte zu einer erhöhten Aktivität des generativen Sprossapikalmeristems, hatte jedoch nur milde Konsequenzen für den vegetativen Phänotyp. Der Gesamtcytokiningehalt der *rock1* Pflanzen war erhöht, der Cytokininstatus jedoch nur leicht erhöht und die Cytokininsensitivität unverändert. Sowohl der höhere Anteil an *N*-glukosylierten Cytokinen, die bei exogener Gabe von Cytokinin entstanden, als auch die überproportionale Zunahme der *N*-glukosylierten Cytokininmetabolite im Gesamtcytokiningehalt lieferten Hinweise darauf, dass die *N*-Glykosylierung von Cytokinen in *rock1* Pflanzen die verringerte Deaktivierung durch Abbau kompensieren konnte.

Die Überexpression von *ROCK1* führte zu einer verfrüht einsetzenden Blattseneszenz und einem geringeren Wurzelwachstum. Der Sprossphänotyp entstand nicht durch einen verringerten Cytokininstatus in Folge einer erhöhten CKX Aktivität und der Cytokininstatus im Spross war unverändert. Die Wurzel zeigte eine erhöhte

Cytokininsensitivität, womöglich in Folge einer verringerten Fähigkeit zur Deaktivierung von Cytokinen durch Glykosylierung.

Für ROCK1 konnte eine Transportaktivität für UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc in Hefemikrosomen nachgewiesen werden. Somit handelt es sich bei ROCK1 um den ersten identifizierten pflanzlichen Transporter für diese Nukleotidzucker. Die Expression eines menschlichen UDP-GlcNAc Transporters im ER von *rock1-1 35S:CKX1* Pflanzen führte jedoch zu keiner Komplementation der *rock1-1* Mutation. *rock1* hatte keinen messbaren Einfluss auf die Proteinabundanz oder *N*-Glykosylierung von myc-CKX1. Die Kreuzung von *35S:CKX1* mit *complex glycan less1* ergab, dass die Aktivität von CKX1 unabhängig von hybriden und komplexen *N*-Glykanen ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit Hinweise darauf liefert, dass *ROCK1* an einer bislang nicht beschriebenen Form der Proteinglykosylierung mit GlcNAc oder GalNAc im ER beteiligt ist. Das Vorhandensein dieser Modifikation beeinflusst unter anderen die Aktivität von CKX Enzymen. Durch einen genetischen Screen auf Suppressoren der *rock1* Mutation konnten allelische Suppressormutationen isoliert und mittels *next-generation sequencing* ein 2,5 Mb großes Kartierungsintervall definiert werden. Die Identifizierung der *ROCK IS OVER (RIO1)* Gene wird weitere Hinweise auf die physiologische Funktion von *ROCK1* in Pflanzen und die Natur der in dieser Arbeit postulierten Proteinglykosylierung im ER liefern.

6. Summary

The gene *ROCK1* was identified in a genetic screen as a positive regulator of cytokinin deficiency in *Arabidopsis thaliana*. The presented thesis contains the molecular characterization of *ROCK1* and the analysis of its role in cytokinin homeostasis.

The analysis of *ROCK1* expression using the reporter construct *ROCK1:ROCK1-uidA* revealed *ROCK1* expression domains mainly in young mitotically active tissues of root and shoot. A detailed analysis of the subcellular localization showed that *ROCK1* is localized in the endoplasmic reticulum (ER). The loss of a C-terminal dilysine motif led to an almost complete re-localization to Golgi.

The comparison of cytokinin content of *rock1-1 35S:CKX1* and *35S:CKX1* plants showed a stronger increase in shoot than root. It is possible that this increase was the cause for the phenotypic reversion. *rock1* decreased the CKX activity and suppressed the cytokinin deficiency phenotype of the lines *35S:CKX1*, *35S:CKX2* and *35S:CKX3* but not of *35S:CKX7-GFP*. *rock1* had only weak effects on the cytokinin deficiency phenotype in mutants with a decreased perception or synthesis of cytokinin. This suggests that *ROCK1* influences the cytokinin status primarily by reducing the activity of CKX enzymes. The loss of *ROCK1* in wild type background led to a higher activity of the shoot apical meristem, but had only mild effects on the vegetative development. The total cytokinin content was increased in *rock1*, the cytokinin status only slightly increased and the cytokinin sensitivity unchanged. The increased amount of *N*-glucosylated cytokinins after exogenous cytokinin application as well as a disproportionately high increase of *N*-glucosylated cytokinin metabolites under normal conditions supported the idea that in *rock1* plants cytokinin *N*-glycosylation compensated for the decreased degradation.

Overexpression of *ROCK1* caused earlier initiation of leaf senescence and decreased root growth. The shoot phenotype was not caused by an increase in CKX activity and decreased cytokinin status, which was unchanged in the shoot. The root displayed increased cytokinin sensitivity, probably due to a decreased ability for deactivating cytokinins by glycosylation.

It could be demonstrated that *ROCK1* transports UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc in the yeast microsomes. Hence, *ROCK1* is the first identified plant transporter for these nucleotide sugars. The expression of a human UDP-GlcNAc transporter in the ER of *rock1* plants did not complement the *rock1* mutation. No influence of *rock1* on protein

abundancy or *N*-glycosylation of myc-CKX1 protein was detected. The cross of *35S:CKX1* with *complex glycan less1* revealed that CKX1 activity is independent of hybrid and complex *N*-glycans. In summary, results of this thesis indicate that *ROCK1* is involved in a yet unknown type of ER protein glycosylation utilizing GlcNAc or GalNAc. This putative modification influences among others the activity of CKX enzymes. Allelic suppressor mutations of *rock1* were identified in a genetic screen and mapped to a 2.5 Mb interval by next-generation sequencing. The identification of the *ROCK IS OVER (RIO)* genes will provide further insights into the physiologic function of *ROCK1* and will help to reveal the nature of the protein glycosylation postulated in this thesis.

7. Literaturverzeichnis

Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*, **30**, 174-178.

Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E.C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C.B. and Robbins, P.W. (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **122**, 307-323.

Ahn, J.W., Verma, R., Kim, M., Lee, J.Y., Kim, Y.K., Bang, J.W., Reiter, W.D. and Pai, H.S. (2006) Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J Biol Chem*, **281**, 13708-13716.

Alonso, A.P., Piasecki, R.J., Wang, Y., LaClair, R.W. and Shachar-Hill, Y. (2010) Quantifying the labeling and the levels of plant cell wall precursors using ion chromatography tandem mass spectrometry. *Plant Physiol*, **153**, 915-924.

Andersson, H., Kappeler, F. and Hauri, H.P. (1999) Protein targeting to endoplasmic reticulum by dilysine signals involves direct retention in addition to retrieval. *J Biol Chem*, **274**, 15080-15084.

Aoki, K., Sun-Wada, G.H., Segawa, H., Yoshioka, S., Ishida, N. and Kawakita, M. (1999) Expression and activity of chimeric molecules between human UDP-galactose transporter and CMP-sialic acid transporter. *J Biochem*, **126**, 940-950.

Aoki, K., Ishida, N. and Kawakita, M. (2001) Substrate recognition by UDP-galactose and CMP-sialic acid transporters. Different sets of transmembrane helices are utilized for the specific recognition of UDP-galactose and CMP-sialic acid. *J Biol Chem*, **276**, 21555-21561.

Applied Biosystems (2008) Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR.

Apweiler, R., Hermjakob, H. and Sharon, N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, **1473**, 4-8.

Ariizumi, T. and Toriyama, K. (2011) Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol*, **62**, 437-460.

Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309**, 741-745.

Ashikov, A., Routier, F., Fuhlrott, J., Helmus, Y., Wild, M., Gerardy-Schahn, R. and Bakker, H. (2005) The human solute carrier gene *SLC35B4* encodes a bifunctional nucleotide sugar transporter with specificity for UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*, **280**, 27230-27235.

Åstot, C., Dolezal, K., Nordstrom, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.H. and Sandberg, G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14778-14783.

Bahaji, A., Munoz, F.J., Ovecka, M., Baroja-Fernandez, E., Montero, M., Li, J., Hidalgo, M., Almagro, G., Sesma, M.T., Ezquer, I. and Pozueta-Romero, J. (2011) Specific delivery of AtBT1 to mitochondria complements the aberrant growth and sterility phenotype of homozygous *Atbt1* Arabidopsis mutants. *Plant J*, **68**, 1115-1121.

Bakker, H., Routier, F., Oelmann, S., Jordi, W., Lommen, A., Gerardy-Schahn, R. and Bosch, D. (2005) Molecular cloning of two Arabidopsis UDP-galactose transporters by complementation of a deficient Chinese hamster ovary cell line. *Glycobiology*, **15**, 193-201.

