

**Funktionelle Charakterisierung von
CKX7 und cytokininregulierten
Transkriptionsfaktorgenen
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Ireen Köllmer
aus Königs Wusterhausen

März, 2009

Die Arbeit wurde von Oktober 2004 bis März 2009 am Lehrstuhl „Molekulare Entwicklungsbiologie der Pflanzen“ des Instituts für Biologie /Angewandte Genetik unter der Leitung von Prof. T. Schmülling angefertigt

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Schmülling

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Schuster

Disputation am: 30.04.2009

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	- 1 -
1.1	Das Phytohormon Cytokinin	- 1 -
1.1.1	Biosynthese von Cytokinin	- 1 -
1.1.2	Modifikationen und Interkonversionen der Cytokinine	- 4 -
1.1.3	Cytokininabbau durch Cytokininoxidasen / -dehydrogenasen (CKX)	- 5 -
1.1.3.1	CKX Gene vieler Pflanzenarten gehören zu Multigenfamilien	- 6 -
1.1.3.2	Biochemische Eigenschaften der CKX Enzyme und katalytischer Mechanismus	- 6 -
1.1.3.3	Gewebespezifische Expression der CKX Gene	- 10 -
1.1.3.4	Regulation der CKX Aktivität und der CKX Expression	- 10 -
1.1.3.5	Entwicklungsbiologische Rolle von CKX Enzymen	- 12 -
1.1.4	Cytokinintransport	- 13 -
1.1.5	Cytokininsignaltransduktion in <i>Arabidopsis</i>	- 14 -
1.2	Transkriptionsfaktorfamilien in <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 22 -
1.2.1	GATA Transkriptionsfaktoren in <i>Arabidopsis</i>	- 24 -
1.2.2	HD-Zip Transkriptionsfaktoren in <i>Arabidopsis</i>	- 26 -
1.2.3	bHLH Transkriptionsfaktoren in <i>Arabidopsis</i>	- 29 -
1.3	Zielsetzung der Arbeit	- 31 -
2.	Material und Methoden	- 33 -
2.1	Chemikalien	- 33 -
2.2	Enzyme	- 33 -
2.3	Computerprogramme	- 33 -
2.4	Biologisches Material	- 34 -
2.4.1	Pflanzen	- 34 -
2.4.2	Bakterien	- 35 -
2.4.3	Verwendete Plasmide	- 35 -
2.5	Kultivierungsbedingungen und Medien	- 36 -
2.5.1	Kultivierung von Bakterien	- 36 -
2.5.2	Sterilkultur von <i>Arabidopsis</i> und Tabak	- 36 -
2.5.3	Dem Kulturmedium zugesetzte Antibiotika, Herbizide und Hormone	- 37 -
2.6	Transformation von Pflanzen	- 37 -
2.6.1	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 37 -

II

2.6.2	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	- 38 -
2.7	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	- 38 -
2.8	Cytokininsensitivitätstests	- 38 -
2.8.1	Wurzelwachstumstest auf cytokininhaltigem Medium	- 38 -
2.8.2	Chlorophyllmessung und Chlorophyll-Retentionstest	- 39 -
2.9	Bestimmung der CKX-Enzymaktivität	- 39 -
2.10	Proteinbestimmung	- 40 -
2.11	Cytokininmessung	- 40 -
2.12	Identifizierung und Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten	- 40 -
2.13	Molekularbiologische Methoden	- 41 -
2.13.1	DNA Extraktionen.....	- 41 -
2.13.1.1	Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzen	- 41 -
2.13.1.2	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien – Miniprep	- 42 -
2.13.2	Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA.....	- 43 -
2.13.2.1	Restriktionsanalysen.....	- 43 -
2.13.2.2	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	- 44 -
2.13.2.3	Ligation	- 44 -
2.13.3	Herstellung und Transformation elektrokompenter Bakterien	- 44 -
2.13.3.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	- 44 -
2.13.3.2	Transformation von Bakterien durch Elektroporation.....	- 45 -
2.13.4	Polymerase-Kettenreaktion - PCR	- 45 -
2.13.5	Aufreinigung, Quantifizierung und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	- 46 -
2.13.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	- 46 -
2.13.5.2	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	- 46 -
2.13.5.3	Natriumacetat-Ethanol-Fällung	- 46 -
2.13.5.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Säulenausschlusschromatographie.....	- 47 -
2.13.6	RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial.....	- 47 -
2.13.7	Semiquantitative RT-PCR	- 48 -
2.13.7.1	DNase Behandlung.....	- 49 -
2.13.8	Quantitative RT-PCR.....	- 49 -
2.13.8.1	cDNA Synthese	- 49 -
2.13.8.2	Quantitative PCR.....	- 50 -
2.13.9	<i>Northern Blot</i> -Analyse	- 50 -
2.13.9.1	RNA-Gel und Transfer der RNA auf eine Nylonmembran	- 50 -
2.13.9.2	<i>Northern</i> -Hybridisierung.....	- 51 -
2.13.9.3	Herstellung der radioaktiv markierten Sonde.....	- 51 -
2.13.10	Klonierungsstrategien.....	- 52 -
2.14	Lichtmikroskopie und verwendete Präparations- und Färbemethoden	- 54 -
2.14.1	Präparation von <i>Arabidopsis</i> Gewebe für die Lichtmikroskopie	- 54 -
2.14.2	Histochemische GUS-Färbung.....	- 55 -
2.14.3	Lugol-Färbung	- 56 -
2.15	Konfokale Mikroskopie und Färbemethoden	- 56 -
2.15.1	Detektion von GFP und CKX7-GFP	- 56 -
2.15.2	Detektion des Xylem durch Fuchsin-Red Färbung	- 56 -

3.	Ergebnisse Teil I: Funktionelle Charakterisierung von <i>AtCKX7</i>	- 57 -
3.1	<i>CKX7</i> wird im Leitgewebe von Keimlingen und in Blüten exprimiert	- 57 -
3.2	<i>CKX7</i> ist im Zytoplasma lokalisiert	- 58 -
3.3	Identifizierung und Charakterisierung <i>CKX7</i> überexprimierender <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	- 60 -
3.3.1	In <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen ist das <i>CKX7</i> Transkriptlevel erhöht	- 61 -
3.3.2	In <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen ist die CKX Aktivität erhöht	- 61 -
3.3.3	In <i>35S:CKX7</i> transgenen Keimlingen ist der Cytokiningehalt verringert	- 62 -
3.3.4	<i>CKX7</i> überexprimierende Pflanzen haben einen spezifischen Phänotyp	- 64 -
3.3.5	Detailanalyse der Primärwurzel <i>CKX7</i> überexprimierender Pflanzen	- 67 -
3.3.5.1	In <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen ist das Wurzelmeristem der Primärwurzel verändert.....	- 67 -
3.3.5.2	<i>35S:CKX7</i> transgene Pflanzen bilden weniger Cortexzellen in der Teilungszone der Primärwurzel	- 68 -
3.3.5.3	In <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen ist die Teilungsaktivität im Wurzelmeristem reduziert... -	70 -
3.3.5.4	Die Primärwurzel von <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen hat eine veränderte Xylemstruktur . -	71 -
3.3.5.5	In Columellazellen von <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen gibt es im Alter von neun Tagen keine Stärke mehr	- 72 -
3.3.5.6	Analyse der Aktivität spezifischer Markergene in der Primärwurzel von <i>35:CKX7</i> transgenen Pflanzen.....	- 74 -
3.3.6	Komplementationsversuche des Primärwurzelphänotyps <i>35S:CKX7</i> transgener Keimlinge durch exogene Zugabe von Phytohormonen	- 77 -
3.3.7	Komplementationsversuche des Primärwurzelphänotyps <i>35S:CKX7</i> transgener Keimlinge durch Kreuzungen mit Mutanten des Cytokininsignalweges	- 78 -
3.3.8	Analyse <i>CKX7</i> überexprimierender Tabakpflanzen	- 84 -
3.3.9	Vergleich von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen, die <i>CKX2</i> ektopisch im Zytoplasma exprimieren mit <i>CKX7</i> überexprimierender Pflanzen	- 86 -
4.	Ergebnisse Teil II: Analyse cytokininregulierter Gene für Transkriptionsfaktoren	- 89 -
4.1	Auswahl der cytokininregulierten Gene mit potentieller Funktion als Transkriptionsfaktor	- 90 -
4.2	Untersuchung der cytokininabhängigen Regulation der Kandidatengene	- 92 -
4.2.1	Analyse der Transkriptmenge durch RT-PCR und <i>Northern Blot</i>	- 92 -
4.2.2	Analyse der Transkriptmenge durch quantitative RT-PCR	- 94 -
4.3	Identifizierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene	- 95 -
4.3.1	Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten durch PCR-Genotypisierung	- 96 -
4.3.2	Untersuchung des Transkriptlevels in bestätigten T-DNA-Insertionsmutanten	- 98 -
4.3.3	Phänotypische Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene	- 100 -
4.3.4	Cytokininsensitivitätstests mit Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene	- 104 -
4.4	Funktionelle Charakterisierung cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene anhand von Überexpressionslinien	- 111 -
4.4.1	Konstruktion von Vektoren zur Überexpression cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren und Selektion transgener Linien	- 111 -
4.4.2	Phänotypische Charakterisierung von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren	- 113 -

4.4.2.1	Phänotypische Charakterisierung des Sprosses der Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren	- 113 -
4.4.2.2	Phänotypische Charakterisierung der Wurzelentwicklung von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren	- 125 -
4.4.3	Analyse der Cytokininsensitivität von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren	- 127 -
4.4.4	Analyse der molekularen Cytokinantwort in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren am Beispiel <i>ARR5</i>	- 130 -
5.	Diskussion	- 133 -
5.1	Funktionelle Charakterisierung von <i>CKX7</i>	- 133 -
5.1.1	Funktionalität und subzelluläre Lokalisation von <i>CKX7</i> sowie Cytokin Gehalt <i>35S:CKX7</i> transgener Pflanzen	- 133 -
5.1.2	Phänotypische Konsequenzen der <i>CKX7</i> Überexpression im Spross	- 135 -
5.1.3	Phänotypische Konsequenzen der <i>CKX7</i> Überexpression in der Wurzel.....	- 136 -
5.2	Funktionelle Charakterisierung cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene	- 145 -
5.2.1	Bestätigung der cytokininabhängigen Regulation der Kandidatengene.....	- 145 -
5.2.2	Phänotypische Konsequenzen der Überexpression einzelner Transkriptionsfaktorgene und Cytokininsensitivität der transgenen Pflanzen	- 145 -
5.2.2.1	<i>HAT22</i> ist ein positiver Regulator des Wurzellängenwachstums und vermittelt cytokininabhängige Prozesse in Spross und Wurzel gegensätzlich.....	- 146 -
5.2.2.2	<i>GATA22</i> reguliert das Wurzelwachstum negativ und beeinflusst verschiedene Aspekte des Sprosswachstums	- 148 -
5.2.2.3	<i>HAT4</i> vermittelt wesentliche Aspekte des <i>shade avoidance syndrom</i> in auxinabhängiger Weise und ist möglicherweise an einer cytokininregulierten Feinabstimmung der Schattenvermeidungsreaktion beteiligt.....	- 150 -
5.2.2.4	<i>bHLH64</i> ist ein negativer Regulator des Chlorophyllgehaltes und der Lateralwurzelbildung und verschaltet möglicherweise die Signalwege von Cytokinin, Licht und Gibberellin	- 152 -
5.2.3	Phänotypische Konsequenzen des Verlustes der Genfunktion einzelner Transkriptionsfaktorgene und Cytokininsensitivität der Insertionsmutanten	- 154 -
5.2.3.1	<i>HSFA2</i> ist ein negativer Regulator der Lateralwurzelbildung.....	- 155 -
5.2.3.2	<i>HAT3</i> ist ein positiver Regulator von Chlorophyllgehalt und cytokininabhängiger Chlorophyllretention und ist an der Lateralwurzelbildung beteiligt.....	- 156 -
5.2.3.3	<i>MYB48</i> könnte an der Vermittlung verschiedener cytokininabhängiger Aspekte des Wurzelwachstums beteiligt sein	- 157 -
5.2.3.4	<i>MYB60</i> reguliert cytokininvermittelte Prozesse durch einen positiven Einfluss auf den Chlorophyllgehalt und einen negativen Einfluss auf das Wurzelwachstum.....	- 159 -
5.2.4	Gesamtbeurteilung der funktionellen Analyse cytokininregulierter Gene für Transkriptionsfaktoren	- 160 -
6.	Zusammenfassung	- 164 -
7.	Summary	- 166 -
8.	Literatur	- 168 -
9.	Verzeichnis der erfolgten Publikationen	- 192 -
10.	Danksagung	- 193 -
11.	Anhang	- 194 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Modell der Cytokininbiosynthese, der Modifikationen und Interkonversionen.....	4 -
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der CKX-katalysierten Abbaureaktion von Cytokinin am Beispiel Isopentenyladenin.	7 -
Abbildung 3:	Modell der Cytokinin signaltransduktion in <i>Arabidopsis</i>	16 -
Abbildung 4:	GUS-Aktivität in <i>CKX7:GUS</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	58 -
Abbildung 5:	Subzelluläre Lokalisation des CKX7-GFP Fusionsproteins in Wurzeln stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	60 -
Abbildung 6:	Nachweis des <i>CKX7</i> Transkriptes in <i>35S:CKX7-GFP</i> und <i>35S:CKX7</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Keimlingen mittels <i>Northern Blot</i> -Analyse.	61 -
Abbildung 7:	CKX Enzymaktivität in <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen.....	62 -
Abbildung 8:	Keimlingsphänotyp von <i>35S:CKX7</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	64 -
Abbildung 9:	Wurzelpheänotyp von <i>35S:CKX7</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Keimlingen.	65 -
Abbildung 10:	Sprossphänotyp von <i>CKX7</i> überexprimierenden <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	66 -
Abbildung 11:	Vergleich des Wurzelmeristems und der Teilungszone im WT und in <i>35S:CKX7</i> transgenen Keimlingen.	68 -
Abbildung 12:	Größenverteilung der Cortexzellen von der Wurzelspitze bis zur Wurzelhaarbildungszone.	69 -
Abbildung 13:	Anteil ungestreckter und gestreckter Zellen einer Cortexzelllinie in der Wurzelspitze.....	70 -
Abbildung 14:	Teilungsaktive Zellen im Wurzelmeristem, analysiert mittels der <i>CYCB1:GUS</i> Markerlinie.....	71 -
Abbildung 15:	Fuchsinfärbung der Primärwurzel von <i>35S:CKX7</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp.....	72 -
Abbildung 16:	Stärkenachweis in der Columella durch Lugol'sche Färbung.	73 -
Abbildung 17:	Expression von <i>ARR5:GUS</i> in der Wurzel von WT und <i>35S:CKX7</i> transgenen Keimlingen.....	75 -
Abbildung 18:	Analyse des Markers QC184 für das Ruhenden Zentrum durch GUS-Färbung in WT und <i>35S:CKX7</i> transgenen Keimlingen.	76 -
Abbildung 19:	Analyse des Cortex-/Endodermis-Markers J0571 in Wurzeln von <i>35S:CKX7</i> transgenen Keimlingen im Vergleich zum WT-Hintergrund.	77 -
Abbildung 20:	Auswirkungen des Funktionsverlustes von Cytokininrezeptoren in <i>35S:CKX7- GFP</i> transgenen Keimlingen.....	80 -
Abbildung 21:	Auswirkungen des Funktionsverlustes von <i>AHP6</i> in <i>35S:CKX7</i> transgenen Pflanzen.	83 -
Abbildung 22:	Nachweis des <i>CKX7</i> Transkriptes und Messung der CKX-Aktivität in <i>35S:CKX7</i> und <i>35S:CKX7-GFP</i> transgenen Tabakpflanzen.	85 -
Abbildung 23:	Sprossphänotyp <i>35S:CKX7</i> transgener Tabakpflanzen.	86 -
Abbildung 24:	Detektion des <i>CKX2</i> Transkriptes mittels <i>Northern Blot</i> -Analyse in <i>cCKX2</i> und <i>cCKX2-GFP</i> überexprimierenden <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	88 -
Abbildung 25:	Semiquantitative RT-PCR und <i>Northern Blot</i> zur Überprüfung der Induktion ausgewählter Transkriptionsfaktorgene durch Cytokinin.....	93 -
Abbildung 26:	Analyse der genspezifischen Transkriptmenge von homozygoten T-DNA- Insertionsmutanten.	99 -
Abbildung 27:	Wurzelwachstum von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene unter Standardbedingungen.....	101 -
Abbildung 28:	Chlorophyllgehalt von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene unter Standardbedingungen.....	102 -

Abbildung 29:	<i>ARR5</i> Expression in T-DNA- Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.	- 103 -
Abbildung 30:	Primärwurzelelongation der Insertionslinien <i>hat3_IS1</i> und <i>myb48_IS1</i> auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.	- 105 -
Abbildung 31:	Lateralwurzelanzahl der Insertionslinien <i>hat3_IS1</i> und <i>hsfA2_IS1</i> auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.	- 107 -
Abbildung 32:	Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren am Beispiel <i>gata22_IS2</i>	- 108 -
Abbildung 33:	Relative Induktionsrate von <i>ARR5</i> in Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene durch Cytokinin im Vergleich zum WT.	- 110 -
Abbildung 34:	Bestimmung des Transkriptlevels cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene in Überexpressionslinien durch <i>Northern Blot</i> -Analyse.	- 112 -
Abbildung 35:	Phänotypische Veränderungen des Sprosses von <i>35S:GATA22</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	- 115 -
Abbildung 36:	Phänotypische Veränderungen von <i>35S:HAT4</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	- 117 -
Abbildung 37:	Phänotypische Veränderungen und Wachstumsparameter des Sprosses von <i>35S:HAT22</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	- 118 -
Abbildung 38:	Natürliche Seneszenz und Chlorophyllgehalt in <i>35S:HAT22</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	- 120 -
Abbildung 39:	Phänotyp von <i>35S:bHLH64</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	- 122 -
Abbildung 40:	Detailanalyse des Hypokotyls von <i>35S:bHLH64</i> transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	- 124 -
Abbildung 41:	Wurzelwachstum von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene.	- 126 -
Abbildung 42:	Prozentuale Reduktion der Lateralwurzelanzahl in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene.	- 129 -
Abbildung 43:	<i>ARR5</i> Expression in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren im Vergleich zum WT.	- 131 -
Abbildung 44:	Relative Induktionsrate von <i>ARR5</i> durch Cytokinin in Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene im Vergleich zum WT.	- 132 -
Abbildung 45:	Genstruktur der für den <i>loss-of-function</i> Ansatz ausgewählten Gene und die Position verfügbarer T-DNA Insertionen.	- 194 -
Abbildung 46:	Relative Änderung der Transkriptmenge ausgewählter Gene im Wildtyp durch Cytokininbehandlung ermittelt mit qRT-PCR.	- 196 -
Abbildung 47:	Primärwurzelelongation von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.	- 197 -
Abbildung 48:	Lateralwurzelwachstum von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.	- 199 -
Abbildung 49:	Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.	- 200 -
Abbildung 50:	Veränderung der <i>ARR5</i> Transkriptmenge durch Cytokinin im WT.	- 205 -
Abbildung 51:	Relative Induktionsrate von <i>ARR5</i> in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene durch Cytokinin im Vergleich zum WT.	- 206 -
Abbildung 52:	Primärwurzelelongation von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene nach Cytokininbehandlung.	- 208 -
Abbildung 53:	Lateralwurzelanzahl von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene nach Cytokininbehandlung.	- 209 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Bakterienstämme	- 35 -
Tabelle 2:	Verwendete Plasmide	- 35 -
Tabelle 3:	Antibiotika und Herbizide im Kulturmedium	- 37 -
Tabelle 4:	Cytokiningehalt in <i>CKX</i> überexprimierenden <i>Arabidopsis</i> Keimlingen im Vergleich zum WT.....	- 64 -
Tabelle 5:	Gene mit erhöhter oder reduzierter Transkriptmenge nach Cytokininbehandlung	- 91 -
Tabelle 6:	Zusammenfassung der Induktionswerte ermittelt in der qRT-PCR und der <i>Microarray</i> -Analyse.....	- 95 -
Tabelle 7:	Untersuchte T-DNA-Insertionslinien.	- 97 -
Tabelle 8:	Phänotypen von Mutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene	- 161 -
Tabelle 9:	Alle verfügbaren T-DNA-Insertionslinien der Kandidatengene aus Tabelle 5.....	- 195 -
Tabelle 10:	Zusammenfassung der Ergebnisse aller qRT-PCR Experimente von Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene, in denen die <i>ARR5</i> Induktion nach 30 Minuten Cytokininbehandlung bestimmt wurde.	- 207 -
Tabelle 11:	Verwendete Primer zur Bestätigung von T-DNA-Insertionslinien mit verändertem Transkriptlevel des korrespondierenden Gens.....	- 213 -
Tabelle 12:	Verwendete Primer in der RT-PCR und der qRT-PCR	- 214 -

VIII

Abkürzungen

ABA	Abcsicinsäure	kDa	kilo Dalton
ADP	Adenosindiphosphat	K_m	Michaelis-Menten-Konstante
AHK	Arabidopsis Histidin Kinase	LB-	Luria-Bertani-Medium
AHP	Arabidopsis Phosphotransmitter Protein	Medium	
AMP	Adenosinmonophosphat	M	Molarität
Amp ^R	Ampicilin-Resistenz	MES	2-(N-morpholino)Ethansulfonsäure
ARR	Arabidopsis Response Regulator	MEP	Methylerythritolphosphat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	μ M	Mikromolar
ATP	Adenosintriphosphat	mM	Millimolar
ATS	Arabidopsis thaliana Kultivierungsmedium plus Saccharose	MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
BA	Benzyladenin	mRNA	messenger RNA
Bar ^R	Basta-Resistenz	MS	Murashige & Skoog
bHLH	basic Helix-Loop-Helix	MU	4-Methylumbeliferon
bidest.	bidestilliert	MUG	4-Methylumbeliferongluconid
BSA	Rinderserumalbumin	NAA	Naphtylessigsäure
bZip	basic leucine zipper	NaAc	Natriumacetat
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA	NaOH	Natronlauge
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	nM	nanoMolar
CKX	Cytokininoxidase/-dehydrogenase	nm	Nanometer
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid	OD	Optische Dichte
cZ	<i>cis</i> -Zeatin	PCR	Polymerase-Chain-Reaction
cZR	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
cZ9G	<i>cis</i> -Zeatin-9-Glukosid	PPT	Phosphinothricin
cZOG	<i>cis</i> -Zeatin-O-Glukosid	PPT ^R	Phosphinothricin-Resistenz
cZRMP	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid-Monophosphat	PVP	Polyvenylpyrrolidon
DCIP	2,6-Dichlorophenol Indophenol	qPCR	quantitative PCR
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat	r	revers
DMSO	Dimethylsulfoxid	R	Rötlicht
DNA	Desoxyribonukleinsäure	R/FR	Rotlicht/Dunkelrotlicht Verhältnis
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	RAM	apikales Wurzelmeristem - root apical meristem
DS	<i>Dendrobium Sonia</i>	RB	Right Boarder
DZ	Dihydrozeatin	Rif ^R	Rifampicin-Resistenz
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	RNA	Ribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum	ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin-Trimethylaminsulfat
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
f	forward	RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
FR	Dunkelrotlicht - far red light	SAM	apikales Sprossmeristem - shoot apical meristem
FAD	Flavinadenindinukleotid	SAR	shade aviodance response
g	Erdbeschleunigung	SAS	shade aviodance syndrom
GA ₃	Gibberellinsäure	SDS	Natriumlaurylsulfat
Gent ^R	Gentamycin-Resistenz	TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
GFP	green fluorescent protein	T-DNA	Transfer-DNA
GUS	β -Glukoronidase	TFs	Transkriptionsfaktoren
HD	Homöodomäne	TE	Tris-EDTA-Puffer
HMBDP	4-Hydroxy-3-Methyl-2-(E)-Butenyldiphosphat	tRNA	transfer RNA
HTH	Helix-Turn-Helix	Tris	Tris - Hydroxymethylaminomethan
Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz	iZ	<i>trans</i> -Zeatin
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>	iZ9G	<i>trans</i> -Zeatin-9-Glukosid
IAA	Indoleessigsäure	iZOG	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glukosid
iP	N ⁶ -(Δ^2 -Isopentenyl)adenin	iZR	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid
iPR	N ⁶ -(Δ^2 -Isopentenyl)adenosin	iZRMP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-Monophosphat
iPRMP	N ⁶ -(Δ^2 -Isopentenyl)adenosin-Monophosphat	ÜN	über Nacht
IPT	Isopentenyltransferase	UV	Ultra Violett
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz	v/v	Volumenprozent
kb	Kilobasenpaare	w/v	Gewichtsprozent
		WT	Wildtyp
		X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glukoronid
		Zm	<i>Zea mays</i>

1. Einleitung

1.1 Das Phytohormon Cytokinin

Cytokinine sind Substanzen, die Zellen stimulieren, sich zu teilen, also Cytokinese durchzuführen. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts beobachtete Gottlieb Haberlandt, dass im Phloem des Leitgewebes eine wasserlösliche Substanz vorkommt, die Zellen verwundeter Gewebe stimuliert, sich zu teilen (Haberlandt, 1913). Eine vergleichbare Funktion wurde für Kokosnussmilch beschrieben (Van Overbeek *et al.*, 1941). Das erste nachgewiesene Cytokinin war Kinetin und wurde aus hitzedenaturierter Heringsspermien-DNA gewonnen. Die Isolierung und Kristallisierung gelang Miller und Skoog (Miller *et al.*, 1955a; Miller *et al.*, 1955b; Miller *et al.*, 1956). Jedoch ist Kinetin kein natürlich in der Pflanze vorkommendes Cytokinin. Die Versuche, Kinetin-verwandte Substanzen aus Pflanzen zu isolieren, waren Anfang der 60-er Jahre erfolgreich. Fast zeitgleich gelang es zwei Forschergruppen Zeatin aus Maiskörnern zu isolieren (Miller, 1961; Letham, 1963). Bis heute ist eine große Zahl verschiedener Cytokinine beschrieben worden, die alle Zellteilungs-stimulierende Aktivität aufweisen (Mok und Mok, 2001).

Natürlich vorkommende Cytokinine sind von Adenin abgeleitete Moleküle, die am N^6 -Stickstoffatom des Adenins eine Isoprenoid- oder aromatische Seitenkette tragen. Die Isoprenoidkette ist zum Beispiel in N^6 -(Δ^2 -Isopentenyl)adenin (iP) und Zeatin (Z) ungesättigt, wobei Zeatin eine charakteristische Hydroxylgruppe in *cis*- oder *trans*-Konfiguration am Ende der Seitenkette trägt. Anhand dieser Hydroxylgruppe unterscheidet man *cis*-Zeatin (cZ) und *trans*-Zeatin (tZ). Beim Dihydrozeatin (DZ) liegt die Isoprenoidkette gesättigt vor. Die aromatischen Cytokinine tragen einen Benzylring, im Falle von Benzyladenin (BA) oder einen Furanring im Falle von Kinetin (Mok und Mok, 2001; Sakakibara, 2006). Weitere synthetische Cytokinine sind von Phenylurea abgeleitete Moleküle wie Diphenylurea oder Thidiazuron. Neben diesen Grundformen gibt es viele Modifikationen dieser Moleküle.

Zum einen können verschiedene Zucker (Glukose, Ribose) an den Stickstoffatomen in N^3 -, N^7 - oder N^9 -Position des Adeninringes vorkommen (*N*-Glykoside). Bei Cytokininnukleosiden ist am N^9 des Adeninringes Ribose verknüpft. Diese kann zusätzlich als Mono-, Di- oder Triphosphat vorliegen (Cytokininnukleotide). Zum anderen kommen Modifikationen der Isoprenoidkette vor. Zum Beispiel ist bei den *O*-Glykosiden der Zeatine die Hydroxylgruppe mit Glukose oder Xylose verknüpft. Diese *O*-Glykolysierung ist die einzige bekannte reversible Cytokininkonjugation.

1.1.1 Biosynthese von Cytokinin

In vitro Cytokininbiosynthese wurde erstmals in Enzymextrakten des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* beschrieben (Taya *et al.*, 1978). Das isolierte Enzym Isopentenyltransferase (IPT) katalysiert die Übertragung von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) auf Adenosinmonophosphat

(AMP) und es entsteht Isopentenylribosidmonophosphat (IPRMP). Nach dem gleichen Mechanismus verläuft die Biosynthese von Cytokinin in *Agrobacterium tumefaciens*. Es wurden IPT kodierende Gene (*tmr* und *tzs*) isoliert (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984; Akiyoshi *et al.*, 1985). Als Seitenkettenakzeptor fungiert in Agrobakterien ausschließlich AMP, welches sowohl mit DMAPP als auch mit 4-Hydroxy-3-Methyl-2-(E)-Butenyldiphosphat (HMBDP) verknüpft werden kann (Blackwell und Horgan, 1993; Krall *et al.*, 2002). HMBDP ist ein Zwischenprodukt bei der Synthese von DMAPP über den Methylerythritolphosphat- (MEP)-Weg. Der MEP-Syntheseweg von DMAPP ist typisch für Bakterien (Hecht *et al.*, 2001).

In höheren Pflanzen erfolgt die Cytokininbiosynthese in zwei Hauptwegen (Abbildung 1). In beiden Wegen ist der erste und limitierende Schritt die Übertragung des Isoprenoiddonors DMAPP auf den Akzeptor durch IPT Enzyme. Der Isoprenoidakzeptor ist entweder AMP/ADP/ATP, was dem Biosyntheseweg von *Agrobacterium* ähnelt und zur Bildung von iP-Nukleotiden führt oder eine Cytokininvorläufer-enthaltende tRNA, wobei über Zwischenschritte cZ-Ribosidmonophosphat (cZRMP) entsteht (Sakakibara, 2006). Die Bildung von DMAPP erfolgt auch in höheren Pflanzen über den MEP-Weg und dieser findet in Plastiden statt. Es existiert jedoch noch ein zweiter Syntheseweg (MVA-Weg), bei dem DMAPP im Cytosol über das Zwischenprodukt Mevalonat gebildet wird (Lichtenthaler, 1999). Für die cZ-Synthese stammt das DMAPP mehrheitlich aus dem MVA-Weg und für die tZ- und iP-Synthese aus dem MEP-Weg (Kasahara *et al.*, 2004). HMBDP wird von den IPTs aus *Arabidopsis* anscheinend nicht als Isoprenoiddonor verwendet (Sakakibara *et al.*, 2005).

Die Herkunft der Hydroxylgruppe des Zeatin ist Gegenstand von Diskussionen. Einerseits wurden Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP735A1 und CYP735A2 identifiziert, Enzyme die iP bzw. dessen Nukleotide direkt zu tZ und dessen Nukleotiden hydroxylieren (Takei *et al.*, 2004b). Andererseits wurde auch eine iP-unabhängige Übertragung einer unbekannt hydroxylierten Vorläuferkomponente auf den Adenylrest als alternativer tZ-Biosyntheseweg beschrieben (Abbildung 1) (Åstot *et al.*, 2000).

Zu den Biosynthesewegen unter Verwendung von AMP/ADP/ATP oder tRNA als Isoprenoidakzeptoren lassen sich die Aktivitäten von zwei verschiedenen IPT-Typen zuordnen. AtIPT1 und AtIPT3-AtIPT8 wurden anhand ihrer Homologien zu bakteriellen IPTs als Enzyme klassifiziert, die vermutlich DMAPP auf AMP/ADP/ATP übertragen (AMP/ADP/ATP-IPTs) und AtIPT2 und AtIPT9 als solche, die DMAPP auf Adenosin von tRNAs übertragen (tRNA-IPTs) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a). Die erhöhte Expression der AMP/ADP/ATP-IPT Gene führte in *E. coli* zur Akkumulation von iP und tZ im Medium (Takei *et al.*, 2001a) sowie zu cytokininunabhängigem Sprosswachstum aus Kallusgewebe in *Arabidopsis* (Kakimoto, 2001; Sun *et al.*, 2003). AtIPT2 katalysiert dagegen die Übertragung von DMAPP auf Cytokininvorläufer-enthaltende tRNAs (Golovko *et al.*, 2002), was auch für AtIPT9 vermutet wird. Es ist schon lange bekannt, dass Cytokininreste in tRNAs vorkommen, zum Beispiel in tRNA mit Anticodon für Serin (Armstrong *et*

al., 1969; Skoog und Armstrong, 1970). Außerdem wurden in WT tRNA *cZR* und sogar geringe Mengen iPR gemessen (Miyawaki *et al.*, 2006). Wie die Hydroxylierung prenylierter tRNA erfolgt, ist noch unklar. Einerseits wird eine *cis*-Hydroxylase postuliert (Sakakibara, 2006), die durch IPT2 prenylierte tRNA-Moleküle an der Isoprenoidkette in *cis*-Position hydroxyliert, genau wie es bereits für *miaE* in *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Persson *et al.*, 1994). Andererseits wird auch eine Übertragung von einer bereits hydroxylierten Isoprenoidkette durch IPT2 auf das Adenosin in tRNA als Syntheseweg für *cZRM* diskutiert (Golovko *et al.*, 2002).

Die Isolation von *ipt* Mutanten und die Charakterisierung von Mehrfachmutanten verschiedener *ipt* Kombinationen lieferten zusätzlich überzeugende Hinweise für die verschiedenen Biosynthesewege der Isoprenoid-Cytokinine. Anhand von Cytokininmessungen in den *ipt* Mutanten wurde gezeigt, dass iP und *tZ* mehrheitlich von den AMP/ADP/ATP-IPTs (IPT1, IPT3-8) synthetisiert werden. Auf der anderen Seite werden *cZ* und dessen Konjugate von den tRNA-IPTs (IPT2 und IPT9) synthetisiert (Miyawaki *et al.*, 2006). Außerdem scheint die *cis-trans*-Isomerisierung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Miyawaki *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 2006).

Die Wirkung als AMP/ADP/ATP-IPT bzw. tRNA-IPT unter der Verwendung von DMAPP aus dem plastidären MEP-Weg oder dem cytosolischen MVA-Weg stimmt mit den verschiedenen subzellulären Lokalisationen der IPTs gut überein. So wurden GFP-Fusionsproteine aus GFP und AtIPT1, -3, -5 oder AtIPT8 in Plastiden sowie AtIPT2 und AtIPT4 im Cytosol lokalisiert. AtIPT7 konnte in Mitochondrien lokalisiert werden (Kasahara *et al.*, 2004). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass bei AtIPT3 die katalytische Aktivität und die subzelluläre Lokalisation von der Farnelysierung des Proteins abhängig sind und über diese Proteinmodifikation eine zusätzliche Regulation der Cytokininbiosynthese möglich sein könnte (Galichet *et al.*, 2008). *E. coli* sowie Hefezellen, die IPT3 exprimierten, produzierten nur hohe Mengen iP, wenn das Protein farnelysiert war. Aktives, farnelysiertes IPT3 ist im Kern und im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen nicht-farnelysiertes IPT3 nur in Plastiden lokalisiert war (Galichet *et al.*, 2008).

AtIPT Gene werden in verschiedensten Geweben, Organen und Entwicklungsstadien exprimiert. Die Expression von *AtIPT1*, -4, -6 und *AtIPT8* wurde in reproduktiven Organen und die Expression von *AtIPT1*, -3, -5 und *AtIPT7* in vegetativen Geweben nachgewiesen (Miyawaki *et al.*, 2004). Die tRNA-IPTs *AtIPT2* und *AtIPT9* werden weniger spezifisch exprimiert. Eine Unterdrückung der *IPT* Expression durch Cytokinin spricht für eine Feedback-Regulation der Cytokininbiosynthese (Miyawaki *et al.*, 2004). Nitratgabe führt nach Nitratmangel zu steigenden Cytokiningehalten in Wurzeln, u.a. durch Induktion von *AtIPT3*. Dies führte zur Annahme, dass Cytokinin als mobile Substanz Informationen über den Nitratstatus der Wurzel an den Spross übermitteln kann (Takei *et al.*, 2001b; Takei *et al.*, 2002; Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004a). Erst kürzlich wurde auch in Mais ein ganzes Set von *IPT* Genen identifiziert. Erste Untersuchungen einzelner Mitglieder der *ZmIPT* Genfamilie deuten auf einen vergleichbaren Mechanismus der Cytokininbiosynthese in Mais

mit ADP/ATP-IPTs unter der Verwendung von DMAPP als Isoprenoidakzeptor hin (Brugière *et al.*, 2008).

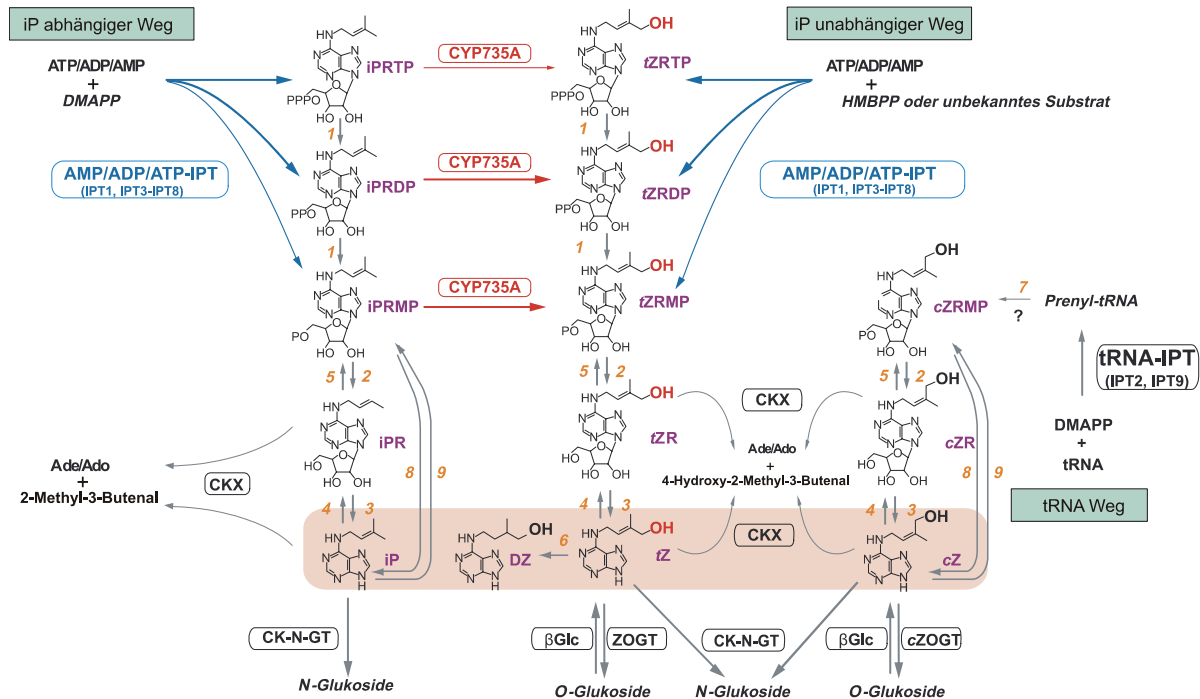


Abbildung 1: Modell der Cytokininbiosynthese, der Modifikationen und Interkonversionen.

Dargestellt sind die verschiedenen Biosynthesewege für Isoprenoidcytokinine. Die Interkonversionen zu den freien Cytokininbasen und deren Konjugationen sind mit den zugehörigen Enzymen abgebildet. Die verwendeten Abkürzungen sind, wenn hier nicht angegeben dem Abkürzungsverzeichnis und dem Text zu entnehmen. (CK-N-GT) Cytokinin-*N*-Glykosyltransferase, (ZOGT) *tZ*-*O*-Glykosyltransferase, (*c*ZOGT) *cZ*-*O*-Glykosyltransferase, (β Glc) β -Glukosidase, (1) Phosphatase, (2) Ribonukleotid-Phosphohydrolase, (3) Adenosinnukleosidase, (4) Purinnukleosid-Phosphorylase, (5) Adenosinkinase, (6) Zeatinreduktase, (7) *cis*-Hydroxylase, (8) Cytokinnukleosid-5'-Monophosphat-Phosphoribohydrolase, (9) Adenin-Phosphoribosyltransferase. (verändert nach: Sakakibara, 2006).

1.1.2 Modifikationen und Interkonversionen der Cytokinine

Die Übertragung von Zuckerresten auf iP oder Zeatine in N^3 -, N^7 - oder N^9 -Position wird durch *N*-Glykosyltransferasen katalysiert (Hou *et al.*, 2004). Diese Konjugation ist nicht reversibel und führt deshalb zur Inaktivierung des betreffenden Cytokinins (Abbildung 1).

Die freien Basen iP und Zeatin können von Adenosinphosphorylasen mit Ribose zu Nucleosiden verknüpft (Chen und Petschow, 1978) und dann weiter von Adenosinkinasen zu Nucleotiden phosphoryliert werden (Chen und Eckert, 1977; von Schwartzberg *et al.*, 1998; Moffatt *et al.*, 2000; Kwade *et al.*, 2005). Das Enzym Adenosinphosphoribosyltransferase (APRT) katalysiert eine direkte Verknüpfung von iP oder BA mit einem Phosphoribosylrest und es entsteht das korrespondierende 5'-Monophosphat (Moffatt und Somerville, 1988; Moffatt *et al.*, 1991; Lee und Moffatt, 1993; Schnorr *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2002). Adenosinkinasen, -phosphorylasen und -phosphoribosyltransferasen

entstammen hauptsächlich dem Purinstoffwechsel und ihre Spezifität für Cytokinine ist geringer als für die Substrate Adenin, Adenosin oder AMP (Mok und Mok, 2001).

Die Verknüpfung von Glukose oder Xylose mit der OH-Gruppe der Isoprenoidkette von *tZ* wird durch *O*-Glykosyltransferasen katalysiert (Martin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001a; Martin *et al.*, 2001b; Veach *et al.*, 2003). Diese *O*-Glykolysierung ist die einzige bekannte reversible Cytokininkonjugation, denn durch eine β -Glukosidase kann der Glykosylrest wieder abgespalten werden, wodurch wieder aktives *tZ* entsteht (Brzobohaty *et al.*, 1993; Falk und Rask, 1995). *O*-Glykoside von Zeatinen gelten daher als Speicherformen und die Reversion zu aktivem *tZ* ist ein Mechanismus zur Regulation der Homöostase von Cytokinin (Mok und Mok, 2001).

Nach dem IPT-katalysierten ersten Syntheseschritt katalysieren die Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP735A1 und CYP735A2 ausgehend von den iP-Nukleotiden die weiteren Konversionen zu *tZ* (Takei *et al.*, 2004b). Die iPR-tri- und diphosphate werden von Phosphatasen zu iPRMP und dieses dann von Phosphohydrolasen weiter zu iPR dephosphoryliert. Die Adenosinnukleosidase katalysiert dann die Abspaltung des Ribosylrestes und damit die Bildung der freien Base iP. Äquivalent verläuft die Bildung der freien Basen *cZ* und *tZ* ausgehend von *cZRMP* und *tZRMP* (Sakakibara, 2006). Eine direkte Phosphoribolyse von iPRMP und *cZRMP* zu iP und *cZ* wurde mit der Identifizierung des korrespondierenden Gens und Enzyms in der *log* Mutante von Reis nachgewiesen (Kurakawa *et al.*, 2007) und es existieren Homologe in *Arabidopsis*.

1.1.3 Cytokininabbau durch Cytokininoxidasen / -dehydrogenasen (CKX)

Der Cytokiningehalt in Pflanzen wird neben der *de novo* Synthese und der Konjugation auch wesentlich durch den enzymatischen Abbau reguliert. Nicht lange nach der Entdeckung und Aufklärung der Struktur von Cytokininen wurde auch eine enzymatische Aktivität im Proteinextrakt von Tabak-Zellkultur beschrieben, die zur Inaktivierung von iPR und der Bildung von Adenosin führte (Paces *et al.*, 1971). Die Entdeckung einer ähnlichen Enzymaktivität in Maiskörnern führte zur Prägung des Namens Cytokininoxidase (CKX) (Whitty und Hall, 1974). Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Cytokininen mit ungesättigter Isoprenoidkette in Adenin oder Adenosin (McGaw und Horgan, 1983) und das entsprechende Aldehyd wie zum Beispiel 3-Methyl-2-Butenal im Falle der Spaltung von iP (Brownlee *et al.*, 1975). CKX Aktivität wurde seither in vielen Geweben und Pflanzenarten beschrieben wie zum Beispiel Mais, Soja, Tabak, Bohnen, Äpfel, Ahorn, Pappel, Erbse, Weizen und Gerste (Armstrong, 1994; Hare und van Staden, 1994). Die Spaltung erfolgt in einem einzigen enzymatischen Schritt und ist nicht reversibel.

In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte bei der Aufklärung des katalytischen Mechanismus und der biochemischen Eigenschaften der CKX Proteine gemacht. Die Identifizierung von CKX Genen in *Arabidopsis*, Mais, Gerste, Weizen, Orchideen und Reis (Werner *et al.*, 2006) machte zudem Studien zur Regulation der Gene möglich. Die Manipulation dieser Gene und die damit

verbundenen Veränderungen des Cytokiningehaltes in transgenen Pflanzen brachten viele Hinweise zur biologischen Rolle von Cytokinin während der Pflanzenentwicklung.

1.1.3.1 CKX Gene vieler Pflanzenarten gehören zu Multigenfamilien

Als erstes CKX Gen wurde *ZmCKX1* von zwei Arbeitsgruppen in Mais identifiziert und die Funktionalität des korrespondierenden Enzyms bestätigt (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999). Ausgehend von *ZmCKX1* wurden mit Hilfe bioinformatischer Methoden CKX Gene in vielen Spezies identifiziert. In Mais konnten seither insgesamt fünf CKX Gene identifiziert, kloniert sowie für die meisten Proteine eine CKX Aktivität nachgewiesen werden (Bilyeu *et al.*, 2003; Massonneau *et al.*, 2004). CKX Gene wurden außerdem in Weizen (*TaCKX1-TaCKX7*) und Gerste (*HvCKX1-HvCKX8*) identifiziert und die CKX Aktivität einiger Enzyme nachgewiesen (Galuszka *et al.*, 2001; Galuszka *et al.*, 2004). Auch in Orchideen (*Dendrobium Sonia*) wurde CKX Aktivität gemessen und das zugrunde liegende Gen *DSCKX1* kloniert und charakterisiert (Yang *et al.*, 2003a; Yang *et al.*, 2003b). Eines der elf potentiellen CKX Gene in Reis konnte ebenfalls als aktive CKX identifiziert werden (Ashikari *et al.*, 2005). Im *Arabidopsis* Genom wurden sieben CKX Gene identifiziert und die CKX Aktivität wurde für AtCKX1-AtCKX6 nachgewiesen (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007).

1.1.3.2 Biochemische Eigenschaften der CKX Enzyme und katalytischer Mechanismus

CKX Enzyme enthalten kovalent gebundenes FAD als Kofaktor und sind Dehydrogenasen, die p-Chinon-verwandte Elektronenakzeptoren verwenden

Es wurde lange Zeit angenommen, dass CKX Enzyme bei der Spaltung ihrer Substrate Sauerstoff verwenden (Whitty und Hall, 1974). Die 50-fache Erhöhung der CKX Aktivität durch Kupfer-Imidazol-Komplexe (Chatfield und Armstrong, 1987) führte zur Klassifizierung der Enzyme als Kupfer-abhängige Amino-Oxidasen (Hare und van Staden, 1994). Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Galuszka *et al.*, 2001; Laskey *et al.*, 2003) und die Hypothese, dass Sauerstoff der primäre Elektronenakzeptor ist, wurde angezweifelt. Vielmehr war eine viel stärkere Erhöhung der CKX Aktivität durch die Zugabe künstlicher Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen möglich (Frébort *et al.*, 2002; Laskey *et al.*, 2003). Die enzymatische Wirkung von CKX als Dehydrogenase wurde postuliert (Galuszka *et al.*, 2001; Laskey *et al.*, 2003). Zwar konnte für *ZmCKX1* eine duale katalytische Wirkung als Oxidase und als Dehydrogenase gezeigt werden, jedoch ist die Oxidase Aktivität sehr gering und unspezifisch. Deshalb ist diese Funktion vermutlich *in vivo* physiologisch irrelevant und die Dehydrogenase Funktion von *ZmCKX* aufgrund einer viel höheren Substrataffinität und -spezifität die physiologisch relevante Form (Frébortová *et al.*, 2004; Kopecný *et al.*, 2005). Auch in *Arabidopsis* wurde im

Vergleich zur Oxidase-Aktivität eine viel stärkere Dehydrogenase-Aktivität der AtCKX Proteine gefunden (Galuszka *et al.*, 2007).

Die Identifizierung von CKX Proteinen in Weizen und Mais und die Analyse der Aminosäuresequenz deckten auf, dass die Enzyme eine FAD-bindende Domäne haben und die Analyse des Absorptionsspektrum sowie des Redoxpotentials zeigte, dass dieses Flavin FAD ist, welches kovalent gebunden ist (Morris *et al.*, 1999; Bilyeu *et al.*, 2001; Galuszka *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004). Deshalb werden CKX Enzyme als FAD-abhängige Oxidoreduktasen bezeichnet. Physiologische Elektronenakzeptoren könnten p-Chinon-verwandte Moleküle sein, die aus phenolischen Vorläufersubstanzen von verschiedenen Oxidasen der Pflanze produziert werden (Frébortová *et al.*, 2004; Galuszka *et al.*, 2005).

Zu einer genaueren Vorstellung des Reaktionsablaufes (Abbildung 2) gelangte man durch die Darstellung der dreidimensionalen Struktur von ZmCKX1 (Malito *et al.*, 2004) Die katalytische Reaktion wurde wie folgt angenommen. Bei der Spaltung von zum Beispiel iP kommt zunächst die Isoprenoidkette im katalytischen Zentrum des CKX Enzyms zu liegen. Das C₁₁-Atom des Cytokinins ist der Ort des oxidativen Angriffs. Das benachbarte N₁₀-Atom geht eine wichtige Wasserstoffbrückenbindung zum Aspartat₁₆₉ des CKX Enzyms ein. Beim oxidativen Angriff werden Elektronen und eine Proton (in Form von H⁺) auf das N₅-Atom des Flavins übertragen, wodurch aus FAD die reduzierte Form FADH⁻ wird. Dabei wird C₁₁ dehydrogenisiert bzw. oxidiert und durch Umlagerung der Doppelbindung vom N₁₀-Atom wird dieses positiv geladen. Der limitierende Schritt ist die Re-oxidation von FADH⁻ zu FAD durch Übernahme der Elektronen durch einen Elektronenakzeptor. Unter Hydrolyse von Wasser wird abschließend die Aminogruppe des N₁₀-Atoms zur Bildung von Adenin reduziert und dieses zusammen mit 3-Methyl-2-Butenal als Produkte entlassen (Malito *et al.*, 2004).

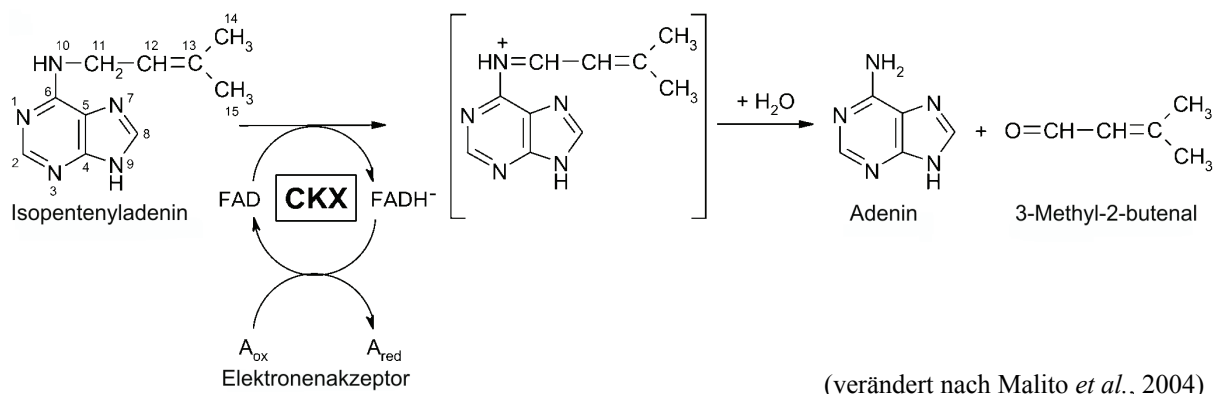


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CKX-katalysierten Abbaureaktion von Cytokinin am Beispiel Isopentenyladenin.

Substratspezifitäten und dreidimensionale Struktur des Proteins

Die bevorzugten Substrate der meisten CKX Enzyme sind iP und tZ sowie deren Riboside (Armstrong, 1994; Hare und van Staden, 1994; Schmülling *et al.*, 2003). Über die CKX Enzyme der Spezies Tabak, Bohne, Weizen und Gerste wurde berichtet, dass iP und iPR von diesen Enzymen am stärksten bevorzugt werden (Kamínek und Armstrong, 1990; Motyka und Kamínek, 1994; Galuszka *et al.*, 2001; Galuszka *et al.*, 2004), jedoch wurde zum Beispiel für Mais und Tabak auch mit tZ als Substrat eine starke CKX Aktivität beschrieben (Motyka und Kamínek, 1994; Bilyeu *et al.*, 2001). Die sterische Anordnung der Hydroxylgruppe im Zeatin ist ausschlaggebend für die Stärke der Aktivität, mit der CKX Enzyme diese beiden Zeatin-Isoformen abbauen und tZ wird meist bevorzugt. Es gibt nur wenige Berichte über CKX Enzyme, zu deren Substraten cZ gehört. Die Aktivität, mit der cZ im Vergleich zu tZ abgebaut wird, ist abhängig von der Pflanzenart verschieden. So war der K_m -Wert von ZmCKX1 für tZ deutlich geringer als für cZ als Substrat (Bilyeu *et al.*, 2001). Weizen und Tabak CKX Enzyme können beide Zeatin-Isoformen mit gleich starker Aktivität abbauen (Motyka und Kamínek, 1994; Galuszka *et al.*, 2001). In Gerste wurde zwar CKX Aktivität mit cZ als Substrat gefunden, jedoch auch in geringerem Maße als mit tZ als Substrat und auch nur in Wurzeln und Körnern (Galuszka *et al.*, 2004). Die CKX Enzyme aus *Arabidopsis* zeigen hohe Substratpräferenzen für iP und tZ sowie deren Riboside. AtCKX2 und AtCKX4, welche ZmCKX1 am ähnlichsten sind, zeigen diese Präferenz am deutlichsten und haben insgesamt die stärkste Aktivität der CKX Proteinfamilie (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007). Interessant ist, dass die vermutlich innerhalb der Zelle aktiven CKX Enzyme AtCKX1, -3 und AtCKX7 (Schmülling *et al.*, 2003) auch iPRMP als Substrat verwenden können. Zudem ist die Aktivität mit der sie iP9G abbauen sogar höher als für das Substrat iP (Galuszka *et al.*, 2007). AtCKX7 ist das einzige Protein der CKX Familie, das cZ mit höherer Aktivität abbaut als tZ. Im Gegensatz dazu verwenden die apoplastisch aktiven Enzyme AtCKX2 und AtCKX4 cZ gar nicht als Substrat (Galuszka *et al.*, 2007). Die unterschiedlichen Substratspezifitäten der verschiedenen AtCKX Proteine deuten auf das Vorkommen verschiedener Cytokininpools in den verschiedenen Kompartimenten der Pflanzen hin.

Cytokinine mit gesättigter Seitenkette (wie Dihydrozeatin), sterisch großer Seitenkette (wie der aromatischen Kette im BA oder der glykolysierten Kette im Zeatin-O-Glukosid) werden gar nicht oder nur mit sehr geringer Aktivität von CKX Enzymen abgebaut (Armstrong, 1994; Hare und van Staden, 1994; Galuszka *et al.*, 2001; Schmülling *et al.*, 2003; Frébortová *et al.*, 2004; Galuszka *et al.*, 2004; Galuszka *et al.*, 2007). Die Ursache dafür scheint unter anderem die Anordnung des Cytokinins im katalytischen Zentrum der CKX zu sein. Die dreidimensionale Struktur von ZmCKX1 (Malito *et al.*, 2004) und AtCKX7 (Bae *et al.*, 2008) sind sehr ähnlich. Das katalytische Zentrum besteht aus einer trichterförmigen Vertiefung an der Proteinoberfläche und einer elipsoiden Höhle im Inneren des Proteins gesäumt vom FAD-Kofaktor. Durch Kristallisation von ZmCKX1 mit iP wurde abgeleitet,

dass das Cytokininmolekül mit der Seitenkette in die Höhle ragt und der Adeninring in die trichterförmige Vertiefung an der Oberfläche des Enzyms zu liegen kommt und die Höhle damit verschließt (Malito *et al.*, 2004). Deshalb bewirkt die Konjugation der Cytokininbasen zu *N*-Glukosiden sowie die Bindung eines Ribosylrestes scheinbar auch keine merkliche Minderung der Aktivität von CKX Enzymen. Der Benzylring des BA scheint zu groß zu sein, um die vorhergesagte leichte Drehung des Cytokininmoleküls im katalytischen Zentrum effektiv zu ermöglichen (Malito *et al.*, 2004).

CKX Enzyme können verschieden stark glykolysiert werden

Die Charakterisierung von CKX Enzymen vieler Spezies zeigte eine große Spanne des molekularen Gewichtes von 25 kDa bis 94 kDa (Armstrong, 1994) obwohl die aus den Aminosäuresequenzen abgeleiteten Größenordnungen relativ ähnlich waren (Schmülling *et al.*, 2003). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf einer unterschiedlich starken Glykolysierung der CKX Proteine. ZmCKX1 hat zum Beispiel acht Glykolysierungsstellen (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999). Für alle AtCKX Proteine wurden ebenfalls zwischen zwei und acht Glykolysierungsstellen vorhergesagt (Schmülling *et al.*, 2003). In Tabak und Bohnen kommen jedoch sowohl nicht glykolysierte als auch glykolysierte CKX Proteine vor (Kamínek und Armstrong, 1990; Motyka und Kamínek, 1994; Motyka *et al.*, 1996). Die Glykolysierung könnte für die Lokalisation der CKX Proteine wichtig sein, denn es wurden CKX Proteine mit verschiedenen pH Optima in Tabakkalluskultur gefunden, die zudem abhängig von ihrer Glykolysierung aus der Zelle sekretiert wurden (Motyka *et al.*, 2003).

Subzelluläre Lokalisation der CKX Proteine

Die subzelluläre Lokalisation der CKX Enzyme innerhalb verschiedener Kompartimente der Zelle wurde bisher nur für einige Enzyme aus *Arabidopsis* mittels GFP-Fusionsproteinen gezeigt. Das AtCKX2-GFP Fusionsprotein wurde assoziiert mit dem ER nachgewiesen und eine apoplastische Lokalisation nach Sekretion angenommen, da das Protein vermutlich keine ER-Verankerungssequenz aufweist und nach heterologer Expression in Hefe sekretiert wurde (Werner *et al.*, 2003). Da für AtCKX4 anhand der Aminosäuresequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Zuordnung zum sekretorischen Weg vorhergesagt wurde (Schmülling *et al.*, 2003) und beide Enzyme sehr ähnliche Substratspezifitäten und pH-Optima zeigen (Galuszka *et al.*, 2007), kann man annehmen, dass AtCKX4 vermutlich auch im Apoplasten lokalisiert ist. Eine experimentelle Bestätigung gibt es bisher jedoch nicht. AtCKX1-GFP und AtCKX3-GFP Fusionsproteine wurden in der Vakuole und bisher nicht näher identifizierten Endomembran-kompartimenten nachgewiesen (Werner *et al.*, 2003).

1.1.3.3 Gewebespezifische Expression der CKX Gene

Die individuellen CKX Proteine der verschiedenen Familien (zum Beispiel Mais, Reis, Gerste, Orchideen und *Arabidopsis*) werden unterschiedlich exprimiert. Dies wurde mittels Transkriptanalysen sowie Expressionsanalysen von Promotor-*GUS*-Fusionsgenen gezeigt. *HvCKX1* aus Gerste wird ubiquitär exprimiert, *HvCKX2* und *HvCKX3* hingegen nur in Blättern oder Körnern (Galuszka *et al.*, 2004). Das Transkript des Reis-Gens *OsCKX1* wurde außer in der Wurzel und dem Embryo in allen Geweben detektiert, Transkripte der restlichen Gene der Familie wurden fast alle in Infloreszenzmeristemen nachgewiesen (Ashikari *et al.*, 2005). Die CKX Gene der Maisfamilie zeigen spezifische aber auch zum Teil überlappende Expressionsmuster. Alle fünf *ZmCKX* Gene sind in Körnern exprimiert, zeigen jedoch während der Kornentwicklung verschiedene Expressionsmaxima. In vegetativen Organen wurden zudem Transkripte von *ZmCKX1-ZmCKX3* und in reproduktiven Organen von *ZmCKX4* und *ZmCKX5* gefunden (Massonneau *et al.*, 2004). *ZmCKX1* ist im vaskulären Gewebe von Spross und Wurzel exprimiert (Brugière *et al.*, 2003).

In *Arabidopsis* wurde die Expression der sieben *AtCKX* Gene in verschiedenen Geweben und entwicklungsbiologischen Stadien nachgewiesen (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2004; Werner *et al.*, 2006). Die Expression der Gene ist sehr gering und zum Beispiel mit einer *Northern Blot*-Analyse nicht detektierbar (T. Werner, persönliche Mitteilung). Die Expressionsmaxima der individuellen *AtCKX* Gene wurde mittels histochemischer GUS-Färbung von *AtCKX:GUS* transgenem Pflanzenmaterial von *Arabidopsis* ermittelt. Im Spross werden die *AtCKX* Gene im Apex (*AtCKX1*, *AtCKX2*), jungen Blättern (*AtCKX4*, *AtCKX5*), Spaltöffnungen (*AtCKX4*, *AtCKX6*), Trichomen (*AtCKX4*), Blattachsen (*AtCKX5*), Stipeln (*AtCKX2*, *AtCKX4*) und dem Leitgewebe (*AtCKX6*) exprimiert (Werner *et al.*, 2003). In reproduktiven Organen wurde die Expression von *AtCKX1*, *AtCKX5*, *AtCKX6* und *AtCKX7* gefunden. Im Gynoecium wurde zu zwei entwicklungsbiologischen Zeitpunkten eine *AtCKX* Expression nachgewiesen und zwar vor der Bestäubung im Transmissionsgewebe (*AtCKX6*, *AtCKX7*) und nach der Bestäubung innerhalb der Samenanlage (*AtCKX7*) und in Funikeln (*AtCKX6*) (Werner *et al.*, 2003; Köllmer, 2004). In der Wurzel werden die *AtCKX* Gene im Leitgewebe (*AtCKX6*), Primordien (*AtCKX5*, *AtCKX6*), dem Wurzelprokambium (*AtCKX5*), der Wurzelhaube (*AtCKX4*) und Wurzelverzweigungspunkten (*AtCKX1*) exprimiert (Werner *et al.*, 2003). In allen genannten Organen ist die Expression der einzelnen *AtCKX* Gene nur wenig überlappend. Die Expressionsorte der *AtCKX* Gene zeigen viele Übereinstimmungen mit denen von *AtIPT* Genen (Werner *et al.*, 2006).

1.1.3.4 Regulation der CKX Aktivität und der CKX Expression

In Pflanzen wurde in verschiedenen Spezies eine temporäre und lokale Korrelation zwischen Cytokiningehalt und CKX Aktivität beobachtet. Zum Beispiel sind in Getreidekörnern (Mais und

Gerste) die Maxima der Cytokininkonzentration und der CKX Aktivität oft gleich, jedoch in den einzelnen Geweben des Kornes unterschiedlich (Jones *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1995; Galuszka *et al.*, 2001). Zusammenfassend wurde zudem über eine Erhöhung der CKX Aktivität nach exogener Applikation von Cytokinin in Zellkultur von Tabakkalli und *Phaseolus* (Chatfield und Armstrong, 1986; Kamínek *et al.*, 1997) sowie in transgenem Cytokinin-überproduzierendem Tabakgewebe berichtet (Zhang *et al.*, 1995; Eklöf *et al.*, 1996; Motyka *et al.*, 1996; Motyka *et al.*, 2003). Dies führte zu der Annahme, dass CKX Enzyme durch Cytokinin positiv reguliert werden und von Cytokinin so eine negative Feedback-Regulation zur Aufrechterhaltung der Homöostase ausgeht (Werner *et al.*, 2006). Eine positive Regulation von CKX Transkripten durch Cytokinin wurde bereits mehrfach gezeigt, zum Beispiel für das Mais-Gen *ZmCKX1* (Brugière *et al.*, 2003) oder das Gen aus Orchideen (Yang *et al.*, 2003b). In *Arabidopsis* konnte mittels Transkriptanalysen und Promotor-*GUS*-Fusionsgenen gezeigt werden, dass die Gene *AtCKX1-AtCKX6* durch Cytokinin positiv reguliert werden. In verschiedenen *Microarray*-Experimenten wurde eine Cytokinininduktion von *AtCKX* Genen ebenfalls mehrfach nachgewiesen (Hoth *et al.*, 2003; Rashotte *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2006).

Ein Einfluss von Auxin auf den Cytokiningehalt in Pflanzen wurde bereits in vielen Arbeiten berichtet und die Ergebnisse zeigten übereinstimmend einen negativen regulatorischen Einfluss von Auxin auf die Cytokininkonzentration (Kamínek *et al.*, 1997). Als Ursache wurde zum einen ein regulatorischer Einfluss von Auxin auf die Cytokininbiosynthese beschrieben (Zhang *et al.*, 1996; Miyawaki *et al.*, 2004; Nordström *et al.*, 2004). Zum anderen wurde nach Auxinapplikation eine erhöhte Spaltung von Cytokinin gemessen, was auf eine erhöhte CKX Aktivität zurückgeführt wurde (Palni *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1995). Im Kontrast dazu scheint eine langfristige Erhöhung des Auxingehaltes in Pflanzen ausschließlich über eine verringerte *de novo* Synthese einen Einfluss auf die Cytokininkonzentration zu haben, da in Tabak mit erhöhtem endogenem Auxingehalt zwar ein reduzierter Cytokiningehalt gefunden wurden, jedoch die CKX Aktivität nicht erhöht sondern sogar reduziert war (Eklöf *et al.*, 1997). Diese Unterschiede der CKX Aktivität in Reaktion auf veränderte endogene oder exogene Auxinkonzentrationen spiegeln sich auch in der differentiellen Regulation von *AtCKX* Genen durch Auxin wieder. RT-PCR und *Microarray*-Experimente zeigten, dass die Expression von *AtCKX2*, -4, -5 und *AtCKX7* durch Auxinbehandlung reduziert und die von *AtCKX1* und *AtCKX6* erhöht war (Goda *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004; Rashotte *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2006). Andere Hormone wie Salicylsäure, Abscisinsäure und Methyljasmonat bewirken eine reduzierte Expression von einigen *AtCKX* Genen (Werner *et al.*, 2006).

Die Expression von *AtCKX* Genen wird auch durch Veränderungen in der Lichtqualität und -intensität reguliert. Eine reduzierte Expression wurde zusammenfassend aus einer Reihe verschiedener *Microarray*-Experimente für *AtCKX1* sowie *AtCKX4*, -5 und -6 berichtet (Werner *et al.*, 2006). Eine spezifische Induktion von *AtCKX5* und *AtCKX6* wurde dagegen bei einem niedrigen Verhältnis aus

Rot- und Dunkelrotlicht beschrieben und eine Rolle der Gene während der Schattenvermeidungsreaktion angenommen (Sessa *et al.*, 2005; Carabelli *et al.*, 2007). Auch abiotische Faktoren haben einen Einfluss auf die *AtCKX* Genexpression. Die Expression von *AtCKX4*, *-6* und *AtCKX7* war bei Phosphatmangel reduziert (Werner *et al.*, 2006).

1.1.3.5 Entwicklungsbiologische Rolle von CKX Enzymen

Durch die Reduktion oder die Erhöhung der CKX Aktivität in transgenen Pflanzen wurden Erkenntnisse darüber gewonnen, in welchen Prozessen die Regulation des Cytokinergehaltes durch CKX eine Rolle spielt. In *Arabidopsis* und Reis konnte durch den Verlust bzw. die Reduktion einzelner CKX Enzyme der Familien in spezifischen Geweben wie den reproduktiven Organen eine erhöhte Anzahl Blüten, Samenanlagen und damit ein erhöhter Samenertrag erzielt werden. Die Ursache war eine erhöhte Cytokininkonzentration in diesen Geweben (Ashikari *et al.*, 2005; Bartrina, 2006). Die Annahme, dass die CKX regulierte Cytokininkonzentration auch für die Samenentwicklung wichtig zu sein scheint, wird durch die im vorherigen Abschnitt beschriebene enge zeitliche und örtliche Kopplung der Aktivitäts- und Konzentrationsmaxima von Cytokinin und CKX Enzymen in Getreidekörnern unterstützt (Jones *et al.*, 1992; Galuszka *et al.*, 2001). Das Vorkommen von CKX in Pedizellus/Plazenta/Chalaza-Gewebe von Mais wurde interpretiert als Möglichkeit, den Cytokininimport aus dem vegetativen Teil der Maispflanze zu kontrollieren und den Embryo so vor frühzeitiger Keimung als Reaktion auf die Zellteilungs-stimulierende Wirkung von Cytokinin zu schützen (Jones und Schreiber, 1997).

Das Vorkommen extrazellulär aktiver CKX Enzyme könnte den regulatorischen Einfluss von Cytokinin auf physiologische Prozesse erklären. Zum Beispiel ist durch den kontrollierten Abbau von Cytokinin im Zuge des dessen Ein- und Austransportes in die Leitgewebe die transportierte Menge an Cytokinin regulierbar. Da Cytokinin als Übermittler der physiologischen Information über die Verfügbarkeit von Nitrat vermutet wird (Takei *et al.*, 2001b; Takei *et al.*, 2002; Takei *et al.*, 2004a), erscheint eine solche Regulation sinnvoll, jedoch fehlt bisher der experimentelle Nachweis. Schmülling *et al.* zogen eine weitere biologisch relevante Funktion extrazellulärer CKX Enzyme in Betracht. Eine Regulation und Kontrolle des Cytokinergehaltes jeder einzelnen Zelle und die lokale Begrenzung der Cytokininwirkung könnte die Autonomie der Zelle vor allem in teilungsaktiven Geweben gewährleisten (Schmülling *et al.*, 2003). Eine Regulation des Zellzyklusgens *CyclinD3* durch Cytokinin und auch Zellzyklus-abhängige Maxima der Cytokininkonzentration wurden beschrieben (Redig *et al.*, 1996; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999).

An transgenen *Arabidopsis* und Tabakpflanzen, die durch Überexpression der *AtCKX* Gene einen deutlich reduzierten Cytokinergehalt aufweisen, wurden entscheidende Erkenntnisse über die gegensätzliche Wirkung von Cytokinin auf das Wachstum und die Entwicklung von Spross und Wurzel gewonnen (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). Die morphologischen Konsequenzen

eines reduzierten Cytokiningehaltes werden zusammenfassend als das Cytokinindefizienz-Syndrom bezeichnet. Der Spross cytokinindefizienter Pflanzen weist ein reduziertes Wachstum auf, welches auf ein kleineres und weniger aktives apikales Sprossmeristem zurückzuführen ist (SAM). In *Arabidopsis* wurde eine reduzierte Blattgröße und demzufolge ein reduzierter Rosettendurchmesser beschrieben. Die Blätter wiesen weniger Zellen in dorsoventraler Richtung auf und es gab weniger Phloem- und Xylemzellen. Die Sprosshöhe war verringert und es wurden weniger Blüten gebildet, die jedoch größer waren und weniger, aber dafür größere Samen hervorbrachten. Der Blühbeginn war stark verzögert (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003).

Die Wurzeln cytokinindefizienter *Arabidopsis* und Tabakpflanzen wiesen im Kontrast zum Spross ein verstärktes Wachstum auf, welches in längeren und stärker verzweigten Wurzeln resultierte. Zurückzuführen war dieses verstärkte Wurzelwachstum auf ein größeres und aktiveres Wurzelmeristem (RAM). Der Durchmesser der Wurzeln war erhöht, da zum einen mehr Cortex- und Endodermiszelllagen gebildet wurden sowie alle Zellen einschließlich der Phloem- und Xylemzellen radiär vergrößert waren (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003).

Vergleichbare morphologische Auswirkungen hatte die Überexpression von CKX Enzymen aus Orchideen (Yang *et al.*, 2003a; Yang *et al.*, 2003b), Gerste (Galuszka *et al.*, 2004) oder Mais (Kopečný *et al.*, 2006) in verschiedenen Pflanzen.

1.1.4 Cytokinintransport

Cytokinin wird im Phloem sowie im Xylemsaft gefunden. Transportierte Cytokinine sind hauptsächlich die Riboside, jedoch werden auch *O*- und *N*-Glukoside sowie Nukleotide transportiert (Letham, 1994). Das im Xylem transportierte Cytokinin wirkt als endokrines Signalmolekül zum Beispiel für die Übermittlung des Nitratstatus der Wurzel an den Spross (siehe Punkt 1.1.1). Cytokinin-gesteuerte biologische Prozesse des Sprosses, wie das Auswachsen von Seitenknospen und die Seneszenz, bedürfen wohl eher lokal (parakrin) direkt in den Knospen oder Blättern produziertem Cytokinin. Diese Prozesse waren nämlich in WT-Sprossen nicht verändert, die in Pfropfungsexperimenten auf *ipt* überexprimierenden Wurzelstöcke von Tabak gepfropft wurden (Faiss *et al.*, 1997), obwohl Cytokinin in der Wurzel verstärkt gebildet und auch im Xylemsaft nachgewiesen wurde.

In Pflanzen scheint es sowohl *high*- als auch *low affinity* Transportsysteme für Cytokinin in Form von Transporterproteinen zu geben. Die Identifizierung korrespondierender Gene und Proteine hat gezeigt, dass diese Transportproteine keine absolute Spezifität für Cytokinine haben, sondern Purine sowie auch Nukleoside mit gleicher oder höherer Affinität transportieren.

Der Purintransporter bzw. die Purinpermease (PUP) PUP1 wurde durch funktionelle Komplementation einer Hefemutante identifiziert, die kein Adenin aufnehmen kann. PUP1 gehört einer Familie von 21 PUPs in *Arabidopsis* an. PUP1 transportiert neben Adenin auch Kinetin und Zeatin (Gillissen *et al.*,

2000) sowie außerdem die Cytokinine *tZ*, *iP*, *cZ* und *cZR* (Bürkle *et al.*, 2003). Kürzlich wurden die kinetischen Parameter des *tZ* Transports ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass es eine *low affinity* Transportaktivität mit K_m -Werten im μM Bereich und auch eine *high affinity* Transportaktivität mit K_m -Werten im nM Bereich gibt. Der Transport von Cytokinin durch PUPs gehört zum *low affinity* Transport und ist vermutlich energieabhängig (Cedzich *et al.*, 2008).

Neben den Purintransportern haben wahrscheinlich auch äquilibrierende Nucleosidtransporter (ENTs) eine gewisse Affinität für Cytokinine. Diese Transporter können neben anderen Nucleosiden zum Beispiel Adenosin energieunabhängig entlang ihres Konzentrationsgradienten transportieren. In *Arabidopsis* gibt es acht ENTs und einige transportieren Adenosin mit hoher Affinität (Li *et al.*, 2003). Der erste Nachweis für einen Cytokintransport durch ENTs *in planta* wurde an der *AtENT8*-Mutante *soi33-1* erbracht (Sun *et al.*, 2005). *soi33-1* hat eine verringerte Sensitivität des Primärwurzelwachstums gegenüber *iPR* und *tZR*, jedoch nicht gegenüber *iP*. *AtENT8* überexprimierende Keimlinge sind hypersensitiv gegenüber *iPR* und *tZR*. Zudem wurde gezeigt, dass Hypokotyle von T-DNA-Insertionsmutanten der Gene *AtENT8* und *AtENT3* signifikant geringere Mengen radioaktiv markiertes *iPR* aufnehmen konnten als der WT (Sun *et al.*, 2005). Der Transport beschränkte sich dabei auf Cytokininnucleoside. Die freie Base *iP* wurde nicht transportiert. *AtENT6* transportiert *iPR* und *tZR*, wobei es sich auch um einen *low affinity* Transport mit K_m -Werten im μM Bereich handelt (Hirose *et al.*, 2008). Vergleichbare Erkenntnisse wurden auch an Reis gewonnen. Die ENT-Familie hat in Reis vier Mitglieder und *OsENT2* transportiert in Hefe sowohl Adenosin als auch *iPR* und *tZR* mit Transportaktivitäten geringer Affinität und K_m -Werten im μM Bereich (Hirose *et al.*, 2005).

1.1.5 Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis*

Die Antwort auf die Frage wie und wo Cytokinin als Signal wahrgenommen wird und wie dieses Signal weitergeleitet wird, um die vielfältigen physiologischen und morphologischen Wirkungen des Hormons auszulösen, war lange weitgehend unbekannt. Man geht heute davon aus, dass Cytokininsignaltransduktion auf der Basis des so genannten Zwei-Komponenten-Signalsystems (ZKS) abläuft, welches bereits aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten bekannt ist (Hutchison und Kieber, 2002; Heyl *et al.*, 2006). Das Signal wird im prokaryotischen System von Sensor-Histidin-Kinasen (HK) durch Bindung des Liganden wahrgenommen und dies führt zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidin-Restes (H). Der Phosphatrest wird anschließend an die zweite Komponente des Systems, den *Response Regulator* (RR) weitergegeben, in welchem ein konservierter Aspartat-Rest (D) phosphoryliert wird. Der dadurch aktivierte RR wirkt meist als Transkriptionsfaktor und führt im aktivierten Zustand zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen. Die erweiterte Form des ZKS besteht aus drei Komponenten und wurde bereits in niederen Eukaryoten wie zum Beispiel der Hefe *S. cerevisiae* gefunden. Dabei wird der Phosphatrest von der HK auf ein Histidin-enthaltendes

Phosphotransmitter-Protein (HP) Protein übertragen, welches dann den Phosphatrest auf den RR überträgt. Für alle drei Komponenten wurden Gene in *Arabidopsis* identifiziert und diese gehören jeweils Multigenfamilien an.

In *Arabidopsis* kommt es nach der Bindung eines Liganden an die CHASE-Domäne einer *Arabidopsis*-Histidin-Kinase (AHK) zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung des konservierten Histidins. Das Phosphat (P) wird über einen Aspartat-Rest (D) des Rezeptors weiter auf das Histidin (H) eines *Arabidopsis*-Phosphotransmitter-Proteins (AHP) übertragen und von dort weiter auf das Aspartat (D) in der N-terminalen *Receiver*-Domäne eines *Arabidopsis* RR (ARR) (Abbildung 3). Diese unterteilt man anhand ihrer C-terminalen Domänen in zwei Gruppen. B-Typ ARRs haben eine lange C-terminale Domäne, die Transkriptionsfaktoraktivität besitzt. B-Typ ARRs regulieren nach Phosphorylierung die Transkription von Zielgenen, zu denen unter anderem die A-Typ ARRs gehören. A-Typ ARRs haben nur einen kurzen C-terminalen Rest, keine DNA-Bindfähigkeit und keine Transkriptionsfaktoraktivität (Heyl *et al.*, 2006).

Cytokininrezeptoren in *Arabidopsis* sind HK, die N-terminal 2-3 Transmembrandomänen aufweisen, die die so genannte CHASE-Domäne einschließen, welche als extrazelluläre Ligandenbindedomäne fungiert (Heyl und Schmölling, 2003). In *Arabidopsis* wurden AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1 identifiziert (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001a; Ueguchi *et al.*, 2001b). In eleganten Experimenten wurde nach heterologer Expression der Nachweis erbracht, dass diese AHKs die HKs aus Bakterien und Hefen in den korrespondierenden Mutanten funktionell und cytokininabhängig ersetzen können (Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001a; Ueguchi *et al.*, 2001a; Ueguchi *et al.*, 2001b; Yamada *et al.*, 2001; Kakimoto, 2003). In einem pflanzlichen Protoplastenassay konnte zudem die cytokininabhängige Aktivierung des cytokinininduzierbaren A-Typ ARR Gens *ARR6* durch alle drei Rezeptoren nachgewiesen werden (Hwang und Sheen, 2001). In einem bakteriellen Assay wurden die Substratspezifität und die Sensitivität von AHK3 und AHK4 verglichen. Die höchste Aktivität wurde mit AHK4 für iP und tZ gefunden. Mit AHK3 konnte eine größere Vielfalt an verschiedenen Cytokinin das Reportergen aktivieren, unter anderem auch cZ, jedoch war die Aktivität etwa 10-fach geringer (Spíchal *et al.*, 2004). Die direkte Bindung von Cytokinin an die Rezeptoren wurde außerdem mit ³H-markiertem tZ und iP an *E. coli* Zellen oder Hefemembranen gezeigt, die die AHKs exprimierten (Romanov *et al.*, 2005; Romanov *et al.*, 2006). Dabei wurde gezeigt, dass AHK4 iP und tZ im Vergleich zu anderen Cytokinin besonders gut bindet. Es wurde zudem gezeigt, dass neben tZ und iP auch tZR, cZ, DZ oder BA binden können. Die Bindung war jedoch zum Beispiel im Falle von cZ mehr als 200-fach geringer als die von tZ (Romanov *et al.*, 2005; Romanov *et al.*, 2006). Interessant ist, dass es in Mais Cytokininrezeptoren gibt, die cZ bevorzugt und sogar mit höherer Affinität als iP binden (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004).

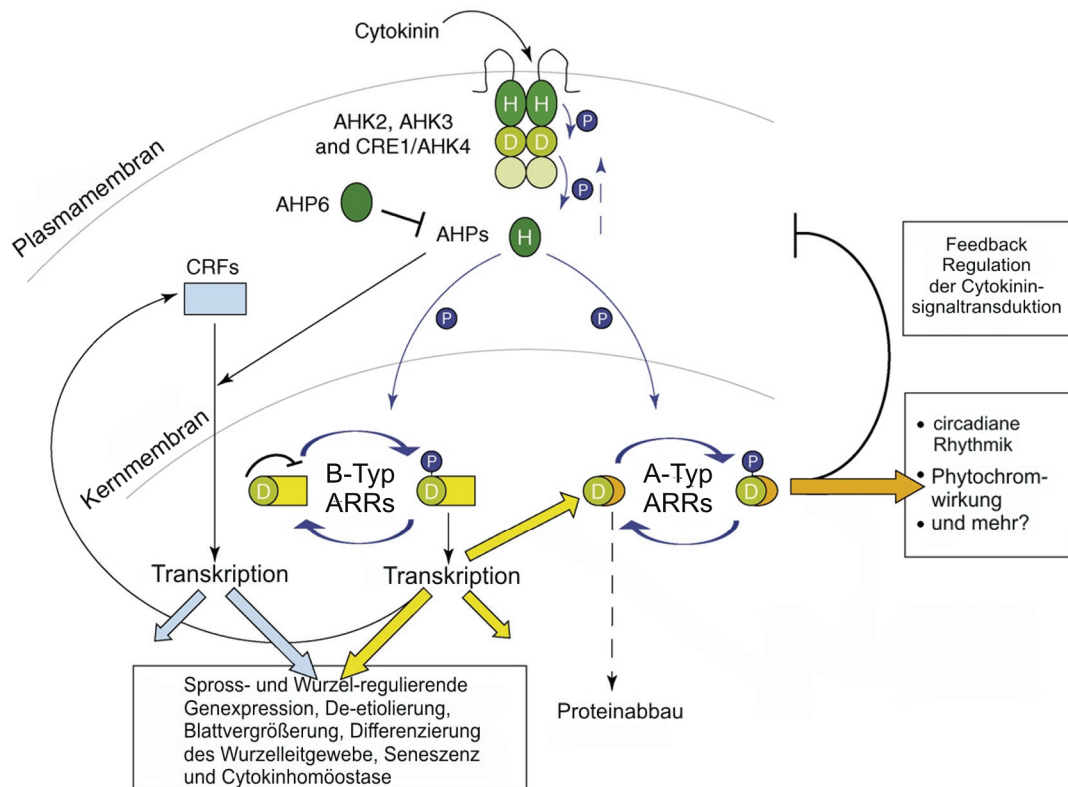


Abbildung 3: Modell der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis*.

→ steht für eine positive Regulation und –| beschreibt eine negative Regulation. Blaue Pfeile markieren die Phosphatkaskade. Der unterbrochene blaue Pfeil markiert die rückläufige Phosphatkaskade in *wol* Mutanten. (H) Histidin, (D) Aspartat, (P) Phosphatrest, siehe Text für Erläuterungen; (verändert nach: To und Kieber, 2008).

Die drei Rezeptoren sind anscheinend in vielen ihrer Funktionen redundant. Besonders während der Sprossentwicklung hat der Verlust eines Rezeptors fast keine merklichen Auswirkungen auf Wachstum und Entwicklung (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Studien an T-DNA-Insertionsmutanten zeigten, dass erst das Ausschalten von zwei Rezeptoren zu merklichen Veränderungen an der Pflanze führte und die phänotypische Charakterisierung der jeweiligen Doppelmutanten deckte auch spezifische Funktionen der einzelnen Rezeptoren auf. Zum Beispiel scheint die positive Regulation des Sprosswachstums durch Cytokinin hauptsächlich durch AHK2 und AHK3 vermittelt zu werden. *ahk3* und in verstärktem Maße die Doppelmutante *ahk2, ahk3* haben eine reduzierte Rosetten- und Sprossgröße (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006) AHK3 spielt vermutlich eine dominante Rolle bei der cytokininabhängigen Chlorophyll-Retention in Blättern, da in Mehrfachmutanten in Kombinationen mit *ahk3* eine besonders starke Reduktion der Cytokininsensitivität gemessen wurde (Riefler *et al.*, 2006) und die Überexpression von *AHK3* eine verzögerte Seneszenz zur Folge hatte (Kim *et al.*, 2006). Andere cytokininabhängige Prozesse im Spross werden wahrscheinlich redundant von allen drei Rezeptoren vermittelt, da sich der jeweilige Ausfall von ein, zwei oder allen drei Rezeptoren additiv auf die beobachteten Effekte auswirkte, wie zum Beispiel der partiellen oder vollständigen Resistenz gegenüber Cytokinin in

Kallusbildung, Sprossbildung aus Kallusgewebe oder aber der Organgröße im allgemeinen (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Der Sprossphänotyp der Dreifachmutante *ahk2*, *ahk3*, *ahk4* ähnelt den Konsequenzen stark reduzierter Cytokiningehalte in *CKX* überexprimierenden Pflanzen (Werner *et al.*, 2003).

Das Wurzelwachstum von einzelnen T-DNA Insertionsmutanten der Cytokininrezeptoren unterscheidet sich nicht vom WT, mit Ausnahme der *cre1*-Mutante, welche ein leicht verstärktes Wurzelwachstum zeigt (Inoue *et al.*, 2001). Zudem wurde eine reduzierte Sensitivität der Primärwurzelelongation gegenüber exogen appliziertem Cytokinin in T-DNA-Insertionsmutanten von *AHK4* gefunden (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001b). Von einzelnen Doppelmutanten der verschiedenen *AHK*-Null-Allele wurde ein verstärktes Wurzelwachstum und eine reduzierte Cytokinin sensitivität der Primärwurzelelongation beschrieben (Higuchi *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Dieser Phänotyp ist in guter Übereinstimmung mit den Konsequenzen reduzierter Cytokiningehalte in *Arabidopsis* (Werner *et al.*, 2003).

Der Verlust aller drei Rezeptoren hat eine vollständige Cytokininresistenz des Wurzelwachstums zur Folge. Die Primärwurzel ist im Vergleich zum WT drastisch verkürzt, von geringerem Durchmesser und weist eine reduzierte Wurzelmeristemaktivität auf (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass eine gestörte Xylementwicklung die Ursache dafür ist, denn bei vollständigem Verlust der Cytokininwahrnehmung wird von den Xylemvorläuferzellen nur Proto- jedoch kein Metaxylem oder Phloem gebildet, sodass das Primärwurzelwachstum ab diesem entwicklungsbiologischen Schritt terminiert ist (Mähönen *et al.*, 2006b). Diese wichtige Funktion der Cytokinin signalweiterleitung für die Xylementwicklung erklärt auch in vollem Umfang den Phänotyp der *wooden leg (wol)* Mutante (Mähönen *et al.*, 2000), in der durch einen einzigen Aminosäureaustausch in *AHK4* (*AHK4/CRE1/WOL* - T278I) die Cytokininbindung nicht mehr möglich ist (Yamada *et al.*, 2001). In der *wol* Mutante findet man neben dem Xylemdefekt keine weiteren Wachstumsdefizite (Mähönen *et al.*, 2000). Anhand der besonderen Enzymeigenschaft von *AHK4* kann erklärt werden, dass in *wol* Pflanzen trotz der vollständigen Funktion von *AHK2* und *AHK3* ein nahezu vollständiger Verlust der Signalweiterleitung in den *AHK4* Expressionsdomänen vorliegt. Neben der Kinase-Aktivität in Anwesenheit von Cytokinin ist dieser Rezeptor als einziger der drei Cytokininrezeptoren in der Lage, wenn kein Cytokinin gebunden ist als Phosphatase zu wirken und so in umgekehrter Richtung AHPs zu dephosphorylieren (Mähönen *et al.*, 2006b). In *wol* Pflanzen kann durch die Mutation in der CHASE-Domäne kein Cytokinin an den mutierten Rezeptor *ahk4* gebunden werden und demzufolge wirkt *ahk4* konstitutiv als Phosphatase. Die von den funktionalen *AHK2* und *AHK3* phosphorylierten AHPs werden demzufolge von *ahk4* wieder dephosphoryliert, sodass eine Phosphatkaskade ausgehend von den AHPs nicht mehr ablaufen kann. Es wurden bisher zwei weitere *wol* Allele identifiziert, die den gleichen Primärwurzeldefekt aufweisen (Garcia-Ponce de Leon *et al.*, 2004; Kuroha *et al.*, 2006).

Phosphotransmitterproteine in *Arabidopsis* (AHPs) übertragen das Phosphat von aktivierten AHKs weiter auf die ARRs (Abbildung 3). Im *Arabidopsis* Genom wurden bisher 5 AHPs identifiziert (Suzuki *et al.*, 2000). Es wurde anhand von Komplementationsversuchen gezeigt, dass die AHPs bakterielle und Hefe-Phosphotransmitterproteine in den korrespondierenden Mutanten funktionell ersetzen können und dass sie *in vitro* den Phosphatrest aktivierter Histidin-Kinasen übernehmen und an ARRs weitergeben können (Miyata *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2001b; Tanaka *et al.*, 2004). Eine Überexpression von AHP Genen in *Arabidopsis* Protoplasten, bewirkte eine Erhöhung der cytokininabhängigen Expression des Reportergens *ARR6:Luciferase* (Hwang und Sheen, 2001). Die Lokalisation im Zytoplasma und die cytokininabhängige Translokation in den Kern untermauern das Modell, wonach AHPs als Signalüberträger zwischen den AHKs und den ARRs fungieren (Hwang und Sheen, 2001; Imamura *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004). Die Interaktion von AHPs mit allen AHKs und einigen ARRs (Dortay *et al.*, 2006) ist ein zusätzliches Indiz für das oben erläuterte Modell der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis*. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die AHP2 unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren, zeigen eine hypersensitive Reaktion des Wurzel- und Hypokotylwachstums gegenüber exogen appliziertem Cytokinin (Suzuki *et al.*, 2002). Dies ließ auf eine positive regulatorische Funktion der AHPs in der Cytokininsignaltransduktion schließen und diese Annahme wurde experimentell durch die Identifizierung und Charakterisierung einzelner und mehrfacher T-DNA-Insertionsmutanten der AHPs bestätigt. Das Ausschalten einer zunehmenden Anzahl an AHPs führt zur graduellen Abnahme der Cytokininsensitivität von Primärwurzelwachstum und -verzweigung sowie des Hypokotylwachstums im Dunkeln (Hutchison *et al.*, 2006). Die Primärwurzel in Pflanzen, die kein funktionelles AHP mehr exprimieren, zeigt den gleichen Entwicklungsdefekt des Xylems, wie er bereits für die Dreifachmutante *ahk2, ahk3, ahk4* und die *wol* Mutante gezeigt wurde. Die gebildeten Adventivwurzeln zeigen jedoch keine vergleichbaren Entwicklungsdefekte (Hutchison *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* wurde kürzlich AHP6 als ein Pseudo-Phosphotransmitter-Protein (pAHP) identifiziert, welches nicht von den aktivierten Rezeptoren phosphoryliert werden kann, da das konservierte Histidin im Protein nicht vorhanden ist. Es wurde gezeigt, dass AHP6 die Phosphatkaskade auf noch unbekannte Weise inhibiert. AHP6 ist somit ein negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion (Mähönen *et al.*, 2006a).

Die Response-Regulatoren von *Arabidopsis* (ARRs) stellen die dritte Komponente dar, auf die der Phosphatrest übertragen wird (Abbildung 3). Es gibt in *Arabidopsis* 23 ARR, die in zwei Hauptgruppen unterteilt werden (Heyl *et al.*, 2006). Zwei Hauptmerkmale unterscheiden die A-Typ ARR und die B-Typ ARR. A-Typ ARR Gene sind schnell und stark durch Cytokinin induzierbar, B-Typ ARR Gene sind dagegen nicht cytokininreguliert. B-Typ ARR fungieren aufgrund der DNA-

Bindefähigkeit ihres langen C-Terminus als Transkriptionsfaktoren, A-Typ ARR_s dagegen nicht (Heyl *et al.*, 2006).

Die ersten A-Typ ARR Gene (*ARR4* und *ARR5*) wurden als cytokinininduzierte Gene in *Arabidopsis* identifiziert (Brandstatter und Kieber, 1998) und insgesamt zählt man heute *ARR3-ARR9* und *ARR15-ARR17* zu den cytokinininduzierten A-Typ ARR Genen (Imamura *et al.*, 1998; Taniguchi *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 1999; Kiba *et al.*, 1999; D'Agostino *et al.*, 2000; Kiba *et al.*, 2002). Die A-Typ ARR Gene sind primäre Antwortgene, da ihre cytokininabhängige Induktion sehr schnell, zum Teil in wenigen Minuten, abläuft und keine Proteinsynthese dazu notwendig ist (D'Agostino *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung einiger A-Typ ARR_s durch AHP2 und auch durch bakterielle Phosphotransferproteine in einem bakteriellen *in vitro* Testsystem zeigte, dass A-Typ ARR_s als Teil der Phosphatkaskade an der Signalweiterleitung von Cytokinin beteiligt sein könnten (Imamura *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 1999). Die Funktionen von A-Typ ARR_s bei der Vermittlung cytokininrelevanter Aspekte des Pflanzenwachstums sind noch wenig bekannt. Es wurde zum Beispiel beschrieben, dass *ARR4* Cytokininsignalwege mit Lichtsignalwegen verschalten kann, da *ARR4* direkt mit der lichtaktivierten Form von Phytochrom B (P_{fR}) interagieren kann und dieses dadurch stabilisiert wird. Dementsprechend zeigen *Arabidopsis* Pflanzen, welche *ARR4* überexprimieren, eine verstärkte Reaktion von Wurzel und Hypokotyl auf Rotlicht (Sweere *et al.*, 2001). Eine Hauptfunktion der A-Typ ARR_s ist deren negative regulatorische Funktion auf den Cytokininsignalweg (Abbildung 3). In *Arabidopsis*-Protoplasten bewirkte die Überexpression von vielen A-Typ ARR Genen eine Reduktion der Expression des *ARR6:Luciferase* Reportergens (Hwang und Sheen, 2001). Erste *in planta* Hinweise lieferte die phänotypische Charakterisierung von Mehrfachmutanten der A-Typ ARR Gene in *Arabidopsis*. T-DNA-Insertionsmutanten zeigten gegenüber exogen appliziertem Cytokinin mit steigender Anzahl ausgeschalteter A-Typ ARR Gene eine zunehmende Hypersensitivität von Primärwurzelwachstum, -verzweigung und der dunkel-induzierten Seneszenz (To *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigten *Arabidopsis* Pflanzen, die A-Typ ARR Gene überexprimieren ein hyposensitives Primärwurzelwachstum in Reaktion auf exogen appliziertes Cytokinin (To *et al.*, 2007). Die negative regulatorische Funktion der A-Typ ARR_s auf die Cytokininsignaltransduktion scheint abhängig von der Phosphorylierung des Proteins zu sein, denn kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass nur die WT-Form von *ARR5* den cytokinin-hypersensitiven Phänotyp der Quatuple-Mutante *arr3, arr4, arr5, arr6* komplementieren konnte. Eine nicht phosphorylierbare *ARR5*-Form komplementierte den Phänotyp nicht (To *et al.*, 2007). Die Rolle der Phosphorylierung wurde zum einen als Konkurrenz der A-Typ ARR_s und B-Typ ARR_s um die Phosphatreste der AHPs diskutiert, jedoch auch die phosphorylierungsabhängige Konformation der A-Typ ARR-Proteine als Voraussetzung für eine Interaktion mit den TCS Komponenten ist wahrscheinlich. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, denn eine veränderte Form von *ARR5*, die zwar nicht phosphoryliert werden kann, jedoch eine phosphorylierungsähnliche Konformation (Phosphomimik) durch Austausch eines

Aspartat gegen einen Glutamat einnimmt, konnte die negative regulatorische Funktion auf den Cytokininsignalweg ausüben und auch die Mutante *arr3*, *arr4*, *arr5*, *arr6* komplementieren (To *et al.*, 2007).

B-Typ ARRs haben einen längeren C-Terminus als A-Typ ARRs und besitzen die typische *Receiver*-Domäne zur Aktivierung durch Phosphorylierung. Der C-Terminus enthält als *Output*-Domäne die GARP-Domäne, mit der die Proteine an DNA binden können und die die Transkriptionsfaktoraktivität vermittelt (Hutchison und Kieber, 2002). Anhand der Sequenzhomologie zu bakteriellen RRs wurden zuerst ARR1 und ARR2 identifiziert (Sakai *et al.*, 1998). Für unter anderem ARR1, ARR2 und ARR11 wurde die Bindung an DNA experimentell bestätigt (Lohrmann *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2000; Lohrmann *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003). Die Bindung von ARR1 und ARR2 erfolgt bevorzugt an die Sequenz (G/A)GAT(T/C), ARR11 bindet die Sequenz GGATT (Sakai *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 2003). Diese Erkennungssequenzen sind zum Beispiel in den Promotoren der A-Typ *ARR*-Gene zu finden, was zur Annahme führte, dass diese direkte Zielgene der transkriptionellen Aktivierung durch B-Typ ARRs sind (Hutchison und Kieber, 2002). Eine positive Regulation der A-Typ *ARR* Transkription durch B-Typ ARRs wurde experimentell an transgenen Pflanzen mit erhöhtem oder reduzierten B-Typ ARR-Gehalt und in einem Protoplasten-Reporter-gen-System gezeigt (Hwang und Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001). Die Funktion als Transkriptionsfaktor wird untermauert durch das Vorkommen vieler B-Typ ARRs im Zellkern (Sakai *et al.*, 2000; Hwang und Sheen, 2001; Imamura *et al.*, 2001; Lohrmann *et al.*, 2001). Die Expression der B-Typ *ARR* Gene wird nicht durch Cytokinin induziert (Imamura *et al.*, 1999; Kiba *et al.*, 1999). Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung des konservierten Aspartat durch AHPs (Abbildung 3), mit denen die B-Typ ARRs interagieren können (Imamura *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001b; Imamura *et al.*, 2003; Dortay *et al.*, 2006). Die Expressionsmuster von B-Typ *ARR* Genen zeigten für die eng verwandten Gene *ARR1*, *ARR2*, *ARR10* und *ARR12* eine ubiquitäre Expression in allen Geweben und eine überlappende Expression vor allem in der Wurzel, dagegen wurden für andere B-Typ *ARR* Gene spezifische Expressionsmuster in den reproduktiven Organen identifiziert (Mason *et al.*, 2004; Tajima *et al.*, 2004). Die B-Typ ARRs sind positive Regulatoren des Cytokininsignalweges. Die *in planta* Funktion einiger B-Typ ARRs wurde anhand von T-DNA-Insertionsmutanten und auch durch Überexpression dieser Proteine untersucht. Für die *arr1* Mutante wurde eine reduzierte Sensitivität des Wurzelwachstums und der Kallusbildung gegenüber Cytokinin ermittelt und der gegenteilige Effekt in *ARR1*- und auch *ARR11*-überexprimierenden *Arabidopsis* Pflanzen beobachtet (Sakai *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003). *Arabidopsis* Pflanzen, die andere A-Typ *ARR* Gene überexprimierten, zeigten phänotypische Änderungen, unter anderem verzögerte Seneszenz, die Bildung zusätzlicher Seitensprosse oder eine reduzierte Kallusbildung, die charakteristisch für erhöhte exogene oder endogene Cytokiningehalte sind (Hwang und Sheen, 2001; Tajima *et al.*, 2004). Die Sensitivität von *Arabidopsis* Pflanzen

gegenüber exogen appliziertem Cytokinin nimmt mit zunehmender Anzahl ausgeschalteter B-Typ *ARR* Gene ab. Die funktionelle Redundanz scheint nicht so hoch wie bei den AHKs, AHPs oder den A-Typ *ARRs* zu sein. Bereits das Fehlen von zwei B-Typ *ARRs* führt zu längeren und stärker verzweigten Primärwurzeln, was die positive Rolle der B-Typ *ARRs* für die Cytokininsignalkette bestätigt (Mason *et al.*, 2005). Eine noch stärkere Reduktion der Cytokininsignalkette durch Ausschalten von *ARR1*, *ARR10* und *ARR12* führt zur nahezu vollständigen Resistenz gegenüber Cytokinin in sowohl Wurzelwachstum, Kallusbildung und Chlorophyllgehalt. Außerdem ist die cytokininabhängige Induktion der Expression von A-Typ *ARR* Genen reduziert (Mason *et al.*, 2005; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). Der Sprossphänotyp der Mutante *arr1*, *arr10*, *arr12* ist nahezu identisch zu dem von Pflanzen mit vollständigem Funktionsverlust aller AHKs oder AHPs (Yokoyama *et al.*, 2007; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). In den Wurzelprokambiumzellen dieser Mutante scheint die Cytokininsignalweiterleitung vollständig unterbunden zu sein, denn es wurde der spezifische *wol* Phänotyp mit einer im Vergleich zum WT stark verkürzten Primärwurzel und des bereits oben beschriebenen Xylemdefekts beschrieben (Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008), genau wie in Pflanzen, in denen alle *AHK* Gene oder alle *AHP* Gene ausgeschaltet sind (Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Mähönen *et al.*, 2006a). Übereinstimmend mit der überlappenden Expression in der Wurzel sind diese drei *ARRs* vermutlich hauptsächlich für die Signalweiterleitung von Cytokinin in den Prokambiumzellen und die Vermittlung der wichtigen Rolle von Cytokinin für die ausbalancierte Differenzierung in Proto- und Metaxylem verantwortlich.

Ein eleganter Ansatz, um trotz ihrer funktionellen Redundanz gleichzeitig viele Zielgene von B-Typ *ARRs* zu reprimieren, gelang durch die Fusion der transkriptionellen Repressor-Domäne *SRDX* an *ARR1*, wodurch *ARR1* in einen transkriptionellen Repressor überführt wurde (Heyl *et al.*, 2008). In einem Protoplasten Expressionssystem wurde durch die Co-Expression von *ARR1-SRDX* mit *ARR6:GUS* die GUS-Aktivität reduziert, selbst wenn andere B-Typ *ARR* Gene zusätzlich überexprimiert wurden. Der Phänotyp von *35S:ARR1-SRDX* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen spiegelt das Cytokinindefizienz-Syndrom wieder, was bedeutet, dass viele Zielgene von B-Typ *ARRs* gleichzeitig reprimiert wurden und dass die Zielgene von *ARR1* an der Vermittlung der meisten Aspekte cytokininregulierter Prozesse beteiligt sind. Der Vergleich von Transkriptprofilen von WT Pflanzen mit denen von *35S:ARR1-SRDX* oder *35S:ARR1* transgenen Pflanzen lieferte erste Hinweise über direkte Zielgene von *ARR1* und vermutlich anderer B-Typ *ARRs*. Dazu gehören zum Beispiel *CKX4*, *CYP735A2*, *IAA3/SHY2*, sowie Gene für Nitrat- und Zuckertransporter oder auch Gene für Repressoren des Gibberellinsignalweges (Taniguchi *et al.*, 2007; Heyl *et al.*, 2008).

Neben den A-Typ *ARR* Genen sind noch nicht viele Zielgene der B-Typ *ARRs* charakterisiert. Cytokininregulierte Gene wurden vielfach anhand des Vergleiches von Transkriptprofilen cytokininbehandelter mit denen unbehandelter Pflanzen und anhand des Vergleiches transgener Pflanzen mit veränderter Cytokininsignalleitung oder Cytokininingehalt gefunden (Hoth *et al.*, 2003;

Rashotte *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005). Dabei wurden zum Beispiel kürzlich die Gene *CRF2* und *CRF5* als cytokinininduzierte Gene identifiziert, die zur Familie der Transkriptionsfaktoren mit AP2-Domäne gehören (Rashotte *et al.*, 2006). Deren funktionelle Analyse zeigte eine cytokininabhängige Translokation der CRFs (*Cytokinin Response Factor*-Proteine) vom Zytoplasma in den Zellkern und zwar ohne eine notwendige transkriptionelle Aktivierung jedoch abhängig von der Funktionalität der AHKs und der AHPs. Auf welche Weise phosphorylierte AHPs die CRFs aktivieren und die Translokation bewirken, ist nicht bekannt. Unabhängig von der intrazellulären Translokation der CRF Proteine ist die Transkription der korrespondierenden Gene abhängig von den B-Typ ARR, sodass zumindest einige *CRF* Gene direkte Zielgene von B-Typ ARRs sind. In Pflanzen mit reduzierter CRF Funktion (durch Ausschalten dreier *CRF* Gene) zeigten etwa die Hälfte der cytokininregulierten Gene im Vergleich zum WT eine reduzierte Reaktion der Expression auf Cytokinin. Dabei gehörten viele deregulierte Gene auch zu denen mit veränderter cytokininabhängiger Expression in der Doppelmutante *arr1, arr12*. Dennoch scheinen einige Zielgene der CRF-Proteine andere entwicklungsbiologische Aspekte der Pflanze zu vermitteln, denn die Mutanten *crf2* und *crf2, crf5* zeigen zum Beispiel Entwicklungsdefekte der Keimblätter, jedoch keine der sonst cytokininverwandten Phänotypen, wie zum Beispiel eine Veränderung von Primärwurzelwachstum und -verzweigung. Zudem gehören A-Typ *ARR* Gene nicht zu den Zielgenen der CRFs (Rashotte *et al.*, 2006).

Brenner *et al.* (2005) identifizierten eine Reihe weiterer cytokininregulierter Gene, unter anderem auch potenzielle Transkriptionsfaktoren verschiedenster Transkriptionsfaktorklassen. Da diese cytokininregulierten Transkriptionsfaktoren ein wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit sind, werden die Hauptklassen der Transkriptionsfaktoren und der Wissensstand zu einzelnen der hier analysierten Faktoren im nächsten Abschnitt vorgestellt.

1.2 Transkriptionsfaktorfamilien in *Arabidopsis thaliana*

Transkriptionsfaktoren (TFs) sind definiert als Proteine, die sequenzspezifisch an DNA binden können und dadurch die Fähigkeit besitzen, die Transkription zu aktivieren oder zu unterdrücken (Riechmann *et al.*, 2000). Im Allgemeinen enthalten TFs ein oder mehrere Kernlokalisierungssignale, eine die Transkription regulierende Domäne, mindestens eine DNA-Bindedomäne und optional eine Dimerisierungsdomäne (Liu *et al.*, 1999). Die Bindung an DNA wird durch spezielle Sekundärstrukturen des Proteins vermittelt, die von der Aminosäuresequenz abhängig sind. Diese DNA-bindenden Proteindomänen sind die Basis für die Einteilung in verschiedene Familien von Transkriptionsfaktoren (Riechmann *et al.*, 2000). Das Vorkommen weiterer Proteindomänen, die zum Beispiel für die Homo- oder Heterodimerisierung von Proteinen verantwortlich sind, bildet die Grundlage für eine zusätzliche Gruppierung in Unterfamilien und macht die regulatorische Vielfalt aus. Durch das so genannte *domain shuffling* wurden in der evolutionären Entwicklung verschiedene

DNA-Binde-Domänen mit verschiedenen weiteren Proteindomänen kombiniert und es entstand so die enorme Vielfalt an verschiedenen Unterfamilien. Auf diesem Wege stellt man sich auch die Entstehung von einigen Transkriptionsfaktorfamilien vor, die es nur in höheren Pflanzen gibt. Dazu gehören zum Beispiel die Klassen der AP2/EREBP-, der NAC- oder der WRKY-Transkriptionsfaktoren (Riechmann *et al.*, 2000).

Für die Bindung an die DNA gibt es einige Grundstrukturen, auf die die Variationen der verschiedenen Klassen zurückgehen. Ein klassisches DNA-Binde-Motiv ist zum Beispiel das Helix-Turn-Helix (HTH) Motiv, welches vielfach in Prokaryoten beschrieben wurde. Die DNA-bindende Struktur ist dabei eine von zwei α -Helices des Proteins, die sich mit ihrem N-Terminus in die große Rinne der DNA legt und dabei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen basischen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin mit den Basen oder auch dem DNA-Rückgrat ausgebildet (Pabo und Sauer, 1992). Eine Anordnung von drei α -Helices findet man in der Homöodomäne (HD), wobei die dritte Helix auch noch in eine vierte zusätzliche Helix übergehen kann. Dieses DNA-Binde-Motiv findet man in allen Eukaryoten einschließlich der höheren Pflanzen. Die α -Helices sind zwar auch in einer HTH-ähnlichen Anordnung strukturiert, jedoch werden andere Bereiche für die Bindung an die DNA verwandt und die räumliche Anordnung der Helices zueinander unterscheidet sich vom HTH-Motiv in Prokaryoten. In der Homöodomäne bilden α -Helix 1 und α -Helix 2 eine parallele Anordnung über der DNA und α -Helix 3 legt sich im rechten Winkel dazu über seine gesamte Länge in die große Rinne der DNA. Die Homöodomäne ist eine hochkonservierte Domäne und die zugrunde liegende 60 Aminosäuren lange Sequenz unterscheidet sich in den verschiedenen Organismen nahezu nicht. Zuerst wurden Proteine mit einer Homöodomäne in *Drosophila melanogaster* beschrieben, wo sie für die Entwicklung der dorsoventralen Achse wichtig sind (Pabo und Sauer, 1992).

Zink-Finger sind DNA-Binde-Motive, bei der die Aminosäuresequenz eine fingerartige Struktur ausbildet, an deren Beginn und Ende entweder je zwei Cysteine (C_2C_2) oder zwei Cysteine und zwei Histidine (C_2H_2) in kurzen Abständen vorkommen (zum Beispiel Cys- X_{2-4} -Cys- X_{12} -His- X_{3-5} -His). Diese Cysteine und Histidine binden durch Ausbildung einer Quartetstruktur ein Zink-Atom. Dabei können zum Beispiel die zwei Cysteine Bestandteil einer β -Faltblattstruktur und die Histidine Bestandteil einer α -Helix sein, die an die DNA bindet. Die Wiederholung mehrerer dieser Zink-Finger-Motive ist ein Charakteristikum dieser DNA-Bindedomäne. Jeder Finger bindet in der großen Rinne der DNA. Dabei werden auch Wasserstoffbrücken von basischen Aminosäuren des Fingers zu Basen der DNA oder zum Rückgrat der DNA ausgebildet. Die C_2C_2 - oder C_2H_2 -Struktur sowie die Anzahl der Finger bestimmen hauptsächlich die Einteilung in die Superfamilien und zusätzliche Proteindomänen deren weitere Untergliederung (Pabo und Sauer, 1992).

Die Bindung an DNA erfolgt bei einigen DNA-bindenden Proteinen ausschließlich als Dimer. Dazu gehören die bZip (*basic leucine zipper*) Domänen und die bHLH (*basic helix turn helix*) Domänen. Beide Domänen besitzen einen spezifischen Bereich basischer Aminosäuren, an den sich eine Domäne

anschließt, die ausschließlich für die Dimerisierung zuständig ist. Mit den basischen Aminosäuren erfolgt die Bindung an die DNA, wenn zum Beispiel durch Dimerisierung die basischen Bereiche zweier Proteine eine Art Scherenstruktur bilden, die beidseitig an die DNA in der großen Rinne binden. Die Zip-Struktur, die sich in bZip-Domänen an den basischen Bereich anschließt, ist eine Sequenz, bei der in regelmäßiger Abfolge an jeder siebten Stelle ein Leuzin vorkommt (*leucine zipper*) und die sich in zwei α -Helices formt. Diese bilden bei der Dimerisierung mit den zwei α -Helices des Dimerpartners eine übergeordnete helikale Struktur. Die HLH-Struktur, die sich an den basischen Bereich in bHLH-Domänen anschließt und für die Dimerisierung der Proteine nötig ist, besteht aus zwei α -Helices verbunden von einer unstrukturierten Schleife.

Die Kombination eines basischen Bereichs mit einem HTH-Motiv und dem Vorkommen regelmäßig verteilter Tryptophan-Reste führt zur übergeordneten Struktur, wie sie in zwei bis drei Wiederholungen charakteristisch für die MYB-Domäne ist.

In einer weniger verbreiteten Form der Bindung erfolgt die Bindung an die DNA nicht durch eine α -Helix, sondern durch eine β -Faltblattstruktur, was bereits von prokaryotischen transkriptionellen Repressorproteinen bekannt ist (Pabo und Sauer, 1992). Diese Form der Bindung findet man auch in AP2-Domänen der pflanzenspezifischen Klasse der AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren (Allen *et al.*, 1998).

Die durch die basischen Bereiche der Transkriptionsfaktoren erkannten Sequenzen sind 5-15 Nukleotide lange und hoch konservierte Sequenzen in den Promotoren der Zielgene. Diese Erkennungssequenzen sind von den meisten Transkriptionsfaktoren bekannt und verliehen den Unterfamilien zum Teil auch deren Namen, wie zum Beispiel die GATA-Zink-Finger, deren Erkennungssequenz (A/T)GATAR lautet (Reyes *et al.*, 2004).

1.2.1 GATA Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis*

In *Arabidopsis* gibt es sechs große Transkriptionsfaktorklassen, die Zink-Finger in verschiedener Anordnung enthalten und bei denen das Zink von Tetramerstrukturen aus ausschließlich vier Cysteinen oder einer Kombination aus Cysteinen und Histidinen koordiniert wird (Riechmann *et al.*, 2000). Die Zink-Finger des C₂C₂-Typs werden in *Arabidopsis* in vier Familien eingeteilt, abhängig von den zusätzlich im Protein vorhandenen Domänen und auch der Anzahl an Aminosäuren, die die Cysteine trennen. Eine der vier Unterfamilien der C₂C₂-Zink-Finger bilden die GATA Transkriptionsfaktoren, die in allen Eukaryoten vorkommen. Der GATA-Zink-Finger zeichnet sich durch die sequenzspezifische Bindung an die Nukleotid-Konsensussequenz (T/A)GATA(G/A) aus (Teakle *et al.*, 2002). Die Anzahl der Finger-bildenden Aminosäuren zwischen den Cysteinen beträgt 17 bei Tieren, 17-18 bei Pilzen und 18-20 bei Pflanzen. Die GATA-Konsensussequenz wurde in vielen Promotoren lichtregulierter pflanzlicher Gene gefunden (Teakle *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2004). Die Fähigkeit zellkernspezifischer Proteinextrakte *in vitro* an diese GATA-Sequenz zu binden und dafür

Zink zu benötigen, führte zur Annahme, dass in Pflanzen GATA-Zink-Finger die Transkriptionsfaktoren lichtregulierter Gene sind. Der Vergleich vieler annotierter Sequenzen mit denen bekannter eukaryotischer GATA-Faktoren führte in *Arabidopsis* zur Identifizierung der ersten GATA-Faktoren. Von diesen wurden für GATA1 bis GATA4 *in vitro* eine Bindung an GATA-Konsensussequenzen gezeigt. Zudem wurde die Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription in einem GAL4-Transaktivierungs-System gezeigt (Teakle *et al.*, 2002). In *Arabidopsis* wurden bioinformatisch 29 Gene, die für GATA-Faktoren kodieren identifiziert und diese in vier Unterfamilien eingeteilt (Reyes *et al.*, 2004). Die Einteilung beruht zusätzlich zur GATA-Zink-Finger Domäne auf der Exon/Intron-Struktur der Gene und der Anzahl von Aminosäuren im Zink-Finger. Im Vergleich zu anderen Eukaryoten gibt es in *Arabidopsis* drei- bis viermal soviel GATA-Faktoren, was auf die Duplikationsereignisse im Genom zurückzuführen ist und zu vielen Gen-Paaren mit hoher Homologie führte (Reyes *et al.*, 2004). Dazu gehören unter anderem auch *GATA21* und *GATA22*, die Bestandteil der Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit sind. Die biologische Funktion der GATA-Faktoren ist bisher nur anhand weniger Vertreter der vier Unterfamilien beschrieben worden. Dazu gehören *GATA8* (BME3) aus Unterfamilie I, dessen Ausfall in der Mutante *bme3* zu Defekten während der Samenkeimung führte, und *GATA25* (ZIM) aus Unterfamilie III, für den eine Funktion bei der Zellelongation gezeigt wurde (Manfield *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde *GATA22* aus Unterfamilie II näher charakterisiert. Aus dieser Unterfamilie wurden *GATA18* (HAN), für den eine Funktion bei der Blüten- und Sprossmeristementwicklung angenommen wird, und *GATA21* (GNC) bereits beschrieben. Die Expression von *GNC* wird durch Nitrat induziert. Die *gnc* Mutante hat einen reduzierten Chlorophyllgehalt und eine veränderte Expression vieler Gene, die für den Zuckermetabolismus verantwortlich sind (Bi *et al.*, 2005). Eine systematische Analyse der Expression aller *GATA* Gene in *Arabidopsis* zeigte kürzlich, dass die Faktoren auch anhand ihrer Expressionsmaxima in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können, die aber nicht unbedingt mit den phylogenetischen Gruppen übereinstimmen. Es gibt zum Beispiel Gruppen, welche ganz spezifisch nur im Licht exprimiert werden und zu denen *GATA21* und *GATA22* gehören. Diese bilden eine eigene Gruppe mit circadianer Rhythmik und einem Expressionspeak etwa vier Stunden vor der Lichtphase im Tagesverlauf (Manfield *et al.*, 2007). Die Expression von *GATA22* war im Licht 75-fach höher als im Dunkeln, was eine strikt lichtabhängige Expression darstellt. Auch die gewebespezifische Expression führte zur Identifizierung einer Reihe verschiedener Gruppen der *GATA* Gene, die zum Beispiel nur in Wurzeln oder Blüten exprimiert werden. *GATA21* und *GATA22* werden nur in oberirdischen Pflanzenteilen und nicht in Wurzeln exprimiert. *GATA22* zeigt dabei eine spezifische Expression in Rosettenblättern. Die Einteilung anhand der Expressionscharakteristika zeigte, dass *GATA21* und *GATA22* eine eigene Gruppe bilden. Dieses Beispiel zeigt, dass sowohl die Expression als auch die Sequenz der beiden GATA-Faktoren sehr ähnlich sind, was auf eine eventuell ähnliche biologische Funktion schließen lässt. Die Expressionsprofile von *GATA21* und *GATA22* zeigten zudem

eine starke Korrelation zueinander und zwar bezüglich der Ko-Regulation mit Genen, für Transkriptionsfaktoren, welche an der circadianen Rhythmik oder lichtregulierten Prozessen beteiligt sind (Manfield *et al.*, 2007).

In *Microarray*-Experimenten wurde gezeigt, dass die Expression von *GATA21* und auch *GATA22* durch Nitratzugabe nach Nitratmangel oder auch durch Zucker induzierbar ist (Wang *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004; Scheible *et al.*, 2004). Zudem erhöht dauerhafte Rotlichtbestrahlung nach Dunkelanpassung die Expression beider *GATA* Gene und zwar vermutlich über eine Phytochrom-abhängige Lichtwahrnehmung im Zusammenspiel mit Phytochrom-interagierenden-Faktoren (PIFs) (Monte *et al.*, 2004). Erste Hinweise auf eine Beteiligung von *GATA21* und *GATA22* bei der Aktivierung von Zielgenen als Reaktion auf Cytokinin wurden in mindestens zwei unabhängigen *Microarray*-Experimenten erhalten. Dabei wurde zumindest die Expression von *GATA22* schnell (innerhalb von 15-20 Minuten) und vermutlich in Abhängigkeit von *ARR21* induziert (Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005).

1.2.2 HD-Zip Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis*

In Pflanzen gibt es viele Gene, die eine Sequenz enthalten, die für die Homöodomäne (HD) kodiert. Abhängig von weiteren Proteindomänen werden 6 Klassen unterschieden. Eine Klasse sind zum Beispiel HD-Zip Transkriptionsfaktoren, bei denen eine Homöodomäne und direkt dahinter ein Leuzin-Zipper vorkommt (siehe auch Punkt 1.2). Diese Domänenkombination findet man so nur in Pflanzen (Riechmann *et al.*, 2000; Ariel *et al.*, 2007). Die 60-61 Aminosäuren lange Homöodomäne macht dabei die sequenzspezifische Bindung an die DNA möglich und der Leuzin-Zipper ist für die Dimerisierung verantwortlich. Anders als HD-Proteine ohne weitere Proteindomäne, können die HD-Zip-Transkriptionsfaktoren vermutlich nur als Dimere an die DNA binden. Die Erkennungssequenz ist CAAT(X)ATTG. Das variable Nukleotid in der Mitte ist in den Unterfamilien spezifisch.

In *Arabidopsis* gibt es 48 Gene, die vermutlich für HD-Zip-Transkriptionsfaktoren kodieren und die in weitere vier Unterfamilien (HD-Zip I - HD-Zip IV) unterteilt werden. Die Unterfamilie HD-Zip I hat 17 Mitglieder, die Dimere bilden können und deren Gene durch viele Stresstimuli reguliert werden. Die HD-Zip I Faktoren haben mehrheitlich Funktionen in entwicklungsbiologischen Prozessen (Ariel *et al.*, 2007). Zur Unterfamilie HD-Zip II gehören zehn Mitglieder, von denen die drei Gene *AtHB2/HAT4*, *HAT3* und *HAT22* im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Diese Unterfamilie wird deshalb im nächsten Abschnitt etwas detaillierter vorgestellt. Zur HD-Zip III Unterfamilie gehören 5 Gene (*PHABULOSA*, *PHAVOLUTA*, *REVOLUTA*, *CORONA* und *AtHB8*), deren Funktionen bereits gut charakterisiert sind. Die korrespondierenden Proteine haben unter anderem Funktionen in der Regulation der Entwicklung des apikalen Sprossmeristems, der Leitgewebe und den Domänen lateraler Organe. Dabei zeigen *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA* und *REVOLUTA* überlappende Funktionen bei der Embryogenese und beeinflussen die Blattpolarität und

die Bildung der apikalen Symmetrie. Ihre Regulation durch die Mikro-RNAs mi165 und mi166 ist bekannt (Ariel *et al.*, 2007). Die HD-Zip IV Unterfamilie hat 16 Mitglieder und die Proteinstruktur ist bis auf die spezifische MEKHLA-Domäne und eine spezifische Schleife im Leuzin-Zipper ähnlich der von HD-Zip III Faktoren. Ein bekannter Vertreter ist GLABRA2/AtHB10, die korrespondierende Mutante bildet keine Trichome und mehr Wurzelhaare. Die HD-Zip IV Faktoren spielen vermutlich eine Rolle bei der Etablierung des Zellschicksals von Epidermiszellen oder der Zellidentität in der Wurzel, was durch ihre Expression in der äußeren Zellschicht von Organen untermauert wird (Ariel *et al.*, 2007).