- Bakker, H., Routier, F., Ashikov, A., Neumann, D., Bosch, D. and Gerardy-Schahn, R.** (2008) A CMP-sialic acid transporter cloned from *Arabidopsis thaliana*. *Carbohydr Res*, **343**, 2148-2152.
- Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A. and Dupree, P.** (2001) Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 2283-2295.
- Bar-Peled, M. and O'Neill, M.A.** (2011) Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu Rev Plant Biol*, **62**, 127-155.
- Bar-Peled, M., Urbanowicz, B.R. and O'Neill, M.A.** (2012) The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II - Insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Front Plant Sci*, **3**, 92.
- Bartrina, I.** (2006) Molekulare Charakterisierung von *ckx* Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokinidefizienzsyndroms in *Arabidopsis thaliana*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit**.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. and Schmülling, T.** (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **23**, 69-80.
- Bennett, E.P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T.A., Fritz, T.A. and Tabak, L.A.** (2012) Control of mucin-type *O*-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, **22**, 736-756.
- Berkey, R., Bendigeri, D. and Xiao, S.** (2012) Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. *Front Plant Sci*, **3**, 68.
- Bernard, P. and Couturier, M.** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol*, **226**, 735-745.
- Berninsone, P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R. and Hirschberg, C.B.** (1997) Functional expression of the murine Golgi CMP-sialic acid transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **272**, 12616-12619.
- Berninsone, P., Hwang, H.Y., Zemtseva, I., Horvitz, H.R. and Hirschberg, C.B.** (2001) SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3738-3743.
- Berninsone, P.M. and Hirschberg, C.B.** (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 542-547.
- Bertani, G.** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **62**, 293-300.
- Bhattacharya, R., Townley, R.A., Berry, K.L. and Bulow, H.E.** (2009) The PAPS transporter PST-1 is required for heparan sulfation and is essential for viability and neural development in *C. elegans*. *J Cell Sci*, **122**, 4492-4504.
- Bialeski, R.L.** (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal Biochem*, **9**, 431-442.
- Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey, J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D. and Morris, R.O.** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol*, **125**, 378-386.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.

- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benkova, E., Mahonen, A.P. and Helariutta, Y.** (2011a) A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Curr Biol*, **21**, 917-926.
- Bishopp, A., Lehesranta, S., Vaten, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mahonen, A.P., Sakakibara, H. and Helariutta, Y.** (2011b) Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Curr Biol*, **21**, 927-932.
- Boisson, M., Gomord, V., Audran, C., Berger, N., Dubreucq, B., Granier, F., Lerouge, P., Faye, L., Caboche, M. and Lepiniec, L.** (2001) *Arabidopsis glucosidase 1* mutants reveal a critical role of *N*-glycan trimming in seed development. *EMBO J*, **20**, 1010-1019.
- Bonin, C.P., Freshour, G., Hahn, M.G., Vanzin, G.F. and Reiter, W.D.** (2003) The *GMD1* and *GMD2* genes of *Arabidopsis* encode isoforms of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase with cell type-specific expression patterns. *Plant Physiol*, **132**, 883-892.
- Boraston, A.B., Warren, R.A. and Kilburn, D.G.** (2001) Glycosylation by *Pichia pastoris* decreases the affinity of a family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi*: a functional and mutational analysis. *Biochem J*, **358**, 423-430.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L. and Schmülling, T.** (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J*, **44**, 314-333.
- Brewer, C. and Bhattacharyya, L.** (1988) Concanavalin A interactions with asparagine-linked glycopeptides. The mechanisms of binding of oligomannose, bisected hybrid, and complex type carbohydrates. *Glycoconjugate Journal*, **5**, 159-173.
- Brignac-Huber, L., Reed, J.R. and Backes, W.L.** (2011) Organization of NADPH-cytochrome P450 reductase and CYP1A2 in the endoplasmic reticulum--microdomain localization affects monooxygenase function. *Mol Pharmacol*, **79**, 549-557.
- Brownlee, B.G., Hall, R.H. and Whitty, C.D.** (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Can J Biochem*, **53**, 37-41.
- Brugière, N., Jiao, S., Hantke, S., Zinselmeier, C., Roessler, J.A., Niu, X., Jones, R.J. and Habben, J.E.** (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol*, **132**, 1228-1240.
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. and Palme, K.** (1993) Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, **262**, 1051-1054.
- Burch, L.R. and Horgan, R.** (1989) The purification of cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels. *Phytochemistry*, **28**, 1313-1319.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C. and Frommer, W.B.** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J*, **34**, 13-26.
- Burn, J.E., Hurley, U.A., Birch, R.J., Arioli, T., Cork, A. and Williamson, R.E.** (2002) The cellulose-deficient *Arabidopsis* mutant *rsw3* is defective in a gene encoding a putative glucosidase II, an enzyme processing *N*-glycans during ER quality control. *Plant J*, **32**, 949-960.
- Caesar, K., Thamm, A.M., Witthoft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J. and Harter, K.** (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot*, **62**, 5571-5580.

- Cannon, M.C., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y., Wegenhart, B.L., Chen, L., Lamport, D.T., Chen, Y. and Kieliszewski, M.J. (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2226-2231.
- Capasso, J.M. and Hirschberg, C.B. (1984a) Effect of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into Golgi apparatus vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **777**, 133-139.
- Capasso, J.M. and Hirschberg, C.B. (1984b) Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 7051-7055.
- Castilho, A., Strasser, R., Stadlmann, J., Grass, J., Jez, J., Gattinger, P., Kunert, R., Quendler, H., Pabst, M., Leonard, R., Altmann, F. and Steinkellner, H. (2010) *In planta* protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway. *J Biol Chem*, **285**, 15923-15930.
- Castilho, A., Neumann, L., Daskalova, S., Mason, H.S., Steinkellner, H., Altmann, F. and Strasser, R. (2012) Engineering of sialylated mucin-type O-Glycosylation in plants. *J Biol Chem*, **287**, 36518-36526.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B. and Frommer, W.B. (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in Arabidopsis cell cultures. *Plant Physiol*, **148**, 1857-1867.
- Chalat, M., Menon, I., Turan, Z. and Menon, A.K. (2012) Reconstitution of glucosylceramide flip-flop across endoplasmic reticulum: implications for mechanism of glycosphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem*, **287**, 15523-15532.
- Chao, D.Y., Gable, K., Chen, M., Baxter, I., Dietrich, C.R., Cahoon, E.B., Guerinot, M.L., Lahner, B., Lu, S., Markham, J.E., Morrissey, J., Han, G., Gupta, S.D., Harmon, J.M., Jaworski, J.G., Dunn, T.M. and Salt, D.E. (2011) Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **23**, 1061-1081.
- Chatfield, J.M. and Armstrong, D.J. (1988) Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus cultures: Affinity for Concanavalin. *Plant Physiol*, **88**, 245-247.
- Chaturvedi, P., Misra, P. and Tuli, R. (2011) Sterol glycosyltransferases--the enzymes that modify sterols. *Appl Biochem Biotechnol*, **165**, 47-68.
- Cheng, C.Y., Mathews, D.E., Eric Schaller, G. and Kieber, J.J. (2013) Cytokinin-dependent specification of the functional megaspore in the Arabidopsis female gametophyte. *Plant J*, **73**, 929-940.
- Chiaromonte, M., Koviach, J.L., Moore, C., Iyer, V.V., Wagner, C.R., Halcomb, R.L., Miller, W., Melancon, P. and Kuchta, R.D. (2001) Inhibition of CMP-sialic acid transport into Golgi vesicles by nucleoside monophosphates. *Biochemistry*, **40**, 14260-14267.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D.M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T. and Aebi, M. (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **184**, 159-172.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**, 735-743.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Perilleux, C. and Bernier, G. (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J Exp Bot*, **54**, 2511-2517.

- Cortleven, A., Remans, T., Brenner, W.G. and Valcke, R.** (2009) Selection of plastid- and nuclear-encoded reference genes to study the effect of altered endogenous cytokinin content on photosynthesis genes in *Nicotiana tabacum*. *Photosynth Res*, **102**, 21-29.
- Cosson, P. and Letourneur, F.** (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629-1631.
- Cuperus, J.T., Montgomery, T.A., Fahlgren, N., Burke, R.T., Townsend, T., Sullivan, C.M. and Carrington, J.C.** (2010) Identification of MIR390a precursor processing-defective mutants in Arabidopsis by direct genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 466-471.
- D'Agostino, I.B., Deruere, J. and Kieber, J.J.** (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, **124**, 1706-1717.
- Daskalova, S.M., Radder, J.E., Cichacz, Z.A., Olsen, S.H., Tsaprailis, G., Mason, H. and Lopez, L.C.** (2010) Engineering of *N. benthamiana* L. plants for production of *N*-acetylgalactosamine-glycosylated proteins--towards development of a plant-based platform for production of protein therapeutics with mucin type *O*-glycosylation. *BMC Biotechnol*, **10**, 62.
- Davis, J., Brandizzi, F., Liepman, A.H. and Keegstra, K.** (2010) Arabidopsis mannan synthase CSLA9 and glucan synthase CSLC4 have opposite orientations in the Golgi membrane. *Plant J*, **64**, 1028-1037.
- DeBolt, S., Scheible, W.R., Schrick, K., Auer, M., Beisson, F., Bischoff, V., Bouvier-Nave, P., Carroll, A., Hematy, K., Li, Y., Milne, J., Nair, M., Schaller, H., Zemla, M. and Somerville, C.** (2009) Mutations in UDP-Glucose:sterol glucosyltransferase in Arabidopsis cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiol*, **151**, 78-87.
- Dejima, K., Murata, D., Mizuguchi, S., Nomura, K.H., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Kamiyama, S., Nishihara, S. and Nomura, K.** (2009) The ortholog of human solute carrier family 35 member B1 (UDP-galactose transporter-related protein 1) is involved in maintenance of ER homeostasis and essential for larval development in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, **23**, 2215-2225.
- Delgado, I.J., Wang, Z., de Rocher, A., Keegstra, K. and Raikhel, N.V.** (1998) Cloning and characterization of *AtRGPI*. A reversibly autoglycosylated Arabidopsis protein implicated in cell wall biosynthesis. *Plant Physiol*, **116**, 1339-1350.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S. and Sabatini, S.** (2008a) Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 23-27.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P. and Sabatini, S.** (2008b) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, **322**, 1380-1384.
- Delmas, F., Seveno, M., Northey, J.G., Hernould, M., Lerouge, P., McCourt, P. and Chevalier, C.** (2008) The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J Exp Bot*, **59**, 2639-2647.
- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.C., Liang, Y. and Zuo, J.** (2010) Arabidopsis histidine kinase CKII acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell*, **22**, 1232-1248.
- Dobritsa, A.A., Geanconteri, A., Shrestha, J., Carlson, A., Kooyers, N., Coerper, D., Urbanczyk-Wochniak, E., Bench, B.J., Sumner, L.W., Swanson, R. and Preuss, D.** (2011) A large-scale genetic screen in Arabidopsis to identify genes involved in pollen exine production. *Plant Physiol*, **157**, 947-970.
- Dohm, J.C., Lottaz, C., Borodina, T. and Himmelbauer, H.** (2008) Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*, **36**, e105.
- Dörmann, P. and Benning, C.** (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci*, **7**, 112-118.

- Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T. and Heyl, A.** (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, **273**, 4631-4644.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.L., Bernard, S., Kousar, S., Chevalier, L., Vire-Gibouin, M. and Lerouxel, O.** (2012) Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Front Plant Sci*, **3**, 79.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. and Wall, R.** (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol*, **179**, 125-142.
- Elbers, I.J., Stoop, G.M., Bakker, H., Stevens, L.H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Jordi, W.J., Bosch, D. and Lommen, A.** (2001) Influence of growth conditions and developmental stage on *N*-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant Physiol*, **126**, 1314-1322.
- Elling, L., Grothus, M. and Kula, M.R.** (1993) Investigation of sucrose synthase from rice for the synthesis of various nucleotide sugars and saccharides. *Glycobiology*, **3**, 349-355.
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C.J. and Bacic, A.** (2010) Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol*, **153**, 403-419.
- Etzler, M.E. and Mohnen, D.** (2009) *Viridiplantae*. In *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R.D. and Esko, J.D., eds). Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fanata, W.I., Lee, K.H., Son, B.H., Yoo, J.Y., Harmoko, R., Ko, K.S., Ramasamy, N.K., Kim, K.H., Oh, D.B., Jung, H.S., Kim, J.Y., Lee, S.Y. and Lee, K.O.** (2013) *N*-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa*. *Plant J*, **73**, 966-979.
- Farid, A., Pabst, M., Schoberer, J., Altmann, F., Glossl, J. and Strasser, R.** (2011) *Arabidopsis thaliana* α 1,2-glucosyltransferase (ALG10) is required for efficient *N*-glycosylation and leaf growth. *Plant J*, **68**, 314-325.
- Ferguson, M.A.J., Kinoshita, T. and Hart, G.W.** (2009) Glycosylphosphatidylinositol anchors. In *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R.D. and Esko, J.D., eds). Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Franc, V., Sebela, M., Rehulka, P., Koncítikova, R., Lenobel, R., Madzak, C. and Kopečný, D.** (2012) Analysis of *N*-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *J Proteomics*, **75**, 4027-4037.
- Frank, J., Kaulfürst-Soboll, H., Rips, S., Koiwa, H. and von Schaewen, A.** (2008) Comparative analyses of *Arabidopsis complex glycan1* mutants and genetic interaction with *staurosporin* and *temperature sensitive3a*. *Plant Physiol*, **148**, 1354-1367.
- Frébortová, J., Galuszka, P., Werner, T., Schmülling, T. and Frébort, I.** (2007) Functional expression and purification of cytokinin dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologia Plantarum*, **51**, 673-682.
- Frébortová, J., Novák, O., Frébort, I. and Jorda, R.** (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *Plant J*, **61**, 467-481.
- Freeze, H.H. and Elbein, A.D.** (2009) Glycosylation precursors. In *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R.D. and Esko, J.D., eds). Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Galichet, A., Hoyerova, K., Kaminek, M. and Gruissem, W.** (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **146**, 1155-1164.

- Galuszka, P., Frebortova, J., Luhova, L., Bilyeu, K.D., English, J.T. and Frebort, I.** (2005) Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant Cell Physiol*, **46**, 716-728.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmülling, T. and Frébort, I.** (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 255-267.
- Gan, S. and Amasino, R.M.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gao, X.D. and Dean, N.** (2000) Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **275**, 17718-17727.
- Gao, X.D., Nishikawa, A. and Dean, N.** (2001) Identification of a conserved motif in the yeast golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J Biol Chem*, **276**, 4424-4432.
- Geserick, C. and Tenhaken, R.** (2013) UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for arabinose and xylose recycling, and is required during vegetative and reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.12116.
- Gillissen, B., Bürkle, L., Andre, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B. and Frommer, W.B.** (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 291-300.
- Gillmor, C.S., Poindexter, P., Lorieau, J., Palcic, M.M. and Somerville, C.** (2002) A-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *J Cell Biol*, **156**, 1003-1013.
- Gillmor, C.S., Lukowitz, W., Brininstool, G., Sedbrook, J.C., Hamann, T., Poindexter, P. and Somerville, C.** (2005) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for cell wall synthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 1128-1140.
- Glazebrook, J. and Weigel, D.** (2002) *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Goda, E., Kamiyama, S., Uno, T., Yoshida, H., Ueyama, M., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Ueda, R. and Nishihara, S.** (2006) Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J Biol Chem*, **281**, 28508-28517.
- Goder, V. and Spiess, M.** (2001) Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett*, **504**, 87-93.
- Gomord, V., Fitchette, A.C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D. and Faye, L.** (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J*, **8**, 564-587.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. and Frugier, F.** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, **18**, 2680-2693.
- Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C. and Meyerowitz, E.M.** (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16529-16534.
- Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M. and Hayashi, S.** (2001) UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat Cell Biol*, **3**, 816-822.

- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D.** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4645-4649.
- Gravel, P.** (2002) Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes by lectin blots. In *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J.M., ed. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc., pp. 779-795.
- Greenboim-Wainberg, Y., Maymon, I., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N., Eshed, Y. and Weiss, D.** (2005) Cross talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell*, **17**, 92-102.
- Grille, S., Zaslowski, A., Thiele, S., Plat, J. and Warnecke, D.** (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res*, **49**, 262-288.
- Gu, R., Fu, J., Guo, S., Duan, F., Wang, Z., Mi, G. and Yuan, L.** (2010) Comparative expression and phylogenetic analysis of Maize Cytokinin Dehydrogenase/Oxidase (CKX) gene family. *J Plant Growth Regul*, **29**, 428-440.
- Guerriero, G., Fugelstad, J. and Bulone, V.** (2010) What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? *J Integr Plant Biol*, **52**, 161-175.
- Gültekin, H. and Heermann, K.H.** (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem*, **172**, 320-329.
- Han, I. and Kudlow, J.E.** (1997) Reduced *O*-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*, **17**, 2550-2558.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Handford, M., Rodriguez-Furlan, C. and Orellana, A.** (2006) Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles *in vivo*. *Braz J Med Biol Res*, **39**, 1149-1158.
- Handford, M., Rodriguez-Furlan, C., Marchant, L., Segura, M., Gomez, D., Alvarez-Buylla, E., Xiong, G.Y., Pauly, M. and Orellana, A.** (2012) *Arabidopsis thaliana* AtUTr7 encodes a Golgi-localized UDP-Glucose/UDP-Galactose transporter that affects lateral root emergence. *Mol Plant*, **5**, 1263-1280.
- Handford, M.G., Sicilia, F., Brandizzi, F., Chung, J.H. and Dupree, P.** (2004) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol Genet Genomics*, **272**, 397-410.
- Hang, H.C. and Bertozzi, C.R.** (2005) The chemistry and biology of mucin-type *O*-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem*, **13**, 5021-5034.
- Hansch, F.G.** (2001) *O*-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem*, **382**, 143-149.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. and Vibe Scheller, H.** (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol*, **153**, 384-395.
- Harper, A.D. and Bar-Peled, M.** (2002) Biosynthesis of UDP-xylose. Cloning and characterization of a novel Arabidopsis gene family, *UXS*, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase isoforms. *Plant Physiol*, **130**, 2188-2198.
- Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A.** (2000) DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res*, **10**, 1788-1795.