Die ersten HD-Zip II Faktoren wurden aufgrund der konservierten Sequenz ihrer Homöobox im Vergleich zu bekannten Genen für HD-Proteine aus *Drosophila*, *C. elegans* oder Hefe identifiziert. Zunächst wurden parallel die vier *HAT* Gene (für Homöobox aus *Arabidopsis thaliana*) *HAT4*, *HAT5*, *HAT22* und *HAT24* und die zwei *AtHB* Gene (für *Arabidopsis thaliana* Homöobox) *AtHB1* und *AtHB2* identifiziert und in den Proteinen die Leuzin-Zipper-Domäne entdeckt (Ruberti *et al.*, 1991; Schena und Davis, 1992). Aufgrund der zwei Nomenklaturen wurden Gene z.T. mehrfach benannt und annotiert. Zum Beispiel ist eines der am besten charakterisierten Proteine der HD-Zip II Unterfamilie, *HAT4*, identisch mit *AtHB2* und wird in der Literatur immer noch unterschiedlich benannt.

Über die Wirkungsweise als Transkriptionsfaktor, die Regulation der Expression und die biologische Funktion von *HAT4* ist bereits vieles bekannt. Direkte Zielgene wurden bisher allerdings nur wenige identifiziert. *HAT4* bindet als Dimer an DNA und erkennt die palindromische Sequenz CAAT(G/C)ATTG (Sessa *et al.*, 1993; Ohgishi *et al.*, 2001). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die HD-Zip-Domäne des Proteins die Bindung an die DNA vermittelt. Das vollständige *HAT4* Protein führte zur Unterdrückung der Aktivität eines Reportergens, welches unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert wurde und dem 5' die Erkennungssequenz von *HAT4* angefügt war (Steindler *et al.*, 1999). *HAT4* wurde aufgrunddessen als transkriptioneller Repressor identifiziert. Es konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass *HAT4* an den Promotor seines eigenen Gens bindet und dadurch die eigene Expression unterdrückt. Nach Induktion von *HAT4* wurde in transgenen Pflanzen eine reduzierte Expression des endogenen *HAT4* gefunden (Ohgishi *et al.*, 2001). Die *HAT4* Genexpression wird also durch eine negative Autoregulation durch das *HAT4* Protein reguliert. Interessanterweise konnte später gezeigt werden, dass *HAT4* an die Promotoren aller anderen Gene für HD-Zip II Faktoren binden kann und vermutlich deren Expression ebenso unterdrücken kann (Ohgishi *et al.*, 2001; Ciarbelli *et al.*, 2008). Die Expression von *HAT4* wird sehr spezifisch und komplex durch Licht reguliert. Die Expression von *HAT4* ist in etiolierten Keimlingen höher als in lichtgewachsenen Keimlingen (Carabelli *et al.*, 1996). Beim Wachstum von Pflanzen in unmittelbarer Nähe von anderen Pflanzen wird der Anteil des Rotlichtes durch Absorption durch das Pflanzenmaterial anderer Pflanzen reduziert und es ändert sich somit das Verhältnis von Rotlicht (R) zum Dunkelrotlicht (FR), genauso

wie bei Morgen- und Abenddämmerung. Ein niedriges Verhältnis von Rot- zu Dunkelrotlicht (R/FR) ist somit charakteristisch für die Beschattung einer Pflanze und damit für den möglichen Wachstumsnachteil dieser Pflanzen gegenüber anderen Pflanzen. Pflanzen reagieren mit der so genannten Schattenvermeidungsreaktion auf ein niedriges R/FR Verhältnis, welche eine Reihe von Änderungen der Morphologie beinhaltet. Dazu gehören zum Beispiel das verstärkte Wachstum des Hypokotyls und eine geringere Wachstumsrate der Blätter, verzögerte Keimung, vorzeitige Blüte sowie reduzierte Chlorophyllgehalte und Apikaldominanz (Smith und Whitelam, 1997). Ein niedriges R/FR Verhältnis führte innerhalb weniger Minuten zu einer starken Induktion von *HAT4* (Carabelli *et al.*, 1993; Carabelli *et al.*, 1996; Ciarbelli *et al.*, 2008). Bei fortwährenden FR- oder Dunkelbedingungen nahm die Transkriptmenge dabei kontinuierlich weiter zu, bis nach etwa einer Stunde ein Maximum überschritten war. Eine kurze Bestrahlung mit Rotlicht konnte jedoch die induzierte Expression in wenigen Minuten wieder reduzieren/revertieren (Carabelli *et al.*, 1996; Ciarbelli *et al.*, 2008). Dieser Effekt konnte auch in Phytochrommutanten wie *phyA* und auch *phyB* beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass PhyE zusammen mit PhyA an der *HAT4* Induktion beteiligt ist (Franklin *et al.*, 2003). Diese Regulation der *HAT4* Expression trat so jedoch nur in lichtangepassten Pflanzen auf. In etiolierten Keimlingen führte jegliche Rot- oder Dunkelrotlichtbestrahlung zur Reduktion der *HAT4* Expression (Carabelli *et al.*, 1996). Eine Beteiligung von *HAT4* an der Etablierung der phänotypischen Veränderungen einer Pflanze während der Schattenvermeidungsreaktion konnte anhand von Pflanzen mit erhöhter oder reduzierter *HAT4* Expression gezeigt werden. Keimlinge, die *HAT4* unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren, hatten ein verlängertes Hypokotyl, zurückzuführen auf verstärkte Zellelongation sowie kleinere Blätter von geringerer Anzahl. Die Keimblätter wiesen eine reduzierte Breite und Länge auf, waren jedoch aufgrund einer größeren Höhe von Mesophyll- und Palisadenparenchymzellen dicker (Schena *et al.*, 1993; Steindler *et al.*, 1999). Das Wurzelsystem von 35S:*HAT4* transgenen Keimlingen war aufgrund einer geringeren Länge der Primärwurzel und einer reduzierten Anzahl an Lateralwurzeln reduziert (Schena *et al.*, 1993; Steindler *et al.*, 1999). Sowohl im Hypokotyl als auch in der Primärwurzel war das sekundäre Dickenwachstum verringert. Dieser Wurzelphänotyp konnte durch Auxinapplikation komplementiert werden. Alle beschriebenen Phänotypen wurden in gegenteiliger Ausprägung in Pflanzen mit einer durch ein *antisense* Gen reduzierten *HAT4* Expression beobachtet (Schena *et al.*, 1993; Steindler *et al.*, 1999). Interessanterweise wurden vergleichbare Phänotypen bei Pflanzen, welche *HAT1* oder *HAT2* überexprimieren, identifiziert (Ciarbelli *et al.*, 2008). Die Gene *HAT1*, *HAT2* und *HAT3* sind genau wie *HAT4* durch ein niedriges R/FR-Lichtverhältnis induzierbar. Dagegen ist *HAT22* nicht durch ein niedriges R/FR-Lichtverhältnis induziert (Ciarbelli *et al.*, 2008).

Neben *HAT4* wurden auch *HAT22* und *HAT3* als cytokinininduzierte Gene bei einem *Microarray*-Experiment identifiziert (Brenner *et al.*, 2005). Die Funktionen von *HAT22* und *HAT3* wurden bisher nicht beschrieben. Die Phänotypen von transgenen Pflanzen mit veränderter *HAT2* Expression ähneln

zwar denen von *HAT4* transgenen Pflanzen und *HAT2* wurde ebenso wie *HAT4* als transkriptioneller Repressor identifiziert, jedoch wird die *HAT2* Expression durch Auxin induziert. *HAT2* ist vermutlich an der Auxinsignaltransduktion beteiligt (Sawa *et al.*, 2002).

1.2.3 bHLH Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis*

bHLH Transkriptionsfaktoren bilden neben den MYB- und den AP2-Transkriptionsfaktoren eine der größten Transkriptionsfaktorfamilien in *Arabidopsis* (Riechmann *et al.*, 2000). Das Hauptmerkmal dieser Familie ist die etwa 60 Aminosäuren lange bHLH Domäne (siehe auch Punkt 1.2), bei der der Bereich von etwa 15 basischen Aminosäuren die DNA-Bindung vermittelt und die HLH-Domäne für die Dimerisierung mit anderen Proteinen verantwortlich ist. Diese Domäne kommt in allen Eukaryoten vor (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Intensive phylogenetische Studien zur Verwandtschaft der bHLH-Familie in *Arabidopsis* und anderen Pflanzen auf Basis der bHLH-Domäne identifizierten 162 bHLH-Proteine in *Arabidopsis* (Bailey *et al.*, 2003; Buck und Atchley, 2003; Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Die Proteinstruktur außerhalb der bHLH Domäne weist einen hohen Grad an Diversität auf. Neben der Sequenzhomologie der bHLH Domäne führte die Exon-/Intronstruktur, die Gesamtlänge der Proteine und zusätzliche Domänen zu einer weiteren Unterteilung in 12 bzw. 21 Unterfamilien in verschiedenen Studien (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Bei Tieren unterscheidet man sechs bHLH Gruppen, die sich unter anderem anhand der Nukleotidsequenz, an die sie binden unterscheiden. Die zentralen Aminosäuren in dieser Erkennungssequenz (5'-CANNTG-3') (E-Box) sind die Grundlage der Einteilung. Bei Sequenzanalysen der *Arabidopsis* Familie wurde nur in 120 bHLH Faktoren ein basischer Bereich gefunden, der die Kriterien zur DNA-Bindung erfüllt und deshalb wurden die restlichen Proteine als HLH Faktoren klassifiziert. Deren Funktion könnte ähnlich den von Tieren darin bestehen, mit anderen bHLH Faktoren Dimere zu bilden, welche dann zur Bindung an DNA fähig sind oder aber umgekehrt die Bindefähigkeit des Dimerpartners negativ zu beeinflussen (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Die meisten bHLH Faktoren aus *Arabidopsis* binden an die so genannte G-Box (5'-CACGTG-3') in Promotoren von Zielgenen. Eine spezifische Aminosäurekonstellation im basischen Bereich der bHLH Domäne ist zusätzlich wichtig zur Unterscheidung der E-Box-bindenden von nicht-E-Box-bindenden bHLH Faktoren bzw. der G-Box-bindenden von nicht-G-Box-bindenden E-Box-bHLH Faktoren. Die G-Box bindenden bHLH Faktoren umfassen weit über 80 Faktoren aus allen phylogenetischen Unterfamilien. Außerdem kommt das G-Box-Palindrom in so vielen Promotoren vor, dass eine funktionelle Diversität der vielen Faktoren so nicht erreicht werden kann (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Die geringe Anzahl beschriebener Phänotypen der Mutanten einzelner bHLH Faktoren spricht für ein hohes Maß an Redundanz und 38% der bHLH Faktoren in *Arabidopsis* gehen aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit vermutlich auf Duplikationsereignisse im Genom zurück. Mehrere zusätzliche Faktoren spielen entscheidende Rollen bei einer Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse, an denen bHLHs regulatorisch beteiligt sind.

Zu diesen Faktoren gehören, neben dem zeitlichen und dem zellspezifischen Kontext, in dem die *bHLH* Gene exprimiert werden, vor allem die Fähigkeit zur Dimerisierung und die Anwesenheit des passenden Dimer-Partners. Es wurden bisher nur wenige bHLH Faktoren in *Arabidopsis* funktionell charakterisiert. Dabei wurden zwei Szenarien beschrieben. Auf der einen Seite gibt es phylogenetisch nah verwandte Faktoren, die jedoch völlig verschiedenen biologischen Funktionen zugeordnet wurden. Dazu gehören beispielsweise Vertreter der Unterfamilie III (nach Heim *et al.*, 2003) und der Unterfamilien 7 und 8 (nach Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Diese haben Funktionen bei der Regulation der Flavonoid-Synthese, der Tryptophan-Synthese, der ABA-regulierten Genexpression sowie bei der Trichom-Entwicklung. Auf der anderen Seite haben Vertreter einer Unterfamilie ganz ähnliche Funktionen. Dazu gehören die drei *BEE* Gene der Unterfamilie 18, deren Expression durch Brassinolide (BR) induzierbar ist und die alle drei redundant in die Brassinosteroid-Signalleitung involviert sind (Friedrichsen *et al.*, 2002). In die gleiche Unterfamilie werden zwei der cytokininregulierten *bHLH* Gene, die in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurden (*bHLH64* und *bHLH78*) eingeordnet, für die allerdings diese BR-Regulation nicht gezeigt werden konnte.

Eine Bildung von Heterodimeren zwischen verschiedenen bHLH Faktoren oder mit anderen Proteinen erhöht deren funktionelle Diversität. Als Beispiel sei die Bildung eines Dimers aus dem bHLH Faktor *GLABRA3* und dem R2R3 MYB Faktor *GLABROUS1* bei der Vermittlung der Trichom-Entwicklung in *Arabidopsis* angeführt (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Eine Unterfamilie der bHLH Faktoren, welche besonders gut charakterisiert ist, besteht aus bHLH Faktoren, von denen einige die Fähigkeit besitzen, über eine N-terminale Domäne an die Rotlicht-aktivierte Form von Phytochromen Pf_R (PhyA und PhyB) zu binden und dadurch Phytochrom-abhängige Lichtreaktionen, zum Beispiel das Hypokotylwachstum oder die Keimung regulieren (Duek und Fankhauser, 2005). Einige dieser Phytochrom-interagierenden-Faktoren (PIFs) spielen nach neuesten Erkenntnissen eine duale Rolle und können durch Interaktion mit DELLA-Proteinen (Repressoren des Gibberellinsignalweges) die Signalwege von Licht und Gibberellin verschalten (Davière *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung cytokinindefizienter Pflanzen. Cytokinine werden durch Cytokininoxidase/-dehydrogenase (CKX) Enzyme abgebaut. In *Arabidopsis* gibt es sieben CKX Gene. Die funktionelle Charakterisierung von CKX1-CKX6 konnte in der Vergangenheit die korrespondierenden Enzyme als FAD-abhängige Oxidoreduktasen identifizieren. Die phänotypischen Konsequenzen der Überexpression dieser sechs CKX Enzyme in Pflanzen werden zusammenfassend als Cytokinindefizienz-Syndrom bezeichnet und dieses umfasst unter anderem ein reduziertes Sprosswachstum und ein verstärktes Wurzelwachstum. CKX7 wurde bisher funktionell nicht untersucht. Die hohe Homologie der Aminosäuresequenz zu CKX1-CKX6 lässt jedoch vermuten, dass es sich bei CKX7 auch um ein cytokininabbauendes Enzym handelt. Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin aufzuklären, ob CKX7 tatsächlich ein aktives CKX Enzym ist. Eine Überexpression des CKX7 Gens unter der Kontrolle des 35S Promotor wurde als experimenteller Ansatz ausgewählt, um diese Fragestellungen anhand CKX7 überexprimierender Pflanzen untersuchen und die Veränderungen der Konzentration einzelner Cytokininmetabolite im Vergleich zum WT zu bestimmen. Der größte Unterschied zwischen CKX7 und CKX1-CKX6 liegt im N-terminalen Bereich. Für CKX7 wurde als einziges Protein der Familie bioinformatisch kein typisches Signalpeptid vorhergesagt. Die anderen CKX Enzyme der Familie kommen entweder assoziiert mit dem ER vor und werden in den Apoplasten sekretiert oder wurden in der Vakuole lokalisiert. Die Lokalisation von CKX7 wurde als zytoplasmatisch vorhergesagt. Um die zytoplasmatische Lokalisation des Proteins zu analysieren, wurden eine C-terminale Fusion mit GFP und die konfokale Mikroskopie als experimentelle Ansätze gewählt. Außerdem war die Untersuchung der Konsequenzen eines verringerten Cytokiningehaltes im Zytoplasma für die Pflanzenentwicklung und der Vergleich mit anderen cytokinindefizienten *Arabidopsis* Pflanzen ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Cytokininsignalleitung. Nach dem aktuellen Modell löst das Cytokininmolekül durch Bindung an die membranständigen Rezeptoren (AHKs) eine Phosphatkaskade über Phosphotransmitterproteine (AHPs) auf kernlokalisierte Response-Regulator-Proteine (ARRs) aus. Diese Phosphatkaskade wurde als erweitertes Zweikomponentensignalsystem (ZKS), ähnlich dem in Bakterien, identifiziert. Neben den cytokinininduzierbaren A-Typ ARR Genen sind nur wenige Zielgene der B-Typ ARRs, die als Transkriptionsfaktoren wirken, bekannt. Um die Vermittler der Cytokininwirkung auf das Pflanzenwachstum zu identifizieren, wird intensiv nach Zielgenen der B-Typ ARRs aber auch nach cytokinininduzierten Genen im Allgemeinen gesucht. Dazu macht man sich heute unter anderem die *Microarray*-Technik zu nutze, mit der ganze Transkriptom analysiert und Gene mit cytokininregulierter Expression identifiziert werden können. Die CRF Gene stellen ein Beispiel dar, in dem auf diese Weise cytokinininduzierte Zielgene von B-Typ ARRs gefunden wurden. Diese CRF Gene sind Transkriptionsfaktoren der AP2-Klasse und haben vermutlich

Einfluss auf die Transkription von Genen, die für die Keimblattentwicklung wichtig sind. In einem vergleichbaren experimentellen Ansatz wurden weitere Gene von potenziellen Transkriptionsfaktoren als cytokininregulierte Gene identifiziert. Dazu gehörten sowohl induzierte Gene als auch Gene mit reduziertem Transkriptlevel. Es wurden Gene mit schneller Veränderung (15 Minuten) als auch Gene mit langsamer Veränderung (120 Minuten) des Transkriptlevels identifiziert. Das Ziel in dieser Arbeit war es, eine erste funktionelle Analyse der Kandidatengene durchzuführen und dabei zu untersuchen, ob ein erhöhter oder reduzierter Transkriptlevel dieser Transkriptionsfaktorgene in Pflanzen einen Einfluss auf cytokininverwandte Aspekte des Pflanzenwachstums hat. Als ein experimenteller Ansatz sollte in einer *loss-of-function* Analyse mittels T-DNA Insertionsmutanten der Kandidatengene überprüft werden, ob der Verlust eines der Genprodukte zu phänotypischen Veränderungen in den Mutanten führt. Da dieser Ansatz methodisch weniger aufwendig ist, wurden alle zwölf Kandidatengene in die *loss-of-function* Analyse einbezogen. Die Kandidatengene gehören jedoch alle zu Familien mit einer großen Anzahl an Mitgliedern. Aufgrund funktioneller Redundanz waren in anderen Arbeiten phänotypische Veränderungen meist erst an Mehrfachmutanten zu beobachten. Aus diesem Grund wurde als zweiter experimenteller Ansatz zur funktionellen Analyse eine Überexpression der Kandidatengene gewählt. Da dieser Ansatz methodisch aufwendiger ist und die transgenen Pflanzen zunächst erstellt werden müssen bevor die phänotypische Analyse erfolgen kann, wurden vier Kandidatengene mit schneller positiver Regulation des Transkriptlevels durch Cytokinin für diesen *gain-of-function* Ansatz ausgewählt.

Eine phänotypische Beschreibung der transgenen Pflanzen beider experimenteller Ansätze und eine Untersuchung der Cytokininsensitivität sollen zu einer ersten Beurteilung über die Beteiligung der ausgewählten Faktoren an der Wirkungsvermittlung von Cytokinin führen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Im Folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Chemikalien aufgeführt:

GE Healthcare Europe, München	Bio-Rad, Richmond, USA
Biozym, Hess.Oldendorf	Difco Laboratories, Detroit, USA
Merck, Darmstadt	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Peqlab, Erlangen	Fluka, Buchs, Schweiz
Qiagen, Hildesheim	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Roth, Karlsruhe	Roche, Basel, Schweiz
Serva, Heidelberg	
Sigma Chemie, Deisenhofen	

2.2 Enzyme

Im Folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Enzyme aufgeführt:

BioLine, Luckenwalde	New England Biolabs, Beverley MA, USA
Boehringer, Mannheim	Promega, Mannheim
Invitrogen, Karlsruhe	Roche, Mannheim
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	

2.3 Computerprogramme

Für Sequenzanalysen wurde die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder der *Arabidopsis Information Resource* (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>) verwendet (Huala *et al.*, 2001).

Oligonukleotide wurden in der Regel mit dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) entworfen (Rozen und Skaletsky, 2000).

Für die Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten wurde zum Entwurf der Oligonukleotide das *iSect-Tool* des *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (SIGnAL, <http://signal.salk.edu/>) verwendet.

Zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation und Domänen von Proteinen wurden die Analyseprogramme, zur Verfügung gestellt durch die *plant membrane protein database* (ARAMEMNON, <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>), verwendet (Schwacke *et al.*, 2003).

Restriktionsanalysen und die Erstellung der Vektorkarten wurden mit dem Programm Vektor NTI sowie im Internet mit dem Programm Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) durchgeführt.

2.4 Biologisches Material

2.4.1 Pflanzen

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen sind, wenn nicht anders angegeben, vom Ökotyp Columbia-0 (Col-0). Für die Erstellung transgener Tabakpflanzen wurden *Nicotiana tabacum* Pflanzen des Kultivars Samsun NN (SNN) verwendet.

- Die T-DNA-Insertionsmutanten wurden vom Torrey Mesa Institut (Syngenta), dem Salk-Institut und der Kölner Arabidopsis T-DNA-Insertionspopulation (GABI-KAT) bezogen (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003) und im „Nottingham Arabidopsis Stock Centre“ (NASC, <http://arabidopsis.org.uk/>) sowie vom „Arabidopsis Biological Resource Center“ (ABRC, <http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm>) über die Plattform „The Arabidopsis Information Resource“ (TAIR) bestellt (Scholl *et al.*, 2000; Huala *et al.*, 2001). Die Linien sind im Anhang (Tabelle 9) zusammengefasst.
- Die T-DNA-Insertionslinien ahk2 IT2, ahk3 IG1 und cre1-2 wurden von M. Riefler erhalten. Dabei entspricht ahk2 IT2 dem Allel ahk2-5 und ahk3 IG1 dem Allel ahk3-7 (Riefler *et al.*, 2006).
- Die T-DNA-Insertionslinie ahp6-3 (Salk_058085) wurde von A.P. Mähönen und wurde bereits publiziert (Mähönen *et al.*, 2006a).
- Die T-DNA-Insertionslinie gata21 IS1 des Salk-Instituts wurde über NASC unter der Nummer Salk_001778 bezogen und entspricht der Mutante gnc (Bi *et al.*, 2005).
- Die verwendete Wurzelmarkerlinie J0571 stammt aus der Gal4-Enhancer-Trap-GFP Kollektion von J. Haseloff (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>) und wurde über NASC unter der Nummer N9094 bezogen.
- Die Wurzelmarkerlinie QC184 wurde von S. Sabatini erhalten und stammt aus der T-DNA Kollektion INRA, Versailles (Bechtold *et al.*, 1993; Sabatini *et al.*, 2003).
- Die transgenen *Arabidopsis* Linien CKX7:GUS und 35S:CKX7 wurden in der Diplomarbeit von I. Köllmer (Köllmer, 2004) erstellt.
- Die Promotor-GUS Reporterlinien CycBI:GUS und ARR5:GUS wurden vom veröffentlichenden Autor bezogen (Colón-Carmona *et al.*, 1999; D'Agostino *et al.*, 2000).
- Die transgenen *Arabidopsis* Linien pBinHygTx-35S:cCKX2 und pBinHygTx-35S:cCKX2-GFP wurden von T. Werner erhalten (unveröffentlichte Daten).

2.4.2 Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Spezies	Genotyp, Referenz
DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	F- ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>supE44 thi-1 λ-gyrA96</i> (Nal ^r) <i>relA1 D(lacZYA-argF)</i> U169. (Hanahan, 1983)
DH10B / TOP10	<i>Escherichia coli</i>	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ-rpsL nupG</i> (Invitrogen)</i>
GV3101::pMP90	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Rif ^R , Gent ^R (Koncz und Schell, 1986)

2.4.3 Verwendete Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Funktion	Resistenz in Bakterien / in Pflanzen	Referenz
pCR [®] 2.1 TOPO [®]	TOPO-TA-Klonierung, Sequenzierung	Kan ^R , Amp ^R / -	Invitrogen
pCR [®] XL TOPO [®]	TOPO-TA-Klonierung, Sequenzierung	Kan ^R , Zeo ^R / -	Invitrogen
pBINHygTx	Binärer T-DNA Vektor zur stabilen Transformation von Pflanzen und Expression von Genen unter Kontrolle des 35S Promotors	Kan ^R / Hyg ^R	(Gatz <i>et al.</i> , 1992)
pbinSMGFP	Binärer T-DNA Vektor zur stabilen Transformation von Pflanzen und Expression von <i>SMGFP</i> unter Kontrolle des 35S Promotors	Kan ^R / Hyg ^R	(Werner <i>et al.</i> , 2003)
pROK2	Binärer T-DNA Vektor zur stabilen Transformation von Pflanzen und Expression von Genen unter Kontrolle des 35S Promotors	Kan ^R / Kan ^R	(Baulcombe <i>et al.</i> , 1986)

2.5 Kultivierungsbedingungen und Medien

2.5.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden auf Standard LB-Agar bzw. LB-Flüssigmedium (Bertani, 1951) kultiviert, welchem zur Selektion auf Plasmide die erforderlichen Antibiotika (Tabelle 3) zugegeben wurde.

E. coli Kulturen wurden über Nacht bei 37°C kultiviert. *A. tumefaciens* Kulturen wurden für zwei Tage bei 28°C kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989).

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
(1,5% Agar)
ad 1 l H₂O
pH 7,5

SOC-Medium

20 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
0,5 g NaCl
25 ml 1 M KCl
5 ml 2 M MgCl₂
20 ml 1 M Glukose
ad 1 l H₂O
pH 7,0

2.5.2 Sterilkultur von *Arabidopsis* und Tabak

Für die Sterilkultur von Tabak wurden die Samen zunächst einer Oberflächensterilisation unterzogen (ca. 7 min. in gesättigter CaCl₂O₂-Lösung mit 0,1% Triton-X-100 auf dem Schüttler inkubieren, dann mehrmals mit sterilem H₂O waschen) und auf sterilem Filterpapier getrocknet. *Arabidopsis* Samen wurden alternativ mit 70% Ethanol sterilisiert (7 Minuten in 70% Ethanol mit 0,1% Triton-X-100 schütteln und mehrmals mit 70% Ethanol waschen) und auf sterilem Filterpapier getrocknet, wobei die Gesamtdauer im Ethanol 12 Minuten nicht überschreiten sollte, um Schädigungen der Samen zu vermeiden.

Für die sterile Aussaat wurde MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit 1% Saccharose und der halben Menge MS-Salze für *Arabidopsis* (MS-A) bzw. 3% Saccharose für Tabak (MS-T) verwendet. Alternativ wurde für *Arabidopsis* auch Ats-Medium (Lincoln *et al.*, 1990) mit 1% Saccharose für Wurzelwachstumstests auf vertikalen Platten verwendet. Allen Medien wurde 0,7% Agar (für Selektionsmedium) bzw. 1,2% Agar (für Wurzeltests auf vertikalen Platten) zugegeben. (Detaillierte Angaben zum MS- und Ats-Medium siehe auch in Köllmer (2004)).

Nach der Aussaat wurden die Kulturen 2-3 Tage bei 4°C dunkel gelagert. Den Selektionsmedien wurden die entsprechenden Antibiotika (Tabelle 3) zugesetzt. Nach der Keimung wurden die Platten 16h im Licht und 8h im Dunkeln bei 22°C kultiviert. Die Lichtstärke betrug standardmäßig in Lichtschranken 70-100 µE /m² * s und für Experimente im Schwachlicht < 40 µE /m² * s.

2.5.3 Dem Kulturmedium zugesetzte Antibiotika, Herbizide und Hormone

Den verschiedenen Kulturmedien für Pflanzen und Bakterien wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Antibiotika und Herbizide zugesetzt:

Tabelle 3: Antibiotika und Herbizide im Kulturmedium

Substanz	Endkonzentration (mg/L)
Kanamycin	50
Rifampicin	50
Gentamycin	25
Hygromycin B	15
Sulfadiazin	5,25
Phosphinotricin	12

Dem Ats-Medium wurde für den Wurzeltest auf vertikalen Platten standardmäßig BA (20 nM, 50 nM und 100 nM gelöst in DMSO) zugesetzt.

Für Komplementationsversuche an *35S:CKX7* transgenen Keimlingen (Kapitel 3.3.6) wurde dem Kulturmedium folgende Substanzen zugesetzt, die getesteten Endkonzentrationen sind in Klammern angegeben: 2-iP (1 μ M; 50 nM), 2-iP-9-G (1 μ M; 50 nM), BA (10 nM; 100 nM), NPA (5 μ M; 10 μ M), NAA (10 nM; 100 nM), AgNO₃ (100 μ M), MZOZ-Cl (10 nM; 100 nM).

Nachdem Blüten *35S:CKX7* transgener Pflanzen mit je 2 μ M der folgenden Substanzen behandelt wurden, wurden die entstandenen Samen auf Medium, welches die gleichen Substanzen enthielt kultiviert und folgende in Klammern angegebene Endkonzentrationen verwendet: BA (5 nM; 10 nM), *cZ* (10 nM; 50 nM), *tZ* (10 nM; 50 nM), MZOZ-Cl (50 nM; 250 nM).

2.6 Transformation von Pflanzen

2.6.1 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana Pflanzen des WT Col-0 wurden mittels Infiltration der Blüten mit Agrobakterien-Lösung nach Vorgabe der „floral dip“-Methode transformiert (Clough und Bent, 1998). Die Samen wurden zur Primärselektion auf 0,5x-MS-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen kultiviert. Resistente Keimlinge wurden zwischen 14 und 20 DAG auf Erde im Gewächshaus weiterkultiviert.

2.6.2 Transformation von *Nicotiana tabacum*

Die Transformation von Tabak des Kultivars SNN wurde durch Infiltration von Blattexplantaten mit Agrobakterien-Lösung unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Dazu wurden Blätter in Sterilkultur gewachsener Tabakpflanzen in 2-3 cm² große Stücke geschnitten, welche dann für 5-10 Minuten in einer Agrobakterien-Lösung inkubiert wurden. 25 ml einer *Agrobacterium* Kultur wurden zuvor abzentrifugiert und die Bakterien in MS-Flüssigmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine OD₅₅₀ von 0,6 eingestellt. Die infiltrierten Blattexplantate wurden zunächst für drei Tage auf Kallusinduktionsmedium (MS-T mit 0,7 mg/l BA und 0,1 mg/l NAA) inkubiert und nachfolgend auf Selektionsmedium überführt (Kallusinduktionsmedium mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion), welchem zur Unterdrückung des weiteren *Agrobacterium* Wachstums Cefotaxim (500 mg/l) zugefügt wurde. Während der Regenerationszeit von 4-6 Wochen wurde das Medium alle 10 Tage erneuert. Entstandene Sprosse wurden von den Explantaten abgetrennt und zur Bewurzelung auf hormonfreiem MS-T Medium weiterkultiviert. Nach der Bildung ausreichender Wurzeln wurden die Primärtransformanten auf Erde bei 24°C und einem Licht/Dunkel-Zyklus von 16h/8h weiterkultiviert.

2.7 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Der weibliche Kreuzungspartner wurde emaskuliert, indem die Staubblätter in einem Stadium entfernt wurden, in dem sie noch unreif und geschlossen waren. Dies ist der Fall, solange die Blüten geschlossen sind und keine Blütenblätter von außen zu sehen sind. Die Blüten wurden dann direkt bestäubt, indem reife Staubblätter des männlichen Kreuzungspartners über den Stempel gestrichen wurden. Es wurde mit dem Binokular kontrolliert, ob Pollen auf den Stempel übertragen wurde.

2.8 Cytokininsensitivitätstests

2.8.1 Wurzelwachstumstest auf cytokininhaltigem Medium

Arabidopsis Keimlinge wurden steril auf Ats-Medium ausgesät, welches verschiedene Konzentration des Cytokinin BA enthielt (siehe Punkt 2.5.3). Die Aussaat erfolgte auf quadratischen 12x12 cm großen Kulturplatten, die vertikal in Wachstumskammern aufgestellt wurden. Das Ende der Primärwurzel wurde 4 DAG und 13 DAG markiert und die Platten fotografiert. Anhand der Bilder und einem Größenstandard wurde die Längenzunahme der Primärwurzel von 4-13 DAG ermittelt. Die Anzahl gebildeter Lateralwurzeln wurde am Binokular 13 DAG gezählt.

2.8.2 Chlorophyllmessung und Chlorophyll-Retentionstest

Die cytokininabhängige Unterdrückung dunkel-induzierter Seneszenz wurde in Anlehnung an erfolgte Publikationen (Riefler *et al.*, 2006) untersucht. Die Chlorophyllmenge in abgetrennten Blättern wurde nach Extraktion über Nacht in Methanol bei Raumtemperatur durch photometrische Messung der Chlorophyllabsorption bestimmt. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 750 nm (Basis-Korrektur), 652 nm und 664 nm. Die Summe aus Chlorophyll a und Chlorophyll b wurde unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten beider Chlorophylle in Methanol berechnet nach der Formel $[22,12 * (OD_{652} - OD_{750}) + 2,71 * (OD_{664} - OD_{750})]$ (Porra *et al.*, 1989).

Jeweils das 5.-6. Blatt 21 Tage alter *in vitro* gewachsener Keimlinge wurde abgetrennt und für das Experiment verwendet. Dabei bestand eine Probe aus fünf Blättern und es wurde der Mittelwert aus den Messungen von drei Proben gebildet. Insgesamt wurden fünf Bedingungen untersucht. Als Null-Kontrolle wurde der Chlorophyllgehalt direkt nach Abtrennen der Blätter bestimmt und entsprach 100%. Zudem wurde der Chlorophyllgehalt von Blättern bestimmt, welche nach dem Abtrennen auf destilliertem Wasser der BA-Konzentration 0 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M und 1,0 μ M BA für 10 Tage im Dunkeln inkubiert wurden. Dieser wurde mit dem Anfangschlorophyllgehalt verglichen.

2.9 Bestimmung der CKX-Enzymaktivität

Die CKX Enzymaktivität wurde standardmäßig mit iP als Substrat mittels einer colorimetrischen Methode bestimmt, bei der die gebildete Menge des abgespaltenen 3-Methyl-2-Butenal (siehe auch Abbildung 2 in der Einleitung unter Punkt 1.1.3) bestimmt wird. Dieses reagiert mit 4-Aminophenol zur Schiff'schen Base (4-Hydroxyphenylimino)-3-Methyl-2-Buten, welche bei 352 nm einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{352} = 15,2 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ hat (Libreros-Minotta und Tipton, 1995).

Das Gesamtprotein wurde aus Keimlingen oder Blattmaterial durch Mörsern in flüssigem Stickstoff und Homogenisierung in Extraktionspuffer (0,2 M Tris/HCl pH 8, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) gewonnen. Der Extrakt wurde bei 12.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand für die Messung verwendet. Die Arbeiten erfolgten auf Eis. Die enzymatische Reaktion erfolgte bei 37°C für 2 h oder über Nacht. 200 μ l Proteinextrakt wurden in ein Reaktionsvolumen von 600 μ l eingesetzt. Dieses bestand neben dem Proteinextrakt aus 10 μ l H₂O, 30 μ l 10 mM iP, 60 μ l 5 mM DCIP und 300 μ l 150 mM Tris/HCl pH 8. Als probenspezifische Null-Kontrolle wurde der gleiche Ansatz jeweils mit 30 μ l DMSO anstelle von 30 μ l iP durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 μ l 40% Trichloressigsäure gestoppt, unlösliche Partikel abzentrifugiert und 800 μ l des Überstandes mit 200 μ l 2% 4-Aminophenol, welches in 6% Trichloressigsäure gelöst war, versetzt. Die Absorption wurde über ein Spektrum von 300-700 nm in einer Quarzküvette jeweils gegen die probenspezifische Null-Kontrolle gemessen. Das Absorptionsmaximum bei 352 nm wurde zur Berechnung der entstandenen Menge 3-Methyl-2-Butenal bzw. der äquimolar gespaltenen Menge iP herangezogen und auf 1 mg Protein und 1 Sekunde bezogen (Frébort *et al.*, 2002).

2.10 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in Pflanzenextrakten wurde mit Bradford-Reagenz (BioRad) bestimmt (Bradford, 1976). 10 µl Proteinextrakt wurden mit 990 µl 1:4 verdünntem Bradford-Reagenz für 15 Minuten bei RT inkubiert und die OD bei 595 nm gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Eichgeraden, die aus verschiedenen Konzentrationen (0,2 – 2,0 mg/ml) BSA erstellt wurde, errechnet.

2.11 Cytokininmessung

Die Messung der Cytokininkonzentration von ganzen sechs Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen wurde von O. Novak in der Palacký Universität Olomouc (Tschechische Republik) durchgeführt. Es wurden je Genotyp drei biologische Replikate von je 1 g Frischgewicht (FG) gemessen. Die Behandlung der Proben und die Messung erfolgten wie in Novak *et al.* und Riefler *et al.* beschrieben (Novak *et al.*, 2003; Riefler *et al.*, 2006).

2.12 Identifizierung und Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten

Die Auswahl der T-DNA-Insertionslinien (siehe auch Punkt 2.4.1) und der genomischen Primer zur Amplifikation der die Insertion flankierenden Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Datenbank SIGnAL T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Einen Überblick der ausgewählten Linien ist in Tabelle 9 im Anhang gezeigt und die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Position der T-DNA wurde der Datenbank entnommen und war Grundlage für die Auswahl der Primer zur Bestätigung der Angaben über die Position der T-DNA. Zum Nachweis der T-DNA im Genom wurde eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, von dem ein Primer homolog zur Sequenz des zu untersuchenden Gens war (RP) und der andere Primer homolog zur Sequenz der T-DNA (BP). Der RP wurde maximal 700 bp entfernt von der vorhergesagten Insertionsstelle ausgewählt und war abhängig von der Orientierung der T-DNA im Genom entweder in 5' oder 3' Richtung des Gens orientiert, sodass die Leserichtung des Primers zur *Left Border* (LB) der T-DNA orientiert war. Dieser Primer wurde nach Vorgabe der Nomenklatur von SIGnAL T-DNA Express unabhängig von seiner Leserichtung mit RP (right primer) im Namen bezeichnet, sodass der genspezifische RP-Primer zum Nachweis der T-DNA jeweils mit dem T-DNA-spezifischen Primer (BP) kombiniert wurde. Der T-DNA-spezifische Primer war am Ende der T-DNA nahe der LB (ca. 380 bp vor T-DNA Ende) lokalisiert und zum 5' Ende der LB orientiert. So konnte eine ungefähre Größe des zu erwartenden Amplifikates ermittelt werden. Dieses bestand demnach aus einer chimären Sequenz, die einen Teil des zu untersuchenden Gens und einen Teil der LB der T-DNA enthielt. Konnte in der PCR ein solches Amplifikat gebildet werden und entsprach dieses der erwarteten Größe, war das die Bestätigung, dass eine T-DNA in dieses Gen an der getesteten Stelle inseriert war.

Zur Genotypisierung von T-DNA-Insertionsmutanten wurde eine zweite PCR mit Primern, die die Insertion flankieren, durchgeführt. Der jeweilige genspezifische RP, der auch in der ersten Reaktion

verwendet wurde, wurde nun mit einem zweiten genspezifischen Primer (LP, left primer) in einer PCR Reaktion kombiniert. Der LP war jeweils in entgegengesetzter Leserichtung zum RP auf der anderen Seite der Insertion positioniert, sodass die eingeschlossene genomische Sequenz etwa 1000 bp betrug. Konnte in dieser PCR ein Amplifikat gebildet werden und entsprach der Größe der Sequenz zwischen den Primern ohne die T-DNA mitzurechnen, war an dieser Stelle keine T-DNA ins Gen inseriert. In einer PCR mit einer Elongationszeit von weniger als vier Minuten und mit einer *Taq*-DNA-Polymerase können keine Amplifkate, die länger als 4 kb sind, gebildet werden. Die Länge der Sequenz zwischen den Primern betrug jedoch, wenn eine T-DNA im Gen inseriert war mehr als 4-5 kb. Entsteht also in einer solchen PCR Reaktion kein Amplifikat, so ist vermutlich, wenn kein technischer Fehler vorliegt, an der untersuchten Stelle im Genom eine T-DNA inseriert. Erst die Auswertung beider PCRs gibt Aufschluss über das Vorhandensein und die Orientierung einer T-DNA am untersuchten Genort und zusätzlich darüber ob die Insertion homozygot oder heterozygot vorliegt. Kann in beiden PCRs ein Amplifikat gebildet werden, ist die untersuchte Pflanze heterozygot und enthält die T-DNA in einem Allel des Gens. Kann nur in der PCR mit den Primern BP und RP ein Amplifikat gebildet werden, ist die untersuchte Pflanze homozygot und trägt in beiden Allelen des Gens eine T-DNA. Umgekehrt kann in WT Pflanzen nur in der PCR mit LP und RP einen Amplifikat erhalten werden.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 DNA Extraktionen

2.13.1.1 Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzen

Genomische DNA aus *Arabidopsis* wurde mittels der CTAB-Methode (Weigel und Glazebrook, 2002) gewonnen, wenn die DNA zur PCR-Amplifikation von Sequenzen und anschließender Klonierung unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit Korrekturfunktion (*proofreading* anhand einer 3'→5' Exonuklease-Funktion) verwendet wurde.

100-500 mg Blattmaterial (-80°C) wurden mittels eines Pistills im 1,5 ml Reaktionsgefäß oder in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver zermahlen. Das Pulver wurde für 30 Minuten in 400 µl 65°C warmen Extraktionspuffer (100 mM Tris/Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 1% PVP) inkubiert, anschließend mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und kräftig gemischt. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit wurde die wässrige Oberphase in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt, erneut zentrifugiert und die wässrige Oberphase in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,7 Volumen Isopropanol 10 Minuten bei RT gefällt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei RT und maximaler Geschwindigkeit wurde die pelletierte DNA mit

70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/Cl pH 8, 1 mM EDTA) resuspendiert (Sambrook *et al.*, 1989; Weigel und Glazebrook, 2002).

Eine Schnellpräparation wurde zur Gewinnung kleiner Mengen DNA durchgeführt, dessen Reinheit ausreichend für eine Standard-PCR war und die die parallele Extraktion vieler Proben möglich machte. Dazu wurde 100 mg Blattmaterial in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zusammen mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/Cl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) und einem Stahlkugelchen (ca. 1,5 mm Durchmesser) bei RT in einer Reetsch-Mühle bei 30 U/Min für 2 Minuten aufgeschlossen. Wenn nötig wurde der Extraktionspuffer ohne SDS verwendet und dieses erst nach dem Aufschluss dem Ansatz zugefügt, um zu starkes Schäumen der Probe zu verhindern. Die Probe wurde mittels Vortex gut gemischt und 5 Minuten bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen Isopropanol gemischt und die DNA durch 5 Minuten Zentrifugation bei RT und maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Die pelletierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert (Weigel und Glazebrook, 2002).

2.13.1.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien – Miniprep

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte nach dem Standardprotokoll der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Es wurden 2 ml einer ÜN-Kultur verwendet. Zur Aufreinigung der DNA vor Sequenzierungen wurde zusätzlich das Reaktionskit „E.N.Z.A. Cycle-Pure-Kit“ (Peqlab) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Isolation von Plasmiden aus *A. tumefaciens* erfolgte ebenso auf der Basis des Standardprotokolls der alkalischen Lyse mit den folgenden Anpassungen:

Es wurden 6 ml einer 2-Tage-Kultur verwendet, welche in drei Proben aufgeteilt bearbeitet wurde. Die gewonnene DNA wurde am Schluss vereinigt, um ausreichende Mengen für Restriktionsanalysen zu erhalten.

Die Agrobakterien aus 2 ml einer 2-Tage-Kultur wurden pelletiert und das Pellet zunächst in 150 mM NaCl resuspendiert und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 300 µl kaltem Puffer1 (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/Cl ph 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (20 mg/ml) wurde die Suspension 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) zugefügt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer3 (100 ml = 60 ml 5 M Kaliumacetat+11,5 ml Eisessig+28,5 ml H₂O) und Invertieren wurde für 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) gut gemischt, 5 Minuten zentrifugiert und 800 µl des Überstands erneut wie im Schritt zuvor behandelt. Der resultierende

Überstand wurde mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gut gemischt und nach 5 Minuten Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 300 µl Isopropanol versetzt. Nach 10 Minuten auf Eis wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O resuspendiert. 10 µl wurden für Restriktionsanalysen eingesetzt.

2.13.2 Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA

2.13.2.1 Restriktionsanalysen

Restriktionsanalysen zur Überprüfung von Plasmiden wurden in 20 µl Ansätzen durchgeführt. 5 µl einer Plasmid Miniprep (Punkt 2.13.1.2) (10 µl bei *A. tumefaciens*) wurden eingesetzt und 10 U Restriktionsenzym verwendet. Folgender allgemeiner Ansatz wurde verwendet:

Plasmid-DNA	5 µl (8-10 µl bei Plasmiden aus <i>A. tumefaciens</i>)
spezifischer 10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O ad	20 µl

In der Regel wurden Restriktionsenzyme von der Firma Fermentas verwendet und die mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Restriktionsenzyme hatten alle eine Konzentration von 10 U/µl. Die Restriktion erfolgte für 1 Stunde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Bei Restriktionen mit mehreren Enzymen wurde entweder ein Puffer des Herstellers verwendet, in dem beide Enzyme eine mindestens 80%-ige Effizienz aufwiesen oder alternativ die Restriktionen separat durchgeführt und zwischen beiden Reaktionen der Ansatz durch Natriumacetat/Ethanol-Fällung gereinigt.

Zur Linearisierung von Plasmiden, die für eine Ligation eingesetzt werden sollten, wurde eine besonders intensive Restriktion durchgeführt. Dazu wurde an eine erste Reaktion von 1 h eine zweite Reaktion angeschlossen. Zum Ansatz (20 µl, siehe oben) wurden nach der Inkubation folgende Substanzen hinzugefügt:

spezifischer 10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H ₂ O ad	40 µl

Dieser Ansatz wurde eine weitere Stunde inkubiert und die Enzyme anschließend durch Erhitzen auf 80°C für 15 Minuten inaktiviert. Wenn nötig wurden die Fragmente mittels präparativem Agarosegel getrennt.

2.13.2.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Linearisierte Plasmide, die für eine Ligation eingesetzt werden sollten, wurden dephosphoryliert. Folgender genereller Ansatz wurde verwendet:

Restriktionsansatz	(ca. 40 µl)
<i>CIAP</i> (1 U/µl)	1 µl
<i>CIAP</i> Verdünnungspuffer	4 µl

Dieser Ansatz wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die *CIAP* bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Das dephosphorylierte Plasmid wurde anschließend mittels „E.N.Z.A. Cycle-Pure-Kit“ (Peqlab) nach Hestellerangaben gereinigt.

2.13.2.3 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Einzelstrangüberhängen (*sticky ends*) wurde die *T4-DNA-Ligase* (Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde in der Regel etwa die 3-fache Menge des Inserts wie des Vektors verwendet. Eine Ligrationsreaktion wurde in einem 20 µl Ansatz mit 1 U *T4-DNA-Ligase* bei 16°C ÜN durchgeführt. Die Gesamtmenge an DNA einer Ligrationsreaktion betrug wenn möglich nicht mehr als 100 ng.

Zur Integration von PCR-Produkten mit A-Überhängen in Klonierungsvektoren (z. B. pCR[®]-2.1-TOPO[®] oder pCR[®]-XL-TOPO[®]) für die Vermehrung in Bakterien oder die Sequenzierung wurde ein TOPO-TA-Klonierungskit (Invitrogen) nach Hestellerangaben verwendet.

2.13.3 Herstellung und Transformation elektrokompenter Bakterien

2.13.3.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden elektrokompente *E. coli* und *A. tumefaciens* nach Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989) mit folgenden Anpassungen hergestellt. Alle Angaben für *E. coli* zur ÜN Kulturen bei 37°C wurden bei *A. tumefaciens* bei 28°C für 2 Tage durchgeführt. Die Effizienz dieser Transformationsmethode liegt in der Regel für *E. coli* bei ca. 10⁹ Transformanden pro µg eingesetzter DNA. Ein frischer Ausstrich aus der Dauerkultur eines Bakterienstammes (Tabelle 1) wurde zunächst auf LB-Agar-Medium (Punkt 2.5.1) angesetzt und bei 37 °C ÜN inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in eine 50 ml Vorkultur angeimpft und ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit 25 ml der Vorkultur wurde eine Kultur von 500 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ 0,3 – 0,4 inkubiert. Nach sofortigem Abkühlen des Erlenmeyerkolben im Eisbad für 20 Minuten wurden die Bakterien durch 15 Minuten Zentrifugieren bei 4 °C und 10.000 x g pelletiert. Alle Resuspendierungen erfolgten vorsichtig mit weiten Glaspipetten. Die Bakterien wurden in 500 ml eiskaltem H₂O (bidest., steril) resuspendiert, gewaschen und erneut für 20 Minuten bei 4°C und 1000 x g pelletiert. Dieser Schritt wurde

anschließend jeweils einmal mit 250 ml und einmal mit 10 ml eiskaltem 10% Glycerin wiederholt. Das abschließende Pellet wurde in 2 ml 10 % Glycerin resuspendiert, in 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.13.3.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Für die Elektroporation muss DNA frei von Salzen, RNA und Proteinen sein. Dazu wurde die DNA wenn nötig zuvor durch Natriumacetat-Ethanol-Fällung (siehe Punkt 2.13.5.3) gereinigt.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 1µl einer klassischen Plasmid-Miniprep wurde mit den Zellen vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert, während die Elektroporationsküvette im Eis vorgekühlt wurde. Der Mix wurde in die Elektroporationsküvette überführt und der Spannungspuls bei einer Voltstärke, abhängig von der Spaltbreite der Küvette (bspw. 1 mm-1,8 kV), für 5 ms ausgeführt. Zur Suspension in der Küvette wurden sofort 500 µl SOC-Medium (Punkt 2.5.1) gegeben, die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C für 1 h (*E. coli*) bzw. bei 28°C für 2-4 h (*A. tumefaciens*) inkubiert. Verschiedene Verdünnungsstufen wurden auf LB-Agar-Medium mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert und bei 37°C ÜN (*E. coli*) bzw. bei 28°C für 2 Tage (*A. tumefaciens*) inkubiert.

2.13.4 Polymerase-Kettenreaktion - PCR

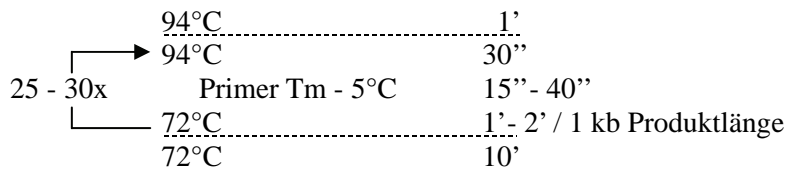
Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde standardmäßig zum einfachen Nachweis einer T-DNA (Punkt 2.12) oder eines Transgens im Genom von *Arabidopsis* oder in Plasmiden aus Bakterien mit der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Zur Amplifikation von genomischen Sequenzabschnitten zur Klonierung wurde die DNA-Polymerase Bio-X-Act (Bioline), die eine Korrekturfunktion (*proofreading* mittels 3'->5' Exonuklease-Funktion) besitzt, verwendet.

PCR-Ansatz mit Bio-X-Act-Polymerase

DNA	2,0 µl
Primer f (15 µM)	3,3 µl
Primer r (15 µM)	3,3 µl
dNTP's (je 5 mM)	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl
10x Opti-Puffer	5,0 µl
Bio-X-Act	1,0 µl
H ₂ O ad	50 µl

PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase

DNA (1 pg-1 µg)	1,0 µl
Primer f (15 µM)	1,0 µl
Primer r (15 µM)	1,0 µl
dNTP's (je 5 mM)	0,8 µl
MgCl ₂ (100 mM)	0,4 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer	2,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1,0 µl
H ₂ O ad	20 µl

Standard-PCR-Programm

2.13.5 Aufreinigung, Quantifizierung und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

2.13.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe (z. B. PCR-Produkte oder Fragmente einer Restriktionsanalyse), zur Qualitätsbestimmung von DNA- und RNA-Präparationen sowie zur Quantifizierung wurde die Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Apparaturen durchgeführt. Die verwendeten Gele hatten je nach Größe der zu trennenden Fragmente einen Agarosegehalt von 0,8-3%. Es wurden standardmäßig Gele in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA pH 8) verwendet. Die Auftrennung erfolgte abhängig von der Größe der Apparatur und der zu trennenden Fragmente bei 70 - 100 V und für 30-90 Minuten. Als Größen- und Mengenstandard wurde Hyperladder I (Bioline) verwendet. Die Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid versetzt, welches bei 320 nm fluoresziert und durch Interkalieren in Nukleinsäuren die Position im Gel nach Belichtung mit UV-Licht sichtbar macht. Die Gele wurden mittels eines UV-Tisches und einer digitalen Kamera dokumentiert.

Für analytische Gele wurden der Agarose 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

Für präparative Gele wurde der Agarose 0,05 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die am UV-Tisch identifizierten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels des „QIAEX II“-Kits (Qiagen) aus dem Gel isoliert.

2.13.5.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Neben der Mengenbestimmung mittels Agarosegel wurde die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. Die Konzentration wurde nach den spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Nukleinsäuren berechnet, dabei ist die $OD_{260} = 1$ bei 40 µg/ml doppelsträngiger DNA und 50 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA. Die Reinheit wurde anhand des Verhältnisses der Extinktionswerte bei 260 und 280 sowie 260 und 230 bestimmt. Bei einem Verhältnis $260/280 > 1,8$ ist die Probe ausreichend frei von Proteinkontaminationen. Bei einem Verhältnis $260/230 > 2,5$ ist die Probe ausreichend frei von Oligosaccharidkontaminationen.

2.13.5.3 Natriumacetat-Ethanol-Fällung

Um Nukleinsäure-Lösungen von Salzen und anderen Inhibitoren für Folgeexperimente zu reinigen, wurden diese standardmäßig einer Natriumacetat-Ethanol-Fällung unterzogen. In Gegenwart

monovalenter Kationen bildet DNA und RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag. Das mit dem Alkohol und der Nukleinsäure gefällte Salz löst sich im Gegensatz zur DNA/RNA beim Waschen mit 70 % Ethanol.

Die DNA/RNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, 2,5 Volumen Ethanol absolut hinzugefügt und gut gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurde die DNA/RNA bei 13000 x g für 20 Minuten bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die DNA/RNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach vollständiger Entfernung des Überstands gut getrocknet. Die DNA/RNA wurde anschließend je nach Konzentrationsanforderung in 4-100 µl sterilem H₂O gelöst.

2.13.5.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Säulenausschlusschromatographie

DNA-Lösungen (z. B. PCR-Produkte oder Fragmente einer Restriktionsanalyse) wurden mittels des „E.N.Z.A. Cycle-Pure-Kit“ (Peqlab) nach Herstellerangaben gereinigt.

RNA-Lösungen aus Präparationen wurden für besonders sensitive Folgeanwendungen (z. B. der qRT-PCR) mittels des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) gereinigt und direkt im gleichen Verfahren einer integrierten DNase-Behandlung unterzogen.

2.13.6 RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Extraktion von RNA aus *Arabidopsis* Keimlingen wurde die TRIzol Methode verwendet. Die verwendeten Reagenzien und Arbeitsschritte erfolgten in Anlehnung an das Protokoll in (Weigel und Glazebrook, 2002). Alle Reagenzien wurden mit sterilem, bidestilliertem H₂O angesetzt, eine DEPC-Behandlung erfolgte nicht.

TRIzol-Reagenz (5ml)

1,9 ml	Phenol
500 µl	4 M Ammoniumthiocyanat
1000 µl	4 M Guanidinthiocyanat
500 µl	50% Glycerin
16,6 µl	3 M Natriumacetat, pH 5
ad 5 ml	mit H ₂ O bidest.

Etwa 200 mg Keimlinge (in der Regel 7 DAG) wurden in flüssigem Stickstoff mittels eines Mörsers zu feinem Pulver zermahlen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1000 µl TRIzol-Reagenz gut durch Vortexen gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden die Zellreste bei 16.000 x g für 5 Minuten bei 4°C pelletiert und der Überstand in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Die Probe wurde kräftig per Hand geschüttelt und nach 5 Minuten Inkubation bei RT erneut für 15 Minuten bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. 700 µl der

wässrigen Oberphase wurde in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß mit 350 µl Isopropanol und 350 µl Hochsalzlösung (1,2 M NaCl, 800 mM Natriumcitrat) durch Invertieren gemischt. Im Anschluss an 10 Minuten Inkubation bei RT wurde die RNA durch Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C für 10 Minuten pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 700 µl 75% Ethanol gewaschen, gut getrocknet und in 30-40 µl sterilem, bidestilliertem H₂O gelöst. Die Qualität und Quantität wurde anhand eines analytischen 1% Agarosegel und durch photometrische Messung (siehe Punkt 2.13.5) bestimmt.

2.13.7 Semiquantitative RT-PCR

Der Mengenvergleich spezifischer Transkripte im Gesamtpool verschiedener RNA-Extraktionen wurde üblicherweise mittels *Northern Blot*-Analyse durchgeführt, da bei dieser Methode eine direkte Abbildung der mRNA-Menge ohne eine Amplifikation erfolgt. Bei gering exprimierten Transkripten, die mittels dieser Methode nicht detektierbar sind, wurde eine reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) durchgeführt.

Die semiquantitative RT-PCR wurde mittels eines Ein-Schritt-Reaktionskits durchgeführt (One-Step-RT-PCR Kit, Qiagen), in dem in einem einzigen Reaktionsansatz die reverse Transkription (durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) und anschließend die Amplifikation (durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase) durchgeführt werden. Es wurden 0,5 µg Gesamt-RNA (Punkt 2.13.6) in einen 25 µl RT-PCR-Ansatz eingesetzt und die Reaktion nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde zuvor einer DNase-Behandlung (Punkt 2.13.7.1) unterzogen. Die reverse Transkription erfolgt mit genspezifischen Primern (Tabelle 12), sodass nur spezifische Abschnitte der mRNA in cDNA überschrieben wurden. Die gleichen Primer dienen im gleichen Ansatz der PCR-Amplifikation.

Unter der Annahme, dass die Amplifikation der gleichen Zielsequenz in verschiedenen Proben nahezu gleich effizient abläuft, wurde das Mengenverhältnis der DNA nach der PCR gleich gesetzt dem Mengenverhältnis vor der PCR und somit gleich dem Verhältnis der Ausgangsmengen spezifischer mRNA im Gesamtpool der RNA. Die DNA-Mengen wurden während der exponentiellen Phase der PCR bestimmt und dafür für jede spezifische Zielsequenz und das zugehörige Primerpaar die optimale Zykluszahl ermittelt. Die DNA-Mengen verschiedener Proben wurden durch Vergleich der Signalstärke der Banden im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel ermittelt, in dem die PCR-Produkte aufgetrennt wurden.

Zur Überprüfung gleicher Ausgangsmengen eingesetzter Gesamt-RNA wurde als Kontrolle jede RNA-Probe auch in einer RT-PCR mit Primern für das Gen *ACTIN2* eingesetzt. *ACTIN2* ist ein kaum reguliertes Gen und hat eine Funktion bei der Cytoskelettbildung. Deshalb wird es immer gleich stark exprimiert und eignet sich sehr gut als Kontrolle (An *et al.*, 1996).

2.13.7.1 DNase Behandlung

RNA Präparationen wurden zur Verwendung in RT-PCR Experimenten einer DNase-Behandlung unterzogen. Dazu wurde die DNase I (1 u/µl, Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet. 1 µg RNA wurden zusammen mit 1 µl 10x Puffer und 1 µl DNase in einem 10µl Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und Inkubation für 10 Minuten bei 65°C gestoppt.

2.13.8 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde in einem Zwei-Schritt-Verfahren durchgeführt. Zunächst wurde die RNA in einer Erststrangsynthese vollständig (nicht sequenzspezifisch wie bei der sRT-PCR im Ein-Schritt-Verfahren) in cDNA überschrieben (Punkt 2.13.8.1). Anschließend wurde diese cDNA in eine quantitative PCR eingesetzt, die durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen eine Mengenbestimmung der DNA in Echtzeit (Real Time) in jedem Zyklus möglich machte. Daraus konnte das relative Verhältnis der genspezifischen cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben zu Beginn der Reaktion und damit das Verhältnis vorhandener genspezifischer mRNA berechnet werden.

2.13.8.1 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurden je nach verfügbarer Konzentration der DNA-freien RNA-Proben (siehe Punkte 2.13.5.4 und 2.13.6) zwischen 2,5 und 5 µg Gesamt-RNA unter Einhaltung des maximalen Reaktionsvolumens eingesetzt. Dabei wurde von den Proben einer biologischen Vergleichsgruppe jeweils die gleiche RNA-Menge zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit gebildeter cDNA-Mengen eingesetzt.

Die cDNA Synthese wurde mit der reversen Transkriptase SuperscriptIIITM (Invitrogen) nach Herstellerempfehlung mit folgender Abweichung durchgeführt: Es wurden als Primer Oligo(dT)₂₀ (2,5 µM Endkonzentration) und Random-N9 (250 nM Endkonzentration) in einer Mischung verwendet, um zu gewährleisten, dass die RNA-Moleküle über die gesamte Länge in gleicher Menge in cDNA überschrieben werden.

2,5 – 5 µg RNA wurden mit 1,8 µl Random-N9, 1 µl Oligo(dT)₂₀ und 2 µl dNTP's (je 5 mM) auf 13 µl mit H₂O aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde sofort 1 Minute auf Eis gekühlt und 5µl 5x Erststrang-Puffer, 1µl DTT (0,1 M), 1µl RNase-out (Invitrogen) sowie 1 µl SuperscriptIIITM zugefügt. Dieser 20 µl Ansatz wurde gemischt und in einem Thermocycler folgender Reaktionsfolge unterzogen: 5 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 50°C und abschließend 15 Minuten bei 70°C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.13.8.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt und die Rohdaten mit der Software 7500 V2.0.1 ausgewertet. Als fluoreszierender Farbstoff zur Mengenbestimmung doppelsträngiger DNA wurde SYBR Green (Biochemika) und zur Korrektur von Varianzen in der Fluoreszenz-Basislinie aufgrund materialabhängiger Schwankungen in der 96-er Mikrotiterplatte wurde ROX (Sigma) verwendet. Jede Probe wurde standardmäßig neben den Primern zur Untersuchung individueller Kandidatengene (Tabelle 12) auch mit Primern zur Amplifikation einer internen Referenzsequenz simultan analysiert. Als interne Referenz wurde die Amplifikation von *UBC10* (At5g53300) als stabil exprimiertem Haushaltsgen durchgeführt und die Transkriptmengen der Kandidatengene zur Transkriptmenge von *UBC10* normalisiert, sodass Unterschiede in der eingesetzten Ausgangsmenge der cDNA verrechnet wurden. Jede Probe wurde in Triplikaten analysiert. Alle Primerpaare wurden getestet und die verwendete Endkonzentration zur Eliminierung möglicher Primerdimere optimiert. Als DNA-Polymerase wurde die Immolase (Bioline) verwendet, die durch Kopplung an einen Antikörper eine Hot-Start-PCR ermöglicht, durch welche das Auftreten unspezifischer Primerdimere deutlich reduziert werden konnte. Je nach eingesetzter Ausgangsmenge RNA in die cDNA Synthese wurden 0,3-0,8 µl des 20 µl cDNA Synthese-Ansatzes (Punkt 2.13.8.1) wie folgt in die qualitative PCR eingesetzt:

Standardansatz einer qualitativen PCR

0,2-0,8 µl	der cDNA Synthese
0,4 µl	dNTP's (je 5 mM)
0,2 µl	SYBR Green
0,8 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,04 µl	ROX (25 µM)
2,0 µl	10x Immolase-Puffer
0,04 µl	Immolase (5 u/µl)
1,0 µl	Primer f (75 – 300 nM Endkonz.)
1,0 µl	Primer r (75 – 300 nM Endkonz.)
ad 20 µl	H ₂ O

Standard-Programm der qualitativen PCR

	95°C	15'	Aktivierung Immolase
	95°C	15''	Denaturierung
50x	55°C	15''	Primer-Annealing
	72°C	15''	Elongation
	95°C	1'	Denaturierung
	60°C	1'	Schrittweise
			Erhöhung zur
			Aufnahme der
			Schmelzkurve
	95°C	30''	

2.13.9 Northern Blot-Analyse

Die Northern Blot-Analyse wurde in Anlehnung an das Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.13.9.1 RNA-Gel und Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

20 µg einer Gesamt-RNA-Präparation (in maximal 15 µl) (Punkt 2.13.6) wurden mit einem gleichen Volumen 2x RNA-Ladepuffer (Fermentas) vermischt, für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die RNA wurde mittels eines ethidiumbromidhaltigen Agarose-Formaldehyd-Gels (1,5% Agarose, 2,1 M Formaldehyd, in 1x MOPS) für 5-6 Stunden bei 60 V in 1x MOPS Laufpuffer

(10x MOPS: 0,2 M MOPS pH 7, 20 mM NaAc, 10 mM EDTA pH 8) aufgetrennt, bis die Bromphenolbande etwa 8 cm weit gelaufen war. Als Größenstandard wurde die „RNA Ladder – High Range“ (Fermentas) verwendet. Das Gel wurde zusammen mit einem Lineal am UV-Tisch fotografiert. Die Übertragung der RNA auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond NX, GE Healthcare) erfolgte ÜN mittels des aufwärtsgerichteten Kapillartransfer bei neutralem pH in 10x SSC Puffer (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat; pH 7,4) nach dem Protokoll in (Sambrook *et al.*, 1989). Die Waschschrte des Gels und der Membran in H₂O bzw. SSC wurden nicht durchgeführt. Die RNA wurde durch Backen für 2 Stunden bei 80°C oder alternativ durch „Crosslinken“ mittels UV-Bestrahlung im Stratalinker (Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde trocken bei RT bis zur Hybridisierung gelagert

2.13.9.2 Northern-Hybridisierung

Die Membran wurde in ca. 20 ml Hybridisierungslösung (0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA) bei 68°C vorhybridisiert. Zur Absättigung der Membranbereiche, an die keine RNA gebunden hat, wurden je ml Hybridisierungslösung 10 µl Heringsspermien-DNA (10 mg/ml) während der Vorhybridisierung zugefügt. Nach einer Stunde Vorhybridisierung wurde zum gleichen Ansatz direkt die mittels ³²P radioaktiv markierte DNA-Sonde (Punkt 2.13.9.3) zugefügt und ÜN unter Rotation bei 68°C hybridisiert.

Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurde die Membran jeweils 20-30 Minuten bei 68°C mit Waschlösung I (2x SSC, 0,1% SDS) und anschließend mit Waschlösung II (0,2x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie. Die Membran wurde dazu in Frischhaltefolie einem Röntgenfilm (Kodak X-O-Mat) in einer Filmkassette exponiert. Die Exposition erfolgte je nach Stärke des Signals ÜN bis zu mehreren Tagen bei -70°C. Alternativ erfolgte die Detektion der radioaktiven Signale mittels Scannen in einem Phosphorimager.

2.13.9.3 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Die sequenzspezifische, radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde mit dem „Prime-it II“-Random-Primer-Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben hergestellt. Die Verlängerung von sequenzunspezifischen Hexamer-Oligonukleotiden erfolgte dabei unter Einbau von [α -³²P]dCTP. Die Sonde wurde von nicht eingebauten Nukleotide über eine Sephadex G-50 Säule (Nick Columns, Pharmacia) durch Ausschlusschromatographie gereinigt. Als DNA-Vorlage diente ein sequenzspezifisches cDNA-Fragment, welches aus RNA mittels semiquantitativer RT-PCR (Punkt 2.13.7) hergestellt wurde. Das cDNA Fragment wurde mittels eines präparativen Agarosegels gereinigt (Punkt 2.13.5).

2.13.10 Klonierungsstrategien

Im Folgenden wird die Vorgehensweise bei der Klonierung der in dieser Arbeit erstellten Vektoren (Vektorkarten siehe Anhang) für die Transformation und die stabile Expression in Pflanzen erläutert. Folgende Vorgehensweise wurde für alle Kandidatengene angewendet:

Das untersuchte Gen wurde etwa vom jeweiligen Translationsstart bis zum Translationsstopp (ohne UTR-Bereiche) aus dem *Arabidopsis* Genom mittels PCR amplifiziert. Die Position des Translationsstarts und -stopps wurde ebenso wie alle weiteren Sequenzinformationen von der *Arabidopsis Information Ressource* (TAIR) (Huala *et al.*, 2001) bezogen. Zur Amplifikation wurde die DNA-Polymerase Bio-X-Act (Bioline), die eine Korrekturfunktion (*proofreading* mittels 3'->5' Exonuklease-Funktion) besitzt, verwendet. Die Bio-X-Act fügt bei der Synthese A-Überhänge an die Sequenz an. Die PCR-Produkte konnten daher leicht mittels einer TOPO-TA-Klonierung (Punkt 2.13.2.3) in einen TOPO-TA-Klonierungsvektor (Tabelle 2) integriert werden. In diesem Vektor wurden die Gensequenzen durch Sequenzierung auf Fehler überprüft und nach deren Ausschluss subkloniert. Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide enthielten Sequenzüberhänge (in der Oligonukleotidsequenz kleingeschrieben), wodurch Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme (in der Oligonukleotidsequenz unterstrichen) an die PCR Produkte angefügt wurden. Über diese Restriktionsschnittstellen wurden die PCR Produkte gerichtet aus dem jeweiligen TOPO-Vektor in einen geeigneten binären Pflanzenvektor (Tabelle 2) subkloniert. Die so konstruierten Plasmide wurden zunächst in *E. coli* transformiert (Punkt 2.13.3.2) und positive Transformanten auf kanamycinhaltigem LB-Medium selektiert. Die identifizierten Klone wurden mittels Restriktionsanalyse nochmals überprüft und die Plasmide dann in *A. tumefaciens* transformiert. Mit diesen *Agrobacterium*-Stämmen wurde *Arabidopsis* durch die *floral-dip*-Infiltrationsmethode und Tabakpflanzen durch die Infiltration von Blattextplantaten transformiert (Punkt 2.6) und die Primärtransformanten auf geeignetem Antibiotika-haltigen Medium *in vitro* selektiert.

pGPTV-BAR-CKX7:GUS

pGPTV-BAR-CKX7:GUS wurde bereits in der Diplomarbeit (Köllmer, 2004) hergestellt. Der Promotor von *CKX7* wurde aus genomischer DNA mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert:

pCKX7SmaI5'-f 5' cgcccggggTTTTCTACTGGAACAACACAATTTTT 3'
 pCKX7SmaI3'-r 5' cgcccggggTGTGTGATTGTGTGTAAATGCTAAAT 3'

Das Fragment wurde nach *SmaI* bzw. *Cfr9I* Restriktion ungerichtet in den Vektor pGPTV-BAR vor das *GUS* Gen kloniert. Die Orientierung wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft.

pBinHygTx-35S:CKX7

pBinHygTx-35S:CKX7 wurde bereits in der Diplomarbeit (Köllmer, 2004) hergestellt. Die genomische Sequenz von *CKX7* wurde vom Start-Codon bis zum Stopp-Codon mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert:

L1/*KpnI*-f 5' cggggtaccACACACACACCAAAATGATAGCTT 3'
L2/*SalI*-r 5' cgggtcgacAATATGAGGGGTCAAAGAGACCTA 3'

Das Fragment wurde gerichtet nach *KpnI* / *SalI* Restriktion hinter den 35S Promotor in den ebenso geschnittenen Vektor pBinHygTx kloniert.

pBinHygTx-35S:CKX7-GFP

Die genomische Sequenz von *CKX7* wurde mit den folgenden Oligonukleotiden amplifiziert:

L1/*KpnI*-f 5' cggggtaccACACACACACCAAAATGATAGCTT 3'
CKX7-Stop/*XhoI*-r 5' gcctcgagAGAGACCTATTGAAAATC 3'

Die kleingeschriebene Sequenz ist nicht homolog zur genomischen Sequenz und führt während der PCR zum Anfügen einer Restriktionsschnittstelle (unterstrichene Sequenz) für *KpnI* an das 5'-Ende der kodierenden Sequenz und einer Restriktionsschnittstelle für *XhoI* an das 3'-Ende. Dabei wurde das Stopp-Codon von *CKX7* nicht amplifiziert und durch den Primer stattdessen ein Basentriplett für Serin angefügt. Durch Ligation des *KpnI* / *XhoI* geschnittenen PCR Produktes mit dem ebenso geschnittenen Vektor pbinSMGFP (Werner *et al.*, 2003) entstand das Fusionsgen *CKX7-GFP* welches im Vektor pBinHygTx-35S:CKX7-GFP unter der Kontrolle des 35S Promotors steht (Vektorkarten siehe Anhang).

pROK2-35S:HAT4

Die Sequenz von *HAT4* wurde aus genomischer DNA von *Arabidopsis* mit den folgenden Oligonukleotiden amplifiziert und mittels TOPO-TA Klonierung in den Klonierungsvektor pCR[®]XL TOPO[®] integriert:

HAT4_5' *XbaI* 5' tctagagTCTTGAGAAAGTTCAACAGAAGATG 3'
HAT4_3' *KpnI* 5' ggtaccaTGCCCTTTGGTTGCAAGT 3'

Nach Restriktion mit *XbaI* und *KpnI* wurde *HAT4* in pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986) subkloniert.

pROK2-35S:HAT22

Die Sequenz von *HAT22* wurde aus genomischer DNA von *Arabidopsis* mit den folgenden Oligonukleotiden amplifiziert und mittels TOPO-TA Klonierung in den Klonierungsvektor pCR[®]XL TOPO[®] integriert:

HAT22_5' *Xba*I 5' tctagaGAAAATTCAAATGGGTCTTGATG 3'
 HAT22_3' *Kpn*I 5' ggtaccTTTTTCCCTGGGATTTATCTTC 3'

Nach Restriktion mit *Xba*I und *Kpn*I wurde *HAT22* in pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986) subkloniert.

pROK2-35S:GATA22

Die Sequenz von *GATA22* wurde aus genomischer DNA von *Arabidopsis* mit den folgenden Oligonukleotiden amplifiziert und mittels TOPO-TA Klonierung in den Klonierungsvektor pCR[®]XL TOPO[®] integriert:

GATA_5' *Xba*I 5' tctagaAGATCTCTATCGGTCATGGGTTC 3'
 GATA_3' *Kpn*I 5' ggtaccTTTTATTCTTAAGCATGCGAGTT 3'

Nach Restriktion mit *Xba*I und *Kpn*I wurde *GATA22* in pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986) subkloniert.

pROK2-35S:bHLH64

Die Sequenz von *bHLH64* wurde aus genomischer DNA von *Arabidopsis* mit den folgenden Oligonukleotiden amplifiziert und mittels TOPO-TA Klonierung in den Klonierungsvektor pCR[®]XL TOPO[®] integriert:

bHLH64_5' *Bam*HI 5' ggtaccGCAGAGAACAATATGTTGGAAGG 3'
 bHLH64_3' *Kpn*I 5' ggtaccCATGTTGTTTCAATGAATCTTGC 3'

Nach Restriktion mit *Bam*HI und *Kpn*I wurde *GATA22* in pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986) subkloniert.

2.14 Lichtmikroskopie und verwendete Präparations- und Färbemethoden

Für die Lichtmikroskopie wurde das Mikroskop „Axioskop 2 plus“ (Zeiss, Jena) und zur Dokumentation die zugehörige Software von Zeiss verwendet.

2.14.1 Präparation von *Arabidopsis* Gewebe für die Lichtmikroskopie

Methode 1: Für die mikroskopische Analyse wurde das gewünschte Gewebe zunächst für 15 min in Lösung I (0,24 N HCl, 20% Ethanol, optional auch Methanol) bei 57°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gegen Lösung II (7% NaOH, 60% Ethanol) ausgetauscht und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gewebe wurde dann für jeweils 5 min in 40%, 20 % und 10% Ethanol rehydriert und für 15 min in 5% Ethanol, 25% Glycerin infiltriert. Das so behandelte Gewebe wurde

für die Analyse mit dem Mikroskop in 50 % Glycerin überführt (modifiziert nach Malamy und Benfey, 1997).

Methode 2: Alternativ wurden vor allem Keimlinge für die Längenmessung der Wurzelzellen mit Chloralhydrat behandelt. Dazu wurden die Keimlinge 2-4 Stunden in Essigsäure/Ethanol (1:6) bei RT fixiert und anschließend mehrmals mit Ethanol (absolut) sowie abschließend einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Gewebe wurde dann je nach Anforderung 1-6 Stunden in Chloralhydrat/Glycerin/H₂O (8:1:2) bei RT inkubiert und direkt für die Mikroskopie eingesetzt (Berleth und Jürgens, 1993).

2.14.2 Histochemische GUS-Färbung

Bei der GUS-Färbung handelt es sich um eine histologische Färbemethode, mit der Expressionsdomänen von Genen lokalisiert werden können. In transgenen Pflanzen, die das β -Glukoronidase-Gen (*uidA*) (Jefferson *et al.*, 1987) unter der transkriptionellen Kontrolle des Promotors eines Kandidatengens exprimieren, können durch die GUS-Färbung die Orte der Expression des *GUS*-Gens und damit stellvertretend die Orte der Expression des Kandidatengens lokalisiert werden. Die β -Glukoronidase spaltet spezifisch die Glukoronid-Gruppe geeigneter Substrate (X-Gluc für den qualitativen Nachweis mittels Färbung und MUG für den quantitativen Nachweis). In der hier verwendeten Färbemethode wurde X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glukoronid) als Substrat verwendet. Nach Abspaltung der Glukoronid-Gruppe durch das Enzym entsteht ein blaues Reaktionsprodukt. Durch die Lokalisation der Blaufärbung im Gewebe kann spezifisch der Expressionsort des Gens bestimmt werden. An der Veränderung der Färbungsintensität kann auch semiquantitativ die Stärke der Promotoraktivität unter verschiedenen Versuchsbedingungen verglichen werden. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll in (Weigel und Glazebrook, 2002) folgendermaßen:

Das Gewebe wurde zunächst bei -20°C in 90% Aceton etwa eine Stunde fixiert und anschließend gründlich zweimal mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) gewaschen. Das Gewebe wurde dann bei 37°C je nach Expressionsstärke für 15 Minuten bis ÜN in Färbelösung (50 mM Natriumphosphat pH 7, 10 mM Kalium-Ferrocyanid, 10 mM Kalium-Ferricyanid, 0,2 % Triton X-100, 0,5 mg/ml X-GlucA) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in 70% Ethanol (wenn nötig bei 37°C) entfärbt und optional der „clearing-Methode“ (Punkt 2.14.1) für die verbesserte Mikroskopierbarkeit unterzogen.

2.14.3 Lugol-Färbung

Stärke in Columellazellen der Wurzelspitze wurde durch Färbung mit 1% Lugol-Lösung (Merck) nachgewiesen. Keimlinge wurden für 2-5 Minuten bei RT gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen.

2.15 Konfokale Mikroskopie und Färbemethoden

Zur Analyse der GFP- und der Fuchsin-Fluoreszenz wurde das konfokale Mikroskop Leica TCS SP2 (Leica, Wetzlar) verwendet und die Bilder mittels Leica Software LCS dokumentiert.

2.15.1 Detektion von GFP und CKX7-GFP

Die Detektion der GFP-Variante smGFP (Davis und Vierstra, 1998) erfolgte in Zellen der Wurzelepidermis, nahe der Wurzelspitze. Die Anregung erfolgte mittels Argon-Laser bei 488 nm und die Emission wurde mit einem 500-530 nm Filter bei einem Maximum bei 507 nm detektiert.

2.15.2 Detektion des Xylem durch Fuchsin-Red Färbung

Das Xylemgewebe in jungen Wurzeln wurde nach Färbung mit Fuchsin-Red detektiert. Dazu wurden Keimlinge nach dem Protokoll (Mähönen *et al.*, 2000) in 0,01 % basisch Fuchsinlösung für 3 Minuten bei RT gefärbt und anschließend mit 70% Ethanol je nach Färbestärke entfärbt. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mit einem Argonlaser und die Emission wurde zwischen 543-627 nm detektiert, mit einem Maximum bei 668 nm.

3. Ergebnisse Teil I:

Funktionelle Charakterisierung von *AtCKX7*

Das Gen *AtCKX7* wurde sowohl in *Arabidopsis thaliana* als auch in Tabak charakterisiert und wird im Folgenden als *CKX7* bezeichnet. Die Untersuchungen in *Arabidopsis* stellen den umfangreicheren Teil der Charakterisierung dar. Zur Klärung, ob *CKX7* eine funktionelle Cytokininoxidase/ -dehydrogenase ist und um deren Funktion genauer zu untersuchen, wurde das Gen in *Arabidopsis* und Tabak unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation wurde durch Erstellung eines *CKX7*-GFP-Fusionsproteins ermittelt, welches ebenfalls unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimiert wurde. Die gewebe- und entwicklungspezifische Expression von *CKX7* wurde in *Arabidopsis* zum Teil bereits in der Diplomarbeit (Köllmer, 2004) untersucht. Dafür wurden die Expressionsdomänen mittels GUS-Färbung in transgenen Pflanzen bestimmt, die das Reporterogen *GUS* unter der Kontrolle des *CKX7*-Promotors exprimieren. Diese Ergebnisse werden hier ergänzt.

3.1 *CKX7* wird im Leitgewebe von Keimlingen und in Blüten exprimiert

Die bisher untersuchten *CKX* Gene in *Arabidopsis* zeigen spezifische Expressionsmuster, die sich wenig in den Orten der Expression überschneiden (Werner *et al.*, 2003). Der Promotor von *CKX7* wurde als ca. 2 kb große Sequenz vor dem *CKX7* Startcodon amplifiziert und vor das Reporterogen *GUS* in einen binären Vektor kloniert (Köllmer, 2004). GUS-Färbungen stabil transformierter Linien zu verschiedenen entwicklungsbiologischen Zeitpunkten zeigten, dass der Promotor von *CKX7* in spezifischen Geweben und Entwicklungsstadien von *Arabidopsis* aktiv ist (Abbildung 4).

Es konnte bereits in der frühen Keimlingsentwicklung eine GUS-Färbung detektiert werden. Diese Färbung beschränkte sich sowohl in der Wurzel als auch im Spross des Keimlings ausschließlich auf das Leitgewebe (Abbildung 4a und Abbildung 4b). Diese Färbung wurde bis zu einem Alter von ca. zwei Wochen nach der Keimung gefunden. Anschließend wurde bis zum Einsatz der Blüte keine GUS Färbung mehr in vegetativen Geweben detektiert.

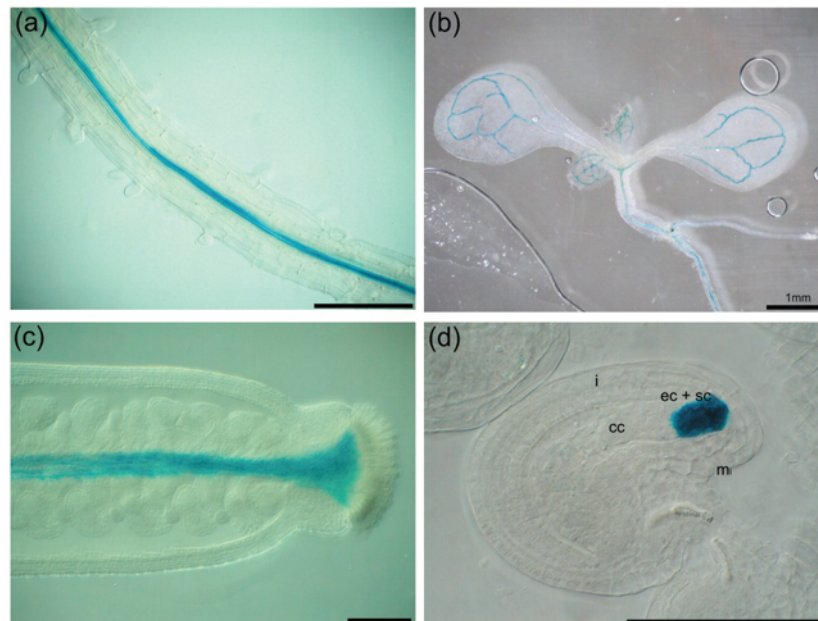


Abbildung 4: GUS-Aktivität in *CKX7:GUS* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen.

Die Expressionsdomänen von *CKX7* wurden in transgenen Pflanzen, die das Reportergen *GUS* unter der Kontrolle des *CKX7*-Promotors exprimierten, mittels histochemischer Färbung nachgewiesen. In vegetativen Geweben von Keimlingen (a, b) ist der Promotor im Leitgewebe der Wurzel (a) und im Leitgewebe des Sprosses (b) aktiv. In generativen Geweben (c, d) ist der Promotor vor der Bestäubung im Transmissionsgewebe des weiblichen Gametophyten (c) und zwischen der Bestäubung und Befruchtung in der reifen Samenanlage des weiblichen Gametophyten aktiv (d). Die Maßeinheit entspricht 100 μm , wenn nicht anders angegeben. (c) und (d) sind Auszüge aus (Köllmer, 2004) und werden hier zur Komplettierung der Ergebnisse angeführt.

i – Integument ; ec – Eizelle ; sc – Synergiden ; mi – Micropyle ; cc – Zentralzelle

In der Diplomarbeit wurde bereits nachgewiesen, dass der Promotor von *CKX7* in Blüten aktiv ist (Köllmer, 2004). Zum Blühbeginn wurde in zwei Entwicklungsstadien der Blüte eine *GUS*-Färbung detektiert. Die Färbung trat zum einen in einem spezifischen Zeitraum vor der Bestäubung im Transmissionsgewebe des Gynoeciums auf (Abbildung 4c). Zum anderen wurde eine *GUS*-Färbung nach der Bestäubung innerhalb der Samenanlage und zwar im Bereich der Eizelle und der Synergiden detektiert (Abbildung 4d).

3.2 *CKX7* ist im Zytoplasma lokalisiert

Da *CKX7* als einziges Protein der *CKX* Familie vermutlich kein Signalpeptid besitzt (Schmülling *et al.*, 2003), bestand die Erwartung, dass es sich bei diesem Protein um ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein handelt. Zur Bestätigung der Vorhersage der *CKX7* Lokalisation wurden die bioinformatischen Programme zur Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen verwendet, die von der Datenbank pflanzlicher Membranproteine *Aramemnon* (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>) zur Verfügung gestellt werden. Dabei wurde von 13 der 17 Programme, die spezifisch die Lokalisation bzw. das Vorhandensein kompartimentspezifischer Signalpeptide anhand der Proteinsequenz

bestimmen, ein Ergebnis erhalten. Eine mitochondriale und ebenso eine chloroplastidäre Lokalisation wurde jeweils mit einer Bewertung von $< 0,2$ (bei einer maximalen Wahrscheinlichkeit von 1) von sechs Programmen (TargetP, PredSL, Predotar, PCLP Chloroplast, iSort, Mitoprot,) ausgeschlossen. Ein Signalpeptid im Allgemeinen wurde zusätzlich zu den oben genannten Programmen von weiteren vier Programmen jeweils mit einer Bewertung von $< 0,2$ ausgeschlossen (PrediSi, SignalP, MultiLoc, SLP Local). Die Bewertungen lagen in Einzelfällen sogar weit unter 0,01. Durch Ausschluss der Lokalisation in Zellkern, Mitochondrion oder Chloroplasten bzw. dem Fehlen eines Signalpeptides für das ER und damit vermutlich der Sekretion, kann man annehmen, dass CKX7 zytoplasmatisch lokalisiert ist. Das Programm WOLF-PSort ermittelte unter den 14 zu CKX7 ähnlichsten Proteinen anhand der Aminosäuresequenz sieben Proteine mit zytoplasmatischer Lokalisation und jeweils drei Proteine mit Lokalisation im Zellkern bzw. assoziiert mit dem Zytoskelett. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für eine zytoplasmatische Lokalisation von CKX7. Diese Erwartung wird unterstützt durch das Ergebnis einer bioinformatischen Analyse mit dem Programm SUBA (Heazlewood *et al.*, 2005; Heazlewood *et al.*, 2007) (Daten nicht gezeigt).

Um diese Vorhersage experimentell zu überprüfen, wurde untersucht, in welchem Kompartiment der Zelle sich das CKX7 Protein befindet. Durch eine C-terminale Fusionierung mit GFP (Punkt 2.13.10) und der Expression unter Kontrolle des 35S Promotors war es möglich, CKX7 in stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen zu lokalisieren. In zwei von mehr als 30 selektierten Linien wurde mittels konfokaler Mikroskopie nach spezifischer Anregung eine Fluoreszenz detektiert (Abbildung 5). Es wurde Pflanzenmaterial verwendet, in dem kein Chlorophyll vorhanden war und die zentrale Vakuole nicht das gesamte Zellvolumen einnahm, damit ein zytoplasmatisches von einem membranlokalisierten Signal gut unterschieden werden konnte. Dafür eigneten sich Wurzelzellen nahe der Wurzelspitze besonders gut (Abbildung 5). Die Fluoreszenz wurde in einem Bereich rund um die zentrale Vakuole lokalisiert. In Zellen, in denen die Vakuole nicht das gesamte Zellvolumen einnahm, lag das Signal auch deutlich von der Zellmembran entfernt vor.

Als Kontrolle wurden Pflanzen verwendet, die *GFP* unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren und von denen bereits gezeigt wurde, dass das GFP-Protein im Kern und im Zytoplasma lokalisiert ist (Werner *et al.*, 2003). Diese Lokalisation des GFP Proteins konnte bestätigt werden (Abbildung 5a). Der Vergleich des Fluoreszenzmusters von 35S:*GFP* transgenen Pflanzen mit dem von 35S:*CKX7-GFP* transgenen Pflanzen zeigte, dass es sich bei der detektierten Fluoreszenz von CKX7-GFP (Abbildung 5b) um ein zytoplasmatisches Signal handelte. Die Vorhersage, dass CKX7 ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein ist, konnte somit bestätigt werden.

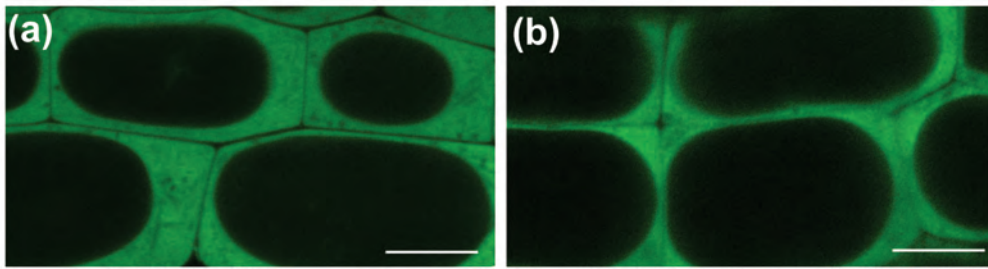


Abbildung 5: Subzelluläre Lokalisation des CKX7-GFP Fusionsproteins in Wurzeln stabil transformierter *Arabidopsis* Pflanzen.

Das GFP Protein ist in *35S:GFP* transgenen Pflanzen im Zytoplasma lokalisiert (a), ebenso wie das CKX7-GFP Fusionsprotein in *35S:CKX7-GFP* transgenen Pflanzen (b). Die Bilder wurden mittels konfokaler Mikroskopie von Epidermiszellen der Wurzel junger Keimlinge erstellt. Die Maßeinheit entspricht je 10 µm.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung *CKX7* überexprimierender *Arabidopsis* Pflanzen

Die Aktivität von CKX Enzymen ist in verschiedenen Pflanzenarten sehr gering. In Tabak, Mais und Orchideen liegt die Aktivität beispielsweise im Bereich unter $1 \text{ nmol Adenin} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot \text{h}^{-1}$ für das Substrat iP (Motyka *et al.*, 1996; Brugière *et al.*, 2003; Motyka *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003b). Es gibt es bisher keine Antikörper, um die verschiedenen Proteine der CKX Familie in *Arabidopsis* differenziert detektieren zu können. Die Messung der CKX Aktivität in Pflanzen ist immer eine Messung der Gesamtaktivität aus der Aktivität aller CKX Enzyme. Die Aktivität ist im WT von *Arabidopsis* so gering, dass sie mit der in Material und Methoden beschriebenen Methode (Punkt 2.9 im Methodenteil) kaum messbar ist und die Werte nahe der Detektionsgrenze der Methode liegen (siehe auch Abbildung 7 im folgenden Abschnitt). Auch die gebildete Menge mRNA der *CKX* Gene ist im WT sehr gering und obwohl hier sequenzspezifisch zum Beispiel mittels *Northern Blot*-Analyse ein Nachweis individueller *CKX* Transkripte möglich ist, gelingt dies nur, wenn die RNA-Extraktion auf spezifische Gewebe, die *CKX* stärker exprimieren, beschränkt wird (Brugière *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde zur funktionellen Untersuchung von *CKX7* das Gen unter der Kontrolle des starken *35S* Promotors in *Arabidopsis* exprimiert. In diesen Pflanzen sollte jede Erhöhung der allgemeinen CKX Aktivität, auf *CKX7* Aktivität zurückzuführen sein. Damit wäre der Nachweis erbracht, dass *CKX7* eine funktionelle CKX ist.

Es wurden insgesamt mehr als 100 *35S:CKX7* transgene Primärtransformanten selektiert. Weiterhin wurden mehr als 30 unabhängige *35S:CKX7-GFP* Linien selektiert, welche neben der funktionellen Analyse von *CKX7* auch für die subzelluläre Lokalisation des *CKX7* Proteins (Kapitel 3.2) verwendet wurden. In diesen Primärtransformanten wurde die CKX Aktivität gemessen und für alle folgenden Experimente Pflanzen mit der höchsten Aktivität ausgewählt. Diese waren *35S:CKX7-92* und *-93* sowie *35S:CKX7-GFP-26*.

3.3.1 In 35S:CKX7 transgenen Pflanzen ist das CKX7 Transkriptlevel erhöht

In den drei ausgewählten Linien wurde die Transkriptmenge mittels *Northern Blot*-Analyse ermittelt (Abbildung 6). In WT Pflanzen war mit dieser Methode kein CKX7 Transkript detektierbar. Dies ist jedoch prinzipiell zum Beispiel mit einer RT-PCR möglich (Köllmer, 2004). Alle drei untersuchten Linien zeigten im Vergleich zum WT eine erhöhte CKX7 Transkriptmenge, wobei diese in der Linie 35S:CKX7-GFP am stärksten war. Hier verläuft die detektierte Bande (Spur 2) etwas oberhalb der anderen Banden (Spur drei und vier), da das Transkript des CKX7-GFP Fusionsgens entsprechend größer ist als CKX7. Das RNA-Gel war annähernd gleichmäßig mit RNA beladen, was an den gleich stark durch Ethidiumbromid gefärbten Banden der rRNA zu erkennen ist (Abbildung 6 unten).

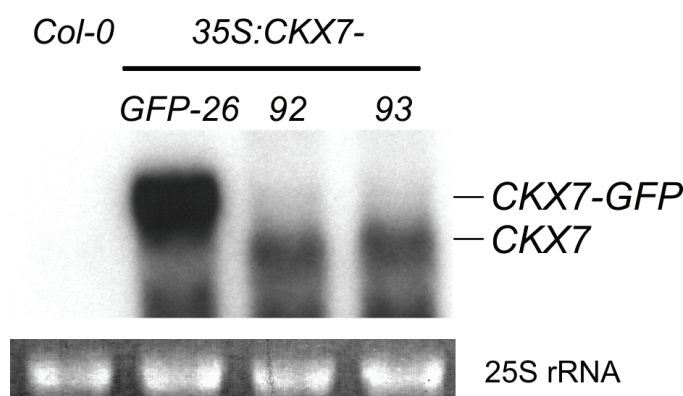


Abbildung 6: Nachweis des CKX7 Transkriptes in 35S:CKX7-GFP und 35S:CKX7 transgenen *Arabidopsis* Keimlingen mittels *Northern Blot*-Analyse.

Das CKX7 Transkript ist im WT Col-0 nicht detektierbar. Transgene Keimlinge, die das CKX7 Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren, zeigen eine hohe Expression, die sich in den verschiedenen Linien in ihrer Stärke unterscheidet. Als Ladekontrolle ist die 25S rRNA-Bande eines mit Ethidiumbromid gefärbten RNA-Gels gezeigt. Es wurde die RNA von zehn Tage alten *in vitro* gewachsenen Keimlingen verwendet.

3.3.2 In 35S:CKX7 transgenen Pflanzen ist die CKX Aktivität erhöht

In den drei ausgewählten Linien wurde die CKX Aktivität von Rosettenblättern vergleichend zum WT bestimmt (Punkt 2.9). Die photometrische Messung bei 352 nm ergab für die WT-Proben Aktivitätswerte von $0,02 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. In den 35S:CKX7 transgenen Linien wurden Werte zwischen $0,26$ und $0,32 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen. In der Linie 35S:CKX7-GFP wurden eine CKX Aktivität von über $23 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen. Diese Werte waren somit zwischen 10- und 1200-fach höher als die des WT (Abbildung 7). In Übereinstimmung mit der unter 3.3.1 ermittelten erhöhten Transkriptmenge konnte somit auch eine Erhöhung der CKX Aktivität in den untersuchten transgenen Linien gemessen werden. Die Linie mit der höchsten Transkriptmenge von CKX7 war 35S:CKX7-GFP-26. Diese Linie zeigte auch die höchste CKX Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei CKX7 um eine funktionelle CKX handelt.

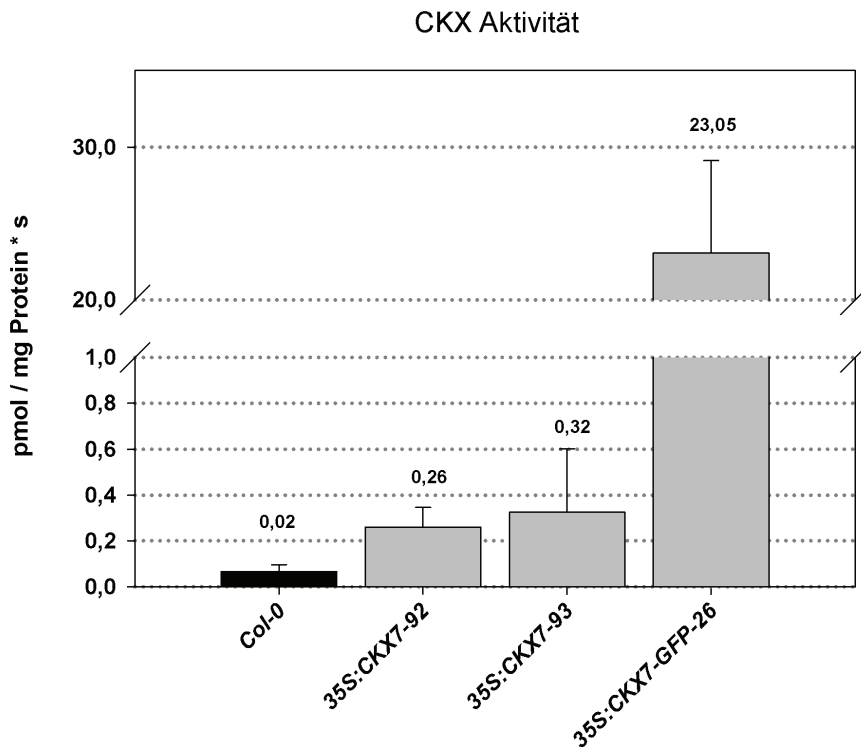


Abbildung 7: CKX Enzymaktivität in 35S:CKX7 transgenen Pflanzen.

Eine CKX Enzymaktivität ist in Wildtyppflanzen fast nicht detektierbar. In transgenen Linien, die das *CKX7* Gen unter Kontrolle des 35S Promoters exprimieren, ist die Enzymaktivität stark erhöht. Die Messung mit Gesamt-Proteinextrakten wurde von Rosettenblättern vorgenommen. Es wurden Pflanzen verwendet, bei denen die ersten Blüten gerade entwickelt waren, die Seneszenz jedoch noch nicht eingesetzt hatte. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung von vier Experimenten. Die Aktivität ist angegeben in der Menge entstandenen Produktes je mg Protein und Sekunde für die Spaltung von iP in Adenin und 3-Methyl-2-Butenal.

3.3.3 In 35S:CKX7 transgenen Keimlingen ist der Cytokiningehalt verringert

Dass es sich bei CKX7 um ein funktionelles cytokininabbauendes Enzym handelt, bestätigte auch die Messung des Cytokiningehaltes in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen (Tabelle 4). Es wurde vergleichend zum WT die Konzentration der verschiedenen Cytokinine in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen gemessen. Die Cytokininmessungen wurden zusätzlich auch in 35S:CKX1 und 35S:CKX2 transgenen Keimlingen durchgeführt. Diese CKX Proteine sind unterschiedlich lokalisiert, nämlich in der Vakuole (CKX1) bzw. apoplastisch (CKX2) (Werner *et al.*, 2003). Anhand des Vergleiches der Cytokiningehalte von 35S:CKX7 transgenen Keimlingen mit denen des WT und auch mit denen von 35S:CKX1 und 35S:CKX2 transgenen Keimlingen kann man eventuell Hinweise darüber gewinnen, welche Cytokinine von den verschiedenen Enzymen präferentiell abgebaut werden und diese Hinweise mit experimentell ermittelten Substratspezifitäten der Enzyme vergleichen (Galuszka *et al.*, 2007).

Die Summe der Konzentrationen aller analysierter Cytokininmetabolite betrug im WT 51,2 pmol / g FG. In den drei vergleichend analysierten *35S:CKX* transgenen Linien war die Gesamtkonzentration dagegen deutlich reduziert (13,4 pmol/g FG in *35S:CKX1*, 32,4 pmol/g FG in *35S:CKX2*, 34,8 pmol/g FG in *35S:CKX7-GFP*). In Tabelle 4 sind die ermittelten Konzentrationen für die wichtigsten und aktivsten Cytokinine gezeigt, sowie für solche Cytokinine, deren Konzentration sich in einer der untersuchten Linien vom WT unterschied. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil vergleichend zum WT dargestellt. In WT Keimlingen waren *cZ*, *tZ* und *iP* einschließlich ihrer Riboside und Glukoside die am höchsten konzentrierten Cytokinine (Tabelle 4). *tZ* (1,2 pmol/g FG) lag vierfach höher konzentriert als *cZ* (0,3 pmol/g FG) vor. *iP* wurde in einer Konzentration von 0,7 pmol/g FG gemessen. Die *O*- und *N*⁹-Glukoside und vor allem die Riboside von *tZ* waren im WT 3-6-fach höher konzentriert als freies *tZ*. Von *cZR* wurde eine fast 5-fach höhere Konzentration im Vergleich zur freien Form gemessen. *iP* lag als *iP-9*-Glukosid in einer doppelt so hohen Konzentration wie die freie Form vor.

In *35S:CKX7* transgenen Keimlingen wurde eine deutliche Reduktion aller hier gezeigten Cytokinine gemessen (Tabelle 4). Bis auf einige Ausnahmen entsprachen die Gehalte deutlich weniger als 20% der Gehalte des WT. Nur *iPR* war nicht und *cZR* nur schwach verändert (105% und 53% der WT Gehalte). Die nicht konjugierten Cytokinine *cZ*, *tZ* sowie *iP*, die in vielen Bioassays die aktivsten Cytokinine darstellen, waren stark reduziert (3%-16% vom WT). Sehr auffällig war, dass die *N*⁹-Glukoside von *cZ* und *iP* bis unter die Detektionsgrenze reduziert waren, was bei *35S:CKX1* und *35S:CKX2* transgenen Keimlingen nicht gefunden wurde (Vergleich Spalte 5 und 6). *cZ* war nur in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen sehr stark reduziert, auf 3% des WT Gehaltes. In *35S:CKX1* und *35S:CKX2* transgenen Keimlingen betrug der Gehalt noch 31% und 15%. Ebenso war *cZ-O*-Glukosid nur in *35S:CKX7* transgenen Pflanzen stark reduziert. Zusammenfassend unterschieden sich die drei cytokinindefizienten Linien anhand der Cytokinintypen, die bei ihnen reduziert vorlagen. *35S:CKX7* transgene Pflanzen zeigten die auffälligsten Veränderungen im Vergleich zum WT und zu *35S:CKX1* und *35S:CKX2* transgenen Pflanzen hinsichtlich des Gehaltes an *cZ* sowie der *N*⁹-Glukoside von *cZ* und *iP*.

Tabelle 4: Cytokiningehalt in *CKX* überexprimierenden *Arabidopsis* Keimlingen im Vergleich zum WT.

Cytokinin	WT			35S:CKX1	35S:CKX2	35S:CKX7
	Mittelwert	±SD	%	% von WT	% von WT	% von WT
<i>tZ</i>	1,16	0,15	100	6	1	9
<i>cZ</i>	0,35	0,03	100	31	15	3
<i>iP</i>	0,72	0,07	100	45	3	16
<i>tZR</i>	6,75	0,33	100	2	2	17
<i>cZR</i>	1,48	0,02	100	40	123	53
<i>iPR</i>	0,55	0,06	100	31	63	105
<i>tZ9G</i>	2,95	0,15	100	4	3	6
<i>cZ9G</i>	0,38	0,04	100	19	57	-
<i>iP9G</i>	1,39	0,27	100	7	6	-
<i>tZOG</i>	4,18	0,45	100	5	4	10
<i>cZOG</i>	0,08	0,01	100	41	55	18

Dargestellt ist der Cytokiningehalt in pmol / g Frischgewicht und der prozentuale Vergleich zum WT-Gehalt. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung (±SD) von drei Replikaten. Es wurden in Flüssigkultur angezogene Keimlinge 6 DAG verwendet. Für die Bezeichnungen der einzelnen Cytokinine siehe Abkürzungsverzeichnis. (-) Konzentration unter der Detektionsgrenze. Verwendet wurden die Klone *35S:CKX1-11-7*, *35S:CKX2-9-3* und *35S:CKX7-GFP-26-10*.

3.3.4 *CKX7* überexprimierende Pflanzen haben einen spezifischen Phänotyp

Rosettenblätter von CKX7 überexprimierenden Keimlingen sind kleiner und weniger grün als im WT

CKX7 überexprimierende Pflanzen zeigten bereits als Keimling eine deutlich veränderte Morphologie im Vergleich zum WT (Abbildung 8b). Es fielen die deutlich verkürzten Blattstiele sowie die erheblich kleineren Blätter auf. Die Färbung der Keimlinge war hellgrüner als die des WT und zum Teil waren die Keimlinge violett gefärbt, was auf eine erhöhte Anthocyanakkumulation hindeutete. Insgesamt waren die Keimlinge sehr klein und gedrungen. Weiterhin war auffällig, dass die Keimlinge in diesem Alter nur eine sehr kurze Primärwurzel besaßen und im Gegenteil zum WT kein weiteres Wurzelsystem entwickelt war. Auf dieses Merkmal wird im weiteren Verlauf noch detailliert eingegangen.

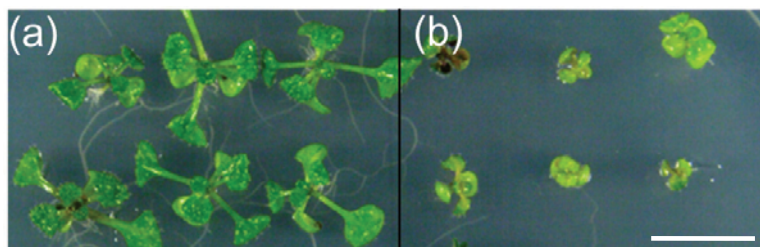


Abbildung 8: Keimlingsphänotyp von 35S:CKX7 transgenen *Arabidopsis* Pflanzen.

Keimlinge des WT Col-0 (a) haben 14 DAG im Vergleich zu 35S:CKX7 transgenen Keimlingen (b) eine größere Rosette, sind grüner und die Blätter haben längere Petiolen. Die Maßeinheit entspricht 1cm.

Die Primärwurzellänge und -verzweigung von CKX7 überexprimierenden Keimlingen ist stark reduziert

Die stark reduzierte Primärwurzellänge ist besonders deutlich in Abbildung 9 zu erkennen. Die Primärwurzel erreichte 12 DAG nur ca. 20% der Länge des gleich alten WT und die Entwicklung von Lateralwurzeln blieb vollständig aus (Abbildung 9a).

Diesen Wurzelphänotyp zeigten Keimlinge aller untersuchten CKX7 transgenen Linien (Abbildung 9b) unabhängig von der Expressionsstärke des Transgens und der Höhe der CKX Aktivität (Vergleich Abbildung 6 und Abbildung 7). Nach einer Entwicklungspause von etwa einer Woche setzte in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen Adventivwurzelwachstum ein. Dabei wurde entweder eine lange und verzweigte Adventivwurzel gebildet oder mehrere kürzere (Abbildung 9c). Die Rosettenblätter des Keimlings wuchsen weiter. Die gebildeten Adventivwurzeln zeigten in ihrer Struktur keinen Unterschied zu WT Wurzeln (nicht gezeigt). Die Analyse der genauen Ursache der veränderten Primärwurzelentwicklung in CKX7 überexprimierenden Keimlingen wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

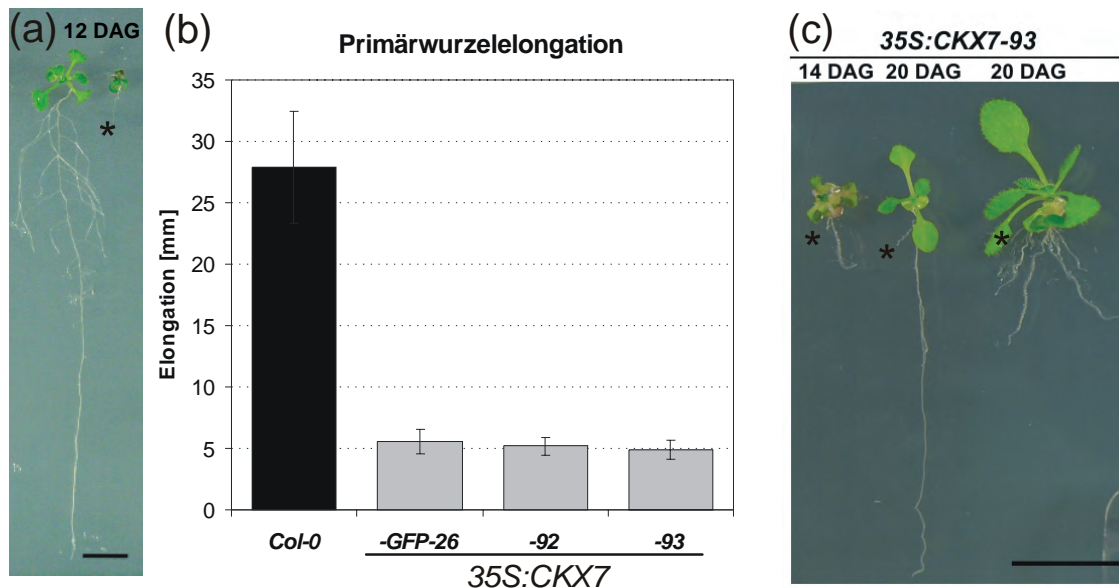


Abbildung 9: Wurzelphänotyp von 35S:CKX7 transgenen Arabidopsis Keimlingen.

In vitro gewachsene Keimlinge von WT und 35S:CKX7 transgenen Linien zeigen 12 DAG deutliche Unterschiede in der Wurzelentwicklung (a). Die Primärwurzellänge und -verzweigung ist in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen stark reduziert. Von links nach rechts: Col-0, 35S:CKX7. Die Primärwurzelelongation von 6-11 DAG (b) ist in 35S:CKX7 transgenen Linien auf etwa 20% des WT reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 30). Im Alter von 20 DAG haben 35S:CKX7 transgene Keimlinge Adventivwurzeln gebildet und entwickeln sich normal weiter (c). Maßeinheit = 1 cm. Der Stern markiert das Ende der Primärwurzel in transgenen Keimlingen.

Der Rosettendurchmesser und die Sprosshöhe von transgenen Linien mit starker Expression von CKX7 sind reduziert

Beim Vergleich *CKX7* überexprimierender Pflanzen mit dem WT fiel im Alter von 30 DAG auf, dass sich die Linie mit der stärksten CKX Aktivität, nämlich *35S:CKX7-GFP-26* (Abbildung 10, ganz rechts) auch am stärksten vom WT unterschied. Der Blüten spross war etwas kleiner und der Rosettendurchmesser reduziert. Weiterhin wurden kleinere Blätter und eine reduzierte Anzahl Blüten (Abbildung 10) und damit auch weniger Schoten und Samen (Daten nicht gezeigt) gefunden.

Linien mit schwächerer Expression des Transgens, wie *35S:CKX7-93* (Abbildung 10, zweite von links) sind im Gegensatz dazu nicht vom WT zu unterscheiden. Pflanzen in diesem Entwicklungsstadium (30 DAG) besaßen, unabhängig von ihrem Sprossphänotyp, in allen untersuchten Linien ein mit dem WT vergleichbar stark ausgeprägtes Wurzelsystem (nicht gezeigt). Eine Untersuchung der Wurzeln ergab jedoch, dass das gesamte Wurzelsystem aus Adventivwurzeln und deren Verzweigungen bestand und die Primärwurzel im Alter von 7-14 DAG abgestorben war (siehe Abbildung 9c).

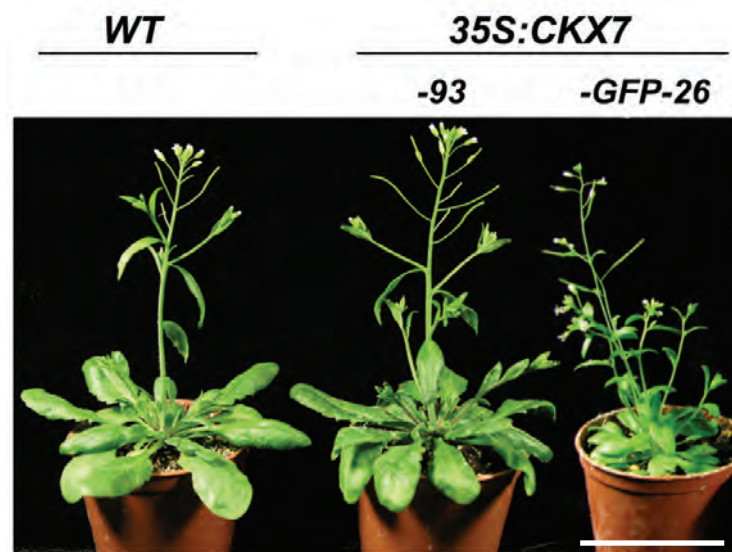


Abbildung 10: Sprossphänotyp von *CKX7* überexprimierenden *Arabidopsis* Pflanzen.

Die Sprossgröße korreliert negativ mit der *CKX7*-Expressionsstärke von links nach rechts. 30 DAG sind die Sprossgröße und der Rosettendurchmesser in Linien mit hoher *CKX7*-Aktivität (rechts) reduziert und die Rosettenblätter sind kleiner. Linien mit geringer *CKX7*-Aktivität (Mitte) sind nicht vom WT zu unterscheiden. Die Maßeinheit entspricht 5 cm.

3.3.5 Detailanalyse der Primärwurzel *CKX7* überexprimierender Pflanzen

Um zu verstehen, warum die Primärwurzel von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen so kurz blieb und nach 7-14 DAG abstarb bzw. keine weitere Entwicklung zeigte, wurde diese von der Keimung bis 9 DAG genauer analysiert und mit dem WT verglichen. Stellvertretend für alle *35S:CKX7*-Linien wurde die Wurzel der Linie *35S:CKX7-93* untersucht, da der Wurzelphänotyp in allen Linien identisch war.

3.3.5.1 In *35S:CKX7* transgenen Pflanzen ist das Wurzelmeristem der Primärwurzel verändert

Da die Verlängerung der Wurzel neben der Zellelongation auch auf die Teilungsaktivität des Wurzelmeristems zurückgeht, wurde dieses mit dem des WT verglichen (Abbildung 11). Man erkennt deutlich, dass die Teilungszone (Ende der Zone gekennzeichnet durch einen Pfeil) im Alter von 6 DAG in *35S:CKX7* Wurzeln kürzer als in Wurzeln des WT war (Abbildung 11 a und c). Das Ende dieser Zone und damit der Beginn der Elongationszone wurde als der Bereich festgelegt, ab dem die Cortexzellen eine Länge von 2,5 μm überschreiten (siehe Pfeil in Abbildung 11a und c). Es war nicht nur auffällig, dass die Primärwurzel *35S:CKX7* transgener Keimlinge kurz und unverzweigt blieb, sondern mit nur 80 μm auch einen im Vergleich zum WT geringeren Durchmesser aufwies (Abbildung 11d). Im WT betrug der Durchmesser der Wurzel 6 DAG 138 μm (Abbildung 11b).

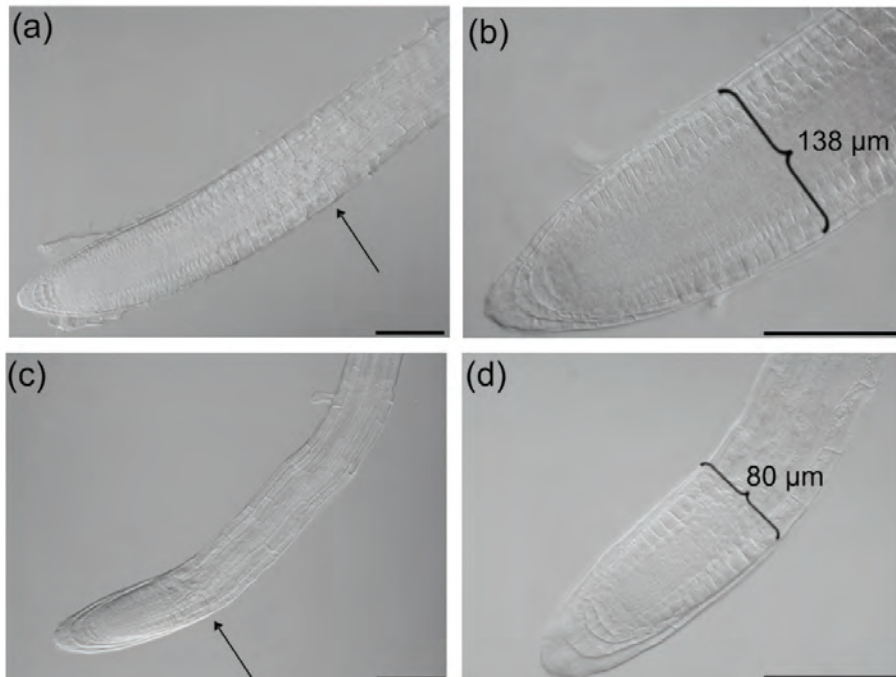


Abbildung 11: Vergleich des Wurzelmeristems und der Teilungszone im WT und in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen.

Dargestellt sind Primärwurzeln von WT (a, b) und 35S:CKX7-93 transgenen Keimlingen (c, d) 6 DAG. Es sind ein Überblick in 200-facher Vergrößerung (a, c) sowie die Wurzelspitze in 400-facher Vergrößerung (b, d) gezeigt. Maßeinheit = 100 µm. Der Pfeil zeigt das Ende der Teilungszone und den Beginn der Elongationszone an.

3.3.5.2 35S:CKX7 transgene Pflanzen bilden weniger Cortezellen in der Teilungszone der Primärwurzel

Während des Wurzelwachstums teilen sich zunächst die Zellen im Bereich des Wurzelmeristems und der Teilungszone. Vom Meristem her bildeten sich immer neue Zellen nach. Solange sich die Zellen in der Teilungszone befinden, erfolgen Zellteilung und Zellstreckung in dem Maße, dass die Zellen immer wieder ihre Ausgangslänge erreichen. In der Teilungszone sind die Zellen also isodiametrisch (Scheres *et al.*, 2002). Nach Verlassen der Teilungszone und Eintritt in die Elongationszone führen die Zellen fast nur noch Zellstreckung durch. Zunächst ist diese Streckung auch radiär und trägt damit zum Erreichen des finalen Durchmessers der Wurzel bei. In der Mitte der Elongationszone setzt dann rapide Zellstreckung in longitudinaler Richtung ein und die Zellen sind ab hier länger als breit (Scheres *et al.*, 2002).

Die genaue Anzahl und Größe der Zellen in der Teilungszone, wurde exemplarisch an einer Cortezzelllinie im WT verfolgt und mit 35S:CKX7 transgenen Wurzeln verglichen (Abbildung 12). Die Analyse erfolgte am ersten, dritten, sechsten und neunten Tag nach der Keimung. Es wurden die Zellen aufsteigend von der Wurzelspitze zum ersten Wurzelhaar gezählt, nummeriert und ihre Länge ermittelt.

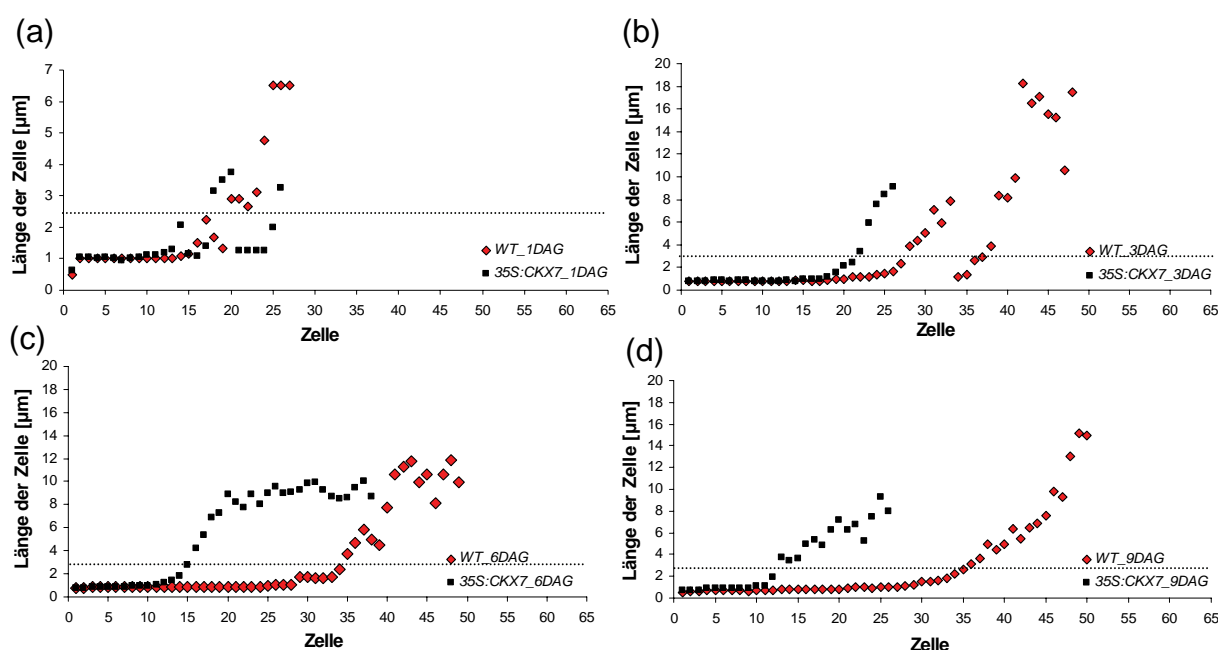


Abbildung 12: Größenverteilung der Cortezellen von der Wurzelspitze bis zur Wurzelhaarbildungzone. Die Zellen einer zentralen Cortezzelllinie wurden gezählt und ihre Länge gemessen 1 DAG (a), 3 DAG (b), 6 DAG (c) und 9 DAG (d). Die Zellen wurden von der Wurzelspitze an aufwärts bis zum ersten Wurzelhaar gezählt, aufsteigend nummeriert und jede einzelne Zelle anhand ihrer Länge im Diagramm abgetragen. Die gestrichelte Linie markiert die Längengrenze von 2,5 µm. Für jeden Zeitpunkt wurden zwischen vier und neun Keimlinge vom WT und 35S:CKX7-93 vermessen.