- Hartweck, L.M., Scott, C.L. and Olszewski, N.E.** (2002) Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics*, **161**, 1279-1291.
- Hartwig, B., James, G.V., Konrad, K., Schneeberger, K. and Turck, F.** (2012) Fast isogenic mapping-by-sequencing of ethyl methanesulfonate-induced mutant bulks. *Plant Physiol*, **160**, 591-600.
- Hashimoto, K., Tokimatsu, T., Kawano, S., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Goto, S. and Kanehisa, M.** (2009) Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional characterization of glycans. *Carbohydr Res*, **344**, 881-887.
- Hayashi, T., Koyama, T. and Matsuda, K.** (1988) Formation of UDP-Xylose and xyloglucan in soybean Golgi membranes. *Plant Physiol*, **87**, 341-345.
- He, L., Vasiliou, K. and Nebert, D.W.** (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics*, **3**, 195-206.
- Henquet, M., Lehle, L., Schreuder, M., Rouwendal, G., Molthoff, J., Helsper, J., van der Krol, S. and Bosch, D.** (2008) Identification of the gene encoding the α 1,3-mannosyltransferase (ALG3) in *Arabidopsis* and characterization of downstream *N*-glycan processing. *Plant Cell*, **20**, 1652-1664.
- Henquet, M., Heinhuis, B., Borst, J.W., Eigenhuijsen, J., Schreuder, M., Bosch, D. and van der Krol, A.** (2010) Differential effects of human and plant *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) in plants. *Transgenic Res*, **19**, 535-547.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T. and Sakakibara, H.** (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol*, **138**, 196-206.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. and Sakakibara, H.** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot*, **59**, 75-83.
- Hong, K., Ma, D., Beverley, S.M. and Turco, S.J.** (2000) The *Leishmania* GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry*, **39**, 2013-2022.
- Hong, Z., Jin, H., Fitchette, A.C., Xia, Y., Monk, A.M., Faye, L. and Li, J.** (2009) Mutations of an α 1,6 mannosyltransferase inhibit endoplasmic reticulum-associated degradation of defective brassinosteroid receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 3792-3802.
- Hong, Z., Kajiyama, H., Su, W., Jin, H., Kimura, A., Fujiyama, K. and Li, J.** (2012) Evolutionarily conserved glycan signal to degrade aberrant brassinosteroid receptors in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 11437-11442.
- Hothorn, M., Dabi, T. and Chory, J.** (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat Chem Biol*, **7**, 766-768.
- Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S. and Bowles, D.J.** (2004) *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **279**, 47822-47832.
- Houba-Herlin, N., Pethe, C., d'Alayer, J. and Laloue, M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J*, **17**, 615-626.
- Huala, E., Dickerman, A.W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L.A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B.W., Beavis, W., Meinke, D.W., Town, C.D., Somerville, C. and Rhee, S.Y.** (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res*, **29**, 102-105.

- Huang, C.F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y. and Ma, J.F.** (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, **21**, 655-667.
- 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. and Kieber, J.J.** (2006) The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, **18**, 3073-3087.
- Hüttner, S., Veit, C., Schoberer, J., Grass, J. and Strasser, R.** (2012) Unraveling the function of *Arabidopsis thaliana* OS9 in the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *Plant Mol Biol*, **79**, 21-33.
- Hwang, I. and Sheen, J.** (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*, **413**, 383-389.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. and Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, **409**, 1060-1063.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A. and Mizuno, T.** (2008) Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **49**, 47-57.
- Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M. and Kawakita, M.** (1999) Molecular cloning and functional expression of the human Golgi UDP-N-acetylglucosamine transporter. *J Biochem*, **126**, 68-77.
- Ishida, N. and Kawakita, M.** (2004) Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflugers Arch*, **447**, 768-775.
- Ishikawa, H.O., Ayukawa, T., Nakayama, M., Higashi, S., Kamiyama, S., Nishihara, S., Aoki, K., Ishida, N., Sanai, Y. and Matsuno, K.** (2010) Two pathways for importing GDP-fucose into the endoplasmic reticulum lumen function redundantly in the O-fucosylation of Notch in *Drosophila*. *J Biol Chem*, **285**, 4122-4129.
- Izumi, K., Nakagawa, S., Kobayashi, M., Oshio, H., Sakurai, A. and Takahashi, N.** (1988) Levels of IAA, cytokinins, ABA and ethylene in rice plants as affected by a gibberellin biosynthesis inhibitor, Uniconazole-P. *Plant Cell Physiology*, **29**, 97-104.
- Jack, D.L., Yang, N.M. and Saier, M.H., Jr.** (2001) The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem*, **268**, 3620-3639.
- Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E.** (1993) Mutations at the *SPINDLY* locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell*, **5**, 887-896.
- Jadid, N., Mialoundama, A.S., Heintz, D., Ayoub, D., Erhardt, M., Mutterer, J., Meyer, D., Alioua, A., Van Dorsselaer, A., Rahier, A., Camara, B. and Bouvier, F.** (2011) DOLICHOL PHOSPHATE MANNOSE SYNTHASE1 mediates the biogenesis of isoprenyl-linked glycans and influences development, stress response, and ammonium hypersensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 1985-2005.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- Jensen, H.** (2013) Molecular characterisation of dominant repressors of the cytokinin deficiency syndrome. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität. **Doktorarbeit**.
- Jiang, H., Wang, S., Dang, L., Chen, H., Wu, Y., Jiang, X. and Wu, P.** (2005) A novel short-root gene encodes a glucosamine-6-phosphate acetyltransferase required for maintaining normal root cell shape in rice. *Plant Physiol*, **138**, 232-242.

- Jin, H., Yan, Z., Nam, K.H. and Li, J.** (2007) Allele-specific suppression of a defective brassinosteroid receptor reveals a physiological role of UGT in ER quality control. *Mol Cell*, **26**, 821-830.
- Jin, S.H., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H., Wang, Y.W. and Hou, B.K.** (2012) Overexpression of glucosyltransferase *UGT85A1* influences *trans*-Zeatin homeostasis and *trans*-Zeatin responses likely through *O*-glucosylation. *Planta*.
- Jürgens, G., Mayer, U., Ramon A, T.R., Berleth, T. and Misera, S.** (1991) Genetic analysis of pattern formation in the *Arabidopsis* embryo. *Development*, **113**, 27-38.
- Kabuss, R., Ashikov, A., Oelmann, S., Gerardy-Schahn, R. and Bakker, H.** (2005) Endoplasmic reticulum retention of the large splice variant of the UDP-galactose transporter is caused by a dilysine motif. *Glycobiology*, **15**, 905-911.
- Kajiura, H., Koiwa, H., Nakazawa, Y., Okazawa, A., Kobayashi, A., Seki, T. and Fujiyama, K.** (2009) Two *Arabidopsis thaliana* Golgi α -mannosidase I enzymes are responsible for plant *N*-glycan maturation. *Glycobiology*, **20**, 235-247.
- Kakimoto, T.** (1996) CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, **274**, 982-985.
- Kakimoto, T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol*, **42**, 677-685.
- Kaminek, M. and Armstrong, D.J.** (1990) Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. *Plant Physiol*, **93**, 1530-1538.
- Kamiyama, S., Suda, T., Ueda, R., Suzuki, M., Okubo, R., Kikuchi, N., Chiba, Y., Goto, S., Toyoda, H., Saigo, K., Watanabe, M., Narimatsu, H., Jigami, Y. and Nishihara, S.** (2003) Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J Biol Chem*, **278**, 25958-25963.
- Kang, J.S., Frank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., Kim, S., Bahk, J.D., Triplett, B., Fujiyama, K., Lee, S.Y., von Schaewen, A. and Koiwa, H.** (2008) Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of *N*-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5933-5938.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, **7**, 193-195.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Sakakibara, H.** (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-Zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **279**, 14049-14054.
- Kelly, A.A., Froehlich, J.E. and Dormann, P.** (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell*, **15**, 2694-2706.
- Kieliszewski, M.J. and Lamport, D.T.** (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J*, **5**, 157-172.
- Kilcoyne, M., Shah, M., Gerlach, J.Q., Bhavanandan, V., Nagaraj, V., Smith, A.D., Fujiyama, K., Sommer, U., Costello, C.E., Olszewski, N. and Joshi, L.** (2009) *O*-glycosylation of protein subpopulations in alcohol-extracted rice proteins. *J Plant Physiol*, **166**, 219-232.
- Killian, J.A.** (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 401-415.
- Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G. and Hwang, I.** (2006a) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 814-819.