Die Messung der Zelllänge in der Teilungszone ergab im untersuchten Fall eine maximale Länge der Cortezellen von 2,5 µm (Abbildung 12). Zellen, die kürzer als 2,5 µm waren, wurden als solche definiert, die sich bisher nur geteilt haben und bei denen die Zellstreckung nur in dem Maße stattfand, dass die jeweilige Ausgangslänge der Zelle wieder erreicht wurde. Diese Zellen stellten somit den Anteil dar, der zur Teilungszone und noch nicht zur Elongationszone gehörte.

Direkt nach der Keimung erfolgte in 35S:CKX7 transgenen Wurzeln noch ein gewisses Maß an Wurzelwachstum, sodass die Primärwurzel eine Länge von ca. 1 cm erreichte (siehe Abbildung 9a). Bis zum ersten Wurzelhaar bestand die Cortezzelllinie wie im WT aus ca. 25 Zellen. Davon gehörten bei beiden Linien gleichermaßen ca. 15-20 Zellen in die Teilungszone (Abbildung 12a). Drei Tage nach der Keimung erhöhte sich diese Zahl im WT auf ca. 25 Zellen und auf ca. 35 nach sechs bzw. neun Tagen. In 35S:CKX7 transgenen Wurzeln hingegen stieg die Zahl bis zum sechsten Tag auf ca. 20 Zellen an, sank dann nach neun Tagen jedoch wieder auf ca. 10 Zellen ab (Abbildung 12b-d). Der WT erreichte eine Gesamtzahl von ca. 50 Zellen bis zum ersten Wurzelhaar, 35S:CKX7 transgene Pflanzen jedoch nur maximal 30. Betrachtet man den Bereich bis zu einer Zelllänge von 2,5 µm, also die Teilungszone (gekennzeichnet in Abbildung 12 durch eine gepunktete Linie), fiel auf, dass in 35S:CKX7 transgenen Wurzeln diese Zone nicht gleich bleibend mit Zellen aus dem Meristem aufgefüllt wurde, wie dies beim WT der Fall war. Deshalb blieb der Anteil an Zellen < 2,5 µm im WT

immer gleich (Abbildung 13a) und verringerte sich in *35S:CKX7* transgenen Wurzeln im Gegensatz dazu mit zunehmendem Alter (Abbildung 13b).

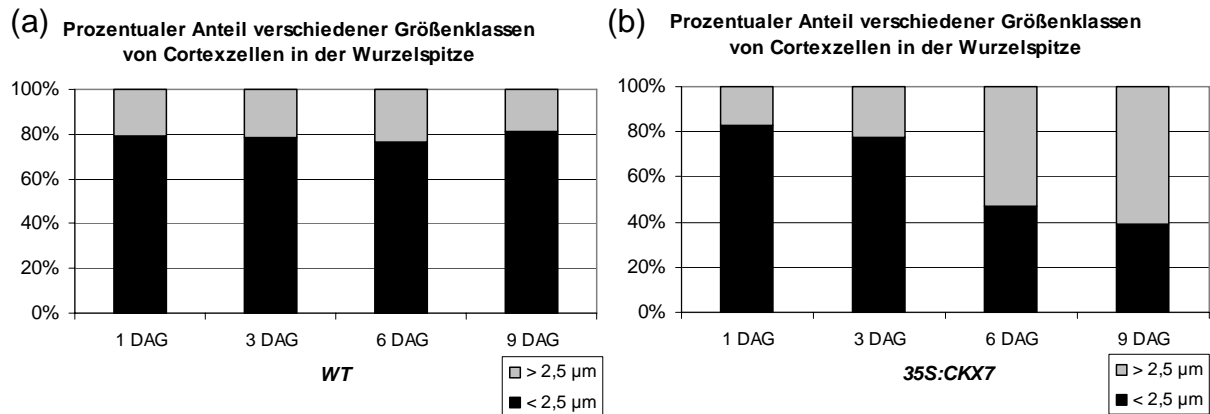


Abbildung 13: Anteil ungestreckter und gestreckter Zellen einer Cortezzelllinie in der Wurzelspitze.

Gezeigt ist der prozentuale Anteil gestreckter und ungestreckter Cortezzellen während der Wurzelentwicklung von 1 DAG bis 9 DAG in WT Keimlingen (a) und *35S:CKX7-93* Keimlingen (b). Zellen < 2,5 µm sind als ungestreckte Zellen definiert worden. Es wurden je Linie und Zeitpunkt mindestens vier Keimlinge vermessen.

3.3.5.3 In *35S:CKX7* transgenen Pflanzen ist die Teilungsaktivität im Wurzelmeristem reduziert

Zur Überprüfung der Teilungsaktivität der Zellen in der Spitze von *35S:CKX7* transgenen Wurzeln, wurde die Aktivität eines Zellzyklusgens mit dessen Aktivität im WT verglichen. Ein Konstrukt aus dem Promotor und Teilen des *AtCYCB1* Gens fusioniert mit dem *GUS* Gen (Colón-Carmona *et al.*, 1999) wurde durch Kreuzung in *35S:CKX7* transgene Pflanzen eingebracht. Dieses ist durch Fusion mit einer speziellen Proteindomäne (*destruction box*) so konstruiert, dass es in der M-Phase des Zellzyklus abgebaut wird. Somit reichert sich das GUS Enzym nicht länger als einen Teilungszyklus in den Zellen an und kann als zeitlich spezifischer Marker für die G2/M-Phase des Zellzyklus verwendet werden.

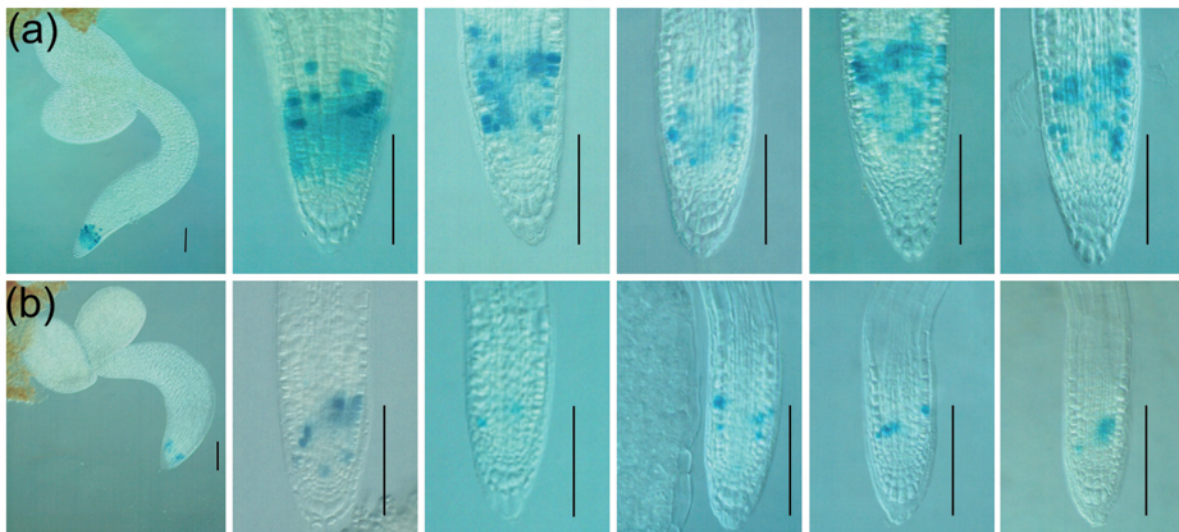


Abbildung 14: Teilungsaktive Zellen im Wurzelmeristem, analysiert mittels der *CYCBI:GUS* Markerlinie. Die Aktivität des *CYCBI:GUS* Markergens von Zellen des Wurzelmeristems im WT-Hintergrund (a) und von *35S:CKX7-93* transgenen Wurzeln (b) zeigt im Vergleich eine stark reduzierte mitotische Aktivität in den transgenen Wurzelmeristemen. Von links nach rechts 0, 1, 2, 3, 5 und 6 DAG. Maßeinheit = 100 μ m.

Abbildung 14 zeigt die mittels GUS Färbung gekennzeichneten mitotisch aktiven Zellen im Wurzelmeristem des WT und von *35S:CKX7* transgenen Pflanzen. Man erkennt deutlich, dass die Teilungsaktivität in transgenen Wurzeln bereits mit Beginn der Keimung reduziert war, da deutlich weniger Zellen gefärbt waren. Dies bestätigte die Ergebnisse, die an der Cortexzelllinie erhalten wurden (siehe oben). Nach 6 Tagen gab es zwar immer noch Teilungsaktivität, diese war jedoch sehr gering. Der gefärbte Bereich war im WT in Längsrichtung ca. 100 μ m lang, wohingegen der Bereich in *35S:CKX7* transgenen Wurzeln nach 6 Tagen nur noch ca. 20 μ m lang war.

3.3.5.4 Die Primärwurzel von *35S:CKX7* transgenen Pflanzen hat eine veränderte Xylemstruktur

Als ein weiteres Merkmal der *35S:CKX7* transgenen Wurzeln wurde bereits deren geringerer Durchmesser im Vergleich zum WT beschrieben (siehe Abbildung 11b und Abbildung 11d). Andere Mutanten von Komponenten des Cytokininsignaltransduktionsweges wie AHKs, Mehrfachmutanten der AHPs oder der B-Typ ARRs zeigen ebenso eine dünne, sehr kurze Primärwurzel (Mähönen *et al.*, 2000; Garcia-Ponce de Leon *et al.*, 2004; Kiba *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Kuroha *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 2007; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). Hier wurde als Ursache eine Fehlbildung des Xylems festgestellt, wobei ausschließlich Proto- jedoch kein Metaxylem gebildet wird. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass sich die Adventivwurzeln dieser Mutante trotzdem normal entwickeln (Hutchison *et al.*, 2006). Aufgrunddessen wurde die Xylemstruktur in *35S:CKX7* transgenen Wurzeln mittels Fuchsinfärbung untersucht. Mit Fuchsin lässt sich spezifisch verholztes Gewebe anfärben (Kraus *et al.*, 1998) und die unterschiedliche Stärke der

Verholzung von Proto- und Metaxylem führen zu individuellen Färbemustern beider Xylemformen. In Wurzeln des WT konnte mittels konfokaler Mikroskopie eindeutig Proto- und Metaxylem nachgewiesen werden (Abbildung 15a). Durch die größeren Abstände der spiralförmigen Ligninstrukturen im Protoxylem war dieses eindeutig vom Metaxylem zu unterscheiden. In Wurzeln *35S:CKX7* transgener Keimlinge zeigte sich nach Fuchsinfärbung, dass das Xylem ausschließlich in Protoxylem entwickelt war (Abbildung 15b), genau wie in den oben genannten Mutanten.

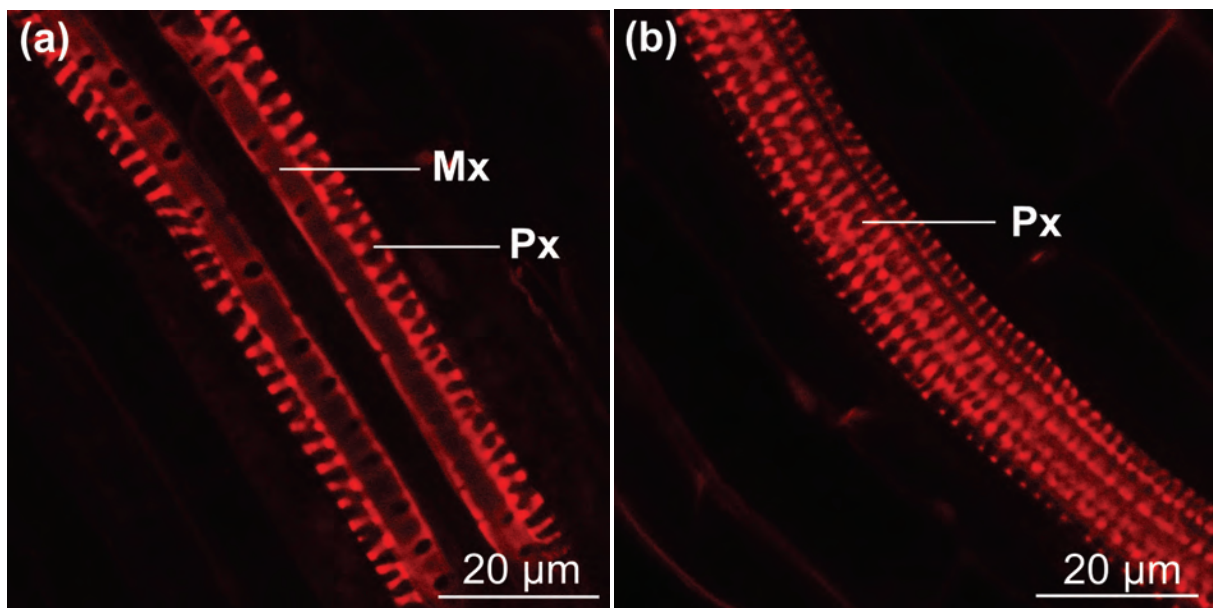


Abbildung 15: Fuchsinfärbung der Primärwurzel von *35S:CKX7* transgenen *Arabidopsis* Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp.

Anstelle einer Differenzierung in Proto- und Metaxylem wie in der WT Primärwurzel (a), zeigen die Primärwurzeln von *35S:CKX7* transgenen Pflanzen ausschließlich eine Differenzierung in Protoxylem (b). Die Bilder wurden 6 DAG mittels konfokaler Mikroskopie erstellt. Fuchsin färbt verholzte Gewebe wie das Xylem und führt bei verschiedenem Verholzungsgrad zu individuellen Färbemustern. Mx - Metaxylem; Px - Protoxylem.

3.3.5.5 In Columellazellen von *35S:CKX7* transgenen Pflanzen gibt es im Alter von neun Tagen keine Stärke mehr

In den Zellen der Wurzelhaube (Columella) akropetal vom Meristem und dem ruhendem Zentrum befinden sich Stärkekörner zur Vermittlung des gravitropen Reizes. In den Columellainitialen, welche direkt an das ruhende Zentrum angrenzen, gibt es keine Stärkekörner (siehe Pfeil in Abbildung 16a). Diese Columellainitialen bleiben undifferenziert und dienen als Stammzellen für die Columella. Die Zellen der Columella sterben relativ schnell ab und verschleimen, um es der Wurzelspitze leichter zu machen, in den sie umgebenden Boden einzudringen. Entfernt man die Zellen des Ruhenden Zentrums, führt dies zum Verlust der Stammzellidentität aller angrenzenden Initialen unter anderem auch der Columellainitialen (Scheres *et al.*, 2002). Dies führt zur Differenzierung der

Columellainitialen und zur Bildung von Stärkekörnern in diesen Zellen (van den Berg *et al.*, 1997). Demnach kann eine Stärkebildung als Zeichen für Differenzierung im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen der Initialen gelten. Stärke lässt sich leicht durch eine Jod-Kaliumjodid-Färbung mit Lugol'scher Lösung nachweisen. Wären die Columellainitialen oder das Ruhende Zentrum in *35S:CKX7* transgenen Wurzeln ausdifferenziert und somit der Grund für der Termination der Zellteilung in der Wurzelspitze, so wäre demnach ihre Stärke durch Lugol'sche Färbung nachweisbar. Diese Färbung wurde im WT und den *35S:CKX7* transgenen Wurzeln neun DAG durchgeführt (Abbildung 16).

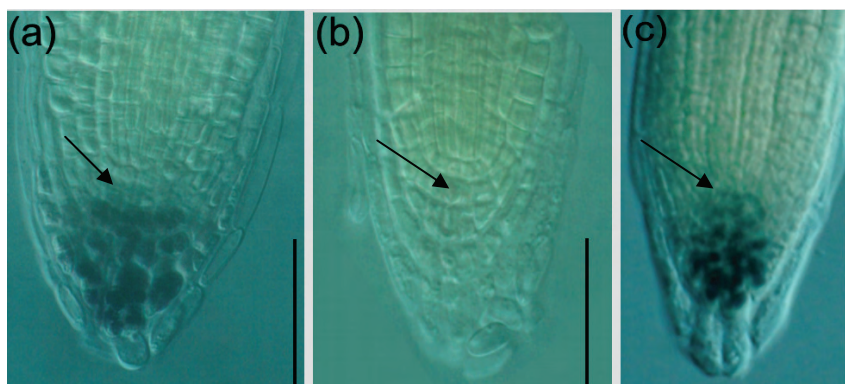


Abbildung 16: Stärkenachweis in der Columella durch Lugol'sche Färbung.

Die Lugol'sche Färbung weist Stärke in Columellazellen der WT Wurzel (a) und in keine Stärke in Wurzeln der Linie *35S:CKX7-93-6* (b) 9 DAG nach. 5 DAG war jedoch noch eine Färbung vorhanden (c). Der Pfeil markiert die Columellainitialen. Maßeinheit = 50 μ m

In der Wurzelspitze des WT konnte 9 DAG Stärke in den Columellazellen, jedoch nicht in den Initialen nachgewiesen werden (Abbildung 16a). Interessanterweise war in der Wurzelspitze von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen 9 DAG weder in der Columella, noch in anderen Zellen Stärke nachweisbar (Abbildung 16b). Dass die Columellazellen von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen an sich jedoch Stärkekörner bilden können, wurde in jüngeren Keimlingen nachgewiesen. Bis zu einem Alter von 5 DAG war Stärke in den Columellazellen vorhanden (Abbildung 16c). Man erkennt zudem, dass bis zu diesem Zeitpunkt die Initialen nicht ausdifferenziert sind, da in diesen keine Stärke vorhanden ist. Zusätzlich war die Expression eines Markergens des Ruhenden Zentrums im Wurzelmeristem von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen 6 DAG nicht verändert (nicht gezeigt). Ein Ausdifferenzieren der Columellainitialen konnte deshalb nur bis zu einem Alter von 6 DAG als Ursache für die Termination des Primärwurzelswachstums ausgeschlossen werden. 9 DAG waren zwar die Initialen nicht gefärbt, jedoch auch die restlichen Columellazellen aus ungeklärter Ursache ebenso wenig.

3.3.5.6 Analyse der Aktivität spezifischer Markergene in der Primärwurzel von 35:CKX7 transgenen Pflanzen

Eine verkürzte Primärwurzel, die das Wachstum vollständig eingestellt hat, könnte neben einer eingestellten Aktivität des Wurzelmeristems auch auf einen vollständigen Verlust des Meristems oder ein Ausdifferenzieren der Stammzellen zurückzuführen sein. Der geringere Durchmesser könnte das Fehlen oder die Fehlbildung einer oder mehrerer Zelllinien in der Wurzel anzeigen. Um weitere mögliche Ursachen des Primärwurzelphänotyps von 35S:CKX7 transgenen Pflanzen aufzudecken, wurde die Aktivität und die Expression von Cytokininantwortgenen und Markergenen verschiedener Zelltypen der Wurzel im Hintergrund 35S:CKX7 transgener Pflanzen und WT Pflanzen untersucht.

In 35S:CKX7 transgenen Pflanzen ist die Expression der cytokininregulierten Reportergene ARR5:GUS, CKX4:GUS und CKX6:GUS reduziert

ARR5 ist ein durch Cytokinin positiv reguliertes Gen (D'Agostino *et al.*, 2000). Die Expressionsstärke eines Cytokininantwortgens kann sowohl den Cytokiningehalt als auch die Cytokininsensitivität widerspiegeln (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Argyros *et al.*, 2008). Der Vergleich der Expressionsstärke eines ARR5:GUS Reportergens in verschiedenen Genotypen und Geweben wurde deshalb als Maß für die Stärke der Cytokininantwort bzw. des Cytokiningehaltes im untersuchten Genotyp verwendet. In cytokinindefizienten *Arabidopsis* Keimlingen, die CKX1 unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren, wurde eine reduzierte Expression von ARR5:GUS bereits beschrieben (Werner *et al.*, 2003). Die Expression von ARR5:GUS wurde in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen vergleichend zum WT an fünf Zeitpunkten von der Keimung bis 6 DAG untersucht. Die enzymatische Aktivität des GUS Enzyms wurde anhand einer GUS-Färbung untersucht und die Stärke der Färbung sowie das Färbemuster mit denen im WT Hintergrund verglichen (Abbildung 17). Die Färbung in den 35S:CKX7 transgenen Wurzeln (Abbildung 17b) war von der Keimung an zu jedem untersuchten Zeitpunkt deutlich geringer als im WT (Abbildung 17a). Dies betraf vor allem die Färbung in der Columella. Zusätzlich war die im WT Hintergrund vorhandene Färbung des Leitgewebes (Abbildung 17a) in 35S:CKX7 transgenen Wurzeln überhaupt nicht vorhanden (Abbildung 17b). Die reduzierte ARR5:GUS Expression in 35S:CKX7 transgenen Wurzeln ist ein weiterer Hinweis auf die bereits durch die Cytokininmessungen (Kapitel 3.3.3) belegte Cytokinindefizienz.

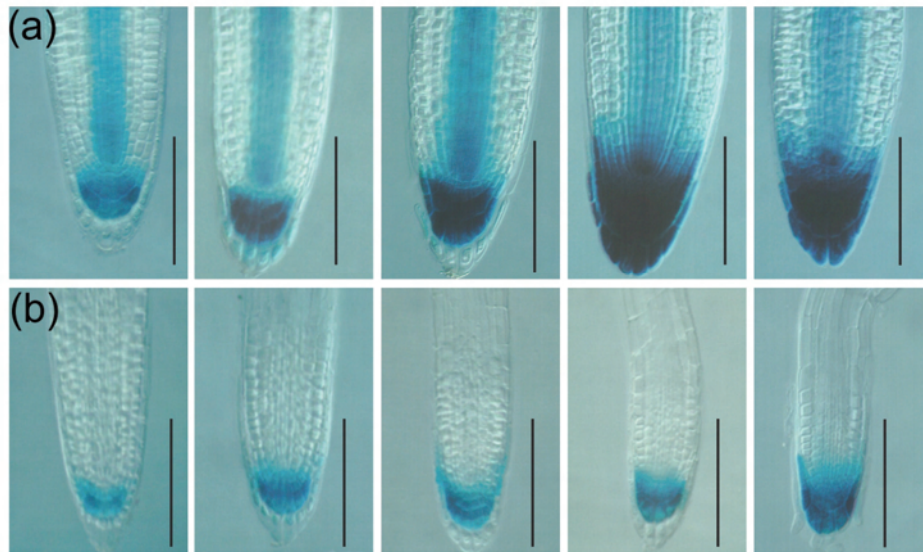


Abbildung 17: Expression von *ARR5:GUS* in der Wurzel von WT und *35S:CKX7* transgenen Keimlingen. Das *ARR5:GUS* Reporter gen ist im WT Hintergrund (a) in der Wurzelspitze und im Leitgewebe exprimiert. In *35S:CKX7* transgenen Keimlingen (b) ist die *ARR5:GUS* Expression stark reduziert und nur in der Wurzelspitze nachweisbar. Von links nach rechts 1, 2, 3, 5 und 6 DAG. Maßeinheit = 100 μ m.

In *35S:CKX7* transgenen Keimlingen wurde zusätzlich auch die Expression der Reportergene *CKX4:GUS* und *CKX6:GUS* untersucht. Beide Gene sind positiv durch Cytokinin reguliert (Köllmer, 2004; Werner *et al.*, 2006). Ähnlich wie in den Kreuzungen mit *ARR5:GUS* konnte auch hier eine schwächere GUS Färbung verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt), die die Cytokinindefizienz erneut belegt. Neben der schwächeren Färbung konnte keine Veränderung im jeweiligen Färbemuster festgestellt werden.

Die Expression des Markers QC184 für das Ruhende Zentrum ist im Wurzelmeristem von 35S:CKX7 transgenen Pflanzen nicht verändert

In der Markerlinie QC184 sind durch GUS Färbung spezifisch die Zellen des Ruhenden Zentrums markierbar (Sabatini *et al.*, 2003). Die Expression von *QC184:GUS* wurde im WT Hintergrund und in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen untersucht (Abbildung 18). Die Färbung der Zellen zeigt in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen ein vergleichbares Bild wie im WT. Da die Kreuzung der Markerlinie mit der Linie *35S:CKX7-93* nur in der F1 Generation dokumentiert wurde, ist der heterozygote Zustand des Markergens in den *35S:CKX7* transgenen Keimlingen ein möglicher Grund für die schwächere GUS Färbung im Vergleich zur homozygoten Markerlinie. Die Identität der Zellen des Ruhenden Zentrums ist demnach nicht verändert und somit vermutlich auch nicht der Grund für die frühere Termination der Zellteilung im Wurzelmeristem von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen.

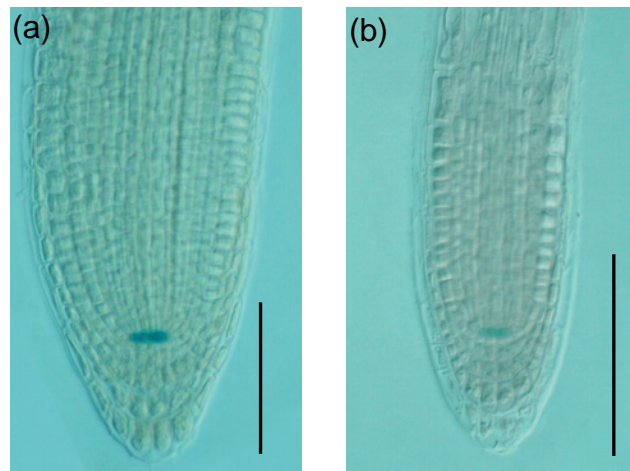


Abbildung 18: Analyse des Markers QC184 für das Ruhenden Zentrum durch GUS-Färbung in WT und 35S:CKX7 transgenen Keimlingen.

In der Markerlinie QC184 (a) sind die Zellen des Ruhenden Zentrums nach GUS-Färbung spezifisch markiert. Keimlinge der Kreuzung von 35S:CKX7-93 mit *QC184* (b) zeigen das gleiche Färbemuster, jedoch mit geringerer Intensität. Analysiert wurde die F1-Generation. Die Färbung wurde 6 DAG durchgeführt, Maßeinheit = 100 µm.

Analyse des Cortex und der Endodermiszelllinie anhand der Markerlinie J0571

Neben einer veränderten Xylemstruktur (Kapitel 3.3.5.4) könnte auch eine Veränderung weiterer Zelllinien in der Wurzel zum verringerten Durchmesser der Primärwurzel 35S:CKX7 transgener Keimlinge beitragen (Kapitel 3.3.5.1 und Abbildung 11). Der Wurzelmarker J0571 (NASC N9094) wurde für die Untersuchung der Cortex- und Endodermisidentität ausgewählt (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). In J0571-Pflanzen ist eine T-DNA, auf der das synthetische *mGAL4-VI6*-Gen lokalisiert ist, im Genom in aktivierender Nähe eines transkriptionellen Enhancers inseriert. Das mGAL4-VI6 Protein wird deshalb nur in Zellen exprimiert, in denen dieser Enhancer aktiv ist. Das mGAL4-VI6 Protein bindet als transkriptioneller Aktivator an eine durch GAL4-Bindung aktivierbare Sequenz des Promotors (GAL4-UAS-Promotor) unter dessen Kontrolle das Reportergen GFP auf der gleichen T-DNA lokalisiert ist (Haseloff und Hodge, 2001). Das führt in J0571-Pflanzen zur gewebespezifischen GFP-Expression im Cortex und der Endodermis (Abbildung 19a, b).

Der Wurzelmarker J0571 wurde im genetischen Hintergrund von 35S:CKX7 transgenen Keimlingen untersucht (Abbildung 19c, d). Es war hier im Vergleich zum WT, bei dem mit Cortex- und Endodermis zwei Zelllinien angefärbt waren, nur eine Zelllinie durch eine GFP-Fluoreszenz markiert (Abbildung 19c). In einer Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Durchlichtbild konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, um welche Zelllinie es sich bei den markierten Zellen handelte (Abbildung 19d). Die Größe der Zellen deutete jedoch darauf hin, dass die markierten Zellen vermutlich Cortexzellen waren.

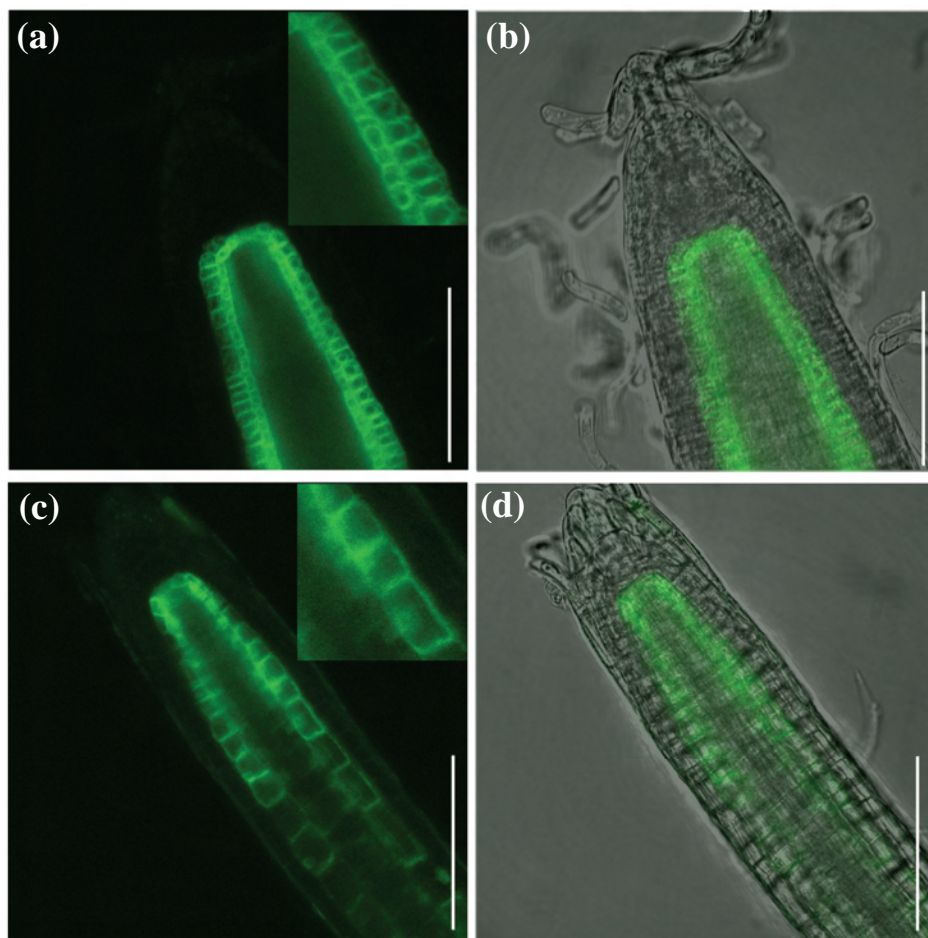


Abbildung 19: Analyse des Cortex-/Endodermis-Markers J0571 in Wurzeln von 35S:CKX7 transgenen Keimlingen im Vergleich zum WT-Hintergrund.

In der Wurzelmarkerlinie J0571 (a, b) zeigen Zellen des Cortex und der Endodermis spezifische GFP Expression. In 35S:CKX7-93 transgenen Wurzeln (c, d) ist nur in einer Zelllinie GFP Expression detektierbar. Gezeigt sind das Fluoreszenzmuster des Markers (a, c) im Hintergrund vom WT (a) und der Linie 35S:CKX7-93 (c) sowie eine Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem jeweiligen Durchlichtbild des WT (b) und 35S:CKX7-93 transgener Wurzeln (d). Die Maßeinheit entspricht 100 µm. Die Bilder wurden mittels konfokaler Mikroskopie von Keimlingen 6 DAG erstellt.

3.3.6 Komplementationsversuche des Primärwurzelphänotyps 35S:CKX7 transgener Keimlinge durch exogene Zugabe von Phytohormonen

Der Primärwurzelphänotyp 35S:CKX7 transgener Keimlinge wird durch exogene Phytohormonzugabe im Medium nicht komplementiert

Da die meisten Cytokinine in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen stark reduziert waren (Kapitel 3.3.3), wurde durch Fütterungsversuche mit Cytokinin und weiteren verschiedenen Phytohormonen versucht, das reduzierte Primärwurzelwachstum von 35S:CKX7 transgenen Keimlingen wieder zu verstärken.

Dazu wurden dem Kultivierungsmedium je zwei physiologisch wirksame Konzentrationen (siehe Material und Methoden Punkt 2.5.3) von BA, iP, NAA, NPA als Auxintransportinhibitor, AgNO₃ als

Ethyleninhibitor, MZOZ-Cl als CKX Inhibitor und iP-9-Glukosid als das am stärksten reduzierte Cytokinin zugesetzt. Die Anwendung der Phytohormone im Medium erfolgte von Beginn der Keimung an. Es war jedoch in keinem Fall möglich, eine Veränderung im Primärwurzelwachstum zu bewirken (Daten nicht gezeigt). Der jeweils als Kontrolle mitgeführte WT zeigte die zu dem jeweilig verwendeten Hormon erwartete Reaktion der Wurzel, wie zum Beispiel ein verringertes Wachstum bei Cytokinin, dem Ethylen- und dem CKX Inhibitor, vermehrte Bildung von Lateralwurzeln bei Auxin sowie verändertes gravitropes Verhalten bei dem Auxintransportinhibitor (Daten nicht gezeigt). Diese Reaktionen konnten durch die fehlende Entwicklung der Primärwurzel in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen nicht beobachtet werden.

Der Primärwurzelphänotyp 35S:CKX7 transgener Keimlinge wird durch exogene Phytohormonbehandlung von Blüten nicht komplementiert

Da die Behandlung der *35S:CKX7* transgenen Keimlinge mit verschiedenen Phytohormonen keine Verstärkung des Primärwurzelwachstums bewirkt hat, ist nicht auszuschließen, dass die Cytokinindefizienz schon sehr früh in der Entwicklung der Keimlingswurzel eine hemmende Rolle spielt und bereits die Struktur und Entwicklung der Radikula beeinflusst. Dieser Zeitpunkt ist möglicherweise direkt nach den ersten Zellteilungen der Zygote in der Samenanlage der Blüte zu suchen. Zusätzlich ist wichtig, dass der Embryo von maternalem Gewebe versorgt wird, welches selbst Cytokinindefizienz aufweist. Möglicherweise hat der Cytokiningehalt im maternalen Gewebe einen Einfluss auf die frühe Entwicklung der Keimlingswurzel. Daher wurde versucht, bereits zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Befruchtung das umgebene Gewebe mit dem möglicherweise fehlenden Cytokinin zu versorgen. Hierzu wurde *cis*-Zeatin, *trans*-Zeatin, Benzyladenin und der CKX Inhibitor MZOZ-Cl ausgewählt. Es wurden Blüten von *35S:CKX7* transgenen Pflanzen kurz vor und nach der Befruchtung mit einer cytokininhaltigen Lösung infiltriert. Die aus diesen Blüten hervorgegangenen Samen wurden zusätzlich direkt auf Medium ausgebracht, welches das gleiche Cytokinin enthielt, mit dem zuvor die Blüten infiltriert wurden. Keine der untersuchten Bedingungen führte zu einer Verstärkung des Primärwurzelwachstums der *35S:CKX7* transgenen Keimlinge (Daten nicht gezeigt).

3.3.7 Komplementationsversuche des Primärwurzelphänotyps *35S:CKX7* transgener Keimlinge durch Kreuzungen mit Mutanten des Cytokininsignalweges

Der Primärwurzelphänotyp 35S:CKX7 transgener Keimlinge wird durch Ausschalten von AHK4 unterdrückt

Die Wahrnehmung und Weiterleitung des Cytokininsignals in *Arabidopsis* erfolgt mittels des in der Einleitung beschriebenen Zwei-Komponenten-Signalsystems. An dessen Anfang stehen die drei Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1/WOL (AHK4). AHK4 hat als einziger der drei

Rezeptoren neben der Kinase-Aktivität bei geringer Cytokininkonzentration auch Phosphatase-Aktivität (Mähönen *et al.*, 2006b). Somit ist dieser Rezeptor nicht nur in der Lage, AHPs zu phosphorylieren, sondern durch Dephosphorylierung der AHPs, die Stärke der Signalweiterleitung zu reduzieren. Die den AHPs entzogenen Phosphatreste können dann auch solche sein, die möglicherweise durch einen der anderen Rezeptoren auf die AHPs übertragen wurden. Somit kann AHK4 möglicherweise unter geringen Cytokininkonzentrationen, wie sie nachgewiesenermaßen in *35S:CKX7* transgenen Pflanzen vorliegen, das Signalsystem negativ regulieren. Dabei spielt neben der Expression der drei Rezeptoren in verschiedenen Organen der Pflanze (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004) eventuell auch deren Ligandenspezifität eine Rolle (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006). AHK4 wird vermutlich nur dann als Phosphatase wirken, wenn wenig oder kein Cytokinin des Typs vorliegt, welches dieser Rezeptor präferentiell bindet. Somit kann die Signalwirkung ausgehend von den zwei anderen Rezeptoren unter solchen speziellen Bedingungen abgeschwächt werden.

In der Mutante *wol* wird der Rezeptor durch die dort vorliegende Mutation dauerhaft in die Konformation versetzt, in der er als Phosphatase wirkt. Diese Konformation tritt normalerweise nur ein, wenn kein Cytokinin gebunden wird. Dies führt zu der bekannten Fehlbildung des Xylems (Mähönen *et al.*, 2000), wie sie auch in *35S:CKX7* Wurzeln vorliegt (Abbildung 15). AHK4 liegt in *35S:CKX7* transgenen Pflanzen aufgrund der geringen Cytokininkonzentration möglicherweise wie in *wol* überwiegend als Phosphatase vor. Um diese Phosphatase-Aktivität von AHK4 zu unterdrücken, wurde in *35S:CKX7* transgene Pflanzen durch Kreuzung das T-DNA-Insertionsallel *cre1-2* (Inoue *et al.*, 2001) eingebracht. Es bestand die Erwartung, dass die verbleibende Cytokininsignalweiterleitung über AHK2 und AHK3 dadurch verstärkt wird, was zu einer Unterdrückung der Xylemfehlbildung führen könnte.

Doppelt homozygote Pflanzen der Linie *cre1-2, 35S:CKX7-GFP_5-43* wurden durch Selektion auf Hygromycin identifiziert. Der Genotyp von F2 Individuen wurde mittels spezifischer PCR-Nachweise für *35S:CKX7* und der T-DNA in *AHK4* anhand von Nachkommen der 3. Generation bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Pflanzen der Linie *cre1-2, 35S:CKX7-GFP_5-43* zeigten genau den erwarteten Phänotyp. Die Keimlinge bildeten eine Primärwurzel, die nicht nach sechs Tagen ihr Längenwachstum einstellte und zudem in der Lage war, Lateralwurzeln zu entwickeln (Abbildung 20a).

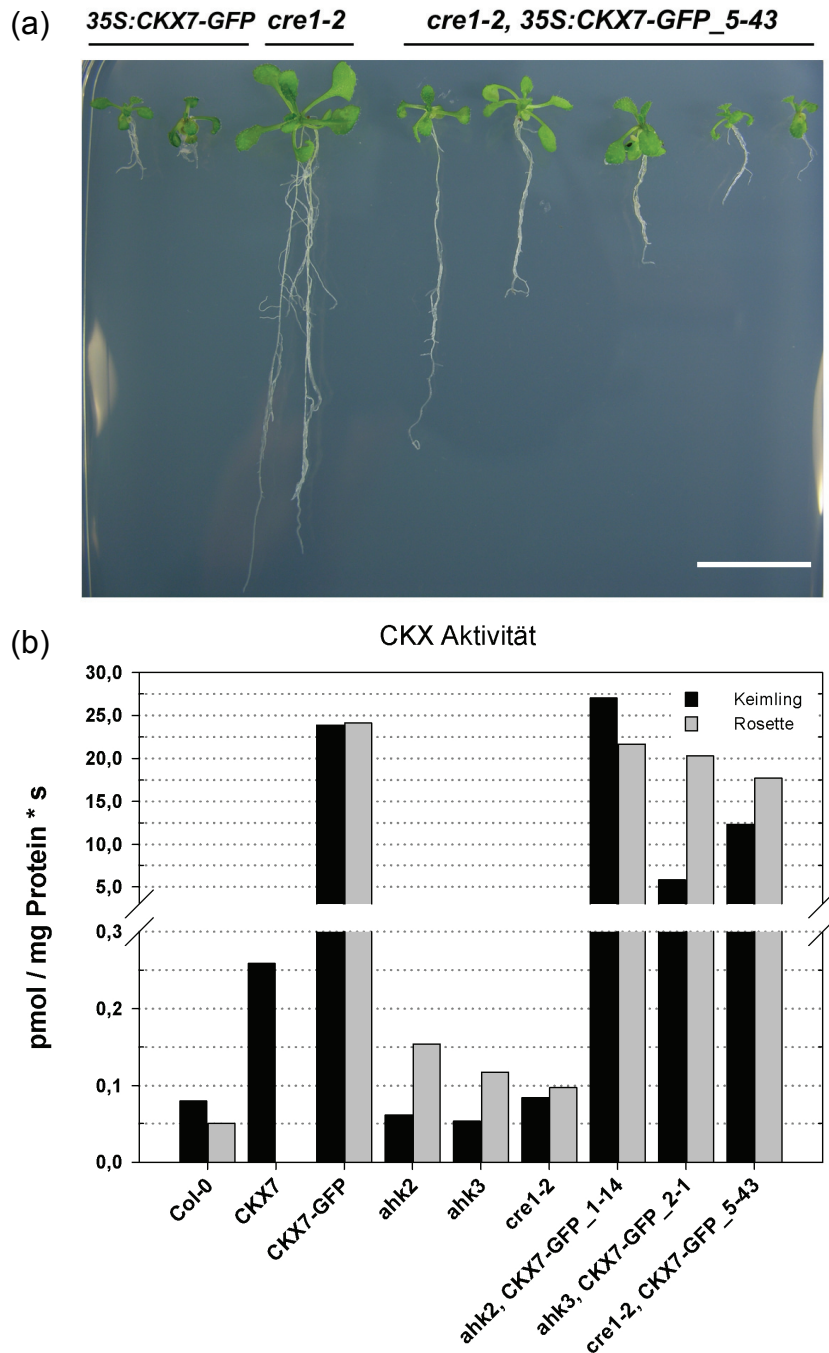


Abbildung 20: Auswirkungen des Funktionsverlustes von Cytokininrezeptoren in 35S:CKX7-GFP transgenen Keimlingen.

Das Fehlen von AHK4 in *cre1-2*, 35S:CKX7-GFP transgenen Keimlingen unterdrückt den CKX7-Primärwurzeldefekt (a). Das reduzierte Längenwachstum wird in verschieden starker Ausprägung in den Nachkommen (4. bis 8. von links) kompensiert. Alter der Keimlinge 18 DAG. Die Maßeinheit entspricht 1,5 cm. Die CKX Aktivität (b) ist trotz Reversion des Primärwurzelphänotyps in *cre1-2*, 35S:CKX7-GFP transgenen Keimlingen hoch.

Die Unterdrückung des Primärwurzelphänotyps ging einher mit einer normale Xylemdifferenzierung (nicht gezeigt), jedoch war die erreichte Länge der Primärwurzel in den verschiedenen homozygoten Nachkommen einer Kreuzungslinie verschieden.

Zum Vergleich und zur zusätzlichen Überprüfung der Hypothese über die Sonderrolle von AHK4 wurden die äquivalenten Kreuzungen von *35S:CKX7-GFP* transgenen Pflanzen auch mit T-DNA Insertionsmutanten von *AHK2* und *AHK3* (Riefler *et al.*, 2006) durchgeführt. Der Erwartung entsprechend konnte ein Ausschalten von *AHK2* oder *AHK3* in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen keine Unterdrückung der Xylemfehldifferenzierung bewirken und demnach auch keine Kompensation des Primärwurzeldefektes (Daten nicht gezeigt).

Die Unterdrückung des Phänotyps könnte möglicherweise nur aufgetreten sein, weil durch die Kreuzung ein weiterer 35S Promotor in der gleichen Pflanze aktiv war und somit eventuell die Expressionsstärke von *CKX7* durch *transgene silencing* reduziert wurde. Allerdings zeigten auch die Linien *35S:CKX7-92* und *-93* mit sehr geringer *CKX7*-Aktivität (Abbildung 7) den beschriebenen Wurzelphänotyp. Um *transgene silencing* als Ursache für die beobachtete Reversion des Primärwurzelphänotyps auszuschließen, wurde die Enzymaktivität homozygoter Keimlinge der Linie *cre1-2, 35S:CKX7-GFP_5-43* im Vergleich zur Ausgangslinie *35S:CKX7-GFP* und den Kreuzungsnachkommen mit den anderen Rezeptormutanten gemessen (Abbildung 20b).

In allen untersuchten Linien war die *CKX* Aktivität signifikant höher als im WT. Es wurde also in keiner Linie das Transgen vollständig unterdrückt. Die *CKX* Aktivität war in den homozygoten Pflanzen der Linie *cre1-2, CKX7-GFP_5-43* etwas geringer (ca. 12 bzw. 17 pmol / mg Protein * s in Keimlingen bzw. Rosettenmaterial) als in *35S:CKX7-GFP* transgenen Pflanzen (ca. 24 pmol / mg Protein * s) (Abbildung 20b). Jedoch selbst die Linie *ahk3, CKX7-GFP_2-1*, die eine noch geringere *CKX* Aktivität als die Linie *cre1-2, CKX7-GFP_5-43* aufwies, nämlich ca. 5 pmol / mg Protein * s in Keimlingen, zeigte den beschriebenen Primärwurzeldefekt. Ein Abschalten des Transgens konnte somit als Ursache für die Reversion des Wurzelphänotyps in *cre1-2, 35S:CKX7-GFP* transgenen Pflanzen ausgeschlossen werden.

Der Primärwurzelphänotyp 35S:CKX7 transgener Keimlinge wird durch Ausschalten von AHP6 unterdrückt

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, ist AHP6 ein so genanntes Pseudo-Phosphotransmitterprotein (pAHP), welches keine Phosphatreste von den Histidin-Kinasen übernehmen kann, jedoch, vermutlich durch Interaktion mit den AHKs und den ARRs, die Signalkette in Konkurrenz zu den aktiven AHPs negativ reguliert. AHP6 ist also ein negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion (Mähönen *et al.*, 2006a). Ebenso wie durch Ausschalten von *AHK4* sollte demnach auch durch Ausschalten von *AHP6* die Weiterleitung des Cytokininsignals verstärkt werden können. Alle Phosphatreste, die der Signalkette zuvor durch Abgabe an AHP6 nicht als Aktivatoren

der Response-Regulatoren zur Verfügung standen, würden nun ausschließlich an aktive AHPs weitergegeben und könnten so die Stärke des weitergeleiteten Cytokininsignal erhöhen. Aufgrund dessen bestand auch in diesem Experiment die Erwartung, dass durch Kreuzung mit der T-DNA-Insertionsmutante *ahp6-3* der Primärwurzeldefekt von *35S:CKX7-GFP* transgenen Pflanzen unterdrückt werden könnte. Durch Ausschalten dieses pAHPs ist es bereits gelungen, die Fehldifferenzierung des Xylems von *wol* Keimlingen zu unterdrücken (Mähönen *et al.*, 2000; Mähönen *et al.*, 2006a).

Die mittels PCR-Genotypisierung identifizierten homozygoten Nachkommen der Kreuzung aus *ahp6-3* und *35S:CKX7-93-6* zeigten wie vermutet eine Unterdrückung des Primärwurzeldefektes (Abbildung 21a). Die Primärwurzel erreichte ca. 70% der Länge von WT Wurzeln bzw. die der *ahp6-3* Pflanzen und bildete Lateralwurzeln aus. Auch in diesen Pflanzen konnte noch eine signifikant erhöhte CKX Aktivität gemessen werden (Abbildung 21b). Nachkommen der Kreuzung von *ahp6-3* mit der Linie *35S:CKX7-GFP-26* zeigten ebenso eine Unterdrückung des Primärwurzelphänotyps (Daten nicht gezeigt) und die CKX Aktivität war auch in diesen Pflanzen immer noch erhöht (Abbildung 21b). In *35S:CKX7-GFP* transgenen Pflanzen wurden CKX Aktivitätswerte zwischen 25 und 29 pmol / mg Protein * s gemessen. In den homozygoten Kreuzungsnachkommen wurde zwar eine geringere CKX Aktivität von 2,5 -5 pmol / mg Protein * s gemessen, diese Werte sind jedoch immer noch mehr als 10-fach höher als im WT. Die Linie *35S:CKX7-93* hatte zudem bei nur 0,2 pmol / mg Protein * s bereits den Primärwurzelphänotyp ausgebildet. Ein Abschalten des Transgens als Ursache für die partielle Reversion des Wurzelphänotyps konnte also auch in diesem Fall ausgeschlossen werden.

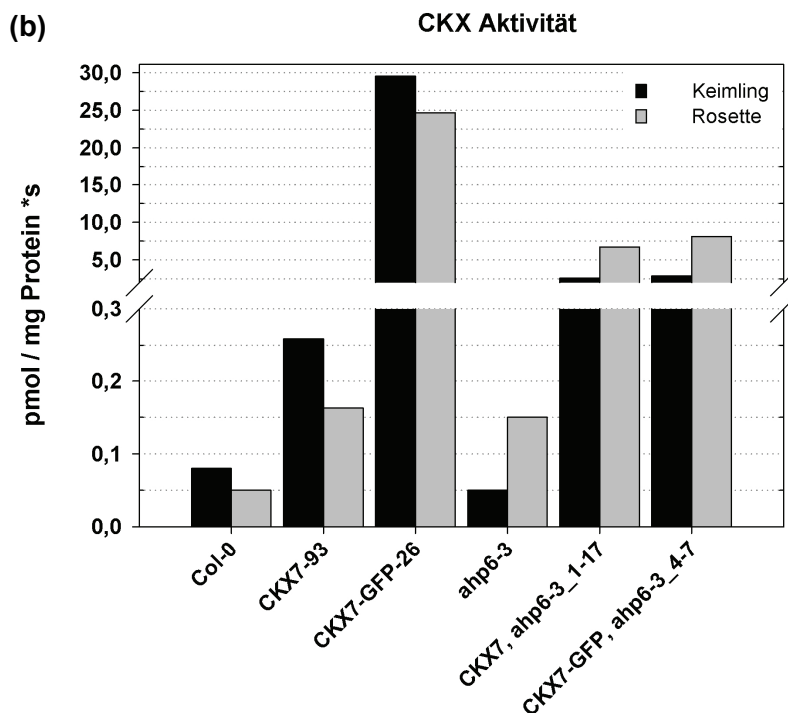
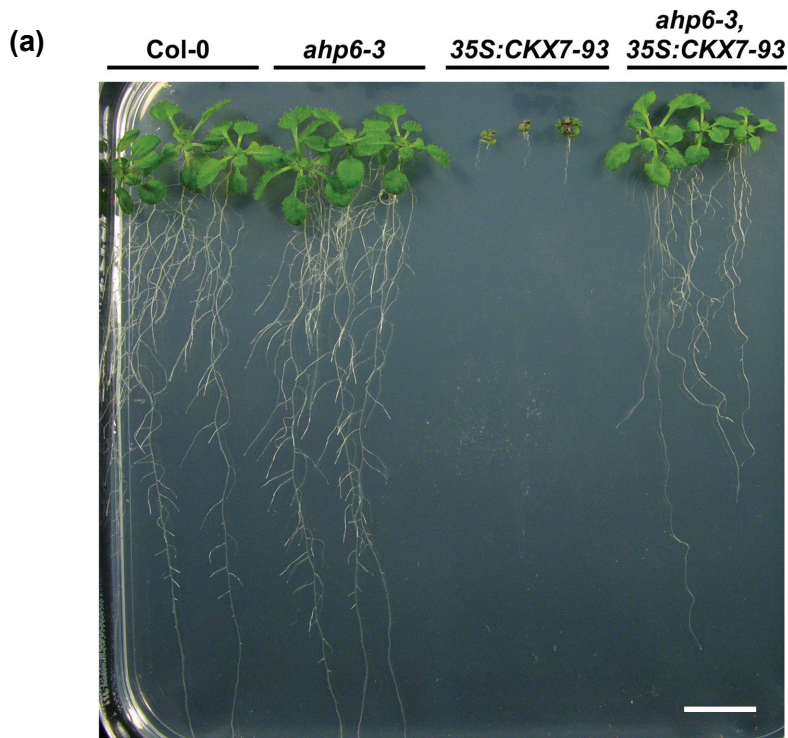


Abbildung 21: Auswirkungen des Ausschalten von *AHP6* auf den Phänotyp und die CKX Aktivität in *35S:CKX7* transgenen Pflanzen.

Durch Kreuzung mit der T-DNA Insertionsmutante *ahp6-3* ist in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen der Primärwurzeldefekt partiell wieder aufgehoben worden (a). Gezeigt sind je drei Keimlinge des WT, der beiden Elternlinien sowie der homozygoten Doppelmutante *ahp6-3, 35S:CKX7-93*, 20 DAG. Die CKX Aktivität (b) ist in homozygoten Kreuzungsnachkommen immer noch stark erhöht. Untersucht wurden Keimlinge zum gleichen entwicklungsbiologischen Zeitpunkt (ca. 6 gebildete Rosettenblätter) sowie Rosetten blühender Pflanzen, die noch keine Seneszenzsymptome zeigten. Die Maßeinheit entspricht 1 cm.

3.3.8 Analyse *CKX7* überexprimierender Tabakpflanzen

In 35S:CKX7 transgenen Tabakpflanzen ist die CKX Aktivität erhöht

Durch Überexpression von *CKX7* in *Arabidopsis* und der Messung erhöhter CKX Aktivitätswerte in den transgenen Pflanzen wurde nachgewiesen, dass *CKX7* eine aktive CKX ist (Kapitel 3.3.2). Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde *CKX7* auch heterolog in Tabak unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimiert. Zum einen wurde die CKX Aktivität in den transgenen Pflanzen untersucht und zum anderen deren Phänotyp mit cytokinindefizienten Tabakpflanzen, die die *Arabidopsis* Gene *CKX1-CKX4* überexprimieren (Werner *et al.*, 2001), verglichen. Diese cytokinindefizienten Tabakpflanzen zeigen vergleichbare Phänotypen wie cytokinindefiziente *Arabidopsis* Pflanzen, die *CKX1-CKX4* überexprimieren (Werner *et al.*, 2003). Sie besitzen eine verringerte Sprossgröße und verstärktes Wurzelwachstum (Werner *et al.*, 2001).

35S:*CKX7* transgene Tabakpflanzen wurden erhalten, indem Pflanzen der Varietät SNN mit binären Pflanzenvektoren, die *CKX7* bzw. *CKX7-GFP* unter der Kontrolle des 35S Promotor enthalten, transformiert wurden. Die Regeneration transformierter Blattexplantate führte zu 60 bzw. 95 Primärtransformanten der Linien 35S:*CKX7* bzw. 35S:*CKX7-GFP*. In jeweils 30% der Linien wurden in der ersten Generation verglichen zum WT erhöhte CKX Aktivitäten gemessen (Daten nicht gezeigt). In einigen ausgewählten 35S:*CKX7* und 35S:*CKX7-GFP* transgenen Tabaklinien wurde die Transkription von *CKX7* mittels *Northern Blot*-Analyse nachgewiesen (Abbildung 22a). In den untersuchten Linien wurde *CKX7* verschieden stark exprimiert. In WT Tabakpflanzen konnte kein *CKX7* Transkript detektiert werden. In den untersuchten Linien wurde zudem in der nächsten Generation die CKX Aktivität gemessen (Abbildung 22b). Die gemessenen Aktivitäten lagen zwischen 0,11 und 0,44 pmol * s⁻¹ * mg Protein⁻¹ und damit 15- und 60-fach höher als die des WT. Die Stärke der CKX Aktivität in den einzelnen Linien korrelierte mit der Stärke der Expression von *CKX7*.

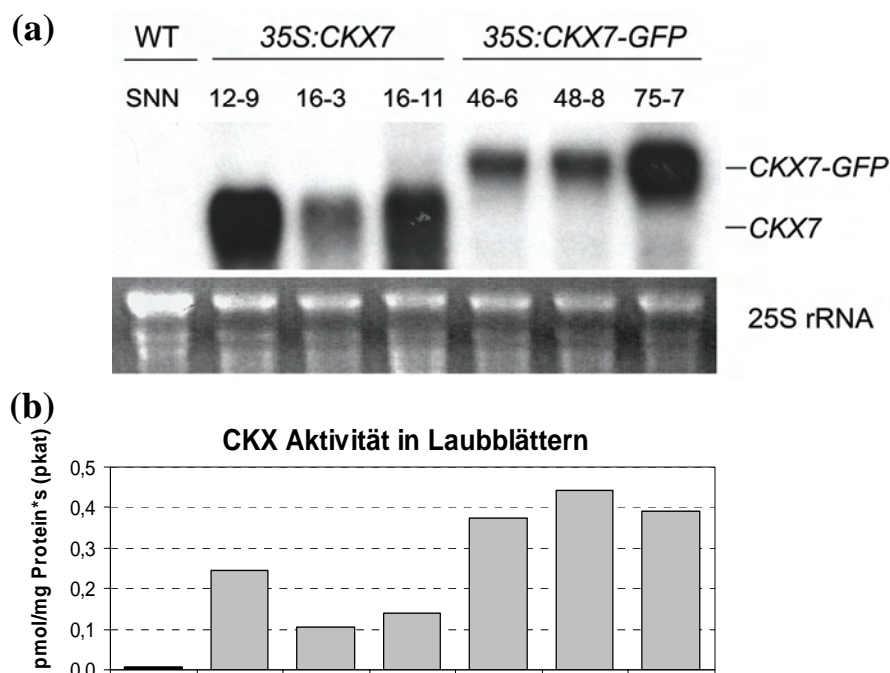


Abbildung 22: Nachweis des CKX7 Transkriptes und Messung der CKX-Aktivität in 35S:CKX7 und 35S:CKX7-GFP transgenen Tabakpflanzen.

Die Detektion des CKX7 Transkriptes erfolgte in Tabakkeimlingen mittels *Northern Blot*-Analyse (a). Als Ladekontrolle ist die rRNA (untere Reihe) gezeigt. Die CKX Aktivität von Primärtransformanten (b) wurde in Laubblättern blühender Pflanzen gemessen. Die CKX Enzymaktivität ist im WT nur sehr gering. In transgenen Linien, die das CKX7 Gen unter Kontrolle des 35S Promoters exprimieren, ist die Enzymaktivität stark erhöht. Die Aktivität ist angegeben in der Menge Produkt je mg Protein und Sekunde für die Spaltung von iP in Adenin und 3-Methyl-2-Butenal. Dargestellt sind Einzelmessungen.

CKX7 überexprimierende Tabakpflanzen haben einen spezifischen Phänotyp

Zunächst ist festzuhalten, dass keine der untersuchten Linien einen Wurzelphänotyp aufwies, der dem der CKX7 überexprimierenden *Arabidopsis* Pflanzen ähnelte. Die Tabakpflanzen hatten kein reduziertes Wurzelwachstum im Vergleich zum WT. Während der Keimlingsphase konnten *in vitro* sogar signifikant längere Primärwurzeln im Vergleich zum WT festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Verzweigung der Wurzeln wurde nicht untersucht. Die Blattentwicklung von Keimlingen zeigte keinen Unterschied zum WT.

Einige auffällige Merkmalsveränderungen wurden jedoch an den adulten transgenen Pflanzen beobachtet. So war zum Beispiel die Apikaldominanz verändert. CKX7 überexprimierende Tabakpflanzen bildeten laterale Sprosse, die aus den Blattachsen an der Hauptsprossachse entsprangen (Abbildung 23a). In WT Pflanzen von Tabak wurde solch ein Auswachsen lateraler Knospen nicht beobachtet. Eine große Zahl der untersuchten Pflanzen bildete sehr wenig oder gar keinen Pollen (Abbildung 23b). Die verminderte Pollenbildung korrelierte mit der Stärke der CKX

Aktivität, denn nur Pflanzen mit hoher CKX Aktivität bildeten wenig oder keinen Pollen. Die Blattform der *CKX7* überexprimierenden Tabakpflanzen war schmaler als beim WT (Abbildung 23c) und wurde so auch bei Tabakpflanzen beobachtet, die andere *CKX* Gene aus *Arabidopsis* überexprimieren (Werner *et al.*, 2001).

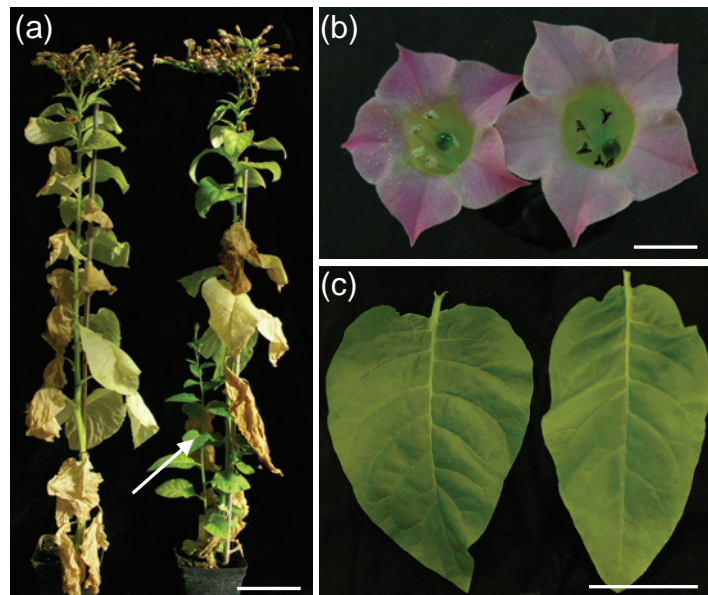


Abbildung 23: Sprossphänotyp 35S:CKX7 transgener Tabakpflanzen.

In *35S:CKX7* transgenen Tabakpflanzen ist die Apikaldominanz (a), die Pollenbildung (b) sowie die Breite der Laubblätter (c) reduziert. Der Pfeil zeigt auf einen lateralen Spross. Der WT ist jeweils links im Bild dargestellt. Die Maßeinheit entspricht 15 cm in (a), 1 cm in (b) und 10 cm in (c).

In den *35S:CKX7* transgenen Tabakpflanzen waren der Zeitpunkt und die Dauer der Blütenbildung verändert. Der Ansatz der Blüte erstreckte sich im WT in einer Gruppe von zehn Pflanzen über maximal zwei Tage. Bei *35S:CKX7* transgenen Tabakpflanzen setzte die Blütenbildung bei einigen Linien bis zu fünf Tage nach dem WT ein und erstreckte sich über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen (Daten nicht gezeigt).

3.3.9 Vergleich von *Arabidopsis* Pflanzen, die CKX2 ektopisch im Zytoplasma exprimieren mit *CKX7* überexprimierender Pflanzen

Der Phänotyp von *35S:CKX7* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen unterschied sich wesentlich von dem der Pflanzen, die andere *CKX* Gene aus *Arabidopsis* überexprimieren (Werner *et al.*, 2003) und zwar hauptsächlich in Bezug auf den Wurzelphänotyp. Zum Beispiel war in *35S:CKX1* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen das Wurzelmeristem größer was zur Bildung längerer und stärker verzweigter Wurzeln führte. Zudem war eine erhöhte Anzahl Zelllinien von Endodermis und Epidermis vorhanden.

Sämtliche Zelltypen der Wurzel einschließlich der Xylem- und Phloemzellen waren radial vergrößert (Werner *et al.*, 2003). In der Primärwurzel von *35S:CKX7* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen war der Durchmesser hingegen reduziert da kein Metaxylem gebildet wurde. Zusätzlich wurde das Längenwachstum eingestellt und es wurden keine Lateralwurzeln von der Primärwurzel gebildet (Kapitel 3.3.5).

Aufgrund dieser wesentlichen oder im Vergleich zum WT sogar konträren Wurzelphänotypen stellte sich die Frage, warum die gleiche Ursache, nämlich Cytokinindefizienz, in diesen Pflanzen eine so verschiedene Wirkung hat. Es gibt einige Aspekte, in denen sich die Proteine der Familie unterscheiden. Zum einen sind die Proteine in drei verschiedenen Kompartimenten der Zelle aktiv. CKX2 und CKX4 wurden experimentell im ER lokalisiert (Werner *et al.*, 2003). Sie werden vermutlich durch Sekretion aus der Zelle transportiert und sind daher wahrscheinlich apoplastisch aktiv. CKX1 wurde in der Vakuole nachgewiesen und CKX3 im Endomembransystem (Werner *et al.*, 2003). Nur CKX7 ist zytoplasmatisch lokalisiert, wie in Kapitel 3.2 beschrieben wurde. Demnach ist denkbar, dass eine Reduktion von Cytokinin im Zytoplasma andere Entwicklungsprozesse beeinflusst, als eine Reduktion außerhalb der Zelle. Es wurde zudem gezeigt, dass sich die CKX Proteine bezüglich der von ihnen präferentiell abgebauten Cytokinine unterscheiden (Galuszka *et al.*, 2007), was ebenfalls als eine Ursachen für die unterschiedlichen Phänotypen in Frage kommt.

Um zu überprüfen, ob die subzelluläre Lokalisation von CKX7 im Zytoplasma der Grund für den Wurzelphänotyp *35S:CKX7* transgener Keimlinge ist, wurde versucht, das im WT apoplastisch lokalisierte CKX2 Protein im Zytoplasma zu exprimieren. Dazu wurde *CKX2* ohne die spezifische Sequenz für das sekretorische Signalpeptid (*cCKX2*) unter der Kontrolle des *35S* Promotors exprimiert. Zur Lokalisation des Proteins wurde *cCKX2* zusätzlich mit der Sequenz des *GFP*-Gens fusioniert (*cCKX2-GFP*). Ein Vergleich des Wurzelphänotyps erhaltener *35S:cCKX2* und *35S:cCKX2-GFP* transgener Pflanzen mit dem *35S:CKX7* transgener Pflanzen sollte Hinweise liefern, ob die subzelluläre Lokalisation des Proteins ausschlaggebend für die Wirkung der dort produzierten Cytokinindefizienz auf die Wurzelentwicklung ist.

In *Arabidopsis* wurden in drei unabhängigen Wiederholungen der Transformation mehr als 20 unabhängigen Transformanten je Konstrukt selektiert. Die *35S:cCKX2* und *35S:cCKX2-GFP* transgenen Pflanzen zeigten nicht den Primärwurzelphänotyp von *35S:CKX7* transgenen Pflanzen. Stattdessen wurde kein Unterschied zu *35S:CKX2* transgenen Pflanzen gefunden, die die vollständige Sequenz von *CKX2* überexprimieren und deren Wurzelwachstum im Vergleich zum WT leicht verstärkt ist (Werner *et al.*, 2003). Bei einer Auswahl der Linien wurde die *cCKX2* Expression mittels *Northern Blot*-Analyse überprüft (Abbildung 24).

In allen selektierten und getesteten Linien wurde in der *Northern Blot*-Analyse im Gegensatz zum WT eine Bande detektiert. Das bedeutet, dass *cCKX2* und *cCKX2-GFP* in den selektierten Linien exprimiert wurden. Einige Spuren weisen einen starken Schmier unterhalb der zu erwartenden Bande

auf, der vermutlich aus degradierten Transkripten bestand. In den Linien, in denen eine eindeutige Bande detektiert wurde, zum Beispiel in beiden *35S:cCKX2-GFP* Linien und der Linie *35S:cCKX2-BI-9*, wurde aufgrund einer erhöhten *cCKX2*-Expression auch eine erhöhte CKX Aktivität erwartet. Die gemessene CKX Aktivität in diesen Linien war jedoch nicht höher als im WT (Daten nicht gezeigt). Auch eine Detektion von GFP-Fluoreszenz war in den selektierten Linien nicht möglich. Somit konnte die Expression von *cCKX2* nur auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Die Bildung des transgenen Proteins konnte weder anhand von CKX Aktivität noch anhand von GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden, sodass eine Aussage über die Aktivität von CKX2 im Zytoplasma nicht möglich war.

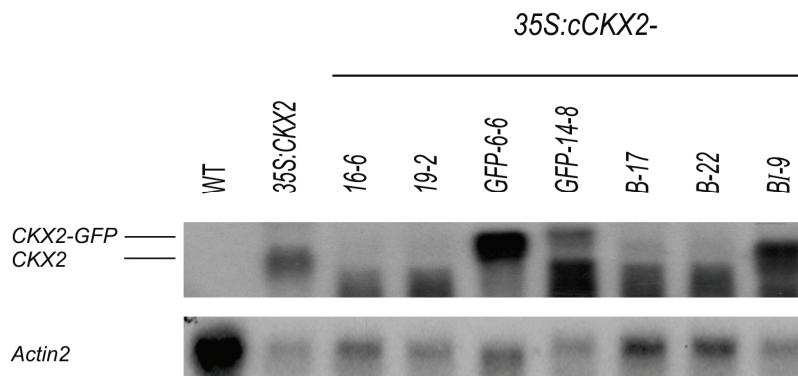


Abbildung 24: Detektion des *CKX2* Transkriptes mittels *Northern Blot*-Analyse in *cCKX2* und *cCKX2-GFP* überexprimierenden *Arabidopsis* Pflanzen.

In allen transgenen Linien ist eine höhere Transkriptmenge von *CKX2* als im WT vorhanden. Die Sonde war homolog zu einem Bereich in *CKX2*, der auch in der um die Signalsequenz verkürzten Form enthalten ist und detektiert somit endogenes als auch transgenes *CKX2*, *cCKX2* und *cCKX2-GFP*. Eine Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für *ACTIN2* ist als Ladekontrolle gezeigt. Es wurden Keimlinge 10 DAG untersucht. Die verschiedenen Nummern und Buchstaben der Linien resultieren aus mehreren unabhängigen Primärselektionen.

4. Ergebnisse Teil II:

Analyse cytokininregulierter Gene für Transkriptionsfaktoren

Zusätzlich zum Metabolismus von Cytokinin, welcher im ersten Teil der Arbeit untersucht wurde, tragen auch die Signalweiterleitung von Cytokinin und dessen Einfluss auf mögliche Zielgene dazu bei, Pflanzenwachstum und -entwicklung zu regulieren.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Untersuchung von Zielgenen des Cytokininsignalweges im Vordergrund. Aus Voruntersuchungen gewonnene Kandidatengene wurden mit dem Ziel untersucht, sie in das komplexe Netzwerk bereits bekannter Komponenten der Cytokininwirkung einzugliedern und ihre Funktion bei der Vermittlung der Cytokininwirkung aufzuklären. Dabei wurden Gene ausgewählt, die anhand ihrer Annotation in Datenbanken für Proteine mit einer DNA-Bindfähigkeit kodieren und somit eine Funktion als potentielle Transkriptionsfaktoren besitzen könnten (siehe Originaldaten aus Brenner *et al.*, (2005) im Anhang).

Ausgangspunkt der Untersuchung stellte ein Experiment dar, in dem *Arabidopsis* WT Keimlinge für 15 Minuten oder 120 Minuten mit dem Cytokinin Benzylaminopurin (BA) behandelt wurden. Mit Hilfe einer *Microarray*-Analyse wurde das Transkriptom beider Untersuchungsgruppen mit dem von unbehandelten WT Keimlingen verglichen. Dieser Vergleich führte zur Identifizierung von 82 Genen mit veränderter Transkription nach 15 Minuten Cytokininbehandlung und weit über 1800 Genen mit veränderter Transkription nach 120 Minuten Cytokininbehandlung (Brenner *et al.*, 2005). Es wurden nach Cytokininbehandlung mehr als zwölf Gene identifiziert, die für potentielle Transkriptionsfaktoren kodieren. Die Behandlung des WT mit Cytokinin für 15 Minuten sollte Aufschluss über die schnellen Veränderungen der Genexpression geben. Durch einen Vergleich mit den Ergebnissen nach zwei Stunden Cytokininbehandlung sollten Hinweise darüber gewonnen werden, wie lange diese Veränderung der Genexpression anhält. In diesem Experiment wurden auch cytokinindefiziente Keimlinge, die *CKX1* konstitutiv unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren, verwendet und dessen Transkriptom ebenfalls mit dem von unbehandelten WT Keimlingen verglichen. Die Verwendung cytokinindefizienter Keimlinge sollte Aufschluss über die langfristigen Anpassungen in der Expression der Gene geben (Brenner *et al.*, 2005).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die identifizierten potentiellen Transkriptionsfaktoren untersucht, deren Transkriptmenge cytokininreguliert war. Es wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. In einem *loss-of-function* Ansatz wurde der Phänotyp von T-DNA-Insertionsmutanten der identifizierten Gene und die Reaktion der Mutanten auf exogen appliziertes Cytokinin untersucht. In einem *gain-of-function* Ansatz wurden vier der Gene unter der Kontrolle des 35S Promotors in *Arabidopsis* überexprimiert. Der Phänotyp dieser Pflanzen wurde charakterisiert und ebenfalls die Reaktion der transgenen Pflanzen auf exogen appliziertes Cytokinin untersucht.

4.1 Auswahl der cytokininregulierten Gene mit potentieller Funktion als Transkriptionsfaktor

Die analysierten Kandidatengene wurden nach mehreren Kriterien aus den Datensätzen eines *Microarray*-Experimentes ausgewählt (Brenner *et al.*, 2005). Es wurden solche Gene ausgewählt, die nach BA-Behandlung eine mindestens zweifache Erhöhung oder eine mindestens fünffache Reduktion der Transkriptmenge aufwiesen. Zudem wurde die Auswahl auf potentielle Transkriptionsfaktoren begrenzt. Die auf diese Weise ermittelte Anzahl an Kandidatengenen wurde durch Literaturrecherchen weiter eingegrenzt (Tabelle 5). Bereits charakterisierte Gene deren Funktion keine Verbindung zur Cytokininsignaltransduktion erkennen ließ, wurden nicht weiter untersucht. Ein Grund dafür war zum Beispiel, dass beschriebene Phänotypen von Mutanten der Gene keinerlei Übereinstimmung mit morphologischen Veränderungen an Pflanzen mit erhöhtem oder reduziertem Cytokiningehalt hatten, wie sie in der Einleitung beschrieben wurden. In Tabelle 5 sind potentiell cytokininregulierte Transkriptionsfaktorgene aufgeführt. Drei der schnell hoch regulierten Gene (*GATA22*, *bHLH64*, *HAT22*) und das nach 120 Minuten hoch regulierte Gen *HAT4* wurden für den *gain-of-function* Ansatz ausgewählt. *HAT4* ist bereits ausführlich charakterisiert worden (Referenzen siehe in Tabelle 5). Der Phänotyp von Mutanten dieses Gens erschien besonders interessant, da er dem Wurzelphänotyp von *35S:CKX1* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen ähnelt. *Arabidopsis* Pflanzen mit reduzierter *HAT4*-Expression haben eine längere und stärker verzweigte Primärwurzel als der WT (Skena *et al.*, 1993; Steindler *et al.*, 1999). Alle Gene in Tabelle 5 wurden zudem für den *loss-of-function* Ansatz verwendet.

Tabelle 5: Gene mit erhöhter oder reduzierter Transkriptmenge nach Cytokininbehandlung.

Annotation im <i>Arabidopsis</i> Genom	Name	Relative Änderung der Transkriptmenge im WT durch Cytokininbehandlung	Literatur
At4g26150	GATA22	2,0	(Reyes <i>et al.</i> , 2004; Bi <i>et al.</i> , 2005; Kiba <i>et al.</i> , 2005; Manfield <i>et al.</i> , 2007)
At1g08810	MYB60	2,2	(Cominelli <i>et al.</i> , 2005)
At4g37790	HAT22	2,4	(Ohgishi <i>et al.</i> , 2001)
At2g18300	bHLH64	2,9	(Heim <i>et al.</i> , 2003; Toledo-Ortiz <i>et al.</i> , 2003; Carabelli <i>et al.</i> , 2007)
At4g16780	HAT4	13,0	(Carabelli <i>et al.</i> , 1993; Schena <i>et al.</i> , 1993; Carabelli <i>et al.</i> , 1996; Steindler <i>et al.</i> , 1999; Ohgishi <i>et al.</i> , 2001; Carabelli <i>et al.</i> , 2007)
At3g60390	HAT3	5,1	(Schindler <i>et al.</i> , 1993; Carabelli <i>et al.</i> , 2007)
At1g71030	MYBL2	5,6	keine Literatur; Annotation TAIR
At2g37430	ZAT11	< 0,1	(Meissner und Michael, 1997)
At2g26150	HSFA2	< 0,1	(Nishizawa <i>et al.</i> , 2006; Schramm <i>et al.</i> , 2006; Charng <i>et al.</i> , 2007)
At3g46130	MYB48 / 111	0,1	(Oh <i>et al.</i> , 2003; Yanhui <i>et al.</i> , 2006)
At5g43520	CHP rich protein	0,1	keine Literatur; Annotation TAIR
At5g48560	bHLH78	0,1	(Toledo-Ortiz <i>et al.</i> , 2003)

Die dargestellten Expressionswerte basieren auf den Daten eines *Microarray*-Versuchs (Brenner *et al.*, 2005), und waren der Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen. Die Transkriptmenge nach 15 bzw. 120 Minuten Behandlung mit 5 µM Cytokinin wurde ins Verhältnis gesetzt zur Transkriptmenge nach Kontrollbehandlung. Sieben Tage alte Keimlinge wurden verwendet. TAIR – www.arabidopsis.org

Erhöhung nach 15 Minuten
 Erhöhung nach 120 Minuten
 Reduktion nach 120 Minuten

4.2 Untersuchung der cytokininabhängigen Regulation der Kandidatengene

Die vier Gene *GATA22*, *HAT22*, *HAT4* und *bHLH64* (Tabelle 5) wurden für den *gain-of-function* Ansatz ausgewählt. Um die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse (Brenner *et al.*, 2005) zu überprüfen, wurden drei zusätzliche Methoden zur Analyse der cytokininabhängigen Regulation der Transkriptmenge der vier Kandidatengene verwendet. Diese unabhängige Überprüfung der Ergebnisse wurde durchgeführt, um eine gesicherte Ausgangsposition für weiterführende Experimente zu erhalten.

4.2.1 Analyse der Transkriptmenge durch RT-PCR und *Northern Blot*

Eine erste Bestätigung der erhöhten Transkriptmenge der vier ausgewählten Gene nach Cytokininbehandlung lieferte das Ergebnis einer semiquantitativen RT-PCR (Reverse Transkription mit anschließender PCR) (Abbildung 25, links). Dazu wurde Gesamt-RNA von mit Cytokinin behandelten Keimlingen verwendet. Die Cytokininbehandlung erfolgte jeweils für 15 und 120 Minuten. Der Einsatz gleicher Ausgangsmengen an Gesamt-RNA in die Reaktion wurde anhand der durchgeführten Kontrollreaktion mit *ACTIN2* überprüft. Die gleich starke Bande des *ACTIN2*-Amplifikates in einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel zeigt, dass gleiche Ausgangsmengen in die Reaktion eingesetzt wurden (Abbildung 25, links). Für jedes untersuchte Gen wurde eine spezifische Zykluszahl ermittelt, bei der die Reaktion noch nicht in die Sättigungsphase übergegangen ist. Anhand der Bandenstärke ließ sich semiquantitativ die Transkriptmenge der einzelnen Gene in den Proben vergleichen. Nach Cytokininbehandlung konnte in WT Keimlingen von allen vier untersuchten Genen eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge festgestellt werden (Abbildung 25a). Die Induktion der einzelnen Transkripte durch Cytokininbehandlung zeigte einen unterschiedlichen temporären Verlauf. Die Transkriptmenge von *GATA22* war erst nach zwei Stunden erhöht, wohingegen die von *bHLH64* bereits nach 15 Minuten Cytokininbehandlung verstärkt vorlag und die Menge auch nach zwei Stunden noch erhöht war. Die Transkriptmengen von *HAT4* und *HAT22* stiegen zwar weniger stark an, waren jedoch auch bereits nach 15 Minuten signifikant erhöht. Nach zwei Stunden ist deren Transkriptmenge etwas geringer als nach 15 Minuten Cytokininbehandlung, aber immer noch höher als in unbehandelten Keimlingen (Abbildung 25a).

Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer *Northern Blot*-Analyse in einer biologisch unabhängigen Wiederholung des Versuchs erhalten (Abbildung 25b). Die Transkripte aller vier Gene wurden in WT Keimlingen in ausreichender Menge gebildet, dass sie mittels einer radioaktiv markierten Sonde, die homolog zum jeweiligen Transkript ist, detektiert werden konnten (siehe erste Spalte in Abbildung 25b). Die Transkriptmenge von *GATA22* war bereits nach 15 Minuten Cytokininbehandlung erhöht und stieg nach zwei Stunden weiter an. Der temporäre Verlauf der Transkripterhöhung von *bHLH64*

verlief im *Northern Blot*-Experiment ebenfalls etwas anders als im RT-PCR Versuch. Die Transkriptmenge stieg nach zwei Stunden Cytokininbehandlung noch weiter an als bereits nach 15 Minuten. Im Falle von *HAT4* und *HAT22* verlief die Induktion durch Cytokininbehandlung in beiden Versuchen gleich. Sie war nach 15 Minuten am höchsten und fiel nach zwei Stunden etwas ab. Die Behandlung mit KOH erhöhte zwar die Transkriptmenge aller untersuchten Gene geringfügig, war jedoch im Vergleich zur Induktion durch Cytokininbehandlung zu vernachlässigen.

Cytokinindefiziente Keimlinge wurden verwendet, um die Genexpression der Kandidatengene bei einem verringerten endogenen Cytokiningehalt in Keimlingen zu untersuchen. Anhand des *Northern Blot*-Versuches (Abbildung 25b) wird deutlich, dass in cytokinindefizienten Pflanzen die Transkriptmengen von *GATA22* und *bHLH64* reduziert sind. Interessanterweise ist die Transkriptmenge von *HAT4* in cytokinindefizienten Keimlingen im Vergleich zum WT erhöht und steigt durch das Lösungsmittel KOH in den Kontrollpflanzen nach zwei Stunden stärker an als im WT.

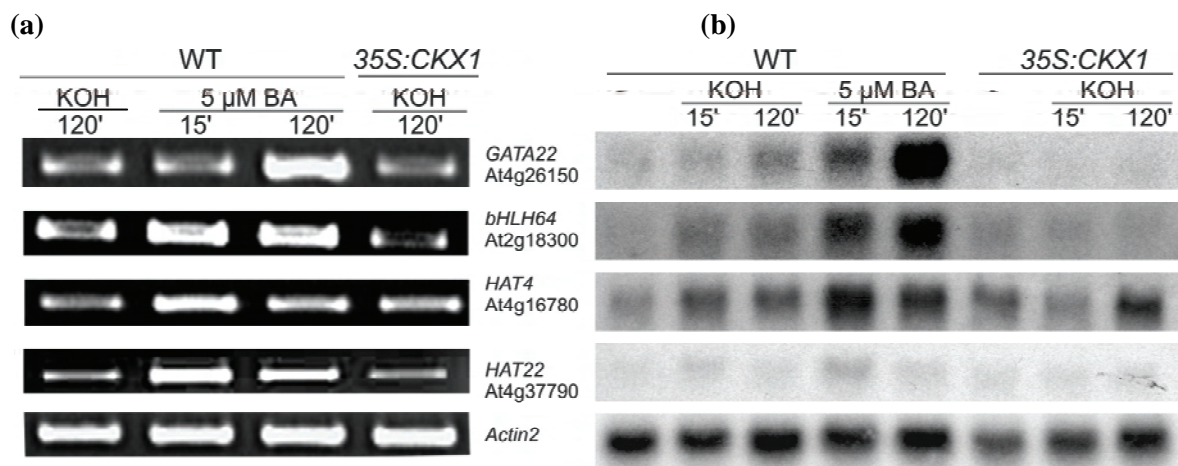


Abbildung 25: Semiquantitative RT-PCR und *Northern Blot* zur Überprüfung der Induktion ausgewählter Transkriptionsfaktorgene durch Cytokinin.

Für eine semiquantitative RT-PCR (a) mit genspezifischen Primern und spezifischer Zyklenzahl je Gen wurden 0,5 µg RNA eingesetzt. Als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen RNA in die Reaktion wurde *ACTIN2* verwendet. Die genspezifischen Zyklenzahlen waren: *ACTIN* – 23x, *GATA22* – 30x, *bHLH64* – 25x, *HAT4* – 27x, *HAT22* – 25x. In einer *Northern Blot*-Analyse (b) wurden mit radioaktiv markierten genspezifischen Sonden Transkripte der Kandidatengene detektiert. Dazu wurden 20 µg Gesamt-RNA mittels Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die RNA auf eine Nylonmembran übertragen und die mRNA mit ³²P markierten spezifischen Sonden detektiert. Als Ladekontrolle wurde eine *ACTIN2* Sonde verwendet. In beiden Versuchen wurden je Probe ca. 50 zehn Tage alte *in vitro* gewachsene Keimlinge verwendet, die zur Cytokinininduktion in Flüssigkultur überführt wurden. - steht für unbehandelte Keimlinge.

Verglichen mit den in Tabelle 5 gezeigten Induktionswerten der Gene *bHLH64* und *HAT22* stimmen die Ergebnisse der RT-PCR und der *Northern Blot*-Analyse gut überein. Die ermittelte starke Erhöhung der Transkriptmenge von *GATA22* wurde in der *Microarray*-Analyse nicht gefunden. Auch die Expressionshöhe von *HAT4* wich besonders nach zwei Stunden Cytokininbehandlung von den hier ermittelten Werten deutlich ab. Es konnte zwar eine Induktion nach Cytokininbehandlung bestätigt

werden, jedoch trat diese bereits nach 15 Minuten ein und war nach 120 Minuten Cytokininbehandlung bereits wieder etwas zurückgegangen. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse (*HAT4* 13-fach erhöht) hinsichtlich ihrer Klassifizierung anzeigen, dass *HAT4* in den Kontrollproben und nach 15 Minuten Cytokininbehandlung so gering exprimiert war, dass die gemessene Fluoreszenzstärke unter der verlässlichen Detektionsgrenze lag (siehe Originaldaten aus Brenner *et al.*, (2005) im Anhang). Da die Transkriptmenge bzw. die gemessene Fluoreszenz erst nach zwei Stunden Cytokininbehandlung über die Detektionsgrenze anstieg, kann man nur eine semiquantitative Aussage treffen und die Transkriptmenge als erhöht gegenüber der Kontrolle bewerten.

4.2.2 Analyse der Transkriptmenge durch quantitative RT-PCR

Die in der *Microarray*-Analyse ermittelten Induktionswerte der vier Gene *GATA22*, *bHLH64*, *HAT4* und *HAT22* sind noch einmal zusammenfassend in Tabelle 6 dargestellt und wurden unabhängig mit einer weiteren quantitativen Methode bestätigt. Mit der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) wurden die relativen Veränderungen der Transkriptmengen der vier Gene nach 15 Minuten und zwei Stunden Cytokininbehandlung ermittelt.

Von allen vier Genen lagen nach Cytokininbehandlung verglichen mit den Kontrollen erhöhte Transkriptmengen zwischen 1,3-fach und 2,5-fach vor (Tabelle 6). Die Ergebnisse der Untersuchung der Transkriptmenge nach Cytokininbehandlung aller Kandidatengene mittels qRT-PCR ist im Anhang dargestellt (Abbildung 46, Anhang). Hier konnte zusätzlich für die Gene *HSFA2*, *MYB48* und *bHLH78* deren Transkriptmenge in der *Microarray*-Analyse nach zwei Stunden Cytokininbehandlung reduziert war, ebenfalls eine leichte Reduktion ermittelt werden. Die Transkriptmengen gingen jedoch nicht unter 0,3-fach ihrer Menge in unbehandelten Proben zurück. Eine cytokininabhängige Regulation von *MYB60* wurde mit dieser Methode nicht gefunden. Die Transkriptmenge von *HAT3* war nach Cytokininbehandlung leicht erhöht (1,5-fach), jedoch nicht so stark wie anhand des *Microarray* ermittelt (5-fach).

Tabelle 6: Zusammenfassung der Induktionswerte ermittelt in der qRT-PCR und der *Microarray*-Analyse.

		qRT-PCR Induktionsfaktor		<i>Microarray</i> Induktionsfaktor	
Gen	Atg Nummer	15' BA	120' BA	15' BA	120' BA
<i>GATA22</i>	At4g26150	2,03 ± 0,09	2,54 ± 0,12	1,99	1,37
<i>bHLH64</i>	At2g18300	1,62 ± 0,13	1,86 ± 0,12	2,94	2,68
<i>HAT4</i>	At4g16780	1,33 ± 0,15	1,41 ± 0,21	8,39	13,05
<i>HAT22</i>	At4g37790	2,09 ± 0,18	1,59 ± 0,07	2,37	1,41

Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von mit 5 µM BA behandelten Keimlingen verglichen mit der jeweiligen Kontrolle ermittelt im einer qRT-PCR (Spalte 3+4) und einer *Microarray*-Analyse (Spalte 5+6). In der qRT-PCR war die jeweilige Kontrolle für 15' BA eine Probe, die 15 Minuten mit dem Lösungsmittel für BA, KOH behandelt wurde und für 120' BA eine Probe, die 120 Minuten mit KOH behandelt wurde. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei technischen Replikaten. Für die qRT-PCR-Analyse wurden je Probe ca. 50 zehn Tage alte, *in vitro* gewachsene Keimlinge verwendet, die zur Cytokinininduktion in Flüssigkultur überführt wurden.

Die Daten des *Microarray* (Spalte 5 und 6) sind ein Auszug aus bereits veröffentlichten Daten (Brenner *et al.*, 2005). Die Kontrolle war dort für beide Behandlungszeiträume eine für 120 Minuten mit KOH behandelte Probe.

Tendenziell zeigten die Änderungen der Transkriptmengen von *GATA22*, *bHLH64* und *HAT22* einen ähnlichen Verlauf wie er auch in den anderen Experimenten ermittelt wurde (Abbildung 25). Der Induktionsfaktor war jedoch insgesamt geringer. Der temporäre Verlauf der Zunahme an Transkript von *HAT4* ist in der qRT-PCR unterschiedlich zu dem der *Northern Blot*-Analyse, wo die Transkriptmenge nach zwei Stunden wieder gesunken war. Mit den Ergebnissen der *Microarray*-Analyse stimmen die Ergebnisse der qRT-PCR jedoch tendenziell überein. In allen Analysen ist verglichen mit der Kontrolle eine Transkriptzunahme von *HAT4* durch Cytokinin zu verzeichnen.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene

Der *loss-of-function* Ansatz sollte dazu beitragen, die Funktion der ausgewählten Gene (Tabelle 5) bei der Vermittlung der Cytokininwirkung auf das Pflanzenwachstum aufzuklären. Das Ziel bei diesem Ansatz besteht darin, durch Mutation der Gene, deren Funktionsverlust zu bewirken. Die Konsequenzen des Funktionsverlustes können dann anhand des Phänotyps dieser *loss-of-function* Mutanten untersucht werden, der möglicherweise dem Phänotyp bekannter cytokininverwandter Mutanten ähnelt. Spielt eines der ausgewählten Gene eine Rolle bei der Vermittlung der Cytokininwirkung, bestand die Erwartung, dass eine veränderte Sensitivität gegenüber exogen appliziertem Cytokinin in verschiedenen Wachstumstests messbar sein könnte. Zur Untersuchung der Auswirkungen des Funktionsverlustes der Kandidatengene wurde die T-DNA-Insertionsmutagenese ausgewählt, da T-DNA-Insertionsmutanten für die meisten Gene in einem genomweiten Projekt von mehreren großen Konsortien hergestellt wurden und leicht zugänglich sind.

4.3.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten durch PCR-Genotypisierung

Für die Kandidatengene aus Tabelle 5 wurde zunächst ermittelt, ob es in den Datenbanken verschiedener Institute (siehe Material und Methoden Punkt 2.4.1) T-DNA-Insertionsmutanten für diese Gene gibt. Mehrere unabhängige Linien wurden, wenn vorhanden, bestellt. Dabei wurden bevorzugt solche Linien ausgewählt, bei denen die Insertion in einem Exon annotiert worden war. Andernfalls wurden Linien bestellt, bei denen die Insertion nicht mehr als 1000 bp vor dem Startcodon oder in einem Intron annotiert worden war. Von den Kandidatengenen aus Tabelle 5 standen in den meisten Fällen T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Eine Zusammenfassung der Linien ist in Tabelle 9 im Anhang gezeigt. Die Größe der Gene und die in den Datenbanken angegebene Position der Insertion in den untersuchten Linien zeigt Abbildung 45 im Anhang.

Als erstes wurde in Einzelpflanzen jeder Linie noch einmal unabhängig die Insertion einer T-DNA in das ausgewählte Gen bestätigt. Dazu wurde die genomische DNA von 20 einzelnen Pflanzen mittels zweier spezifischer PCR-Reaktionen untersucht (siehe Methodenteil für eine detaillierte Beschreibung der Test-PCR Analyse unter Punkt 2.12). Eine der spezifischen PCR Reaktionen gibt Auskunft über das Vorhandensein einer T-DNA an der untersuchten Stelle durch Verwendung eines Primerpaares, das ein chimäres Fragment aus einem Teil des Gens und der *left border* (LB) der T-DNA nachweist. Die zweite PCR Reaktion unter Verwendung zweier die T-DNA flankierender genspezifischer Primer gibt Aufschluss darüber, ob die T-DNA in einem oder beiden Allelen des Gens inseriert ist.

Ergibt nur die PCR mit den beiden genspezifischen Primern ein Amplifikat, so ist am untersuchten Genort in keines der Allele eine T-DNA inseriert. Ergeben beide PCR-Reaktionen ein Amplifikat, so liegt ein Allel ohne T-DNA und das zweite Allel mit T-DNA vor. Ergibt nur die PCR Reaktion mit dem Primerpaar, das den T-DNA spezifischen Primer enthielt ein Amplifikat, so ist in beide Allele des Gens eine T-DNA inseriert. Diese Pflanzen sind somit homozygot für die T-DNA-Insertion und die Genstruktur ist in beiden Allelen verändert.

Die Genotypisierung ausgewählter Linien mit den oben beschriebenen Test-PCR-Reaktionen ergab, dass in einigen Linien gar keine T-DNA Insertion an der angegebenen Stelle im Genom nachweisbar war (Tabelle 7). Solche Linien wurden nicht weiter untersucht. Linien, bei denen in einzelnen Pflanzen der Untersuchungsgruppe eine Insertion nachweisbar war, enthielten die T-DNA entweder in einem oder in beiden Allelen. In einigen der untersuchten Linien wurden in der ersten untersuchten Generation keine homozygoten Mutanten, sondern ausschließlich Heterozygote und Wildtypen identifiziert. In diesen Fällen wurden die Homozygoten durch Selbstung von identifizierten heterozygoten Einzelpflanzen hergestellt. In keinem Fall traten in der Nachkommenschaft einer heterozygoten Mutante keine homozygoten Pflanzen auf. Dies deutet darauf hin, dass der vollständige Funktionsverlust der Gene keine letale Wirkung hat.

Die auf diese Weise ermittelten homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Tabelle gibt einen Überblick über die Insertionslinien, die untersucht wurden und die Position der Insertion im Genom laut Datenbank. Ferner ist gezeigt, ob bei er Genotypisierung eine T-DNA an der in den Datenbanken angegebenen Position im Genom nachgewiesen werden konnte. Die Bestätigung der Insertion und die Identifizierung einer homozygoten Linie war auf diese Weise bis auf eine Ausnahme (Ring-Zinc-Finger Protein, At2g42350) für alle Kandidatengene erfolgreich.

Tabelle 7: Untersuchte T-DNA-Insertionslinien.

Gen	Atg Nummer	Identifikation der Datenbank	Position	Nummer	T-DNA nachgewiesen	Transkript Knockout	Transkript Knockdown
<i>GATA22</i>	At4g26150	Salk_021362	5'UTR	IS1	ja	nein	nein
		Salk_003995	Intron	IS2	ja	ja	
<i>MYB60</i>	At1g08810	Salk_133309	Exon	IS1	nein	n.u.	n.u.
		Salk_089775	Promotor	IS2	nein	n.u.	n.u.
		Salk_148646	Exon	IS3	ja	nein	ja
		Salk_008005	Promotor	IS4	nein	n.u.	n.u.
		Salk_033737	Promotor	IS5	ja	nein	nein
<i>HAT22</i>	At4g37790	Salk_085964	Promotor	IS1	ja	nein	nein
<i>bHLH64</i>	At2g18300	Salk_090958	5' UTR	IS1	ja	nein	nein
		Salk_015771	5' UTR	IS2	ja	nein	nein
		Sail_540_E05	Exon	IS3	nein	n.u.	n.u.
		Sail_77_D01	Exon	IS4	ja	nein	nein
<i>HAT4</i>	At4g16780	Salk_106790	Exon	IS1	ja	ja	n.u.
		Salk_054977	Intron	IS2	ja	nein	nein
<i>HAT3</i>	At3g60390	Salk_014055	Exon	IS1	ja	ja	n.u.
<i>MYBL2</i>	At1g71030	Salk_002284	Promotor	IS2	ja	nein	nein
<i>ZAT11</i>	At2g37430	Salk_110012	Promotor	IS1	ja	nein	nein
<i>HSFA2</i>	At2g26150	Salk_008978	Exon	IS1	ja	ja	n.u.
<i>Ring-Zinc-Finger</i>	At2g42350	Salk_065843	Promotor	IS1	nein	n.u.	n.u.
		Salk_065842	Promotor	IS2	nein	n.u.	n.u.
<i>MYB48</i>	At3g46130	Salk_103847	5' UTR	IS1	ja	ja	n.u.
<i>CHP rich protein</i>	At5g43520	Sail_743_B09	5' UTR	IS1	ja	nein	nein
		Sail_864_F04	5' UTR	IS2	ja	nein	nein
		Sail_894_G10	5' UTR	IS3	nein	n.u.	n.u.
<i>bHLH78</i>	At5g48560	Salk_091522	Exon	IS1	nein	nein	nein
		Salk_076836	Exon	IS2	nein	nein	nein
		Salk_048464	Exon	IS3	ja	ja	n.u.

Dargestellt sind alle untersuchten T-DNA-Insertionslinien. Die DNA von 20 Einzelpflanzen wurde mittels zweier spezifischer PCR Reaktionen untersucht, um die Insertion der T-DNA zu bestätigen und den Genotyp der Pflanzen für die Insertion zu ermitteln (siehe Methodenteil). Die Position der Insertion ist die in den Datenbanken angegebene Position (siehe auch Abbildung 45 im Anhang). Die Bestimmung, ob ein *Knockout* oder ein *Knockdown* vorliegt, erfolgte mittels RT-PCR mit RNA von sieben Tage alten Keimlingen. Linien, in denen kein Transkript mehr nachweisbar war, sind als *Knockout* bezeichnet. Die untersuchten Allele sind Null-Allele. Linien mit reduzierter Transkriptmenge sind als *Knockdown* bezeichnet. Grau unterlegte Linien sind diese, in denen ein *Knockout* oder ein *Knockdown* vorliegt und welche für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurden. n.u. – nicht untersucht, UTR – untranslatierter Bereich, IS – Insertion.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden durch Kreuzung und Genotypisierung der Nachkommen Doppelmutanten aus den Insertionslinien *gata22_IS2-4* und *myb60_IS3-9* hergestellt. Außerdem wurde *gata22_IS2-4* mit einer Insertionsmutante des nahest verwandten *GATA*-Gens der Familie gekreuzt (*GATA21*), welche ebenfalls ein Null-Allel darstellt (Bi *et al.*, 2005).

4.3.2 Untersuchung des Transkriptlevels in bestätigten T-DNA-Insertionsmutanten

In den identifizierten homozygoten T-DNA-Insertionslinien wurde im nächsten Schritt die Transkriptmenge des entsprechenden Gens vergleichend zum WT untersucht. Es wurde eine semiquantitative RT-PCR (RT-PCR) mit RNA von sieben Tage alten Keimlingen durchgeführt. Die verwendeten Primer waren komplementär zu Bereichen am Beginn bzw. Ende des WT Transkriptes. Ein Produkt konnte unter den gewählten PCR-Bedingungen nur im WT entstehen. Entweder wurde in den Insertionslinien kein Transkript mehr gebildet oder es war bei einer beispielsweise nicht herausgespleisten intronlokalisierten Insertion zu lang für die gewählte Elongationszeit in der PCR. Als Positiv-Kontrolle für die genspezifischen Primer wurden WT Pflanzen verwendet. Die Amplifizierbarkeit der RNA der Mutanten wurde mit *ACTIN2* Primern getestet. Die Anzahl der Zyklen in der PCR Reaktion betrug 35, um eine möglicherweise starke Reduktion des Transkriptlevels (*Knockdown*) ebenfalls zu detektieren.

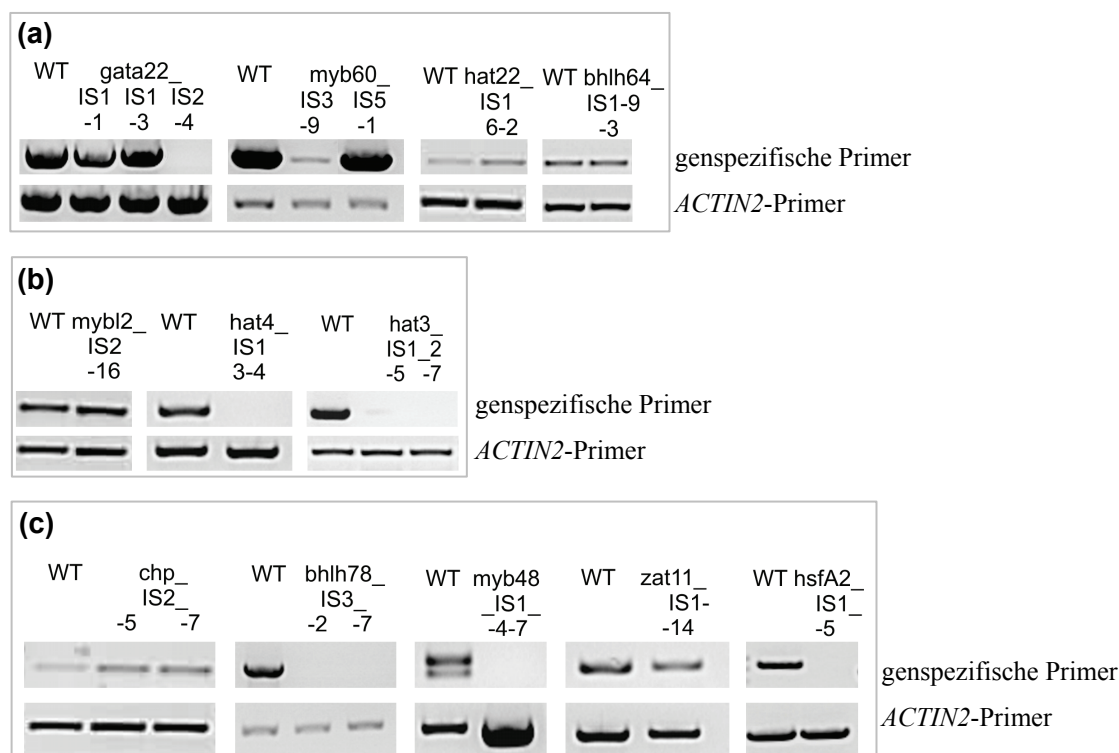


Abbildung 26: Analyse der genspezifischen Transkriptmenge von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten.

Dargestellt sind die Produkte einer RT-PCR-Analyse von Insertionsmutanten von vier Genen, die durch Cytokinin nach 15 Minuten hoch reguliert wurden (a), sowie von drei Genen, die durch Cytokinin nach 120 Minuten hoch reguliert wurden (b) und von fünf Genen, die durch Cytokinin nach 120 Minuten runter reguliert wurden (c). RNA von sieben Tage alten Keimlingen wurde mit genspezifischen Primern (jeweils oben, 35 Zyklen) und zur Kontrolle mit *ACTIN2* Primern (jeweils unten, 23 Zyklen) in der RT-PCR verwendet. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids entspricht den dunklen Banden, da die Bilder für die bessere Sichtbarkeit schwacher Banden schwarz/weiß konvertiert wurden. IS steht für die Insertionslinie des betreffenden Gens und die Ziffern stehen für einzelne identifizierte homozygote Insertionsmutanten, deren Nachkommen für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden.

Von 18 untersuchten Linien war es in sechs Linien nicht möglich, ein Transkript nachzuweisen (Abbildung 26). Das betreffende Transkript wurde im WT jeweils eindeutig nachgewiesen. Diese Linien sind somit *Knockout*-Mutanten bzw. transkriptionelle Null-Allele. Sie sind in Tabelle 7 grau unterlegt. Von den schnell durch Cytokinin hoch regulierten Genen (Abbildung 26a) war es nur für das Gen *GATA22* möglich, eine *Knockout*-Linie zu identifizieren, nämlich *gata22_IS2-4*. Von *MYB60* konnte in der Linie *myb60_IS3-9* eine stark reduzierte Transkriptmenge nachgewiesen werden. Diese Linie ist eine *Knockdown*-Mutante. Weitere *Knockout*-Mutanten wurden in der Gruppe der nach 120 Minuten durch Cytokinin hoch regulierten Gene gefunden (Abbildung 26b). Diese waren *hat4_IS1-3-4* und *hat3_IS1-2*. In der Gruppe der durch Cytokinin runter regulierten Gene waren in den Linien *bHLH78_IS3-2* und *bHLH78_IS3-7* sowie den Linien *myb48_IS1-4* und *hsfA2_IS1-5* keine Transkripte mehr nachweisbar (Abbildung 26c). Diese Linien wurden als bestätigte *Knockout*- bzw. *Knockdown*-

Mutanten für die im weiteren Verlauf beschriebenen Cytokininsensitivitätstest verwendet und werden vereinfacht als Insertionsmutanten bezeichnet.

4.3.3 Phänotypische Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene

Die unter 4.3.1 identifizierten und unter 4.3.2 bestätigten Insertionsmutanten wurden zunächst phänotypisch unter Standardbedingungen untersucht. Es wurde eine Reihe von Wachstumsparametern aufgenommen. Dazu gehörten der Rosettendurchmesser, die Sprosshöhe, der Blühzeitpunkt sowie die Anzahl von Blüten sprossen inklusive der Blüten- und Schotenzahl. Ferner wurde der Beginn der natürlichen Seneszenz anhand augenscheinlich einsetzender Gelbfärbung des jeweils sechsten Blattes mit dem des WT verglichen. Keiner der untersuchten Parameter unterschied sich in den untersuchten Linien vom WT (Daten nicht gezeigt). Im Keimlingsstadium wurden die Keimblätter und die ersten sechs Folgeblätter mit denen des WT verglichen sowie zusätzlich der Chlorophyllgehalt gemessen. Weiterhin wurden das Längenwachstum und die Verzweigung der Primärwurzel untersucht (siehe unten). Die Rosette von Keimlingen der untersuchten Insertionsmutanten unterschied sich morphologisch nicht vom WT (nicht gezeigt).

Insertionsmutanten cytokininregulierter Gene haben ein verändertes Wurzelwachstum

Cytokinin hat eine negative Wirkung auf die Wurzelverlängerung und -verzweigung. Pflanzen mit erhöhter Cytokininproduktion haben ein reduziertes Wurzelsystem (Li *et al.*, 1992) und exogen zugeführtes Cytokinin bewirkt in WT-Pflanzen ein vermindertes Wurzelwachstum (Göran, 1982; Baskin *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite haben Pflanzen mit reduziertem Cytokiningehalt oder verminderter Signaltransduktion ein verstärktes Wurzelwachstum (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2005; Riefler *et al.*, 2006; Argyros *et al.*, 2008). Trägt einer der untersuchten Transkriptionsfaktoren zur Signaltransduktion von Cytokinin bei, so wäre denkbar, dass ein Funktionsverlust des jeweiligen Gens zu einer veränderten Wurzelentwicklung führt. Um das zu überprüfen, wurde das Primärwurzelwachstum von Insertionslinien der durch Cytokinin regulierten Gene untersucht. Die Wurzelelongation unterschied sich in drei Insertionslinien der durch Cytokinin positiv regulierten Gene vom WT (Abbildung 27a). Die Primärwurzel des WT zeigte im Untersuchungszeitraum eine Längenzunahme von 56 mm. Die Primärwurzel von Mutanten der Gene *GATA22*, *MYB60* und *HAT4* zeigten im gleichen Zeitraum eine Verlängerung von ca. 60-70 mm. Dieser Wert entspricht in *myb60_IS3* 117% des WT Wertes und in *hat4_IS1* sogar 122% des WT Wertes (Abbildung 27a). In den ebenfalls untersuchten homozygoten Doppelmutanten *gata22_IS2*, *myb60_IS3* und *gata22_IS2*, *gata21_IS1* konnte keine verstärkte Primärwurzelelongation über den Wert der Elternlinien hinaus gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

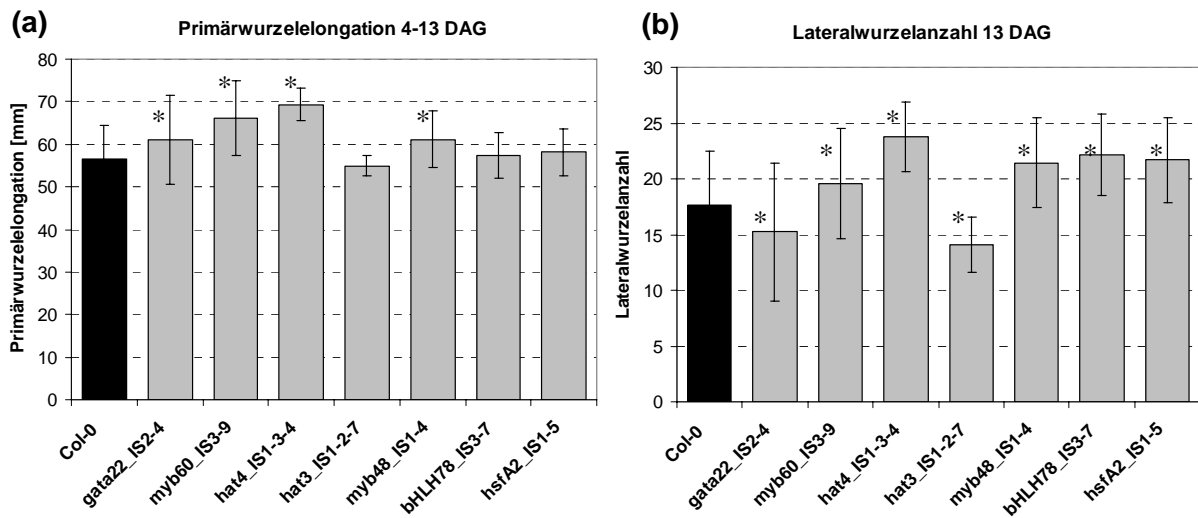


Abbildung 27: Wurzelwachstum von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene unter Standardbedingungen.

Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium untersucht. Die Primärwurzelelongation wurde zwischen 4. und 13. Tag nach der Keimung (DAG) gemessen (a) und die Lateralwurzelanzahl wurde 13 DAG bestimmt (b). Die Balken entsprechen der Standardabweichung (n=40). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert ($p < 0,01$).

13 Tage nach der Keimung hat der WT im Mittel 18 Lateralwurzeln gebildet (Abbildung 27b). Einige Insertionslinien hatten zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger Lateralwurzeln. Die Linien *gata22_IS2* und *hat3_IS1* bildeten nur 15 bzw. 14 Lateralwurzeln aus, was einem Prozentsatz von nur 86% bzw. 80% der Lateralwurzelanzahl des WT entspricht. Interessant war, dass *gata22_IS2* trotz längerer Primärwurzel weniger Seitenwurzeln als der WT bildete und somit pro Längeneinheit eine deutlich verminderte Lateralwurzelzahl hatte. Alle anderen Insertionslinien hatten 13 Tage nach der Keimung deutlich mehr Lateralwurzeln als der WT. Die Linie *hat4_IS1* hatte mit ca. 24 Wurzeln etwa 35% mehr Lateralwurzeln als der WT und die Insertionslinien der Gene *MYB48*, *bHLH78* und *HSFA2* bildeten zwischen 20% und 25% mehr Lateralwurzeln als der WT. Die Messungen wiesen eine starke Standardabweichung auf. Auch bezüglich der Lateralwurzelanzahl konnten bei den oben genannten Doppelmantanten keine stärkeren Unterschiede als bei deren Elternlinien ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Insertionslinien von positiv cytokininregulierten Genen haben einen geringeren Chlorophyllgehalt

Cytokinin beeinflusst die Chloroplastenreifung und verzögert den seneszenzbedingten Chlorophyllabbau (Chory *et al.*, 1994; Gan und Amasino, 1995; Gan und Amasino, 1996). Einige Mutanten mit reduzierter Cytokinin-signaltransduktion haben einen geringeren Chlorophyllgehalt als

der WT (Higuchi *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Argyros *et al.*, 2008). Es wurde auch beschrieben, dass *Arabidopsis* und Tabakpflanzen mit lokal erhöhter Cytokininproduktion einen erhöhten Chlorophyllgehalt besitzen (Li *et al.*, 1992). Sollten die identifizierten Transkriptionsfaktoren bei der Vermittlung dieses Aspektes der Cytokininwirkung eine Rolle spielen, so könnte ein Funktionsverlust der korrespondierenden Gene daher zu veränderten Chlorophyllgehalten führen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Chlorophyllgehalt in 20 Tage alten Pflanzen aus der Summe von Chlorophyll a und Chlorophyll b bestimmt. In drei der sieben Insertionslinien unterschied sich der Chlorophyllgehalt um mehr als 10% vom WT (Abbildung 28). Die Linie *hat4_IS1* hatte mit 0,8 µg/mg Frischgewicht (FG) einen deutlich geringeren Chlorophyllgehalt als der WT mit 1,4 µg/mg FG. Dieser Wert entspricht nur etwa 55% des WT Chlorophyllgehaltes. Der Chlorophyllgehalt von *myb60_IS3* betrug 72% und der von *hat3_IS1* nur 67% des WT Chlorophyllgehaltes. In der homozygoten Doppelmutante *gata22_IS2*, *gata21_IS1* konnte keine stärkere Reduktion des Chlorophyllgehaltes als in den jeweiligen Elternlinien gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Einen geringeren Chlorophyllgehalt als der WT zeigten nur Insertionslinien solcher Gene, die durch Cytokinin positiv reguliert werden. Es gab keine Linie, die einen mehr als 10% höheren Gehalt an Chlorophyll aufwies als der WT.

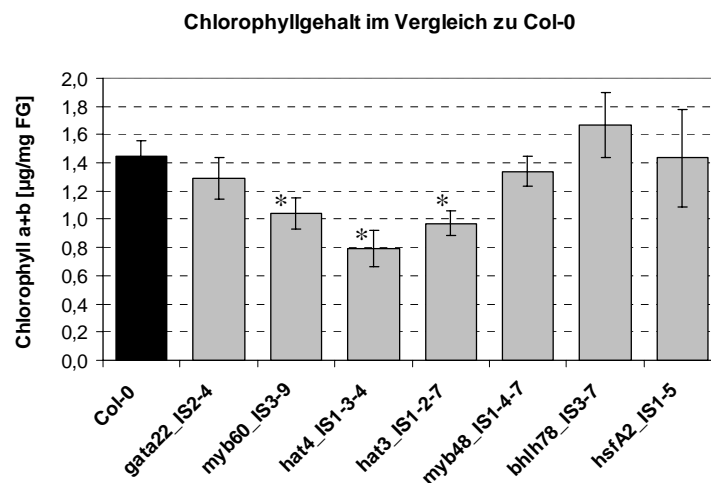


Abbildung 28: Chlorophyllgehalt von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene unter Standardbedingungen.

Das gesamte Chlorophyll von 20 Tage alten Keimlingen wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit Methanol extrahiert. Die Werte der photometrischen Messung bei 664 nm und 652 nm wurden zur Berechnung des Gesamtchlorophyllgehaltes verwendet (siehe Methodenteil). Jeweils ein definiertes Blatt von 20 Tage alten Keimlingen wurde untersucht. Die Blätter von fünf *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurden je Probe verwendet und auf 1 mg Frischgewicht (FG) bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Proben und deren Standardabweichung (n=3). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert ($p < 0,01$).

Insertionslinien von cytokininregulierten Genen haben eine geringfügig reduzierte ARR5 Expression

Als Marker für Cytokininsensitivität wird häufig *ARR5* verwendet, da es durch Cytokinin schnell und positiv reguliert wird (D'Agostino *et al.*, 2000). Ist einer der untersuchten Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung der Cytokininwirkung beteiligt, könnte in Mutanten dieser Faktoren die Cytokininantwort und somit die Expression des Reportergens *ARR5* verändert sein. Beispielsweise wäre in einer Mutante eines Faktors, der ein positiver Regulator der Cytokininwirkung ist, die *ARR5* Menge vermutlich reduziert. Dies wurde experimentell an Mehrfachmutanten dreier B-Typ ARRs gezeigt (Argyros *et al.*, 2008). Mit einer qRT-PCR wurde deshalb die *ARR5* Transkriptmenge von WT Keimlingen gemessen und mit der Menge in den Insertionslinien verglichen. In allen untersuchten Insertionslinien war die *ARR5* Transkriptmenge verglichen zum WT geringfügig reduziert (Abbildung 29). Die Transkriptmenge betrug jedoch nicht weniger als 50% der Menge des WT. Eine Ausnahme stellte die Linie *myb48_IS1* dar, in der die Menge weniger als 30% betrug.

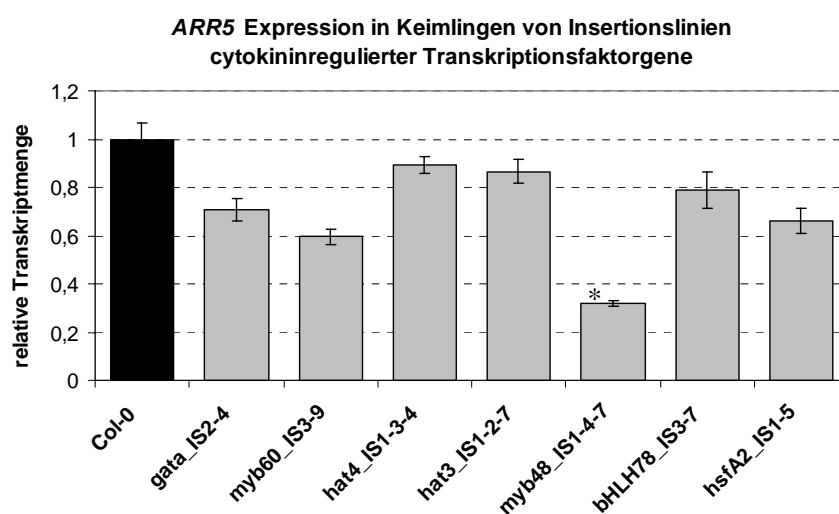


Abbildung 29: *ARR5* Expression in T-DNA-Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.

Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von *ARR5*, die mit einer qRT-PCR ermittelt wurden. Eingesetzt wurde cDNA von zehn Tage alten, unbehandelten, *in vitro* gewachsenen Keimlingen je Probe. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von drei technischen Wiederholungen. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert ($p < 0,01$).

4.3.4 Cytokininsensitivitätstests mit Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, hat Cytokinin einen Einfluss auf viele Aspekte von Pflanzenwachstum und -entwicklung. Zur Untersuchung von Mutanten im Hinblick auf die Relevanz der mutierten Gene für diese cytokininvermittelten Aspekte, wurden verschiedene Biotests entwickelt und bereits vielfach angewandt (Mok, 1994). Diese Tests dienen zur quantitativen Untersuchung der Sensitivität der untersuchten Pflanzen gegenüber exogen appliziertem Cytokinin. Es wird zum Beispiel die Reaktion des Sprosses oder der Wurzel auf Cytokinin gemessen. Zwei dieser Tests wurden mit den *Knockout*-Linien der cytokininregulierten Transkriptionsfaktorgene durchgeführt.

Wurzeln einiger Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene haben eine veränderte Cytokininsensitivität

Die exogene Zugabe von Cytokinin führt zu reduziertem Wurzelwachstum und reduzierter Wurzelverzweigung in *Arabidopsis* (Göran, 1982; Baskin *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006). Ein Funktionsverlust eines durch Cytokinin regulierten Transkriptionsfaktors könnte daher zu einer veränderten Reaktion der Pflanze gegenüber Cytokinin führen, was bereits in anderen Arbeiten gezeigt wurde (To *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2005; Argyros *et al.*, 2008). Unter der Annahme, dass die untersuchten Transkriptionsfaktoren positive oder negative Regulatoren der Cytokininwirkung sind, kann die Erwartung hinsichtlich der Reaktion von Insertionsmutanten wie folgt formuliert werden: Der Funktionsverlust eines positiven Regulators der Cytokininwirkung auf das Wurzelwachstum führt in den Insertionsmutanten vermutlich zu einer geringeren Reaktion des Wurzelwachstums auf exogen zugeführtes Cytokinin als im WT (Hyposensitivität). Das hätte zur Folge, dass die Wurzeln dieser Pflanzen mit steigender Cytokininkonzentration länger und stärker verzweigt sind als im WT. Umgekehrt führt der Funktionsverlust eines negativen Regulators der Cytokininwirkung auf das Wurzelwachstum in den Insertionsmutanten zu einer stärkeren Reaktion des Wurzelwachstums auf exogen zugeführtes Cytokinin als im WT (Hypersensitivität).

Um diese Erwartung zu überprüfen wurde, wie bereits bei der Beschreibung des Phänotyps unter Standardbedingungen (unter Punkt 4.3.3), das Primärwurzelwachstum von Insertionslinien der durch Cytokinin regulierten Gene auf Medium verschiedener Cytokininkonzentrationen untersucht (Abbildung 30).