- Kim, Y., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K.** (2006b) EMS mutagenesis of Arabidopsis. *Methods Mol Biol*, **323**, 101-103.
- Kim, Y.C., Jahren, N., Stone, M.D., Udeshi, N.D., Markowski, T.W., Witthuhn, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Olszewski, N.E.** (2013) Identification and origin of N-linked β -D-N-acetylglucosamine monosaccharide modifications on *Arabidopsis thaliana* proteins. *Plant Physiol*, **161**, 455-464.
- Kinoshita-Tsujimura, K. and Kakimoto, T.** (2011) Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, **6**, 66-71.
- Kiran, N.S., Benkova, E., Reková, A., Dubova, J., Malbeck, J., Palme, K. and Brzobohatý, B.** (2012) Retargeting a maize β -glucosidase to the vacuole--evidence from intact plants that Zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry*, **79**, 67-77.
- Kirchberger, S., Leroch, M., Huynen, M.A., Wahl, M., Neuhaus, H.E. and Tjaden, J.** (2007) Molecular and biochemical analysis of the plastidic ADP-glucose transporter (ZmBT1) from *Zea mays*. *J Biol Chem*, **282**, 22481-22491.
- Kirchberger, S., Tjaden, J. and Neuhaus, H.E.** (2008) Characterization of the Arabidopsis Brittle1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *Plant J*, **56**, 51-63.
- Kishimoto, T., Watanabe, M., Mitsui, T. and Hori, H.** (1999) Glutelin basic subunits have a mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. *Arch Biochem Biophys*, **370**, 271-277.
- Kitomi, Y., Ito, H., Hobo, T., Aya, K., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2011) The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRRI*, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant J*, **67**, 472-484.
- Knappe, S., Flugge, U.I. and Fischer, K.** (2003) Analysis of the plastidic phosphate translocator gene family in Arabidopsis and identification of new phosphate translocator-homologous transporters, classified by their putative substrate-binding site. *Plant Physiol*, **131**, 1178-1190.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and Ohta, H.** (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 17216-17221.
- Kobayashi, K., Nakamura, Y. and Ohta, H.** (2009) Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiol Biochem*, **47**, 518-525.
- Kobayashi, M., Kouzu, N., Inami, A., Toyooka, K., Konishi, Y., Matsuoka, K. and Matoh, T.** (2011) Characterization of Arabidopsis CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, **52**, 1832-1843.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M.G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J.M., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** (2003) The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell*, **15**, 2273-2284.
- Köllmer, I.** (2004) Regulation der *AtCKX*-Genexpression und Charakterisierung cytokinindefizienter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität. **Diplomarbeit.**
- Köllmer, I.** (2009) Funktionelle Charakterisierung von *CKX7* und cytokininregulierten Transkriptionsfaktorgenen in *Arabidopsis thaliana*. *Institut für Biologie/Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin. **Doktorarbeit.**

- Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y.** (2009) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 15067-15072.
- Koncz, C. and 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 MGG*, **204**, 383-396.
- Kopecný, D., Pethe, C., Sebela, M., Houba-Hérin, N., Madzak, C., Majira, A. and Laloue, M.** (2005) High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie*, **87**, 1011-1022.
- Kopecný, D., Tarkowski, P., Majira, A., Bouchez-Mahiout, I., Nogué, F., Laurière, M., Sandberg, G., Laloue, M. and Houba-Hérin, N.** (2006) Probing cytokinin homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by constitutively overexpressing two forms of the maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 gene. *Plant Science*, **171**, 114-122.
- Kotake, T., Yamaguchi, D., Ohzono, H., Hojo, S., Kaneko, S., Ishida, H.K. and Tsumuraya, Y.** (2004) UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity toward various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts. *J Biol Chem*, **279**, 45728-45736.
- Kowalska, M., Galuszka, P., Frebortova, J., Sebela, M., Beres, T., Hluska, T., Smehilova, M., Bilyeu, K.D. and Frebort, I.** (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry*, **71**, 1970-1978.
- Kuderova, A., Urbankova, I., Valkova, M., Malbeck, J., Brzobohatý, B., Nemethova, D. and Hejatko, J.** (2008) Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol*, **49**, 570-582.
- Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H. and Sakakibara, H.** (2012) Cytokinin activity of *cis*-Zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative *cis*-Zeatin-*O*-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol*, **160**, 319-331.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. and Kyojuka, J.** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652-655.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K. and Sakakibara, H.** (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 3152-3169.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lalanne, E., Honys, D., Johnson, A., Borner, G.H., Lilley, K.S., Dupree, P., Grossniklaus, U. and Twell, D.** (2004) *SETH1* and *SETH2*, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 229-240.
- Lampert, D.T. and Miller, D.H.** (1971) Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. *Plant Physiol*, **48**, 454-456.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M.B., Offringa, R., Graham, N., Dumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T. and Bennett, M.** (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, **19**, 3889-3900.
- Le Roy, K., Verhaest, M., Rabijns, A., Clerens, S., Van Laere, A. and Van den Ende, W.** (2007) *N*-glycosylation affects substrate specificity of chicory fructan 1-exohydrolase: evidence for the presence of an inulin binding cleft. *New Phytol*, **176**, 317-324.

- Lee, S. and Cooley, L.** (2007) Jagunal is required for reorganizing the endoplasmic reticulum during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol*, **176**, 941-952.
- Lee, S.B., Go, Y.S., Bae, H.J., Park, J.H., Cho, S.H., Cho, H.J., Lee, D.S., Park, O.K., Hwang, I. and Suh, M.C.** (2009) Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol*, **150**, 42-54.
- Lehle, L., Strahl, S. and Tanner, W.** (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 6802-6818.
- Leibfried, A., To, J.P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J. and Lohmann, J.U.** (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, **438**, 1172-1175.
- Leonard, R., Costa, G., Darrambide, E., Lhernould, S., Fleurat-Lessard, P., Carlue, M., Gomord, V., Faye, L. and Maftah, A.** (2002) The presence of Lewis a epitopes in *Arabidopsis thaliana* glycoconjugates depends on an active α 4-fucosyltransferase gene. *Glycobiology*, **12**, 299-306.
- Lerouxel, O., Mouille, G., Andeme-Onzighi, C., Bruyant, M.P., Seveno, M., Loutelier-Bourhis, C., Driouich, A., Hofte, H. and Lerouge, P.** (2005) Mutants in *DEFECTIVE GLYCOSYLATION*, an *Arabidopsis* homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein underglycosylation and defects in cell differentiation and growth. *Plant J*, **42**, 455-468.
- Li, C., Guan, Z., Liu, D. and Raetz, C.R.** (2011a) Pathway for lipid A biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* resembling that of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 11387-11392.
- Li, C., Wang, Y., Liu, L., Hu, Y., Zhang, F., Mergen, S., Wang, G., Schlappi, M.R. and Chu, C.** (2011b) A rice plastidial nucleotide sugar epimerase is involved in galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency. *PLoS Genet*, **7**, e1002196.
- Li, Y., Rosso, M.G., Strizhov, N., Viehoveer, P. and Weisshaar, B.** (2003) GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, **19**, 1441-1442.
- Liebmingner, E., Hüttner, S., Vavra, U., Fischl, R., Schoberer, J., Grass, J., Blaukopf, C., Seifert, G.J., Altmann, F., Mach, L. and Strasser, R.** (2009) Class I α -mannosidases are required for *N*-glycan processing and root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**, 3850-3867.
- Liebmingner, E., Veit, C., Pabst, M., Batoux, M., Zipfel, C., Altmann, F., Mach, L. and Strasser, R.** (2011) β -*N*-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic *N*-glycans in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **286**, 10793-10802.
- Lim, E.K. and Bowles, D.J.** (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J*, **23**, 2915-2922.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W. and Gong, C.X.** (2004) *O*-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10804-10809.
- Liu, L., Xu, Y.X. and Hirschberg, C.B.** (2010) The role of nucleotide sugar transporters in development of eukaryotes. *Semin Cell Dev Biol*, **21**, 600-608.
- Liu, L., Xu, Y.X., Caradonna, K.L., Kruzal, E.K., Burleigh, B.A., Bangs, J.D. and Hirschberg, C.B.** (2013) Inhibition of nucleotide sugar transport in *Trypanosoma brucei* alters surface glycosylation. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M113.453597 jbc.M113.453597.
- Liu, Y.G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S. and Shibata, D.** (1999) Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6535-6540.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lukowitz, W., Nickle, T.C., Meinke, D.W., Last, R.L., Conklin, P.L. and Somerville, C.R.** (2001) Arabidopsis *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of *N*-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2262-2267.
- Mahonen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. and Helariutta, Y.** (2006a) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, **311**, 94-98.
- Mahonen, A.P., Higuchi, M., Tormakangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y. and Kakimoto, T.** (2006b) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis. *Curr Biol*, **16**, 1116-1122.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N.** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124**, 33-44.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L. and Plummer, T.H., Jr.** (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*, **180**, 195-204.
- Malito, E., Coda, A., Bilyeu, K.D., Fraaije, M.W. and Mattevi, A.** (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *J Mol Biol*, **341**, 1237-1249.
- Mameaux, S., Cockram, J., Thiel, T., Steuernagel, B., Stein, N., Taudien, S., Jack, P., Werner, P., Gray, J.C., Greenland, A.J. and Powell, W.** (2011) Molecular, phylogenetic and comparative genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the *Poaceae*. *Plant Biotechnol J*, **10**, 67-82.
- Marhavy, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Parezova, M., Petrasek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J. and Benkova, E.** (2011) Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev Cell*, **21**, 796-804.
- Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. and Andre, B.** (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 4282-4293.
- Martin, R.C., Mok, M.C. and Mok, D.W.** (1999a) A gene encoding the cytokinin enzyme Zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*, **120**, 553-558.
- Martin, R.C., Mok, M.C. and Mok, D.W.** (1999b) Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding Zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 284-289.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E. and Mok, D.W.** (2001) A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-Zeatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5922-5926.
- Martinez-Duncker, I., Mollicone, R., Codogno, P. and Oriol, R.** (2003) The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie*, **85**, 245-260.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Schaller, G.E.** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 3007-3018.
- Maszczak-Seneczko, D., Olczak, T. and Olczak, M.** (2011) Subcellular localization of UDP-GlcNAc, UDP-Gal and SLC35B4 transporters. *Acta Biochim Pol*, **58**, 413-419.

- Matsubayashi, Y.** (2011) Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant Cell Physiol*, **52**, 5-13.
- McIlvaine, T.C.** (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, **49**, 183-186.
- Melser, S., Batailler, B., Peypelut, M., Poujol, C., Bellec, Y., Wattelet-Boyer, V., Maneta-Peyret, L., Faure, J.D. and Moreau, P.** (2010) Glucosylceramide biosynthesis is involved in Golgi morphology and protein secretion in plant cells. *Traffic*, **11**, 479-490.
- Miller, C.O., Skoog, F., Vonsaltza, M.H. and Strong, F.M.** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc*, **77**, 1392-1392.
- Miller, K.R., Wang, J., Sorci-Thomas, M., Anderson, R.A. and Parks, J.S.** (1996) Glycosylation structure and enzyme activity of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma, HepG2 cells, and baculoviral and Chinese hamster ovary cell expression systems. *J Lipid Res*, **37**, 551-561.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. and Kakimoto, T.** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J*, **37**, 128-138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. and Kakimoto, T.** (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16598-16603.
- Mok, D.W. and Mok, M.C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **52**, 89-118.
- Molhoj, M., Verma, R. and Reiter, W.D.** (2003) The biosynthesis of the branched-chain sugar d-apiose in plants: functional cloning and characterization of a UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase from Arabidopsis. *Plant J*, **35**, 693-703.
- Møller, L.B., Pollanen, J., Ronne, E., Pedersen, N. and Blasi, F.** (1993) N-linked glycosylation of the ligand-binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand. *J Biol Chem*, **268**, 11152-11159.
- Morelle, W. and Michalski, J.C.** (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat Protoc*, **2**, 1585-1602.
- Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G. and Cheikh, N.N.** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Commun*, **255**, 328-333.
- Motyka, V., Faiss, M., Strand, M., Kaminek, M. and Schmölling, T.** (1996) Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol*, **112**, 1035-1043.
- Motyka, V., Vankova, R., Capkova, V., Petrasek, J., Kaminek, M. and Schmölling, T.** (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum*, **117**, 11-21.
- Müller, B. and Sheen, J.** (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, **453**, 1094-1097.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Muraoka, M., Kawakita, M. and Ishida, N.** (2001) Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Lett*, **495**, 87-93.

- Muraoka, M., Miki, T., Ishida, N., Hara, T. and Kawakita, M.** (2007) Variety of nucleotide sugar transporters with respect to the interaction with nucleoside mono- and diphosphates. *J Biol Chem*, **282**, 24615-24622.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Nagai, K., Ihara, Y., Wada, Y. and Taniguchi, N.** (1997) *N*-glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of *N*-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology*, **7**, 769-776.
- Naim, H.Y. and Lentze, M.J.** (1992) Impact of *O*-glycosylation on the function of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of *O*-glycoside addition. *J Biol Chem*, **267**, 25494-25504.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T.** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, **104**, 34-41.
- Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J. and Pepper, A.E.** (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J*, **14**, 387-392.
- Neff, M.M., Turk, E. and Kalishman, M.** (2002) Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet*, **18**, 613-615.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenfuhr, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J*, **51**, 1126-1136.
- Nguema-Ona, E., Andeme-Onzighi, C., Aboughe-Angone, S., Bardor, M., Ishii, T., Lerouge, P. and Driouich, A.** (2006) The *reb1-1* mutation of *Arabidopsis*. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol*, **140**, 1406-1417.
- Niemann, M.** (2008) Molekulare Charakterisierung des *ROCK1* Gens von *Arabidopsis thaliana*. Institut für Biologie/Angewandte Genetik, Berlin: Freie Universität. **Diplomarbeit**.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., Tahtiharju, S., Elo, A., Decourteix, M., Ljung, K., Bhalerao, R., Keinonen, K., Albert, V.A. and Helariutta, Y.** (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20032-20037.
- Nikolovski, N., Rubtsov, D., Segura, M.P., Miles, G.P., Stevens, T.J., Dunkley, T.P.J., Munro, S., Lilley, K.S. and Dupree, P.** (2012) Putative glycosyltransferases and other plant Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics. *Plant Physiology*, **160**, 1037-1051.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T. and Tran, L.S.** (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*, **23**, 2169-2183.
- Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C.B., Silva, H. and Orellana, A.** (2002) Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactos/UDP-glucose transporter. *J Biol Chem*, **277**, 32923-32929.
- Norambuena, L., Nilo, R., Handford, M., Reyes, F., Marchant, L., Meisel, L. and Orellana, A.** (2005) AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose. *Planta*, **222**, 521-529.

- Novák, O., Hauserova, E., Amakorova, P., Dolezal, K. and Strnad, M.** (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, **69**, 2214-2224.
- Nozaki, M., Sugiyama, M., Duan, J., Uematsu, H., Genda, T. and Sato, Y.** (2012) A missense mutation in the glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase-encoding gene causes temperature-dependent growth defects and ectopic lignin deposition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 3366-3379.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. and Kluding, H.** (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, **193**, 267-282.
- Oka, T., Nemoto, T. and Jigami, Y.** (2007) Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-D-glucose to UDP-L-rhamnose conversion. *J Biol Chem*, **282**, 5389-5403.
- Okazaki, Y., Shimojima, M., Sawada, Y., Toyooka, K., Narisawa, T., Mochida, K., Tanaka, H., Matsuda, F., Hirai, A., Hirai, M.Y., Ohta, H. and Saito, K.** (2009) A chloroplastic UDP-glucose pyrophosphorylase from *Arabidopsis* is the committed enzyme for the first step of sulfolipid biosynthesis. *Plant Cell*, **21**, 892-909.
- Orlean, P. and Menon, A.K.** (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosylphospholipids. *J Lipid Res*, **48**, 993-1011.
- Ota, K., Sakaguchi, M., Hamasaki, N. and Mihara, K.** (2000) Membrane integration of the second transmembrane segment of band 3 requires a closely apposed preceding signal-anchor sequence. *J Biol Chem*, **275**, 29743-29748.
- Oxley, D. and Bacic, A.** (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14246-14251.
- Park, J.I., Ishimizu, T., Suwabe, K., Sudo, K., Masuko, H., Hakozaiki, H., Nou, I.S., Suzuki, G. and Watanabe, M.** (2010) UDP-glucose pyrophosphorylase is rate limiting in vegetative and reproductive phases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **51**, 981-996.
- Pattathil, S., Harper, A.D. and Bar-Peled, M.** (2005) Biosynthesis of UDP-xylose: characterization of membrane-bound AtUxs2. *Planta*, **221**, 538-548.
- Petrescu, A.J., Milac, A.L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A. and Wormald, M.R.** (2004) Statistical analysis of the protein environment of *N*-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, **14**, 103-114.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G. and Denecke, J.** (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell*, **13**, 2005-2020.
- Polanska, L., Vicankova, A., Novakova, M., Malbeck, J., Dobrev, P.I., Brzobohatý, B., Vankova, R. and Machackova, I.** (2007) Altered cytokinin metabolism affects cytokinin, auxin, and abscisic acid contents in leaves and chloroplasts, and chloroplast ultrastructure in transgenic tobacco. *J Exp Bot*, **58**, 637-649.
- Puglielli, L. and Hirschberg, C.B.** (1999) Reconstitution, identification, and purification of the rat liver Golgi membrane GDP-fucose transporter. *J Biol Chem*, **274**, 35596-35600.
- Puglielli, L., Mandon, E.C. and Hirschberg, C.B.** (1999) Identification, purification, and characterization of the rat liver Golgi membrane ATP transporter. *J Biol Chem*, **274**, 12665-12669.