Die Ergebnisse waren für fast alle untersuchten Insertionslinien ähnlich. Abbildung 30 zeigt daher exemplarisch die Ergebnisse der Untersuchung der Primärwurzelelongation auf Medien vier verschiedener Cytokininkonzentration (0 nM BA bis 100 nM BA) für die Insertionslinien *hat3_IS1* und *myb48_IS1*. Bei diesen Linien wurden die größten Unterschiede zum WT gefunden. Die Längenzunahme der Primärwurzel war ohne exogen zugeführtes Cytokinin gleich der des WT. Mit

steigender Cytokininkonzentration nahm zwar die Länge der Wurzeln aller Insertionslinien und des WT ab, die Primärwurzel der Linien *hat3_IS1* und *myb48_IS1* blieb jedoch länger als die des WT (Abbildung 30a, c). Die Sensitivität gegenüber Cytokinin war in diesen Linien also verringert. Die Primärwurzel von *hat3_IS1*-Pflanzen blieb bei 20 nM BA im Medium 15% länger als die des WT (Abbildung 30b) und die Primärwurzel der Linie *myb48_IS1* reagierte bei 50 nM BA weniger sensitiv als die des WT und war 20% länger (Abbildung 30d). Für die Linie *gata22_IS2* konnten bei 20 und 50 nM BA im Medium Sensitivitätsunterschiede von ca. 15% verglichen zum WT ermittelt werden. Diese Daten sind zusammen mit den Ergebnissen aller anderen untersuchten Linien im Anhang gezeigt (Abbildung 47). Für alle anderen untersuchten Linien, einschließlich der homozygoten Doppelmutanten *gata22_IS2*, *myb60_IS3* und *gata22_IS2*, *gata21_IS1* konnte jedoch keine veränderte Cytokininsensitivität der Primärwurzelelongation gemessen werden (Abbildung 47, Anhang).

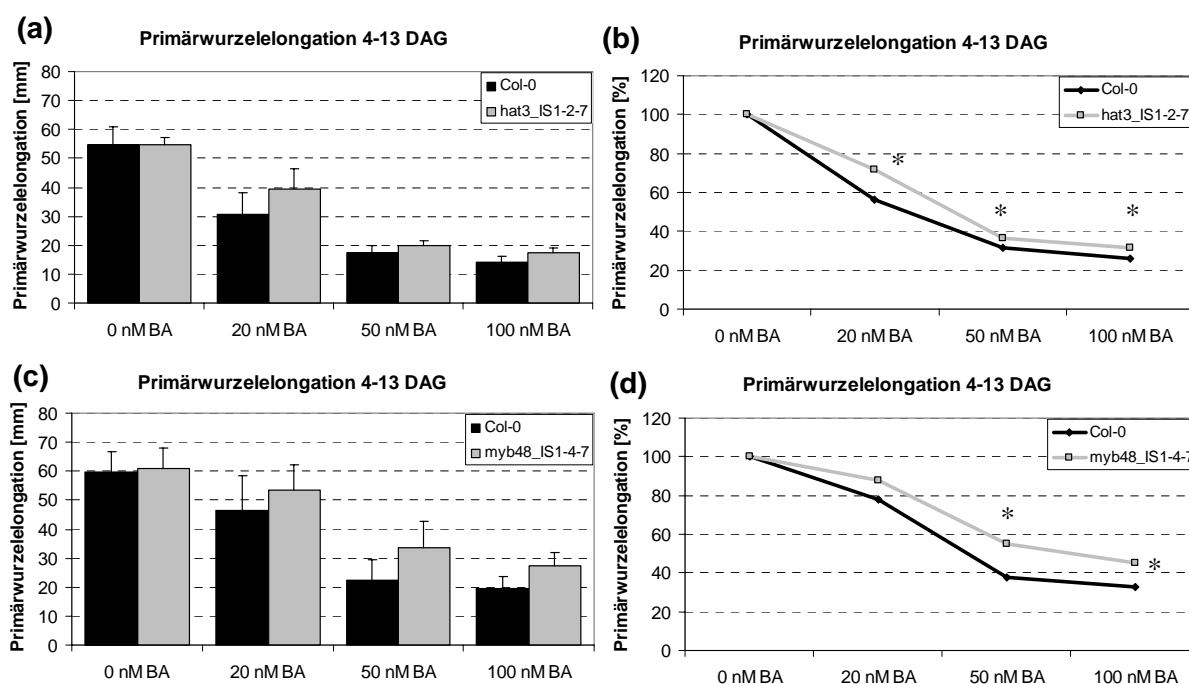


Abbildung 30: Primärwurzelelongation der Insertionslinien *hat3_IS1* und *myb48_IS1* auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.

Die Primärwurzelelongation der Linien *hat3_IS1* und *myb48_IS1* ist im Vergleich zum WT nach Wachstum auf cytokininhaltigem Medium verschiedener Konzentrationen in mm (a, c) sowie als prozentualer Vergleich (b, d) dargestellt. Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium mit verschiedenen Cytokininkonzentrationen untersucht. Die Primärwurzelelongation wurde vom vierten bis zum 13. DAG gemessen. Als Cytokinin wurde BA verwendet. Die Balken entsprechen der Standardabweichung (n=40). Ein Stern markiert signifikante Unterschiede zum WT (p < 0,01).

Die Lateralwurzelanzahl korrelierte ebenfalls negativ mit der Konzentration exogen zugeführten Cytokinins. Für die Linien *hsfA2_IS1*, *hat3_IS1* und *myb60_IS3* wurden Unterschiede hinsichtlich des Lateralwurzelwachstums auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT gefunden (Abbildung 31). Die Lateralwurzelanzahl in *hat3_IS1*-Pflanzen nahm im Vergleich zum WT bei steigender Konzentration an exogen zugeführtem Cytokinin stärker ab (Abbildung 31a). Die Sensitivität war also leicht erhöht. Bei 20 nM BA im Medium fiel die Lateralwurzelanzahl um 20% stärker als bei WT, nämlich auf 50% der Anzahl unter Kontrollbedingungen. Beim WT fällt die Anzahl jedoch nur auf 70% der Anzahl unter Kontrollbedingungen.

Die Linie *hsfA2_IS1* zeigte ebenso eine veränderte Lateralwurzelentwicklung. Unter Kontrollbedingungen waren bereits signifikant mehr Lateralwurzeln vorhanden als beim WT (Abbildung 31c). Die Anzahl nahm zwar wie beim WT mit steigender Cytokininkonzentration im Medium ab, war jedoch bei jeder Konzentration höher als die Anzahl vom WT. Bei 20 nM BA und auch bei 50 nM BA war die Sensitivität signifikant verringert (Abbildung 31d). Der relative Unterschied zum WT betrug etwa 10%.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch an Pflanzen der Insertionslinie *myb60_IS3* gefunden. Bei 20 nM BA im Medium bildeten diese Pflanzen ca. 52% der Lateralwurzeln wie ohne Cytokinin. Im WT waren es nur ca. 32%. Das ist ein Sensitivitätsunterschied von 20%. Für alle anderen untersuchten Insertionslinien wurden entweder keine Unterschiede gefunden oder diese waren nicht signifikant (Abbildung 48, Anhang).

Zusammenfassend konnte also für Mutanten der Transkriptionsfaktoren *MYB60* und *HSFA2* eine leicht verringerte Cytokininsensitivität und für *HAT3* eine leicht erhöhte Cytokininsensitivität anhand der Lateralwurzelanzahl identifiziert werden. In den ebenso untersuchten homozygoten Doppelmutanten *gata22_IS2*, *myb60_IS3* und *gata22_IS2*, *gata21_IS1* war die Sensitivität nicht weiter verringert als in den jeweiligen Elternlinien (Daten nicht gezeigt).

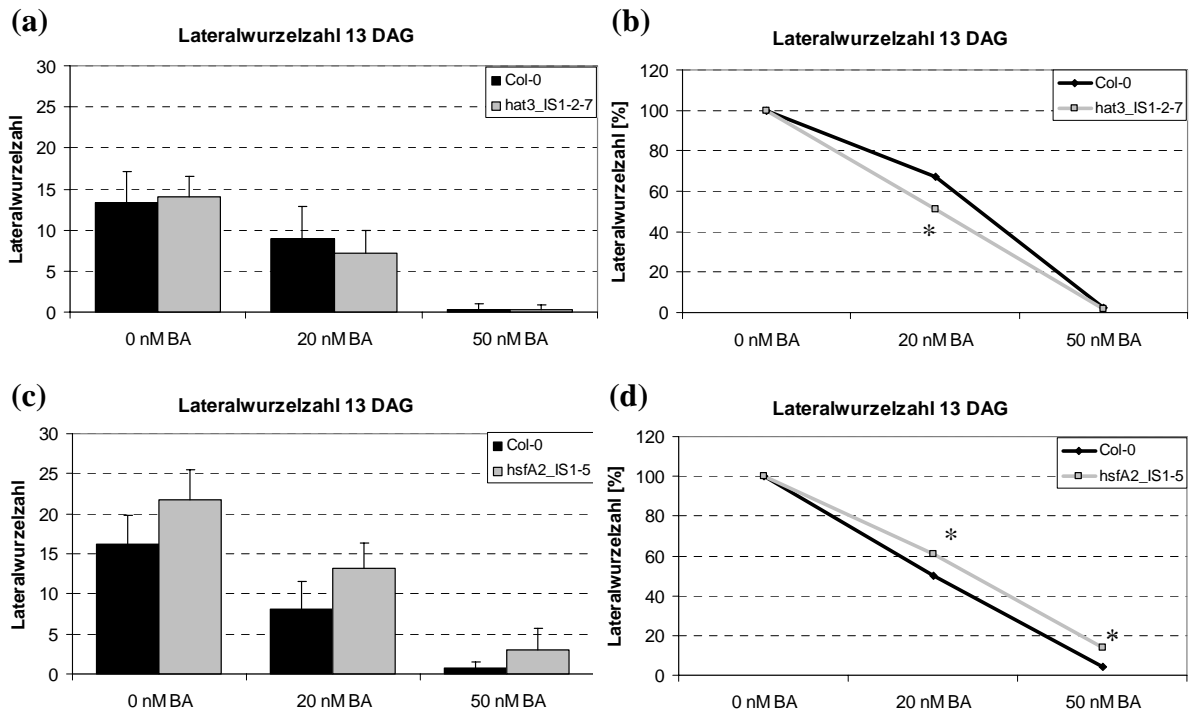


Abbildung 31: Lateralwurzelanzahl der Insertionslinien *hat3_IS1* und *hsfA2_IS1* auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.

Die Lateralwurzelanzahl der Linien *hat3_IS1* und *myb48_IS1* ist im Vergleich zum WT auf cytokininhaltigem Medium verschiedener Konzentrationen als absolute Zahl (a, c) sowie als prozentualer Vergleich (b, d) zu Kontrollpflanzen dargestellt. Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium mit verschiedenen Cytokininkonzentrationen untersucht. Die Lateralwurzelanzahl wurde 13 DAG bestimmt. Als Cytokinin wurde BA verwendet. Die Balken entsprechen der Standardabweichung (n=40). Ein Stern markiert signifikante Unterschiede zum WT ($p < 0,01$).

Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene haben keine stark veränderte Sensitivität gegenüber Cytokinin während der dunkel-induzierten Seneszenz

Cytokinin beeinflusst die Chloroplastenreifung und verzögert den seneszenzbedingten Chlorophyllabbau (Chory *et al.*, 1994; Gan und Amasino, 1995; Gan und Amasino, 1996). Während der natürlichen Seneszenz fällt der endogene Cytokininingehalt in Blättern ab und die externe Zugabe von Cytokinin oder die endogene Erhöhung von Cytokinin in transgenen Pflanzen kann die Seneszenz verlangsamen (Lim *et al.*, 2007). Auch während der dunkel-induzierten Seneszenz von abgetrennten Blättern bewirkt Cytokinin eine verlangsamte Seneszenz einhergehend mit einem verlangsamten Chlorophyllabbau (cytokininabhängige Chlorophyllretention). Der Chlorophyllgehalt dient daher in vielen Experimenten als Indikator für die Cytokininwirkung und als Parameter für den Vergleich der Cytokininsensitivität (Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006).

Zum Vergleich der Cytokininsensitivität von Insertionsmutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene wurde die Stärke der Unterdrückung von dunkel-induzierter Seneszenz in abgetrennten Blättern von Keimlingen untersucht. Die Ergebnisse waren in allen untersuchten Linien

tendenziell ähnlich und sind zusammenfassend in Abbildung 49 im Anhang dargestellt. Am Beispiel *gata22_IS2* werden die erhaltenen Ergebnisse im Folgenden erläutert (Abbildung 32).

Der Gesamtchlorophyllgehalt (Chl) war in 20 Tage alten Keimlingen der Linie *gata22_IS2* im Vergleich zum WT reduziert. Bezogen auf das Frischgewicht (FG) wurde in WT Blättern ein Gehalt von 1,1 µg Chl/mg FG gemessen. Dagegen hatten die Blätter von *gata_IS2*-Keimlingen nur 0,8 µg Chl/mg FG (Abbildung 32a). Nach Inkubation im Dunkeln verloren die Blätter fast das gesamte Chlorophyll und es wurden Werte unter 0,1 µg Chl/mg FG gemessen. Dieser Verlust wurde im WT gleichermaßen wie in *gata_IS2* durch die Zugabe des Cytokinins BA unterdrückt und die Unterdrückung korrelierte positiv mit der BA-Konzentration. Bei der höchsten BA-Konzentration blieben vom Anfangsgehalt mehr als die Hälfte des Chlorophylls erhalten. Der relative Verlauf des Chlorophyllgehalts in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration war im WT und in *gata_IS2* ähnlich. Im WT bleiben bei 1 µM BA ca. 65% und in *gata_IS2* ca. 55% erhalten.

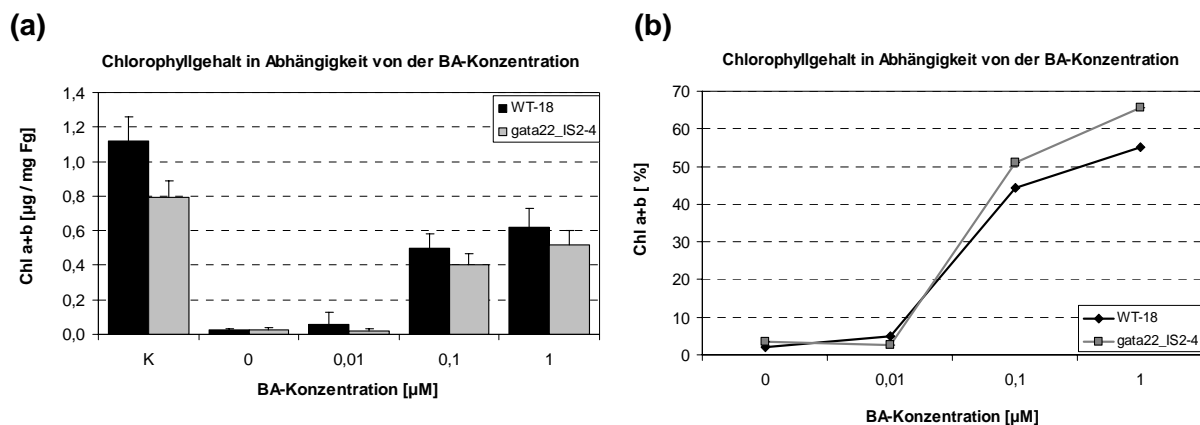


Abbildung 32: Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren am Beispiel *gata22_IS2*.

Der Gesamtchlorophyllgehalt in abgetrennten Blättern, die 10 Tage im Dunkeln inkubiert wurden, wurde gemessen (a) und prozentual zum Anfangschlorophyllgehalt (K) nicht im Dunkeln inkubierter Blätter dargestellt (b). Jeweils ein definiertes Blatt von 20 Tage alten Keimlingen wurde untersucht. Die Blätter von fünf *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurden je Probe verwendet und auf 1 mg Frischgewicht (FG) bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Proben und deren Standardabweichung dar (n=3). Der Anfangschlorophyllgehalt ohne Dunkelbehandlung wurde jeweils als 100% festgelegt. Die Proben wurden für 10 Tage entweder in Wasser und DMSO (0 µM BA) oder in Wasser mit verschiedenen Cytokininkonzentrationen (0,01 µM BA, 0,1 µM BA und 1,0 µM BA) inkubiert. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum WT wurden nicht gefunden. Die Ergebnisse aller untersuchten Linien sind im Anhang in Abbildung 49 zusammengefasst.

In den anderen untersuchten Insertionslinien der Transkriptionsfaktoren wurden auch gleiche oder leicht reduzierte Anfangschlorophyllgehalte gemessen (Abbildung 28 und im Anhang Abbildung 49). Der relative Verlauf des Chlorophyllgehalts in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration unterschied sich in wenigen Linien und nur bei einzelnen Cytokininkonzentrationen um mehr als 15% vom WT. Dazu gehört die Insertionslinie *hat3_IS1*, die mit ca. 1,1 µg Chl/mg FG einen annähernd gleichen Anfangschlorophyllgehalt wie der WT besaß. Die Chlorophyllretention und damit die Cytokininsensitivität waren in dieser Linie jedoch reduziert, da in abgetrennten Blättern weniger

Chlorophyll durch die Zugabe von Cytokinin erhalten blieb (Abbildung 49 im Anhang). Der Unterschied zum WT betrug bei 0,01 μM BA 15% und bei 1 μM BA 11%. Diese Werte sind statistisch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Die Insertionslinie *hat4_IS1* hatte nur bei 0,1 μM BA einen statistisch signifikanten Unterschied zum WT von etwa 11% mehr Chl. Bei dieser Konzentration ist die Linie *hat4_IS1* demnach sensibler gegenüber Cytokinin als der WT. Eine veränderte Cytokininempfindlichkeit konnte anhand des Chlorophyll-Retentionstests demnach nur in den Insertionslinien *hat3_IS1* und *hat4_IS1* nachgewiesen werden.

Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene zeigen keine veränderte cytokininabhängige Induktion von ARR5

Wie bereits erläutert, wird das Gen *ARR5* schnell und stark durch Cytokinin induziert (D'Agostino *et al.*, 2000) und deshalb als Markergen für die Sensitivität einer Pflanze gegenüber Cytokinin verwendet. Ein veränderter *ARR5* Transkriptlevel kann als Maß für eine Veränderung des Cytokiningehaltes oder der Stärke der Signalweiterleitung von Cytokinin gelten. Über die Bestimmung der *ARR5* Transkriptmenge in Mutanten können Gene als positive oder negative Regulatoren der Cytokininwirkung identifiziert werden. Damit erhält man jedoch noch keine Hinweise darauf, an welcher Stelle die untersuchten Gene bzw. dessen Produkte im komplexen Netzwerk der Cytokininsignaltransduktion eine Rolle spielen könnten.

Um Hinweise darüber zu erlangen, ob einige der untersuchten Transkriptionsfaktoren das Cytokininsignal positiv weiterleiten und dabei die Transkription von *ARR5* induzieren, wurde dessen Induktion in den Insertionslinien vergleichend zum WT gemessen. Dazu wurden 10 Tage alte *in vitro* gewachsene Keimlinge für 30 Minuten mit BA behandelt. Die Transkriptmenge von *ARR5* wurde mittels qRT-PCR analysiert und war im WT nach 30 Minuten Cytokininbehandlung im Mittel etwa 17-fach höher als ohne Cytokininbehandlung (Abbildung 50 – Anhang), wies jedoch in den einzelnen Experimenten größere Schwankungen auf (zwischen 12-fach und 19-fach der *ARR5* Transkriptmenge ohne Cytokinin). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden jeweils solche Proben der Insertionsmutanten mit der korrespondierenden WT Kontrolle verglichen, dessen eingesetzte RNA-Menge in die cDNA Synthese gleich war. Es ist zudem zu beachten, dass bereits die Basistranskriptmenge von *ARR5* in einzelnen Insertionslinien verglichen zum WT geringfügig reduziert ist (Abbildung 29). Bezogen auf diesen Ausgangswert war die Transkriptmenge in den einzelnen untersuchten Linien nach Cytokininbehandlung in der gleichen Größenordnung wie im WT erhöht, nämlich zwischen 15-fach und 28-fach (Anhang Tabelle 10). Setzt man diese Induktionswerte zum dem jeweils im gleichen Experiment ermittelten WT-Wert ins Verhältnis, so lagen die relativen Induktionswerte in den Linien *gata22_IS2*, *hat4_IS1*, *myb60_IS3*, *hsfA2_IS1* im Bereich zwischen 1,2 und 1,5 und in den Linien *hat3_IS1* sowie *bHLH78_IS3* bei 0,8 (die Daten zur Cytokinininduktion von *ARR5* in allen untersuchten transgenen Pflanzen dieser Arbeit sind zusammenfassend im Anhang

Abbildung 51 dargestellt). Die Ergebnisse zeigten, dass *ARR5* in den Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene immer noch schnell und stark durch Cytokinin induzierbar ist. Eine wesentliche Veränderung der Sensitivität liegt in den Linien also nicht vor.

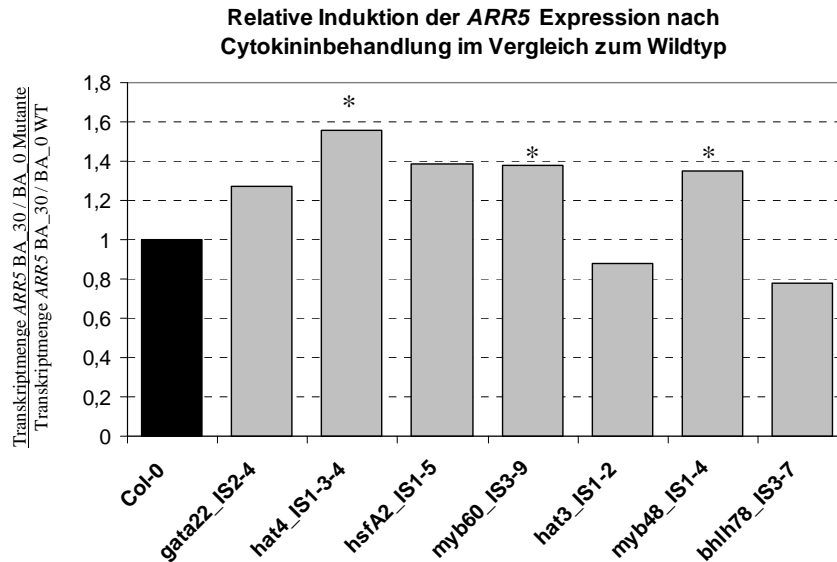


Abbildung 33: Relative Induktionsrate von *ARR5* in Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene durch Cytokinin im Vergleich zum WT.

Dargestellt ist die relative Induktion der Transkriptmenge von *ARR5* durch Cytokinin, die mittels qRT-PCR ermittelt wurde. Die *ARR5* Induktionsrate wurde gleich eins gesetzt. Verwendet wurden Keimlinge, die in Flüssigkultur 30 Minuten mit DMSO oder 5 μ M BA behandelt wurden. Die *ARR5* Transkriptmenge in cytokininbehandelten Proben (BA_30) wurde ins Verhältnis gesetzt zu den Proben, die gleich lang mit DMSO (BA_0) behandelt wurden. Die so ermittelten Induktionsraten für die untersuchten transgenen Linien (siehe Tabelle 10) wurden anschließend zur Induktionsrate des WT ins Verhältnis gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei technischen Replikaten. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Ein Stern markiert Linien, bei denen anhand der absoluten Induktionsraten signifikante Unterschiede zum WT gefunden wurden ($p < 0,05$).

4.4 Funktionelle Charakterisierung cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene anhand von Überexpressionslinien

Untersuchungen des Phänotyps von Mutanten eines Gens geben oft Aufschluss über dessen Funktion. Gelingt es, die im Vergleich zum WT beobachteten phänotypischen Unterschiede von Mutanten den Veränderungen in einem biologischen Prozess zuzuordnen, so kann man schlussfolgern, dass das untersuchte Gen möglicherweise im identifizierten Prozess eine Rolle spielt. Nicht nur der Verlust oder eine verminderte Funktion eines Gens kann auf diese Weise zur Identifikation der Genfunktion führen, sondern auch dessen gezielte Verstärkung der Funktion. Im *gain-of-function* Ansatz wurden vier der cytokininregulierten Gene aus Tabelle 5 auf deren Beteiligung an der Vermittlung der Cytokininwirkung untersucht. Die Expression der ausgewählten Gene *GATA22*, *bHLH64*, *HAT22* und *HAT4* wird schnell durch Cytokinin hochreguliert (Punkt 4.2 und Abbildung 25). Es wurde daher vermutet, dass diese Gene direkt an der Vermittlung der Cytokininwirkung beteiligt sein könnten. Eine erhöhte Menge des Genproduktes dieser Gene würde daher eventuell zu Veränderungen in der Pflanze führen, die phänotypisch einem veränderten Cytokiningehalt oder einer veränderten Cytokininsignalweiterleitung ähneln.

4.4.1 Konstruktion von Vektoren zur Überexpression cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren und Selektion transgener Linien

Um eine erhöhte Menge der vier ausgewählten Transkriptionsfaktoren in transgenen Pflanzen zu erhalten, wurde die genomische Sequenz der Gene unter der Kontrolle des starken und konstitutiv aktiven 35S Promotors in *Arabidopsis* exprimiert. Dazu wurden die vier Gene vom jeweiligen Translationsstart bis zum Translationsstopp aus dem Genom mittels PCR amplifiziert, mittels TOPO-TA-Klonierung in einen TOPO-TA-Vektor integriert und zur Überprüfung der Sequenz auf Fehler sequenziert. Anschließend wurden die Fragmente in den binären Pflanzenvektor pROKII subkloniert und mittels *Agrobacterium* vermittelter Transformation in *Arabidopsis* transformiert (siehe Punkt 2.6.1).

Es wurden je 30 unabhängige Primärtransformanden von *35S:HAT4* und *35S:HAT22* sowie 90 bzw. 160 Primärtransformanden von *35S:GATA22* und *35S:bHLH64* identifiziert.

Die identifizierten Primärtransformanden zeigten in Einzelfällen sehr stark veränderte Phänotypen (nicht gezeigt). Es wurden nur solche Phänotypen weiter verfolgt, die mehrfach aufgetreten sind. Eine detaillierte Beschreibung dieser Phänotypen erfolgt für jedes untersuchte Gen weiter unten. Die gefundenen Phänotypen waren sehr unterschiedlich. Daher wurde für alle vier Gene der Transkriptlevel des Transgens in jeweils einer repräsentativen Linie je phänotypischer Klasse bestimmt. Dazu wurde eine *Northern Blot*-Analyse mit einer Sonde, die die Gesamttranskriptmenge resultierend aus der Transkription des Transgens als auch des endogenen Gens nachwies, durchgeführt.

Es wurden Linien mit verschieden stark erhöhtem Transkriptlevel identifiziert und je Gen die zwei Linien mit der größten Transkriptmenge für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (Abbildung 34). Dabei handelt es sich um die Linien *35S:GATA22-13* und *35S:GATA22-14*, *35S:bHLH64-10* und *35S:bHLH64-88*, *35S:HAT22-7* und *35S:HAT22-29* sowie *35S:HAT4-14* und *35S:HAT4-20*. Die Linie *35S:HAT4-11* hatte zwar die höchste Expression des *HAT4*-Gens (Abbildung 34), war aber infertil und konnte deshalb nicht verwendet werden. Dies gibt jedoch einen Hinweis für eine mögliche Funktion von *HAT4* während der reproduktiven Phase der Pflanzenentwicklung.

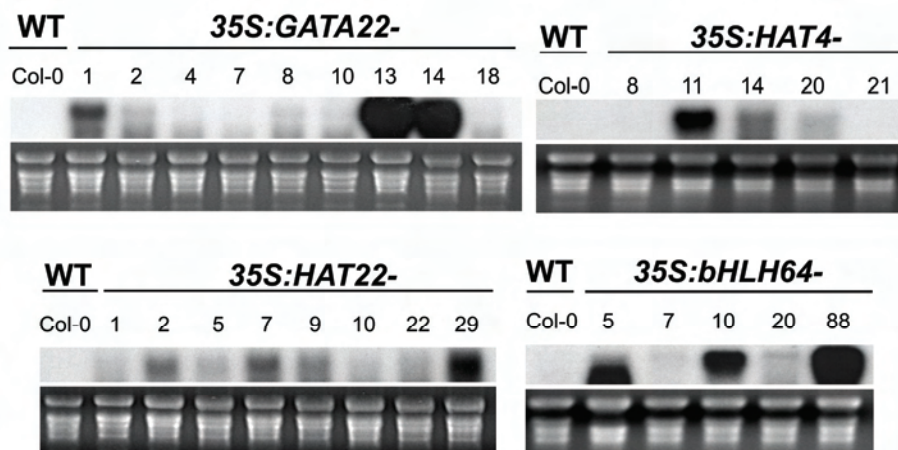


Abbildung 34: Bestimmung des Transkriptlevels cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene in Überexpressionslinien durch Northern Blot-Analyse.

Durch Hybridisierung mit einer ^{32}P radioaktiv markierten genspezifischen Sonde wurde in RNA von Linien, die die Gene *GATA22*, *HAT4*, *HAT22* oder *bHLH64* unter der Kontrolle des 35S Promotor exprimieren, der Transkriptlevel des jeweiligen Gens vergleichend zum WT ermittelt. Die obere Zeile zeigt die Autoradiographie. Der Film wurde für acht Stunden exponiert und nach Exposition über Nacht waren auch die WT-Transkripte detektierbar (nicht gezeigt). Die jeweils untere Zeile zeigt das ethidiumbromidgefärbte Gel, in dem die rRNA als Ladekontrolle zu sehen ist.

4.4.2 Phänotypische Charakterisierung von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren

4.4.2.1 Phänotypische Charakterisierung des Sprosses der Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren

Die Morphologie der Überexpressionslinien, welche für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden, wurde über den gesamten Lebenszyklus vergleichend zum WT beobachtet und wird im Folgenden für die vier Gene einzeln beschrieben. Da bekannt ist, dass Cytokinin eine positive regulatorische Funktion auf das Sprosswachstum hat (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003) und darüber hinaus eine veränderte Cytokininmenge oder -signalweiterleitung die Menge und Größe der Samen beeinflussen kann (Bartrina *et al.* unveröffentlichte Daten; Werner *et al.*, 2003; Ashikari *et al.*, 2005; Riefler *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2008), wurden unter Langtagbedingungen eine Reihe von Wachstumsparametern im Vergleich zum WT aufgenommen. Dazu gehörten der Rosettendurchmesser, die Rosettenblattanzahl 24 DAG und zum Blühbeginn, der Blühbeginn, die Höhe und Verzweigung des Blüten sprosses sowie die Anzahl und Länge der Schoten am Ende des Lebenszyklus. Die gefundenen Unterschiede waren nur in wenigen Fällen signifikant und gleichermaßen in beiden unabhängigen Linien zu finden. Demnach kann man vorweg bereits zusammenfassend sagen, dass keine Unterschiede beim Plastochron und der Anzahl an Rosettenblättern, der Anzahl der Blüten sprosse und Verzweigungen des Hauptblütenspross sowie der Anzahl gebildeter Schoten gefunden wurden.

Zusätzlich wurde der Beginn der natürlichen Seneszenz augenscheinlich nach Einsetzen von Gelbfärbungen des sechsten Rosettenblattes bestimmt, da die Seneszenz durch Cytokinin verzögert werden kann (Gan und Amasino, 1995). Cytokinin führt zudem, wenn es endogen erhöht, wird zu einer erhöhten Chlorophyllmenge in Pflanzen (Li *et al.*, 1992). Es war daher interessant zu untersuchen, ob dies auch der Fall ist, wenn ein Transkriptionsfaktor, der das Cytokinin signal vermutlich weiterleitet, in der Pflanze in erhöhter Menge vorliegt. Der Chlorophyllgehalt wurde daher in den 35S transgenen Linien der untersuchten Transkriptionsfaktoren gemessen und mit dem Gehalt des WT verglichen. Für die Linien der Gene *GATA22* und *HAT4* wurden jeweils auch die T-DNA-Insertionsmutanten vergleichend mit untersucht.

35S:GATA22 transgene Linien

Die höchste Expression des *GATA22*-Gens wurde in den Linien *35S:GATA22-13* und *-14* gefunden (siehe Abbildung 34). In beiden Linien waren die Keimblätter, das Hypokotyl und die an das Hypokotyl angrenzende obere Hälfte der Primärwurzel dunkler grün gefärbt als im WT (Abbildung 35a). Im weiteren Verlauf der Entwicklung war der Rosettendurchmesser der Linie *35S:GATA22-13* geringer als im WT (Abbildung 35b) und betrug zum Blühbeginn mit 5,8 cm nur etwa 80% des WT-Rosettendurchmessers (Abbildung 35c). Für die zweite unabhängige Linie wurde kein veränderter Rosettendurchmesser gemessen, jedoch wurde ein leicht verzögerter Blühbeginn festgestellt (Daten nicht gezeigt) und deshalb wurde der Rosettendurchmesser zu einem entwicklungsbiologisch vergleichbaren Zeitpunkt, nämlich dem Blühbeginn gemessen. Bezogen auf den Zeitraum bis zum Blühbeginn konnte nur für die Linie *35S:GATA22-13* eine reduzierte Wachstumsrate der Rosette ermittelt werden. Die Anzahl der Rosettenblätter, die bis zum Blühbeginn von beiden *35S:GATA22*-Linien und der Insertionsmutante *gata22_IS2* gebildet wurden, ergab, bezogen auf diesen Zeitraum, kein verändertes Plastochron (nicht gezeigt). Die Messung des Chlorophyllgehaltes ergab in WT Keimlingen etwa 1,44 µg Chl / mg FG. Interessanterweise hatten die Pflanzen der Linie *GATA22-14-8* weniger Chlorophyll als der WT, obwohl diese grüner aussahen (Abbildung 35a, d). Es wurden 0,94 µg Chl / mg FG gemessen was einem Gehalt von 65% des WT entspricht. In der Linie *35S:GATA22-13-5* und der Mutante *gata22_IS2* wurde kein veränderter Chlorophyllgehalt gemessen.

Des Weiteren wurde in beiden *35S:GATA22* transgenen Linien eine reduzierte Schotenlänge ermittelt (Abbildung 35e). Die Schoten der Linie *35S:GATA22-13-5* hatten nur etwa 75% der Länge von WT-Schoten. Am Ende des Lebenszyklus waren beide *35S:GATA22* transgenen Linien zudem signifikant um 15% bzw. 30% höher als der WT (Abbildung 35f).

Zusammenfassend wurden für *35S:GATA22* transgene Pflanzen dunkler grün gefärbte Keimlinge und eine grün gefärbte Primärwurzel gefunden, die im WT unter diesen Bedingungen nie gefunden wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in der Primärwurzel Plastiden zu Chloroplasten differenziert waren. In Kontrast dazu war in der Linie *35S:GATA22-14-8* der Chlorophyllgehalt reduziert. Die Linie *35S:GATA22-13-5* hatte eine verringerte Wachstumsrate der Rosette und beide *35S:GATA22*-Linien waren am Ende des Lebenszyklus höher als der WT und bildeten Schoten mit reduzierter Länge.

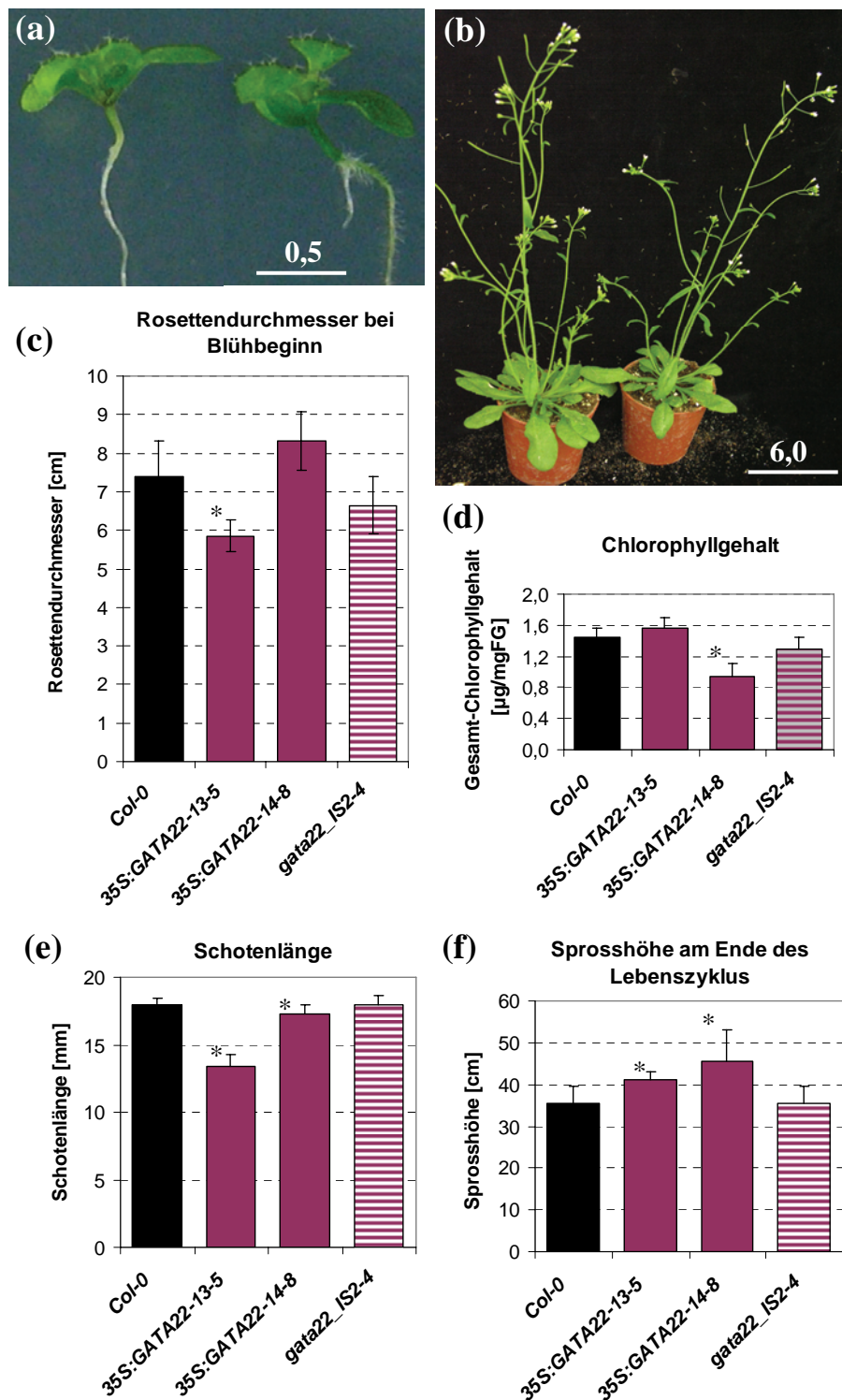


Abbildung 35: Phänotypische Veränderungen des Sprosses von 35S:GATA22 transgenen *Arabidopsis* Pflanzen.

Die Keimblätter, das Hypokotyl und der obere Abschnitt der Primärwurzel von 35S:GATA22 transgenen Keimlingen waren deutlich grüner als im WT (a). Der Rosettendurchmesser der Linie 35S:GATA22-13 war im Alter von 40 DAG kleiner als im WT (b) und wurde zu Blühbeginn quantifiziert (c). Der Chlorophyllgehalt (d) wurde 20 DAG in je drei unabhängigen Proben bestimmt. Eine Probe bestand aus je fünf Blättern und es wurde je das sechste Blatt einer Rosette verwendet. Die Schotenlänge aller Schoten einer Pflanze (e) und die Sprosshöhe (f) wurden am Ende des Lebenszyklus bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 10 in c, e und f). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert (p < 0,015). Maßeinheit in cm. Der WT ist jeweils links im Bild.

35S:HAT4 transgene Linien

Jede der 30 identifizierten Primärtransformanden zeigte bereits im Keimlingsstadium (14 DAG) besonders unter Dauerlicht einen auffälligen Phänotyp. Die Keimblätter hatten eine lang gezogene, lanzenartige Form (Abbildung 36a). Etwa ein Viertel der Primärtransformanden, nämlich die Linien *35S:HAT4-1* bis *-7* hatten im weiteren Verlauf der Entwicklung ein stark verändertes Sprosswachstum (Abbildung 36b). Die Rosette war kleiner als 2 cm im Durchmesser. Die Rosettenblätter waren, wie die Keimblätter, sehr schmal und an den Seiten nach oben gebogen (Abbildung 36c). Im Zentrum dieser Rosette entstanden direkt Blüten, ohne dass eine Stängelverlängerung stattfand. Die Blüten waren daher auf sehr engem Raum angeordnet und vollständig steril, da die Staubblätter stark vertrocknet und deformiert waren (Abbildung 36d). Diese Linien konnten deshalb nicht für weitere Untersuchungen verwendet werden. Unter den fertilen Linien hatten die Linien *35S:HAT4-14* und *-20* die höchste Expression des *HAT4*-Transgens (siehe Abbildung 34). Diese Linien zeigten auch die lanzenförmigen Rosettenblätter (Abbildung 36e), jedoch in vermindertem Maße und die Stängelverlängerung war unverändert, sodass die Pflanzen eine Sprosshöhe hatten, die ähnlich der des WT war. Die Linien *35S:HAT4-14-1*, welche auch die stärkste Expression des Transgens zeigte (siehe Abbildung 34), blühte etwa fünf Tage später (Abbildung 36f) und war am Ende des Lebenszyklus sogar 30% höher als der WT (Abbildung 36g). Die zweite unabhängige Linie zeigte diesen Phänotyp nicht und die untersuchte Insertionsmutante *hat4_IS1* unterschied sich auch nicht vom WT.

Die beschriebenen starken phänotypischen Veränderungen der Linien *35S:HAT4-1* bis *-7* sind interessanterweise in der Linie *35S:HAT4-20* in der zweiten Generation bei drei von acht Nachkommen in identischer Ausprägung aufgetreten (nicht gezeigt), obwohl die Linie als Primärtransformande kaum phänotypische Veränderungen gezeigt hatten. Es war nicht auszuschließen, dass das Auftreten des Phänotyps auf einen Dosiseffekt des Transgens zurückzuführen ist, er konnte jedoch nicht eindeutig mit dem Genotyp der Pflanzen assoziiert werden, denn selbst die homozygoten Nachkommen der Linie *35S:HAT4-20* zeigten diese starke Ausprägung des Phänotyps nicht.

HAT4 hat also vermutlich eine negative regulatorische Funktion bezogen auf die Zellstreckung und -differenzierung während der Blattentwicklung. *HAT4* beeinflusst den Zeitpunkt des Überganges von der vegetativen zur reproduktiven Phase und wirkt sich positiv auf die Sprossgröße aus.

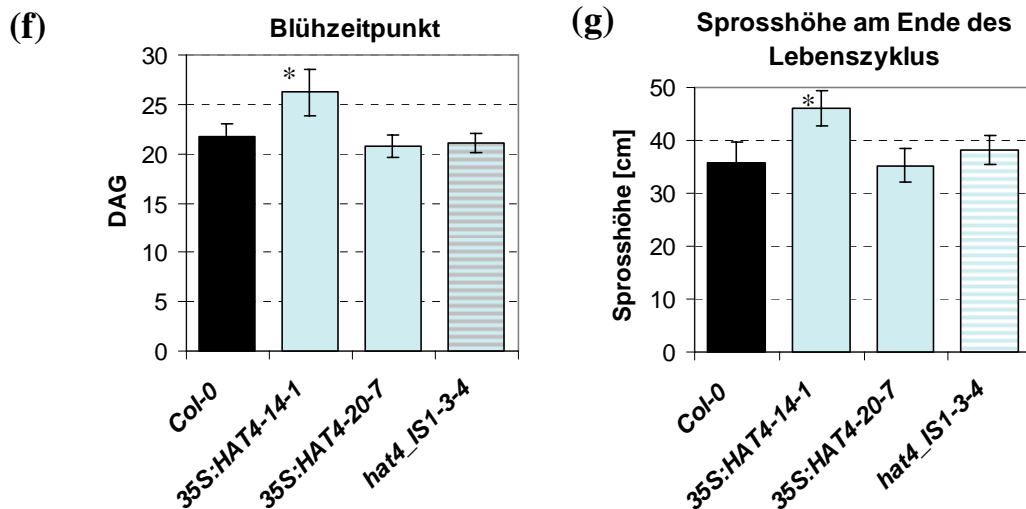
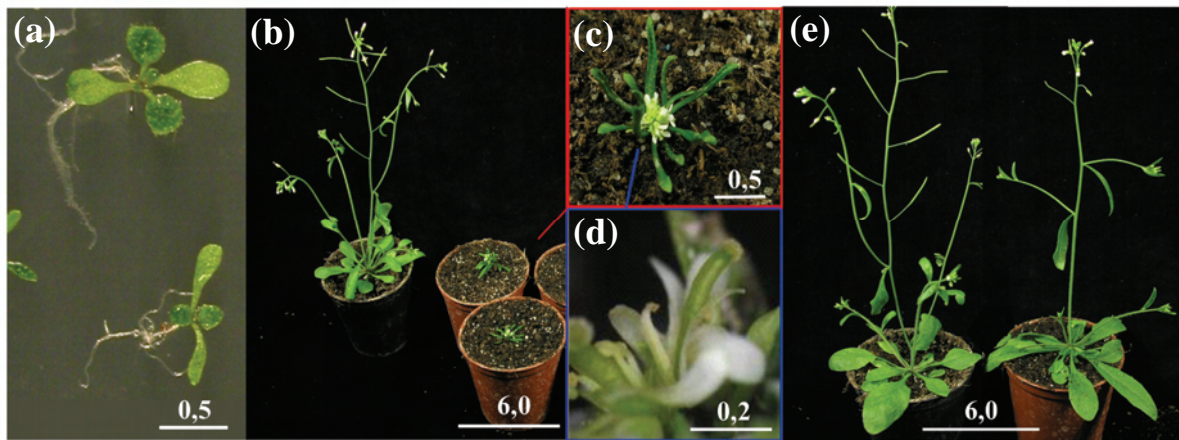


Abbildung 36: Phänotypische Veränderungen von 35S:HAT4 transgenen *Arabidopsis* Pflanzen.

Der Phänotyp aller 35S:HAT4 transgenen Keimlingen (a) unterschied sich deutlich von WT Keimlingen (oben im Bild). Die Keimblätter waren sehr schmal. Im Alter von 30 DAG traten verschieden stark phänotypisch veränderte Primärtransformanten auf (b – e). Die Linien 35S:HAT4-1 bis -7 bildeten keinen Stängel (b). Sie bildeten extrem kleine und schmale Rosettenblätter (c) und direkt aus dem Zentrum der Rosette Blüten. Die gebildeten Blüten waren jedoch aufgrund von deformierten Staubblättern steril (d). Die fertilen Linien 35S:HAT4-14 und -20 hatten lanzenförmige Rosettenblätter, welche jedoch WT-Größe hatten und bildeten einen Stängel aus. Der Blühzeitpunkt (f) und die Sprosshöhe (g) sind je Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 10). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert (p < 0,01). Maßeinheit in cm.

35S:HAT22 transgene Linien

HAT22 gehört zur gleichen Klasse der HD-Zip Transkriptionsfaktoren wie HAT4. Interessant war, dass auch alle der 30 identifizierten Primärtransformanten der Linie 35S:HAT22 den auffälligen Keimlingsphänotyp mit schmalen, lanzenförmigen Keimblättern zeigten (Abbildung 37a). Die anhand ihrer starken Expression des Transgens für weitere Untersuchungen ausgewählten Linien 35S:HAT22-7-7 und 35S:HAT22-29-5 sind in Abbildung 37b gezeigt.

Die Linie *35S:HAT22-29-5*, die die stärkste Expression des Transgens aufwies (siehe Abbildung 34), hatte eine reduzierte Rosettengröße im Vergleich zum WT (Abbildung 37c). Der Unterschied trat erst mit dem Blühbeginn (18 DAG) auf. Bis dahin hatten beide *35S:HAT22* transgenen Linien eine vergleichbare Rosettengröße wie der WT. Die Rosette der beiden *35S:HAT22* transgenen Linien wuchs danach in geringerem Maße und betrug 36 DAG nur 85% und 35% des Durchmessers von WT-Rosetten. Der Blüten spross beider Linien hatte am Ende des Lebenszyklus eine größere Höhe als der des WT. Die *35S:HAT22* transgenen Linien waren gleichermaßen etwa 15% höher (Abbildung 37d).

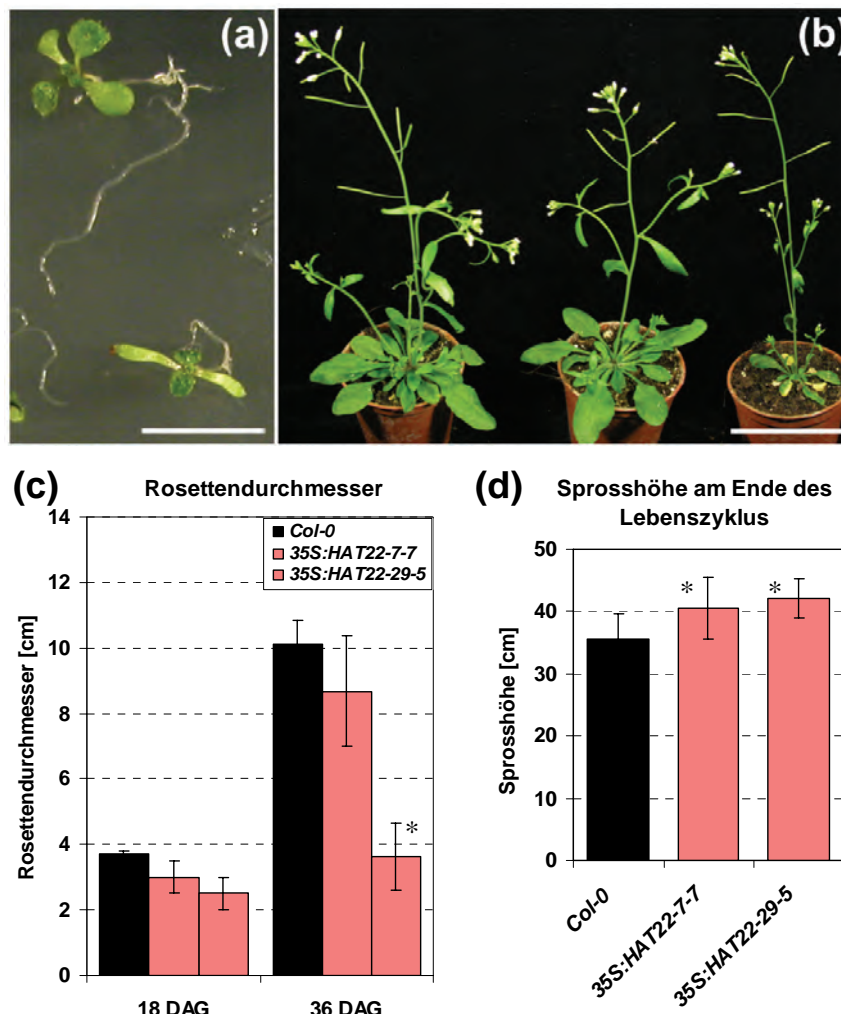


Abbildung 37: Phänotypische Veränderungen und Wachstumsparameter des Sprosses von *35S:HAT22* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen.

Der Phänotyp von *35S:HAT22* transgenen Keimlingen unterschied sich deutlich vom WT (a). Im Vergleich zum WT (oben) hatten die transgenen Keimlinge auffällig stark lanzenförmige Keimblätter (unten). Der Rosettendurchmesser (b, c) war im Alter von 35 DAG (b) in der Linie *35S:HAT22-29-5* (rechts) kleiner als beim WT (links) und der Linie *35S:HAT22-7-7* (Mitte). Der Unterschied in der Rosettengröße nahm mit zunehmendem Alter in beiden *35S:HAT22* transgenen Linien zu (c). Die Blüten sprosse beider transgenen Linien waren höher als die des WT (d). Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung ($n = 10$). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert ($p < 0,01$). Der Maßeinheit entspricht 1 cm in (a) und 6 cm in (b).

Eine Besonderheit *35S:HAT22* transgener Pflanzen war, dass in beiden Linien, jedoch in besonderem Maße in der Linie *35S:HAT22-29-5*, die die stärkere Expression des Transgens hatte, bereits im Alter von 35 DAG deutliche Seneszenzsymptome in Form von Gelbverfärbungen der Rosettenblättern gefunden wurden, wohingegen der WT zu diesem Zeitpunkt noch vollständig grüne Blätter hatte (Abbildung 38 a-c). Des Weiteren wurde bei der Bestimmung des Beginn der natürlichen Seneszenz anhand augenscheinlicher Feststellung von Gelbfärbungen des sechsten Rosettenblattes festgestellt, dass diese Gelbfärbungen in der Linie *35S:HAT22-7-7* vier Tage und in der Linie *35S:HAT22-29-5* sechs Tage früher als im WT einsetzte. Im WT war dies 32 DAG der Fall (Abbildung 38d). In Einklang damit wurde dieser optische Eindruck in beiden *35S:HAT22* transgenen Linien anhand der Messung eines reduzierten Chlorophyllgehaltes bestätigt (Abbildung 38e). Dieser Betrag mit etwa 1,0 µg Chl / mg FG nur etwa 67% des WT Chlorophyllgehaltes.

Zusammenfassend wurden in *35S:HAT22* transgenen Linien die gleichen lanzenförmigen Keim- und Rosettenblätter beobachtet wie bei *35S:HAT4* transgenen Linien sowie höhere Blütenprosse. Eine reduzierte Rosettengröße wurde ebenso gemessen und war besonders in den Linien mit starker Expression des Transgens auffällig. Eine Besonderheit *35S:HAT22* transgener Linien war der verringerte Chlorophyllgehalt einhergehend mit früher einsetzender natürlicher Seneszenz. *HAT22* hat also vermutlich eine negative regulatorische Funktion während der Zellelongation in Blättern und während der Seneszenz und übt einen positiven regulatorischen Einfluss auf die Elongation des Blütenprozesses aus.

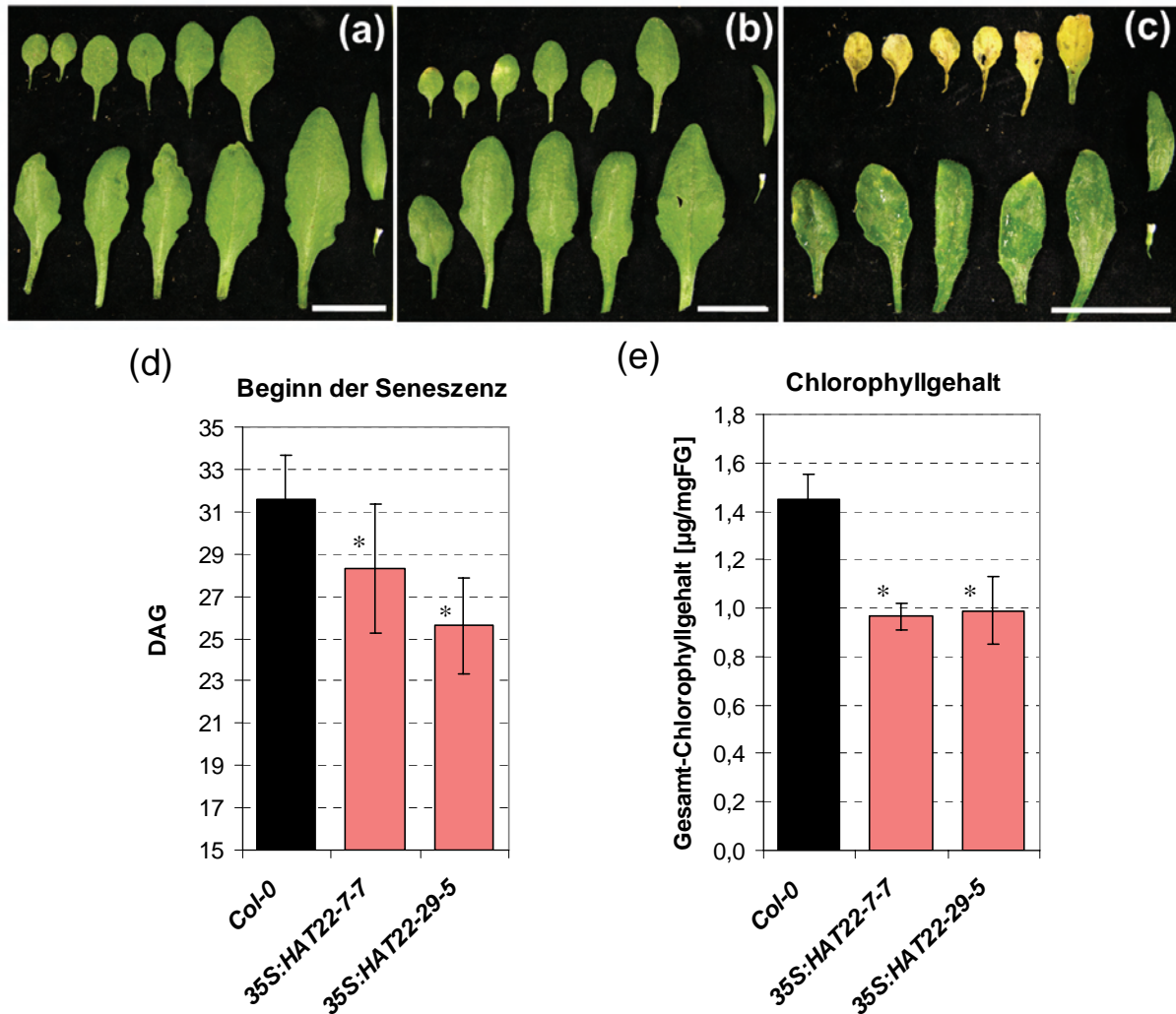


Abbildung 38: Natürliche Seneszenz und Chlorophyllgehalt in 35S:HAT22 transgenen Arabidopsis Pflanzen.

Deutliche Seneszenzsymptome der Rosettenblätter (a-c) wurde 35 DAG im WT (a) noch nicht, jedoch in der Linie 35S:HAT22-7-7 (b) und insbesondere 35S:HAT22-29-5 (c) gefunden. Die Rosettenblätter sind von rechts nach links und oben nach unten nach ansteigendem Alter angeordnet. Der Beginn der Seneszenz (d) wurde augenscheinlich anhand des Auftretens von Gelbfärbungen des sechsten Rosettenblattes bestimmt. Die Messung des Chlorophyllgehaltes (e) des sechsten Rosettenblattes erfolgte *in vitro* 20 DAG. Die Maßeinheit entspricht 2 cm in (a-c). Gezeigt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 10, in d) und (n = 3, in e; je Probe wurde von 5 Pflanzen das sechste Rosettenblatt verwendet). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert (p < 0,01).

35S:bHLH64 transgene Linien

Unter den 90 selektierten Primärtransformanden wurden verschiedene Phänotypen identifiziert. Es gab zwei phänotypische Klassen, die von einer jeweils größeren Anzahl an Primärtransformanden gezeigt wurden. Etwa 15 Pflanzen unterschieden sich nicht vom WT und etwa 60 Pflanzen waren größer als der WT. Von diesen hatten 13 Pflanzen im Vergleich zum WT einen stark vergrößerten

Rosettendurchmesser von 14 cm. Der WT hatte einen Rosettendurchmesser von 10 cm (Daten nicht gezeigt). Die Bestimmung der Expressionsstärke des Transgens in repräsentativen Linien jeder phänotypischen Kategorie ergab, dass die Linien *35S:bHLH64-10* und insbesondere die Linie *35S:bHLH64-88* eine sehr starke Expression von *bHLH64* aufwiesen (siehe Abbildung 34), weswegen sie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden. Die Linie *35S:bHLH64-10* unterschied sich nicht vom WT. Die Linie *35S:bHLH64-88* war unter den Primärtransformanten mit sehr großem Rosettendurchmesser gefunden worden und unterschied sich auch in anderen Merkmalen deutlich vom WT und zwar als Keimling und als blühende Pflanzen. Eine zweite unabhängige Linie mit dem gleichen Phänotyp (*35S:bHLH64-89*) konnte erst gegen Ende dieser Arbeit etabliert werden. Daher wurden die meisten quantitativen Untersuchungen an den Linien *-10* und *-88* durchgeführt. Die phänotypische Beschreibung erfolgt jedoch nur für die Linien *-88* und *-89*.

Die Keimlinge der transgenen Linien *35S:bHLH64-88* und *-89* zeigten deutliche lichtabhängige Veränderungen des Wachstums im Vergleich zum WT. Unter Standardlichtbedingungen und Langtag-Belichtungsdauer war das Hypokotyl länger als im WT, die Keimlinge waren weniger grün (Abbildung 39a). Dieser Keimlingsphänotyp war vermutlich dosisabhängig, denn in beiden unabhängigen Linien war insbesondere die Veränderung der Länge des Hypokotyls in homozygoten Linien stärker (Abbildung 39a). Zur Keimung waren die *35S:bHLH64* transgenen Keimlinge noch grün. Die Form der Blätter war nicht abgerundet wie im WT, sondern spitz zulaufend und insgesamt waren die Keimblätter größer als die des WT (Abbildung 39a). Die Grünfärbung nahm im weiteren Verlauf der Keimlingsentwicklung jedoch stark ab und der Chlorophyllgehalt betrug im Alter von 20 DAG in der Linie *35S:bHLH64-10-3* nur noch 0,9 µg Chl / mg FG und in *35S:bHLH64-88-5* 0,1 µg Chl / mg FG (Abbildung 39b). Diese Chlorophyllgehalte entsprachen nur noch 64% bzw. 8% des WT-Gehaltes. Die Rosettenblätter der Linie *35S:bHLH64-88* hatten ebenso wie die Keimblätter eine veränderte Form. Sie waren nicht rund bis oval wie beim WT (Abbildung 39d), sondern hatten eine lang gezogene und an den Blatträndern gezackte Form sowie längere Petiolen (Abbildung 39e). Auch der Phänotyp des Blütensprosses war dosisabhängig. Der größere Rosettendurchmesser trat nur in heterozygoten Pflanzen auf und in homozygoten Pflanzen waren der Durchmesser und die Sprosshöhe wieder geringer (Abbildung 39e). Im Gegensatz zum WT wuchs das Hypokotyl auch während der reproduktiven Phase kontinuierlich weiter in Längs- als auch Radialrichtung. Daher war es viel länger als das Hypokotyl des WT, es hatte zudem einen größeren Umfang und sah verholzt aus (Abbildung 39f). Blüten dieser Pflanzen waren unter Standardbedingungen männlich steril. Die Antheren kamen nicht zur Reife und es wurden keine Pollen entlassen. Die Antheren sahen morphologisch nicht verändert aus, sie wurden vermutlich nur nicht vollständig reif (Abbildung 39g). Saatgut konnte nur in sehr geringem Maße erhalten werden, da unter speziellen Lichtbedingungen die Fertilität nicht vollständig reduziert war (siehe unten).