- Raab, D., Graf, M., Notka, F., Schodl, T. and Wagner, R.** (2010) The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Syst Synth Biol*, **4**, 215-225.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. and Kieber, J.J.** (2006) A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11081-11085.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Herter, T., Petzold, C.J., Ishii, T., Mukhopadhyay, A., Usadel, B. and Scheller, H.V.** (2011) The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 1373-1390.
- Reaves, M.L., Lopez, L.C. and Daskalova, S.M.** (2011) Non-canonical interactions between plant proteins and lectins cause false positives in lectin blots. *Research in Plant Biology*, **1**, 49-54.
- Reiter, W.D., Chapple, C.C. and Somerville, C.R.** (1993) Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of Arabidopsis. *Science*, **261**, 1032-1035.
- Reyes, F. and Orellana, A.** (2008) Golgi transporters: opening the gate to cell wall polysaccharide biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 244-251.
- Reyes, F., Leon, G., Donoso, M., Brandizzi, F., Weber, A.P. and Orellana, A.** (2010) The nucleotide sugar transporters AtUTr1 and AtUTr3 are required for the incorporation of UDP-glucose into the endoplasmic reticulum, are essential for pollen development and are needed for embryo sac progress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **61**, 423-435.
- Riefler, M., Novák, O., Strnad, M. and Schmülling, T.** (2006) Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, **18**, 40-54.
- Rollwitz, I., Santaella, M., Hille, D., Flugge, U.I. and Fischer, K.** (2006) Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, **580**, 4246-4251.
- Romanov, G.A., Spíchal, L., Lomin, S.N., Strnad, M. and Schmülling, T.** (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal Biochem*, **347**, 129-134.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N. and Schmülling, T.** (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot*, **57**, 4051-4058.
- Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R. and Kudlow, J.E.** (1997) O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol*, **17**, 6472-6480.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. and Weisshaar, B.** (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol*, **53**, 247-259.
- Rosti, J., Barton, C.J., Albrecht, S., Dupree, P., Pauly, M., Findlay, K., Roberts, K. and Seifert, G.J.** (2007) UDP-glucose 4-epimerase isoforms UGE2 and UGE4 cooperate in providing UDP-galactose for cell wall biosynthesis and growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**, 1565-1579.
- Roy, S.K., Chiba, Y., Takeuchi, M. and Jigami, Y.** (2000) Characterization of Yeast Yea4p, a uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter localized in the endoplasmic reticulum and required for chitin synthesis. *J Biol Chem*, **275**, 13580-13587.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A. and Jimenez-Diaz, R.** (2005) Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal Biochem*, **347**, 333-335.

- Sachs, T. and Thimann, K.V.** (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany*, **54**, 136-144.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Oka, A.** (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, **294**, 1519-1521.
- Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K. and Okajima, T.** (2011) *O*-linked-*N*-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat Commun*, **2**, 583.
- Sakaidani, Y., Ichiyanagi, N., Saito, C., Nomura, T., Ito, M., Nishio, Y., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K. and Okajima, T.** (2012) *O*-linked-*N*-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical *O*-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochem Biophys Res Commun*, **419**, 14-19.
- Sakakibara, H.** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 431-449.
- Sanyal, S. and Menon, A.K.** (2009) Specific transbilayer translocation of dolichol-linked oligosaccharides by an endoplasmic reticulum flippase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 767-772.
- Sanyal, S. and Menon, A.K.** (2010) Stereoselective transbilayer translocation of mannosyl phosphoryl dolichol by an endoplasmic reticulum flippase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 11289-11294.
- Scheller, H.V. and Ulvskov, P.** (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 263-289.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupkova, E. and Bartrina y Manns, I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *J Plant Res*, **116**, 241-252.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, K.L., Jorgensen, J.E., Weigel, D. and Andersen, S.U.** (2009) SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Methods*, **6**, 550-551.
- Schnurr, J.A., Storey, K.K., Jung, H.J., Somers, D.A. and Gronwald, J.W.** (2006) UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in Arabidopsis. *Planta*, **224**, 520-532.
- Schoberer, J. and Strasser, R.** (2011) Sub-compartmental organization of Golgi-resident *N*-glycan processing enzymes in plants. *Mol Plant*, **4**, 220-228.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flugge, U.I. and Kunze, R.** (2003) ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol*, **131**, 16-26.
- Segawa, H., Kawakita, M. and Ishida, N.** (2002) Human and Drosophila UDP-galactose transporters transport UDP-*N*-acetylgalactosamine in addition to UDP-galactose. *Eur J Biochem*, **269**, 128-138.
- Seifert, G.J., Barber, C., Wells, B., Dolan, L. and Roberts, K.** (2002) Galactose biosynthesis in Arabidopsis: genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-galactose into cell wall polymers. *Curr Biol*, **12**, 1840-1845.
- Seifert, G.J. and Roberts, K.** (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol*, **58**, 137-161.
- Seino, J., Ishii, K., Nakano, T., Ishida, N., Tsujimoto, M., Hashimoto, Y. and Takashima, S.** (2010) Characterization of rice nucleotide sugar transporters capable of transporting UDP-galactose and UDP-glucose. *J Biochem*, **148**, 35-46.
- Selva, E.M., Hong, K., Baeg, G.H., Beverley, S.M., Turco, S.J., Perrimon, N. and Hacker, U.** (2001) Dual role of the fringe connection gene in both heparan sulphate and fringe-dependent signalling events. *Nat Cell Biol*, **3**, 809-815.

- Shakin-Eshleman, S.H., Spitalnik, S.L. and Kasturi, L.** (1996) The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem*, **271**, 6363-6366.
- Sherman, F.** (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, **194**, 3-21.
- Shimajima, M. and Benning, C.** (2003) Native uridine 5'-diphosphate-sulfoquinovose synthase, SQD1, from spinach purifies as a 250-kDa complex. *Arch Biochem Biophys*, **413**, 123-130.
- Showalter, A.M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D. and Welch, L.R.** (2010) A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol*, **153**, 485-513.
- Shpak, E., Leykam, J.F. and Kieliszewski, M.J.** (1999) Synthetic genes for glycoprotein design and the elucidation of hydroxyproline-O-glycosylation codes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14736-14741.
- Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P. and Mongrand, S.** (2011) An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol*, **14**, 642-649.
- Sipos, G., Puoti, A. and Conzelmann, A.** (1995) Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, **270**, 19709-19715.
- Skoog, F., Strong, F.M. and Miller, C.O.** (1965) Cytokinins. *Science*, **148**, 532-533.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2**, 755-767.
- Sogaard, C., Stenbaek, A., Bernard, S., Hadi, M., Driouich, A., Scheller, H.V. and Sakuragi, Y.** (2012) GO-PROMTO illuminates protein membrane topologies of glycan biosynthetic enzymes in the Golgi apparatus of living tissues. *PLoS One*, **7**, e31324.
- Song, X., Zhang, B. and Zhou, Y.** (2011) Golgi-localized UDP-glucose transporter is required for cell wall integrity in rice. *Plant Signal Behav*, **6**, 1097-1100.
- Sothorn, R.B., Tseng, T.S., Orcutt, S.L., Olszewski, N.E. and Koukkari, W.L.** (2002) *GIGANTEA* and *SPINDLY* genes linked to the clock pathway that controls circadian characteristics of transpiration in Arabidopsis. *Chronobiol Int*, **19**, 1005-1022.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A. and Hawes, C.** (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc*, **1**, 2019-2025.
- Sperling, P. and Heinz, E.** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, **1632**, 1-15.
- Sperling, P., Warnecke, D. and Heinz, E.** (2004) Plant sphingolipids. In *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis*, Vol. 6: Springer Berlin Heidelberg, pp. 337-381.
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S. and Heinz, E.** (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem*, **43**, 1031-1038.
- Sprong, H., Degroote, S., Nilsson, T., Kawakita, M., Ishida, N., van der Sluijs, P. and van Meer, G.** (2003) Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **14**, 3482-3493.

- Steiner, E., Efroni, I., Gopalraj, M., Saathoff, K., Tseng, T.S., Kieffer, M., Eshed, Y., Olszewski, N. and Weiss, D.** (2012) The Arabidopsis *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers. *Plant Cell*, **24**, 96-108.
- Stochaj, W.R., Berkelman, T. and Laird, N.** (2006) Staining membrane-bound proteins with Ponceau S. *CSH Protoc*, **2006**.
- Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A. and Schmülling, T.** (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J*, **67**, 157-168.
- Strasser, R., Steinkellner, H., Boren, M., Altmann, F., Mach, L., Glossl, J. and Mucha, J.** (1999) Molecular cloning of cDNA encoding *N*-acetylglucosaminyltransferase II from *Arabidopsis thaliana*. *Glycoconj J*, **16**, 787-791.
- Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glossl, J. and Steinkellner, H.** (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex *N*-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. *FEBS Lett*, **561**, 132-136.
- Strasser, R., Schoberer, J., Jin, C., Glossl, J., Mach, L. and Steinkellner, H.** (2006) Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi α -mannosidase II, a key enzyme in the formation of complex *N*-glycans in plants. *Plant J*, **45**, 789-803.
- Strasser, R., Bondili, J.S., Vavra, U., Schoberer, J., Svoboda, B., Glossl, J., Leonard, R., Stadlmann, J., Altmann, F., Steinkellner, H. and Mach, L.** (2007) A unique β 1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of *N*-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**, 2278-2292.
- Streatfield, S.J.** (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J*, **5**, 2-15.
- Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H. and Zuo, J.** (2005) Arabidopsis *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *J Integr Plant Biol*, **47**, 588-603.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. and Mizuno, T.** (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHk4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol*, **42**, 107-113.
- Takashima, S., Seino, J., Nakano, T., Fujiyama, K., Tsujimoto, M., Ishida, N. and Hashimoto, Y.** (2009) Analysis of CMP-sialic acid transporter-like proteins in plants. *Phytochemistry*, **70**, 1973-1981.
- Takei, K., Sakakibara, H. and Sugiyama, T.** (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **276**, 26405-26410.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M. and Sugiyama, T.** (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol*, **42**, 85-93.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. and Sakakibara, H.** (2004a) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1053-1062.
- Takei, K., Yamaya, T. and Sakakibara, H.** (2004b) Arabidopsis *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *J Biol Chem*, **279**, 41866-41872.
- Takeshima-Futagami, T., Sakaguchi, M., Uehara, E., Aoki, K., Ishida, N., Sanai, Y., Sugahara, Y. and Kawakita, M.** (2012) Amino acid residues important for CMP-sialic acid recognition by the CMP-

sialic acid transporter: analysis of the substrate specificity of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras. *Glycobiology*, **22**, 1731-1740.

Takeuchi, H., Kantharia, J., Sethi, M.K., Bakker, H. and Haltiwanger, R.S. (2012) Site-specific *O*-glucosylation of the epidermal growth factor-like (EGF) repeats of notch: efficiency of glycosylation is affected by proper folding and amino acid sequence of individual EGF repeats. *J Biol Chem*, **287**, 33934-33944.

Tan, L., Varnai, P., Lampert, D.T., Yuan, C., Xu, J., Qiu, F. and Kieliszewski, M.J. (2010) Plant *O*-hydroxyproline arabinogalactans are composed of repeating trigalactosyl subunits with short bifurcated side chains. *J Biol Chem*, **285**, 24575-24583.

Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A.H., Holm, L.E., Nielsen, V.H., Agerholm, J.S., Arnbjerg, J. and Bendixen, C. (2006) A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene, encoding a UDP-*N*-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res*, **16**, 97-105.

Thornton, T.M., Swain, S.M. and Olszewski, N.E. (1999) Gibberellin signal transduction presents the SPY who *O*-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci*, **4**, 424-428.

To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruere, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Kieber, J.J. (2004) Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, **16**, 658-671.

Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T. and Sakakibara, H. (2012) Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J*, **69**, 355-365.

Toma, L., Pinhal, M.A., Dietrich, C.P., Nader, H.B. and Hirschberg, C.B. (1996) Transport of UDP-galactose into the Golgi lumen regulates the biosynthesis of proteoglycans. *J Biol Chem*, **271**, 3897-3901.

van Hengel, A.J. and Roberts, K. (2002) Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in Arabidopsis. *Plant J*, **32**, 105-113.

Veach, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W., Malbeck, J., Vankova, R. and Mok, M.C. (2003) *O*-glucosylation of *cis*-Zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol*, **131**, 1374-1380.

Velasquez, S.M., Ricardi, M.M., Dorosz, J.G., Fernandez, P.V., Nadra, A.D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancia, M., Verli, H., Pauly, M., Bacic, A., Olsen, C.E., Ulvskov, P., Petersen, B.L., Somerville, C., Iusem, N.D. and Estevez, J.M. (2011) *O*-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science*, **332**, 1401-1403.

Verhertbruggen, Y., Yin, L., Oikawa, A. and Scheller, H.V. (2011) Mannan synthase activity in the CSLD family. *Plant Signal Behav*, **6**, 1620-1623.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, **33**, 949-956.

von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J. and Chrispeels, M.J. (1993) Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks *N*-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex *N*-linked glycans. *Plant Physiol*, **102**, 1109-1118.

Wang, J., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Hou, B.K. (2011) *N*-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **52**, 2200-2213.

- Wang, J., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Hou, B.K.** (2013) Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin *N*-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, **65**, 9-16.
- Wang, L.W., Dlugosz, M., Somerville, R.P., Raed, M., Haltiwanger, R.S. and Apte, S.S.** (2007) *O*-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats in ADAMTS-like-1/punctin-1 regulates secretion: implications for the ADAMTS superfamily. *J Biol Chem*, **282**, 17024-17031.
- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J.E., Tsegaye, Y., Dunn, T.M., Wang, G.L., Bellizzi, M., Parsons, J.F., Morrissey, D., Bravo, J.E., Lynch, D.V. and Xiao, S.** (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 3163-3179.
- Ward, J.M.** (2001) Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, **17**, 560-563.
- Weber, A.P., Linka, M. and Bhattacharya, D.** (2006) Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in *Plantae* from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryot Cell*, **5**, 609-612.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2006) EMS mutagenesis of *Arabidopsis* seed. *CSH Protoc*, **2006**.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. and Schmülling, T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. and 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., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. and Schmülling, T.** (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol (Stuttg)*, **8**, 371-381.
- Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Kramer, U. and Schmülling, T.** (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, **22**, 3905-3920.
- Wilson, N., Simpson, R. and Cooper-Liddell, C.** (2009) Introductory glycosylation analysis using SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. *Methods Mol Biol*, **534**, 205-212.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. and Provart, N.J.** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, **2**, e718.
- Wolf, C., Hennig, M., Romanovicz, D. and Steinebrunner, I.** (2007) Developmental defects and seedling lethality in apyrase *AtAPY1* and *AtAPY2* double knockout mutants. *Plant Mol Biol*, **64**, 657-672.
- Wolucka, B.A. and Van Montagu, M.** (2003) GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem*, **278**, 47483-47490.
- Wulfetange, K., Lomin, S.N., Romanov, G.A., Stolz, A., Heyl, A. and Schmülling, T.** (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol*, **156**, 1808-1818.
- Wulff, C., Norambuena, L. and Orellana, A.** (2000) GDP-fucose uptake into the Golgi apparatus during xyloglucan biosynthesis requires the activity of a transporter-like protein other than the UDP-glucose transporter. *Plant Physiol*, **122**, 867-877.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. and Oliver, D.J.** (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol*, **40**, 711-717.

- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T. and Mizuno, T.** (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol*, **42**, 1017-1023.
- Yang, T., Echols, M., Martin, A. and Bar-Peled, M.** (201) Identification and characterization of a strict and a promiscuous *N*-acetylglucosamine-1-P uridylyltransferase in Arabidopsis. *Biochem J*, **430**, 275-284.
- Yang, X., Su, K., Roos, M.D., Chang, Q., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E.** (2001) *O*-linkage of *N*-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6611-6616.
- Yang, Z., Bennett, E.P., Jorgensen, B., Drew, D.P., Arigi, E., Mandel, U., Ulvskov, P., Levery, S.B., Clausen, H. and Petersen, B.L.** (2012) Toward stable genetic engineering of human *O*-glycosylation in plants. *Plant Physiol*, **160**, 450-463.
- Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H. and Mizuno, T.** (2007) Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **48**, 84-96.
- Yu, B., Xu, C. and Benning, C.** (2002) Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5732-5737.
- Zatloukal, M., Gemrotova, M., Dolezal, K., Havlicek, L., Spíchal, L. and Strnad, M.** (2008) Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorg Med Chem*, **16**, 9268-9275.
- Zeleny, R., Kolarich, D., Strasser, R. and Altmann, F.** (2006) Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta*, **224**, 222-227.
- Zhang, B., Liu, X., Qian, Q., Liu, L., Dong, G., Xiong, G., Zeng, D. and Zhou, Y.** (2011a) Golgi nucleotide sugar transporter modulates cell wall biosynthesis and plant growth in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 5110-5115.
- Zhang, J., Liu, W., Yang, X., Gao, A., Li, X., Wu, X. and Li, L.** (2011b) Isolation and characterization of two putative cytokinin oxidase genes related to grain number per spike phenotype in wheat. *Mol Biol Rep*, **38**, 2337-2347.
- Zhang, M., Henquet, M., Chen, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Ren, X., van der Krol, S., Gonneau, M., Bosch, D. and Gong, Z.** (2009) *LEW3*, encoding a putative α -1,2-mannosyltransferase (ALG11) in *N*-linked glycoprotein, plays vital roles in cell-wall biosynthesis and the abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **60**, 983-999.
- Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. and Lohmann, J.U.** (2010) Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, **465**, 1089-1092.

8. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Betreuer Prof. Dr. Tomáš Werner. Seine beständige Unterstützung, seine Bereitschaft zur Anleitung und sein Wille zur kritischen Auseinandersetzung haben mir diese Arbeit ermöglicht. Vielen Dank.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Thomas Schmülling für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen.

Dann gibt es da noch die Menschen, denen ich in der Angewandten Genetik fast täglich vor Sterilbänken, in Klimakammern, neben Zentrifugen und auf zugigen Passagen ins Gewächshaus begegnet bin. Sie waren mir eine große Hilfe in fachlichen und nicht so fachlichen Fragen. Zumindest die ernstgemeinten Ratschläge stecken in dieser Arbeit drin. Dafür gebührt ihnen mein großer Dank.