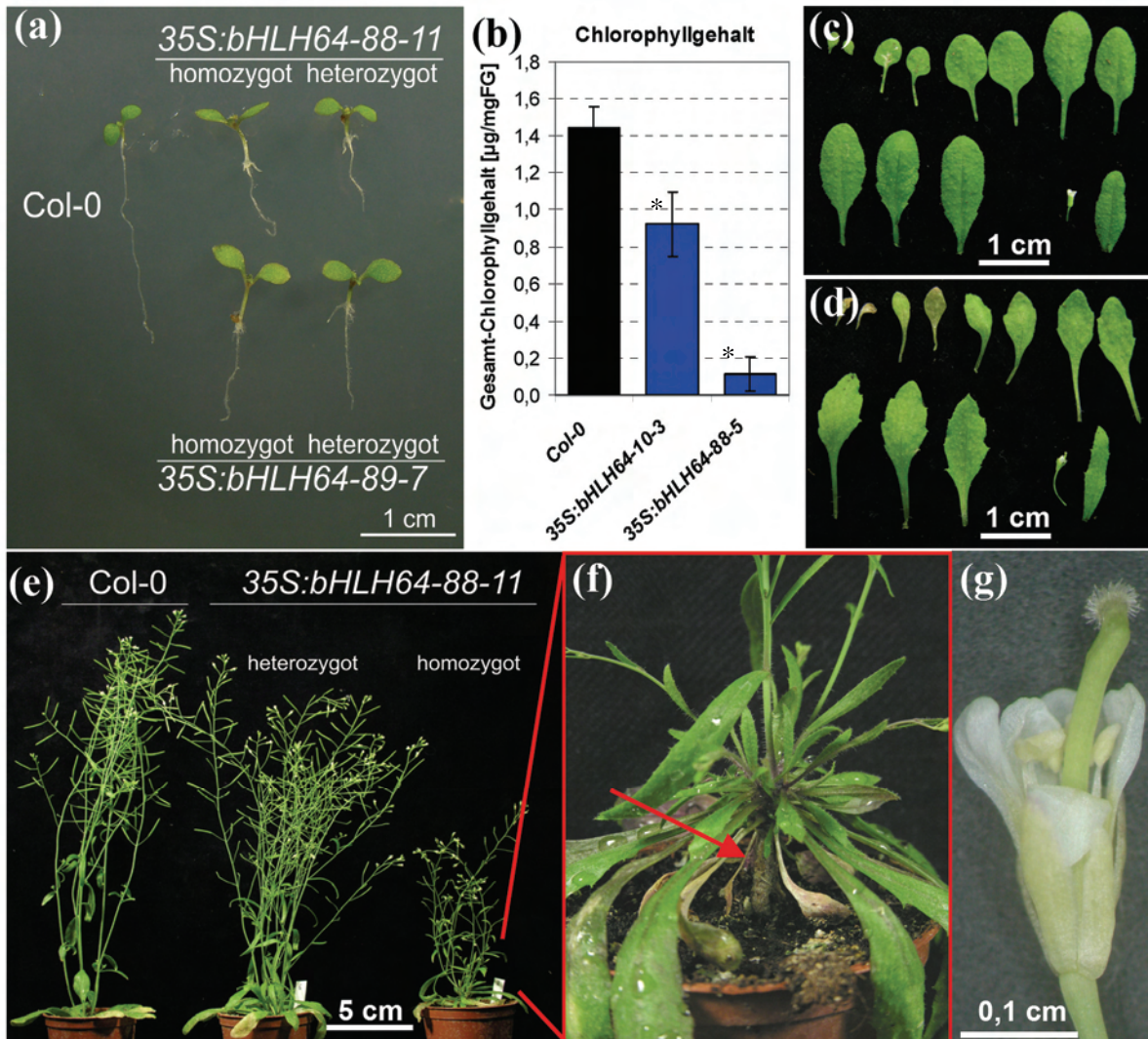


Abbildung 39: Phänotyp von 35S:bHLH64 transgenen Arabidopsis Pflanzen.

35S:bHLH64-88 und -89 transgene Keimlinge hatten im Alter von 6 DAG abhängig von der Dosis des Transgens ein verlängertes Hypokotyl, spitz zu laufende Blätter und waren weniger grün (a). Der Chlorophyllgehalt wurde 20 DAG an *in vitro* gewachsenen Keimlingen bestimmt (b). Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung ($n = 3$). Jede Probe bestand aus dem jeweils sechsten Rosettenblatt von insgesamt fünf Keimlingen. Die Form der Rosettenblätter war im WT 28 DAG abgerundet bis oval (c), jedoch in 35S:bHLH64 transgenen Pflanzen lang gezogen und gezackt (d). Rosettengröße und Sprosshöhe waren abhängig von der Dosis des Transgens (e). Rosetten heterozygoter 35S:bHLH64-88 transgener Pflanzen (Mitte) waren größer als die des WT (links). Die Rosettengröße und die Sprosshöhe von homozygoten Pflanzen (rechts) waren reduziert. Das Hypokotyl in homozygoten 35S:bHLH64-88 transgenen Pflanzen war stark verlängert und verdickt (f). Blüten von 35S:bHLH64-88 transgenen Pflanzen waren männlich steril, da die Antheren vermutlich nicht zur Reife kamen und keine Pollen abgegeben wurden (g).

Die beschriebenen Phänotypen von 35S:bHLH64-88 und -89 transgenen Pflanzen waren von der Lichtintensität und Lichtdauer abhängig. Unter Dauerlicht konnten die Pflanzen nur wenig Biomasse produzieren. Ihre Rosette blieb sehr klein und die Blätter zeigten deutlich stärkere Stresssymptome als der WT in Form von Violettfräbung, die vermutlich auf starke Anthocyanakkumulation zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt). Im Gegenteil dazu konnten diese Pflanzen unter

Schwachlicht (unter $40 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{s}$) oder Kurztagsbedingungen (8h Licht/16h Dunkel) in einigen Fällen sogar fertile Blüten bilden und wenige Samen produzieren (nicht gezeigt). Die Ausbleichungen waren unter diesen Lichtbedingungen auch deutlich geringer als unter normalen Lichtbedingungen (Abbildung 40e, f).

Das verlängerte und in der weiteren Entwicklung zusätzlich stark verdickte Hypokotyl wurde in Keimlingen und auch blühenden Pflanzen detaillierter untersucht. Es stellte sich in erster Linie die Frage nach der Ursache. Es konnte entweder die Zellzahl erhöht sein oder die Länge der einzelnen Zellen. Es konnte natürlich auch ein Zusammenspiel aus beiden Parametern die Ursache für das längere Hypokotyl sein. Um diese Frage zu beantworten, wurden exemplarisch in der Epidermiszelllage die Zellzahl und die Länge der einzelnen Zellen ermittelt. Die Analyse erfolgte aus technischen Gründen unter Schwachlichtbedingungen. Die Anzahl der Epidermiszellen vom apikalen Meristem bis zum Übergang zur Wurzel war in Hypokotylen von *35S:bHLH64-88* und *-89* transgenen Keimlingen im Vergleich zum WT nicht verschieden (Abbildung 40a). Die Zellen in Hypokotylen der *35S:bHLH64-88* und *-89* transgenen Pflanzen waren jedoch doppelt so lang wie die des WT (Abbildung 40b). Unter Standardlichtbedingungen wurden in *35S:bHLH64-88* und *-89* transgenen Keimlingen sogar etwa fünfmal längere Hypokotyl-Epidermiszellen gefunden als im WT (Abbildung 40c, d). Somit konnte ermittelt werden, dass die starke Verlängerung des Hypokotyls in *35S:bHLH64-88* und *-89* transgenen Keimlingen ausschließlich auf eine erhöhte Zellstreckung und nicht -teilung zurückzuführen war.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung konnten unter Schwachlicht zusätzliche Veränderungen am Hypokotyl von *35S:bHLH64-88* und *-89* transgenen Pflanzen beobachtet werden. Das Hypokotyl der transgenen Pflanzen platzte aufgrund von kallusartigen Gewebebildungen auf (Abbildung 40f). Des Weiteren waren die Folgeblätter nicht wie im WT in einer typischen Rosette angeordnet (Abbildung 40e). Vielmehr setzten sie mit größerem Abstand zueinander an, sodass internodienartige Abstände erkennbar wurden (Abbildung 40f).

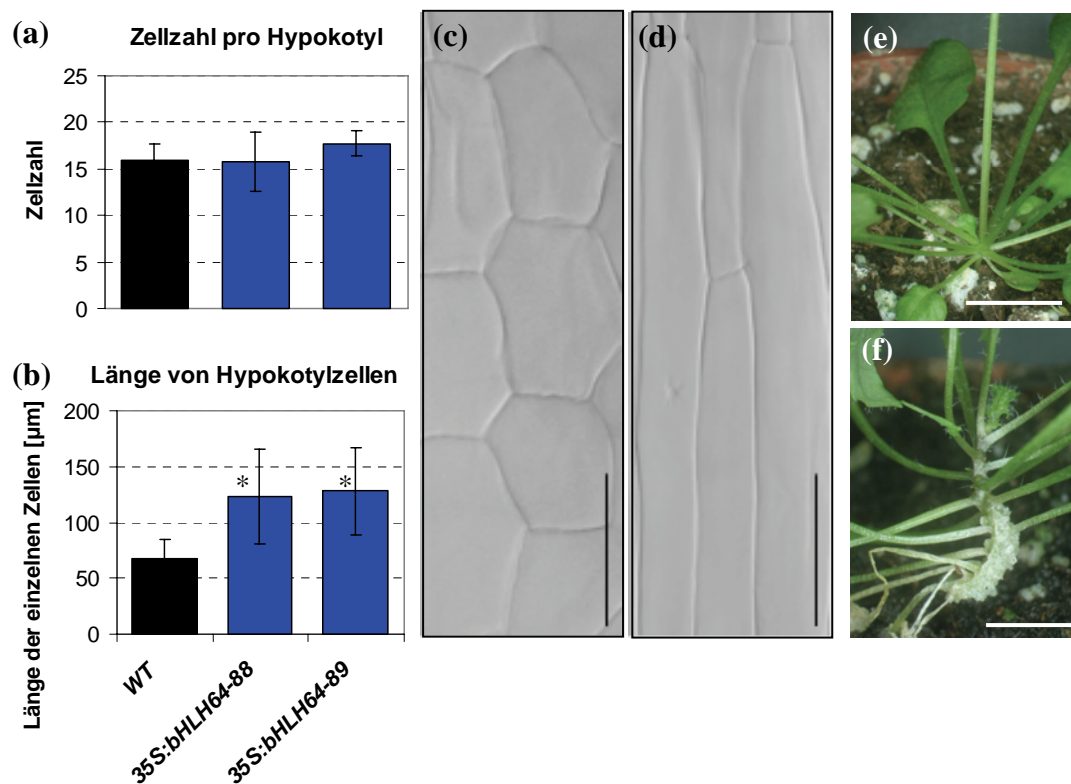


Abbildung 40: Detailanalyse des Hypokotyls von 35S:bHLH64 transgenen Arabidopsis Pflanzen.

Zellzahl und -länge in Epidermiszellen des Hypokotyls unter Schwachlicht ($< 40 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{s}$) 6 DAG (a, b). Die Zellzahl einer Epidermiszelllinie des Hypokotyls von 35S:bHLH64-88 und -89 transgenen Pflanzen war nicht signifikant verschieden zum WT (a) jedoch war die Länge der Epidermiszellen signifikant höher (b). Epidermiszellen von WT und 35S:bHLH64-88 transgenen Keimlingen unter Standardlichtbedingungen ($70\text{-}100 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{s}$) 6 DAG (c, d). Die Epidermiszellen des WT waren unter Standardlichtbedingungen von gleicher Breite und Länge (c), jedoch waren Epidermiszellen von 35S:bHLH64 transgenen Keimlingen (d) nur halb so breit und etwa fünfmal länger als die des WT. Unter Schwachlicht wurden im Vergleich zum WT (e) bei 35S:bHLH64-88 transgenen Pflanzen kallusartige Strukturen am Hypokotyl gebildet, welches seitlich aufplatzte (f). Die Maßeinheiten entsprechen $100 \mu\text{m}$ in (c, d) und 1cm in (e, f). Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung ($n = 17$, in a) ($n = 280$, in b). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert ($p < 0,0001$)

4.4.2.2 Phänotypische Charakterisierung der Wurzelentwicklung von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren

Cytokinin hat eine negative Wirkung auf die Wurzelverlängerung und -verzweigung. Pflanzen mit erhöhter Cytokininproduktion haben ein reduziertes Wurzelsystem (Li *et al.*, 1992) und exogen zugeführtes Cytokinin bewirkt in WT-Pflanzen ein vermindertes Wurzelwachstum (Göran, 1982; Baskin *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006). Das Wurzelwachstum könnte deshalb bei Überexpression eines Transkriptionsfaktors, der das Cytokininsignal positiv weiterleitet, reduziert sein und bei Überexpression eines negativen Regulators verstärkt. Das Wurzelwachstum wurde deshalb in allen Linien quantitativ untersucht.

Unter Standardbedingungen unterschied sich die Primärwurzelelongation der Überexpressionslinien aller vier untersuchten Transkriptionsfaktorgene signifikant vom WT (Abbildung 41a). Beide *35S:GATA22*- und beide *35S:HAT4*-Linien hatten deutlich kürzere Primärwurzeln als der WT und deren Elongation zwischen 4 und 13 DAG betrug nur zwischen 60% und 78% der des WT. Die Linie *35S:bHLH64-10* zeigte eine leicht erhöhte Primärwurzellänge, jedoch hatte die zweite unabhängige Linie *35S:bHLH64-88*, welche die stärkere Expression des Transgens aufweist, eine Primärwurzelelongation von nur 60% verglichen mit dem WT. Beide *35S:HAT22*-Linien zeigten eine signifikant stärkere Elongation der Primärwurzel von 11% und 15%.

Die Lateralwurzelanzahl unterschied sich 13 DAG unter Standardbedingungen in fast allen untersuchten Überexpressionslinien vom WT, der etwa 16 Lateralwurzeln hatte (Abbildung 41b). Beide *35S:GATA22*- und beide *35S:HAT4*-Linien hatten signifikant weniger Lateralwurzeln. Die Lateralwurzelanzahl entsprach nur 27% und 40% des WT-Wertes in *35S:GATA22*-Linien sowie 51%-61% in *35S:HAT4*-Linien. Von den *35S:bHLH64* transgenen Linien hatte die phänotypisch stärker veränderte Linie -88 nur 13% der Lateralwurzeln des WT. *35S:HAT22*-Keimlinge bildeten bis zum 13. DAG die gleiche Anzahl an Lateralwurzeln wie der WT (Abbildung 41b).

Zusammenfassend üben GATA22 und HAT4, sowie bHLH64 vermutlich einen negativen regulatorischen Einfluss auf das Wurzelwachstum aus. HAT22 reguliert die Primärwurzellänge positiv.

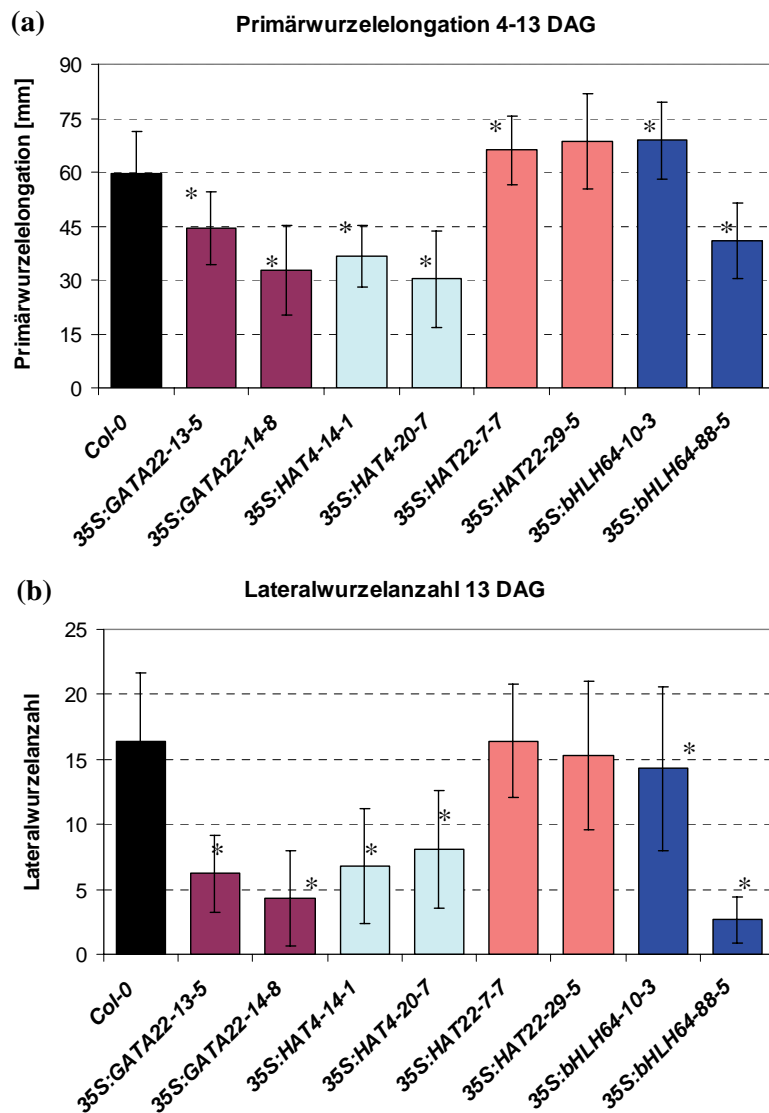


Abbildung 41: Wurzelwachstum von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene.

Die Primärwurzelelongation (a) und die Lateralwurzelanzahl (b) unterschieden sich in den Überexpressionslinien deutlich vom WT. Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium untersucht. Die Primärwurzelelongation wurde zwischen 4 DAG und 13 DAG gemessen und die Lateralwurzelanzahl wurde 13 DAG bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 40). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert (p < 0,01)

4.4.3 Analyse der Cytokininsensitivität von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren

Die bisher beschriebenen morphologischen Veränderungen, insbesondere die des Wurzelwachstums, der Überexpressionslinien (Abbildung 41) gaben erste Hinweise für eine mögliche Funktion der cytokininregulierten Transkriptionsfaktoren bei der Cytokininsignalleitung. In anderen Arbeiten wurde eine veränderte Sensitivität gegenüber Cytokinin in Cytokininsignaltransduktionsmutanten beschrieben. A-Typ ARR's sind beispielsweise negative Regulatoren der Cytokininwirkung und beeinflussen das Wurzelwachstum daher positiv (To *et al.*, 2004). In Mutanten wurde deshalb auch eine erhöhte Cytokininsensitivität des Wurzelwachstums gegenüber exogen zugeführtem Cytokinin gefunden. Bei Mutanten der B-Typ ARR's hingegen wurde von einer reduzierten Cytokininsensitivität des Wurzelwachstums berichtet und diese Faktoren deshalb als positive Vermittler des Cytokininsignals bezeichnet (Mason *et al.*, 2005; Argyros *et al.*, 2008).

Um weiter zu überprüfen, ob die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten cytokininregulierten Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Vermittlung des Cytokininsignals spielen, wurden die Cytokininsensitivität in Überexpressionslinien untersucht. Zwei Bioassays wurden wie bereits bei der Charakterisierung der T-DNA-Insertionsmutanten (siehe Punkt 4.3.4) durchgeführt.

Die Primärwurzelelongation von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene zeigte nur im Falle von 35S:HAT22 transgenen Linien eine veränderte Cytokininsensitivität

Nach exogener Cytokininapplikation nahm die Länge der Primärwurzel in allen Überexpressionslinien mit steigender Cytokininkonzentration ab. Die prozentuale Rate der Abnahme war ähnlich wie beim WT (Anhang Abbildung 52). Es waren zum Beispiel Wurzeln von Linien, die unter Standardbedingungen kürzer (Linien der Gene *GATA22*, *HAT4* und *bHLH64*) bzw. länger (Linien des Gens *HAT22*) als die des WT waren, auch nach Cytokininzugabe kürzer bzw. länger. Die Unterschiede der prozentualen cytokininabhängigen Primärwurzelverkürzung zum WT waren nur bei einzelnen Cytokininkonzentrationen und meist nicht gleichermaßen in beiden unabhängigen Linien zu finden und betragen nie mehr als 10-15%. Eine Ausnahme stellten die 35S:HAT22 transgenen Linien dar. Verglichen mit der Primärwurzelelongation ohne Cytokininapplikation wurde bei beiden unabhängigen Linien bei 50 nM BA eine auf etwa 50% reduzierte Primärwurzelelongation gemessen, beim WT war die Elongation auf etwa 40% reduziert. Bei 100 nM BA wurden in 35S:HAT22 transgenen Linien 36% bzw. 41% kürzere Wurzeln gemessen und beim WT 30%. Der Unterschied in der Sensitivität zum WT betrug also bei beiden Cytokininkonzentrationen 10% (Anhang Abbildung 52). Die Primärwurzeln von 35S:HAT22 transgenen Linien reagierten also weniger sensitiv gegenüber Cytokinin.

Die Bildung von Lateralwurzeln in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene zeigt eine veränderte Cytokininsensitivität

Die Lateralwurzelanzahl in allen untersuchten Überexpressionslinien nahm im Vergleich zum WT prozentual mit einer veränderten Rate abhängig von der Cytokininkonzentration im Medium ab (Abbildung 42).

Die *35S:GATA22* transgenen Linien zeigten nach Applikation von 50 nM BA noch signifikant mehr Lateralwurzeln als der WT. Beim WT wurden nach Applikation von 50 nM BA eine deutliche Reduktion der Lateralwurzelzahl um 90% auf 10% der Anzahl verglichen mit den Kontrollbedingungen gemessen. In den transgenen Linien wurde eine Reduktion auf 18% bis 53% ermittelt (Abbildung 42). Das bedeutet die Lateralwurzelentwicklung dieser Linien war weniger sensitiv gegenüber Cytokinin. Dieser Unterschied in der Sensitivität war in der *35S:GATA22-14-8* Linie nach Applikation von 20 nM BA im Medium noch stärker, wo er mehr als 60% betrug. Beide *35S:GATA22* transgenen Linien hatten sogar bei 100 nM BA im Medium noch bis zu 30% der Lateralwurzelanzahl verglichen mit der Anzahl ohne Cytokininapplikation. Der WT bildete unter diesen Bedingungen gar keine Lateralwurzeln mehr aus.

In *35S:HAT4* transgenen Linien betrug die Lateralwurzelzahl nach Applikation von 50 nM BA im Medium noch 15% und 31% der Lateralwurzelzahl ohne Cytokininapplikation. Im WT waren es nur 6%. Das bedeutet die Lateralwurzelbildung beider *35S:HAT4* transgener Linien war verglichen zum WT auch weniger sensitiv gegenüber Cytokinin (Abbildung 42).

Die Lateralwurzelbildung *35S:HAT22-7-7* transgener Keimlinge hatte die gleiche Sensitivität gegenüber Cytokinin wie WT. Die Lateralwurzelbildung *35S:HAT22-29-5* transgener Keimlinge war jedoch sensitiver gegenüber Cytokinin als der WT. Die Lateralwurzelzahl betrug zum Beispiel bei 20 nM BA im Medium 20% der Anzahl ohne Cytokinin, beim WT waren es noch 40% (Abbildung 42).

Die Sensitivität der Lateralwurzelbildung gegenüber Cytokinin war bei *35S:bHLH64-88* transgenen Keimlingen signifikant reduziert. Bei 20 nM und 50 nM BA im Medium war die Anzahl auf 84% bzw. auf 48% verglichen zur Anzahl ohne Cytokinin gesunken. Der WT hatte bei diesen Cytokininkonzentrationen nur noch 36% bzw. 2% an Lateralwurzeln. *35S:bHLH64-88* transgene Keimlinge hatten also durch Cytokininapplikation eine um 48% bzw. 44% geringere Reduktion der Lateralwurzelzahl. In der zweiten unabhängigen Linie, *35S:bHLH64-10-3* wurde dagegen bei 20 nM BA im Medium eine um 20% stärkere Abnahme der Lateralwurzelzahl als beim WT gefunden, was bedeutet, dass diese Linie eine höhere Cytokininsensitivität als der WT hatte.

Zusammenfassend wurden für *35S:GATA22* sowie *35S:HAT4* transgene Linien reduzierte Cytokininsensitivitäten der Lateralwurzelbildung und für eine der *35S:HAT22* transgenen Linien eine erhöhte Cytokininsensitivität gefunden. *35S:bHLH64-88* transgene Keimlinge zeigten eine reduzierte und *35S:bHLH64-10* transgene Keimlinge eine erhöhte Cytokininsensitivität der Lateralwurzelbildung.

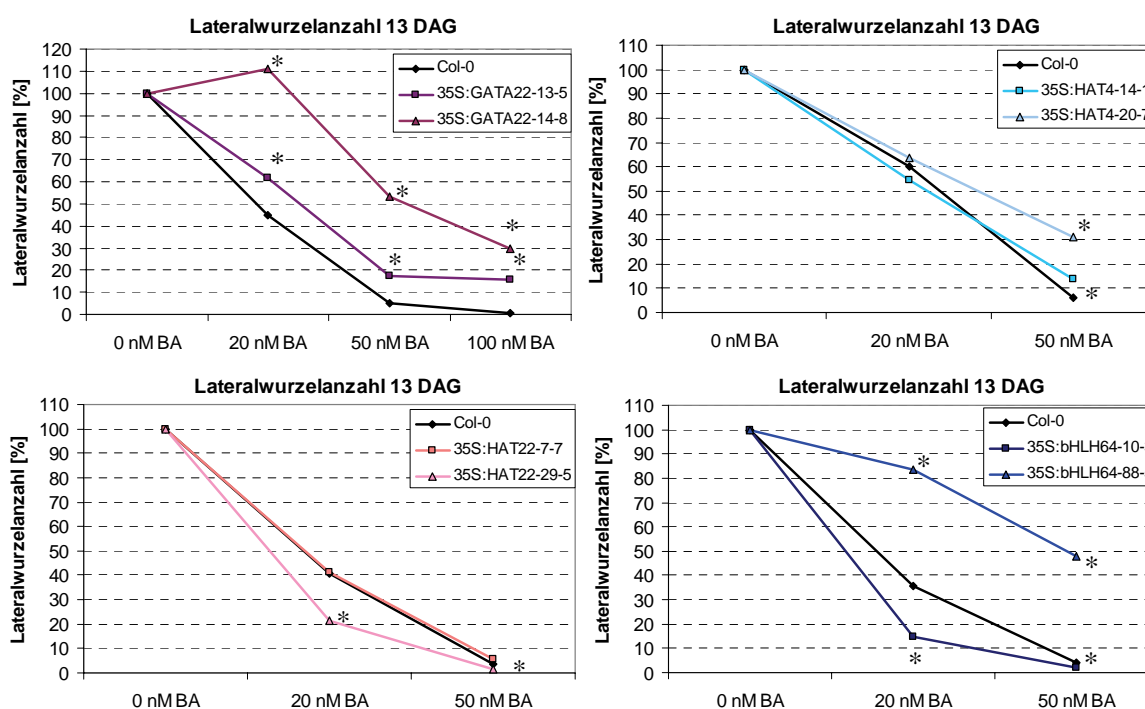


Abbildung 42: Prozentuale Reduktion der Lateralwurzelanzahl in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene. Die Lateralwurzelanzahl wurde 13 DAG bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 40). Signifikante Unterschiede in der Cytokininsensitivität im Vergleich zum WT sind mit einem Stern markiert (p < 0,01). Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium verschiedener Cytokininkonzentrationen untersucht. (Absolute Zahlen, siehe Anhang Abbildung 53).

Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene haben eine veränderte Cytokininsensitivität bei der Unterdrückung von dunkel-induzierter Seneszenz

Cytokinin beeinflusst die Chloroplastenreifung und verzögert den seneszenzbedingten Chlorophyllabbau (Chory *et al.*, 1994; Gan und Amasino, 1995; Gan und Amasino, 1996). Daher bestand ähnlich wie bei der Untersuchung von T-DNA-Insertionsmutanten der untersuchten Transkriptionsfaktorgene (Kapitel 4.3) die Vermutung, dass auch die erhöhte Aktivität dieser Faktoren einen Einfluss auf die cytokininabhängige Chlorophyllretention haben könnte. Aus diesem Grund wurde neben der Messung des Gesamtgehaltes an Chlorophyll auch dessen Retention anhand eines Cytokininsensitivitätstest untersucht. Es wurde die cytokininabhängige Unterdrückung von dunkel-induzierter Seneszenz in abgetrennten Blättern der Überexpressionslinien und den korrespondierenden T-DNA-Insertionslinien ermittelt. Die Ergebnisse sind zusammenfassend im Anhang (Abbildung 49) dargestellt und wurden bereits für die T-DNA-Insertionslinien in Kapitel 4.3.4 erläutert.

In allen Linien wurde die Seneszenz in abgetrennten Blättern prinzipiell unterdrückt. Es war also keine Linie vollständig resistent gegenüber Cytokinin. Die Chlorophyllretention und damit die Sensitivität

der Überexpressionslinien gegenüber Cytokinin waren jedoch nur bei einzelnen Cytokininkonzentrationen verglichen zum WT verändert.

Für die *35S:GATA22*-Linien wurde nur in einer Linie bei 0,1 und 1 μM BA eine verringerte Chlorophyllretention und damit eine geringere Sensitivität als im WT gemessen (Anhang - Abbildung 49), die zweite Linie und auch die T-DNA-Insertionslinie *gata22_IS2* zeigten aufgrund der hohen Standardabweichung aus den drei Replikaten der Messung keine signifikanten Unterschiede in der Cytokinininsensitivität.

In beiden *35S:HAT4*-Linien war die Chlorophyllretention geringer als im WT. Die Unterschiede waren aber nicht bei allen Konzentrationen in beiden Linien signifikant. So blieb im WT bei Zugabe von 1 μM BA noch 50% des Chlorophylls verglichen zum Ausgangswert ohne Dunkelbehandlung erhalten, in den *35S:HAT4*-Linien waren es nur 30%-35%. Die *hat4*-Insertionsmutante hatte bei 0,1 μM BA eine leicht erhöhte Sensitivität verglichen mit dem WT, denn es blieben mehr als 60% des Anfangschlorophyllgehaltes erhalten (Anhang - Abbildung 49).

Eine verstärkte Chlorophyllretention und damit eine erhöhte Cytokinininsensitivität wurde in beiden *35S:HAT22*-Linien gemessen. Die Unterschiede waren jedoch nur bei einer der beiden Linien signifikant. Es blieb in den untersuchten Blättern zwischen 25% und 34% mehr Chlorophyll nach Cytokininbehandlung erhalten als im WT (Anhang - Abbildung 49). *35S:HAT22* transgene Linien sind also im Fall der Unterdrückung von dunkel-induzierter Seneszenz sensitiver gegenüber Cytokinin als der WT.

In der Linie *35S:bHLH64-88* war die Chlorophyllretention trotz eines sehr viel geringeren Anfangschlorophyllgehaltes (siehe auch Abbildung 39b) über fast alle Konzentrationen gleich ansteigend wie im WT. Beide Linien hatten bei 0,1 μM BA noch etwa 35% des Anfangschlorophyllgehaltes. Bei 1 μM stieg dieser im WT weiter auf ca. 40%. In der Linie *35S:bHLH64-88* wurde jedoch bei dieser Konzentration ein stark verringerter Chlorophyllgehalt gemessen, sodass die Kurve hier bereits stark abfiel auf nur 12% (Anhang - Abbildung 49).

4.4.4 Analyse der molekularen Cytokininantwort in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren am Beispiel *ARR5*

Um eine Beteiligung der untersuchten Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung der Cytokininwirkung zu untersuchen, war es interessant, die Expressionsstärke eines durch Cytokinin regulierten Gens als Marker für die generelle Cytokininantwort in den *35S* transgenen Pflanzen zu untersuchen. Dazu wurde wie bereits bei der Untersuchung der T-DNA-Insertionsmutanten (Punkt 4.3.4 und Abbildung 33) *ARR5* ausgewählt, da es durch Cytokinin schnell und stark induziert wird (D'Agostino *et al.*, 2000). Die in einer qRT-PCR ermittelten Transkriptmengen von *ARR5* sind bezogen auf die Menge im WT in Abbildung 43 dargestellt.

Von beiden *35S:GATA22* transgenen Linien wurde nur in der Linie *35S:GATA22-14* eine signifikant reduzierte *ARR5* Transkriptmenge verglichen zum WT gemessen. Diese ist um fast 50% geringer als im WT (Abbildung 43). Das tendenziell vergleichbare Ergebnis wurde für *35S:HAT4* transgene Linien gefunden. In Überexpressionslinien der Gene *HAT22* und *bHLH64* wurde die gleiche *ARR5*-Transkriptmenge wie beim WT gemessen.

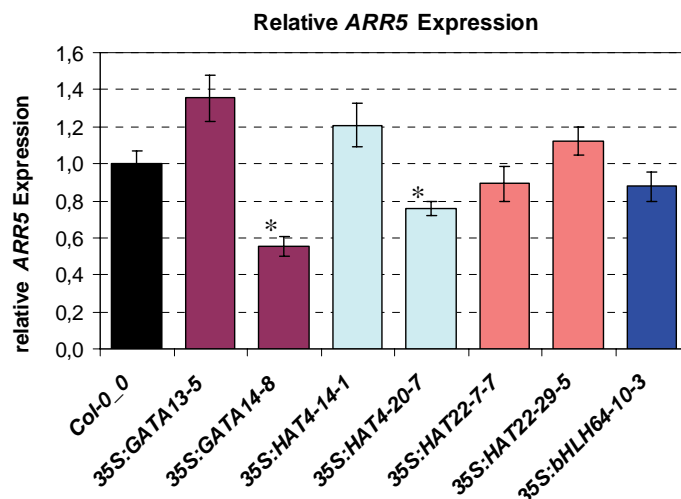


Abbildung 43: *ARR5* Expression in Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktoren im Vergleich zum WT.

Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von *ARR5*, die mit einer qRT-PCR ermittelt wurden. Eingesetzt wurde cDNA von zehn Tage alten, unbehandelten, *in vitro* gewachsenen Keimlingen je Probe. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von drei technischen Replikaten. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (*At5g53300*), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert ($p < 0,01$).

Neben der Messung der Basistranskriptmenge von *ARR5* war es zudem interessant zu überprüfen, ob in den Überexpressionslinien die Induktion von *ARR5* nach exogener Cytokininapplikation verändert ist.

Die Transkriptmenge von *ARR5* wurde zunächst ohne und zusätzlich nach Cytokinininduktion mit 5 μ M BA für 15, 30 und 120 Minuten an WT-Pflanzen bestimmt (Anhang – Abbildung 50). Die Transkriptmenge stieg nach 15 Minuten Cytokininbehandlung etwa 10-fach an und erreichte nach 30 Minuten einen Wert von etwa 17-fach der Ausgangsmenge. Nach 120 Minuten war die Transkriptmenge wieder auf etwa 10-fach der Ausgangsmenge zurückgegangen. Der Zeitpunkt 30 Minuten wurde für die Analyse der Induktionsrate ausgewählt.

Bezieht man die in den transgenen Linien mittels qRT-PCR ermittelten Induktionswerte von *ARR5* auf die jeweils im WT ermittelten Werte, so ergeben sich Abweichungen zwischen 2-fach höherer Induktionsrate bis hin zu nur der halben Induktionsrate des WT (Abbildung 44).

Es wurden für eine der *35S:GATA22*- und beide *35S:HAT4*-Linien eine leicht geringere Sensitivität anhand einer geringeren *ARR5*-Induktionsrate (0,7-0,8-fach von WT) festgestellt. Die

korrespondierenden T-DNA-Insertionslinien wiesen eine leicht erhöhte Sensitivität auf (1,3- und 1,6-fach von WT) (Anhang Abbildung 51 + Tabelle 10). Die Unterschiede waren statistisch nur für die Linie *35S:HAT4-20-7* und *hat4_IS1* signifikant. Auffällig war, dass sich beide *35S:HAT22*-Linien entgegengesetzt zu den anderen untersuchten Überexpressionslinien verhielten. Die Induktionsrate von *ARR5* und damit die Cytokininsensitivität waren in beiden Linien viel höher als im WT (1,6- und 2,0-fach von WT). Insgesamt war festzustellen, dass in allen untersuchten Linien die *ARR5*-Transkriptmenge durch Cytokinin schnell und stark induzierbar war.

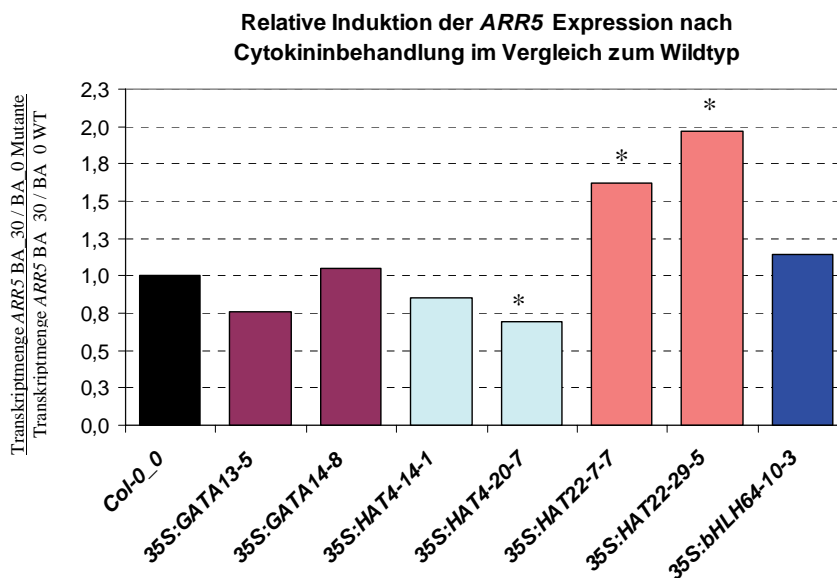


Abbildung 44: Relative Induktionsrate von *ARR5* durch Cytokinin in Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene im Vergleich zum WT.

Dargestellt ist die relative Veränderung der Transkriptmenge von *ARR5* durch Cytokinin, die mittels qRT-PCR ermittelt wurde. Die Induktionsrate von *ARR5* im WT wurde gleich eins gesetzt. Verwendet wurden Keimlinge, die in Flüssigkultur 30 Minuten mit DMSO oder 5 μ M BA behandelt wurden. Die *ARR5* Transkriptmenge in cytokininbehandelten Proben (BA_30) wurde ins Verhältnis gesetzt zu den Proben, die gleich lang mit DMSO (BA_0) behandelt wurden. Die so ermittelten Induktionsraten von *ARR5* für die untersuchten transgenen Linien (siehe Tabelle 10) wurden anschließend zur Induktionsrate des WT ins Verhältnis gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei technischen Replikaten. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Ein Stern markiert Linien, bei denen anhand der absoluten Induktionsraten signifikante Unterschiede zum WT gefunden wurden ($p < 0,05$).

5. Diskussion

5.1 Funktionelle Charakterisierung von *CKX7*

Die funktionelle Analyse der Gene *AtCKX1-AtCKX6* in *Arabidopsis* und Tabak hat in der Vergangenheit einen großen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von Cytokinin bei der Regulation von Pflanzenwachstum und -entwicklung geleistet (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). Die Identifizierung der Prozesse, für die Cytokinin wichtig ist, war lange Zeit nur möglich über die Analyse von phänotypischen Veränderungen an der Pflanze nach exogener Zugabe von Cytokinin oder einer endogenen Erhöhung des Cytokiningehaltes. Cytokinin beeinflusst Wachstumsprozesse in Wurzel und Spross regulatorisch in gegensätzlicher Weise. Anhand der systemischen Reduktion des Cytokiningehaltes in Pflanzen durch konstitutive Überexpression von *CKX* Genen wurde gezeigt, dass Cytokinin einen positiven regulatorischen Einfluss auf die Größe und die Aktivität des apikalen Sprossmeristems hat (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Kopecný *et al.*, 2006). Das Wurzelwachstum wird dagegen von Cytokinin negativ reguliert. Cytokinindefiziente Pflanzen zeigen ein verstärktes Wurzelwachstum (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003a; Galuszka *et al.*, 2004). Viele der identifizierten Phänotypen cytokinindefizienter Pflanzen (Cytokinindefizienz-Syndrom) wurden auch bei Mutanten gefunden, in denen die Cytokininsignaltransduktion mäßig, jedoch nicht vollständig reduziert ist (Mason *et al.*, 2005; Hutchison *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Heyl *et al.*, 2008).

Die Funktionalität von *AtCKX1-AtCKX6* wurde gezeigt, indem den Enzymen *in vitro* eine cytokininabbauende Aktivität nachgewiesen wurde und durch die Tatsache, dass ihre Überexpression in Pflanzen zu stark reduzierten Cytokiningehalten führte (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). *CKX7* wurde vor dieser Arbeit noch nicht funktionell charakterisiert. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse zur Funktionalität von *CKX7* sowie dessen subzelluläre Lokalisation diskutiert und dann die gemessenen Cytokiningehalte *35S:CKX7* transgener Pflanzen im Vergleich zu anderen cytokinindefizienten Pflanzen erläutert. Anschließend wird der Phänotyp *35S:CKX7* transgener Pflanzen besprochen und Erklärungsmodelle für den Phänotyp der Wurzel im Detail erörtert.

5.1.1 Funktionalität und subzelluläre Lokalisation von *CKX7* sowie Cytokiningehalt *35S:CKX7* transgener Pflanzen

Es war bisher nicht bekannt, ob *CKX7* *CKX* Aktivität besitzt. Dies wurde aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu anderen *CKX* Proteinen jedoch vermutet. Die Überexpression von *CKX7* in *Arabidopsis* und in Tabak verursachte eine stark erhöhte *CKX* Aktivität im transgenen Gewebe im Vergleich zum WT. In *Arabidopsis* war die *CKX* Aktivität zwischen 10-1200-fach höher als im WT

(Abbildung 7). In transgenen Tabakpflanzen war die CKX Aktivität 10-40-fach erhöht (Abbildung 22b). Daraus kann man schließen, dass CKX7 ein funktionelles CKX Enzym ist.

Die anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagten subzellulären Lokalisationen der CKX Proteine konnten *in vivo* nicht immer bestätigt werden, da die Analyseprogramme in manchen Fällen nicht sehr verlässlich sind. So wurde zum Beispiel für CKX1 und CKX3 eine mitochondriale Lokalisation vorhergesagt (Schmülling *et al.*, 2003). Die bisher untersuchten CKX Proteine wurden jedoch im ER und im Apoplasten (CKX2) oder in der Vakuole (CKX1 und CKX3) lokalisiert (Werner *et al.*, 2003; Frébortová *et al.*, 2007). Interessanterweise haben überexprimierende Pflanzen vakuolärer CKX Proteine (CKX1, CKX3 und vermutlich CKX5) einen stärkeren Sprossphänotyp als Pflanzen, die apoplastische CKX Proteine überexprimieren (CKX2 und vermutlich CKX4 und CKX6) (Werner *et al.*, 2003). Für CKX7 wurde anhand bioinformatischer Analysen eine zytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt (Punkt 3.2). CKX7 wurde mittels eines in dieser Arbeit erstellten CKX7-GFP Fusionsproteins eindeutig im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 5) und die Vorhersage damit bestätigt. Durch die Überexpression von *CKX7* in *Arabidopsis* und den Vergleich des resultierenden Phänotyps mit dem transgener Pflanzen, die *CKX1* bis *CKX6* überexprimieren, bestand die Erwartung, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob ein im Zytoplasma reduzierter Cytokiningehalt andere Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum hat, als wenn der Gehalt apoplastisch oder in der Vakuole reduziert wird. Da über die intrazelluläre Verteilung und den intrazellulären Transport von Cytokinin bisher wenig bekannt ist und die Überexpression vakuolärer CKX Proteine einen stärkeren Sprossphänotyp in transgenen Pflanzen hervorruft als die Überexpression apoplastisch lokalisierter CKX Proteine (Werner *et al.*, 2003), konnte man annehmen, dass in der Pflanzenzelle verschiedene Cytokininpools unterschiedlich reguliert werden und vermutlich verschiedene Cytokininmetabolite spezifische Wachstumsprozesse in unterschiedlicher Stärke beeinflussen.

Die *35S:CKX7* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen wiesen bei den meisten aktiven Cytokinin eine starke Reduktion verglichen zum WT auf (Tabelle 4). Dies ist ein guter zusätzlicher Beleg der Aktivität von CKX7 als cytokininabbauendes Enzym *in vivo*. Die gemessenen Cytokininkonzentrationen der freien Basen, der Riboside und Glukoside waren bis auf wenige Ausnahmen (*cZR*, *iPR*) geringer als 20% der WT Cytokininkonzentration. Diese Cytokinindefizienz wurde durch eine stark reduzierte Expression des Reportergens *ARR5:GUS* im *CKX7* transgenen Hintergrund zusätzlich deutlich (Abbildung 17). Die reduzierten Cytokinine entsprachen im Wesentlichen den gleichen Metaboliten, welche auch in *35S:CKX1* und *35S:CKX2* transgenen Keimlingen reduziert waren (Tabelle 4). Die Konzentration von *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* war jedoch in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen sehr viel stärker reduziert als in *35S:CKX1* und *35S:CKX2* transgenen Keimlingen, im Falle von *cZ9G* und *iP9G* lag die Konzentration sogar unter der Detektionsgrenze. Da in den cytokinindefizienten Linien *35S:CKX1* und *35S:CKX2* die CKX Aktivität verschiedenen stark erhöht ist und die *35S:CKX1* Linien trotz vergleichsweise schwächerer CKX

Aktivität die stärkeren morphologischen Veränderungen zeigten (Werner *et al.*, 2003), spiegeln die Unterschiede in der Reduktion einzelner Cytokininmetabolite (Tabelle 4) möglicherweise die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften (zum Beispiel die Substratspezifität) und die unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen CKX Enzyme wieder.

Vergleicht man die Ergebnisse einer Studie, in der kürzlich alle CKX Enzyme der *Arabidopsis* Familie hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer Substratspezifität vergleichend analysiert wurden (Galuszka *et al.*, 2007), mit den Cytokininmetaboliten, welche in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen besonders stark reduziert waren, so stimmen die Ergebnisse zum Teil gut überein. CKX7 hat verglichen mit CKX1 oder CKX2 eine Präferenz für *cZ* gegenüber *tZ* (Galuszka *et al.*, 2007), was erklären könnte, warum dieses Cytokinin besonders stark in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen reduziert war. Dies könnte weiterhin erklären, warum *cZ9G*, welches ein Konjugationsprodukt von *cZ* ist, bis unter die Detektionsgrenze reduziert war. Es ist bisher nicht bekannt, ob *cZ9G* ein Substrat von CKX7 ist. Interessanterweise ist CKX7 phylogenetisch am nächsten zu RfCKX1 aus *Rhodococcus fascians* verwandt (Schmülling *et al.*, 2003). Diese Bakterien bilden bei der Infektion der betroffenen Pflanzen selbst Cytokinine für die Gallenbildung, ohne die infizierte Pflanze dabei zu transformieren. *cZ* Metabolite spielen für die Infektion vermutlich eine besonders wichtige Rolle, da deren Produktion vom Bakterium bei der Infektion am stärksten erhöht wird (Pertry *et al.*, 2009). *iP9G* war das weitaus beste Substrat von CKX7 unter den getesteten Cytokininmetaboliten (Galuszka *et al.*, 2007), was gut mit der starken Reduktion von *iP9G* in *35S:CKX7* Keimlingen korrespondiert.

Die besonders starke Reduktion von *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen war zusammenfassend der auffälligste Unterschiede in der Stärke der reduzierten Cytokininmetabolite im Vergleich zu *35S:CKX1* und *35S:CKX2* transgenen Keimlingen. Diese Metabolite könnten deshalb potenzielle Kandidaten für zytoplasmatisch vorkommende Cytokinine sein, da CKX7 im Zytoplasma aktiv ist. Über die Zusammensetzung des Cytokininpools und die Verteilung verschiedener Cytokininmetabolite außerhalb der Zelle und in den verschiedenen Kompartimenten in der Zelle gibt es bisher kaum experimentelle Daten (Fusseder und Ziegler, 1988; Benková *et al.*, 1999). *cZ*, *cZ9G* oder *iP9G* sind möglicherweise besonders wichtig für die frühe Entwicklung der Primärwurzel, worauf in der Diskussion zum Phänotyp *35S:CKX7* transgener Keimlinge noch detailliert eingegangen wird.

5.1.2 Phänotypische Konsequenzen der *CKX7* Überexpression im Spross

Interessanterweise zeigten *35S:CKX7* transgene *Arabidopsis* und Tabakpflanzen nur geringfügige Veränderungen im Sprosswachstum. Transgene Tabakkeimlinge waren nicht vom WT zu unterscheiden. Die Entwicklung der Rosettenblätter im transgenen *Arabidopsis* Keimling war zwar im frühen Stadium verlangsamt, was jedoch vermutlich hauptsächlich auf eine gestörte Ernährung durch die stark veränderte Primärwurzel (siehe unten) zurückgeführt werden kann. Die Sprossentwicklung

war nach der Bildung von Adventivwurzeln kaum und nur in stark exprimierenden Linien vom WT zu unterscheiden (Abbildung 9c). Lediglich die Dauer eines Generationszyklus war durch die verlangsamte Keimlingsentwicklung etwas länger. In der stark exprimierenden Linie *35S:CKX7-GFP-26* wurde eine leichte Reduktion der Sprosshöhe beobachtet (Abbildung 10), was auch in *Arabidopsis* Pflanzen, welche *CKX2* oder *CKX4* überexprimieren der Fall ist (Werner *et al.*, 2003). Eine stark reduzierte Sprosshöhe wie in *35S:CKX1* und *35S:CKX3* transgenen *Arabidopsis* und Tabakpflanzen wurde nach Überexpression von *CKX7* nicht beobachtet. Die einzigen morphologischen Veränderungen *35S:CKX7* transgener Tabakpflanzen waren eine schmalere Blattform, verminderte Pollenbildung und eine leicht reduzierte Apikaldominanz (Abbildung 23). Diese Phänotypen wurden auch für andere cytokinindefiziente Tabakpflanzen beschrieben (Werner *et al.*, 2001; Galuszka *et al.*, 2004). Es könnte sein, dass die durch *CKX7* abgebauten Cytokininmetabolite im adulten Spross weniger wichtig sind, als solche Cytokininmetabolite, die von den anderen CKX Enzymen der Familie abgebaut werden. Übereinstimmend wurde auch keinerlei Promotoraktivität von *CKX7* während der Wachstumsphase von 14 DAG bis zum Einsatz der Blütenbildung detektiert. Die Expression von *CKX7* im WT beschränkte sich auf einige spezifische Domänen im Gynoecium (Köllmer, 2004) und auf das Leitgewebe im Keimling (Abbildung 4).

35S:CKX7 transgene *Arabidopsis* Keimlinge zeigten einen deutlichen Unterschied in der Wurzelentwicklung im Vergleich zum WT und im Vergleich zu transgenen Pflanzen, die eines der anderen *CKX* Gene der Familie überexprimieren. Deshalb wird der Wurzelphänotyp im Folgenden detailliert diskutiert.

5.1.3 Phänotypische Konsequenzen der *CKX7* Überexpression in der Wurzel

35S:CKX7 transgene Keimlinge haben ein stark reduziertes Wurzelwachstum und strukturelle Defekte des Leitgewebes

35S:CKX7 transgene *Arabidopsis* Pflanzen hatten im Vergleich zum WT ein stark reduziertes Primärwurzelswachstum. Die Wurzel wurde maximal 2 cm lang und das Wachstum wurde bereits sehr früh (6-9 DAG) eingestellt. Eine Lateralwurzelbildung fand nicht statt (Abbildung 9). Dieser Phänotyp steht im starken Kontrast zum verstärkten Wurzelwachstum von anderen *35S:CKX* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen oder Mutanten, in denen die Cytokinin-signalleitung reduziert ist (Werner *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2005; Riefler *et al.*, 2006).

Es stellte sich zunächst die Frage nach der Ursache der kurzen Primärwurzel. Dafür kamen einerseits eine reduzierte Zellteilung im Wurzelmeristem (RAM), eine frühere Differenzierung der Zellen und/oder eine reduzierte Elongation der Zellen außerhalb der Teilungszone in Betracht. Eine Untersuchung der Zellteilungsaktivität im RAM *35S:CKX7* transgener Keimlinge mittels des *CYCBI:GUS* Reportergens ergab, dass die Anzahl teilungsaktiver Zellen verglichen zum WT von der Keimung an reduziert war (Abbildung 14). Diese Beobachtung steht im Kontrast zum RAM von

Keimlingen, die andere *CKX* Gene überexprimieren. Diese haben aufgrund einer höheren Anzahl teilungsaktiver Zellen ein größeres RAM als der WT (Werner *et al.*, 2003).

Die Untersuchung der Zellzahl und der Zelllänge einer Cortexzelllinie ergab, dass die Anzahl der isodiametrischen Zellen im *35S:CKX7* transgenen Wurzelmeristem kurz nach der Keimung noch nahezu gleich der des WT war (Abbildung 12a), jedoch bis zum neunten Tag nach der Keimung bedeutend weniger zunahm als im WT (Abbildung 12b bis Abbildung 12d). Im WT blieb zudem das einmal erreichte Verhältnis der Anzahl meristematischer Zellen zur Anzahl bereits elongierten Zellen in der Wurzelspitze gleich (Abbildung 13a), denn die Anzahl Zellen, die durch Elongation die Teilungszone verlassen und in die Differenzierungszone übergehen, ist im WT gleich der Zahl an Zellen, die im Meristem durch Teilung neu entstehen. In den *35S:CKX7* transgenen Wurzelspitzen war dies nicht der Fall. Es gingen mehr Zellen in die Differenzierungszone über, als durch Teilung neu entstanden (Abbildung 13b). Die Differenzierungszone rückte damit von etwa 3-9 DAG immer näher an die Wurzelspitze heran (Abbildung 11). Neun DAG waren alle Cortexzellen in *35S:CKX7* transgenen Wurzelspitzen differenziert und es fand keine Teilung oder Elongation mehr statt. Die Zellen in der Wurzelspitze *35S:CKX7* transgener Keimlinge scheinen also früher zu differenzieren und sich seltener zu teilen als beim WT, was zu einem kleineren RAM und kürzeren Primärwurzeln führt. Neben einer reduzierten Wachstumsrate der Primärwurzel und fehlender Verzweigung wurde zusätzlich ein sehr spezifischer Phänotyp in den Wurzeln *35S:CKX7* transgener Keimlinge gefunden, nämlich ein Defekt in der Differenzierung des vaskulären Gewebes. Verglichen zum WT, bei dem Protoxylem und Metaxylem gebildet wurden (Abbildung 15a), wurde in den Wurzeln *35S:CKX7* transgener Keimlinge ausschließlich Protoxylem gebildet (Abbildung 15b).

Die Defekte im Leitgewebe 35S:CKX7 transgener Keimlinge weisen auf eine reduzierte Cytokininsignalleitung in den vaskulären Initialen infolge einer veränderten AHK4 Aktivität hin

Es wurde anhand der *wol* Mutante in der Vergangenheit gezeigt, dass die Cytokininsignalstärke in den vaskulären Initialen der embryonalen Wurzel besonders wichtig ist, damit ausreichende Zellteilungen stattfinden, um die notwendige Anzahl Initialzellen zu bilden, die eine Differenzierung in sowohl Phloem als auch Xylem ermöglichen (Scheres *et al.*, 1995; Mähönen *et al.*, 2000). In *wol* Mutanten ist die Cytokininsignalstärke durch eine den Signalweg negativ regulierende, starke Phosphatase-Aktivität des mutierten AHK4 Cytokininrezeptors extrem stark reduziert (Mähönen *et al.*, 2006b). Dadurch finden keine ausreichenden Zellteilungen der vaskulären Initialen statt und alle vaskulären Zellen differenzieren frühzeitig und ausschließlich in Protoxylem (Mähönen *et al.*, 2000). Es gibt weitere Mutanten mit stark reduzierter Cytokininsignalleitung, die auch eine sehr kurze Primärwurzel mit ausschließlich Protoxylem bilden. Dabei handelt es sich um Mutanten in denen alle *AHK* Gene, alle *AHP* Gene, oder *ARR1*, *ARR10* und *ARR12* gleichzeitig durch T-DNA Insertionen funktionell ausgeschaltet sind (Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 2007; Argyros *et*

al., 2008; Ishida *et al.*, 2008). *35S:CKX7* transgene Keimlinge zeigen neben dem gleichen Xylemdifferenzierungsmuster auch andere phänotypische Übereinstimmungen mit *wol* Mutanten. Ein Fehlen von Metaxylem könnte zu einer mangelnden Versorgung des Sprosses mit Wasser und Nährsalzen führen, was erklären würde, warum *35S:CKX7* Keimlinge kein weiteres Sprosswachstum nach dem Einstellen des Primärwurzelwachstums mehr zeigen und sich erst weiterentwickeln, sobald Adventivwurzeln gebildet wurden, die keine strukturelle Veränderung der Leitgefäße aufweisen. Dadurch, dass kein Phloem vorhanden ist, könnte darüber hinaus der Transport von Assimilaten aus den photosynthetisch aktiven Blättern in die Wurzeln reduziert sein. Deshalb sind möglicherweise die Zellteilung und damit das Wurzelwachstum aufgrund fehlender Energie aus metabolisierten Assimilaten unterbunden. Somit ist vermutlich der strukturelle Defekt des Leitgewebes der Hauptgrund für den Keimlingsphänotyp *35S:CKX7* transgener Pflanzen. Unterstützt wird diese Hypothese anhand der Beobachtung, dass *35S:CKX7* transgene Keimlinge *in vitro* auf zuckerhaltigem Medium bis die Adventivwurzelbildung einsetzt überleben und auf Erde jedoch absterben.

Die starke Reduktion des Leitgewebes könnte auch erklären, warum trotz Cytokinindefizienz keine Lateralwurzeln gebildet werden. Bei Untersuchungen an der Mutante *wol3*, die die gleichen strukturellen Defekte der Leitgewebe wie *wol* und *35S:CKX7* transgene Keimlinge aufweist, konnte eine starke Akkumulation von Auxin im Hypokotyl nachgewiesen werden (Kuroha *et al.*, 2006). Durch die Reduktion des Leitgewebes, in dem Auxin vom Spross in die Wurzel transportiert wird, war dieser Transport vermutlich stark reduziert und das Auxin am Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel gestaut. Auxin ist jedoch essentiell für die Bildung der Lateralwurzelprimordien. Der gebildete Auxingradient in den Perizykelzellen macht die asymmetrischen Zellteilungen und die Anordnung der polaren Zellteilungsachse möglich (Laplaze *et al.*, 2007). Durch exogene Applikation von Auxin in einer hohen Konzentration (10 μ M) konnte die Lateralwurzelbildung in *wol3* induziert werden, zudem erklärte die erhöhte Auxinkonzentration am Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel die verstärkte Adventivwurzelbildung am Hypokotyl von *wol3* Keimlingen (Kuroha *et al.*, 2006). Die hohe phänotypische Ähnlichkeit von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen zu *wol* Mutanten lässt darauf schließen, dass die fehlende Lateralwurzelbildung und die verstärkte Adventivwurzelbildung in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen möglicherweise auf einen reduzierten Auxintransport in die Wurzel zurückzuführen sein könnten. Durch Analyse des auxinregulierbaren Reportergens *DR5:GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997; Sabatini *et al.*, 1999) im transgenen Hintergrund oder einer Zugabe von Auxin, könnte diese Annahme überprüft werden.

Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert wurde, ist der *wol* Phänotyp der Primärwurzel von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen ein Hinweis darauf, dass die Cytokininsignalleitung in den vaskulären Initialen sehr stark reduziert ist. Als Ursache dafür kommt in Frage, dass in diesen Zellen AHK4 nicht als Kinase, sondern als Phosphatase wirkt. Demzufolge werden die von AHK2 oder AHK3

phosphorylierten AHP Proteine wieder dephosphoryliert, sodass eine Phosphatkaskade ausgehend von den AHPs, nicht mehr oder nur noch stark reduziert abläuft. Das könnte erklären, warum *35S:CKX7* transgene Keimlinge, wie oben beschrieben, eine vergleichbare Fehldifferenzierung des vaskulären Gewebes aufweisen wie zum Beispiel die Dreifachmutante *ahk2, ahk3, ahk4* (Kuroha *et al.*, 2006; Mähönen *et al.*, 2006b). Diese Annahme wird unterstützt durch zwei Komplementationsexperimente, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Das Ausschalten von AHP6, einem negativen Regulator der Cytokininsignalleitung (Mähönen *et al.*, 2006a), führte zu einer Reversion des Primärwurzelphänotyps (Abbildung 21a), da vermutlich die Cytokininsignalleitung in *ahp6-3, 35S:CKX7* Pflanzen wieder höher war als in der *35S:CKX7* transgenen Mutterpflanze. In *ahp6-3, 35S:CKX7* Pflanzen war die CKX Aktivität nach wie vor stark erhöht (Abbildung 21b). Demzufolge scheint eine veränderte Cytokininsignalleitung und nicht ein veränderter Cytokiningehalt in *ahp6-3, 35S:CKX7* Pflanzen die Ursache für den revertierten Wurzelphänotyp zu sein. Auf die gleiche Weise konnte auch der Phänotyp von *wol* Keimlingen partiell revertiert werden, da die *ahp6* Mutation zu einer stärkeren Cytokininsignalleitung und einer verstärkten Metaxylemdifferenzierung führte (Mähönen *et al.*, 2006a).

In einem zweiten Komplementationsexperiment wurde durch Ausschalten von *AHK4* in *35S:CKX7* transgenen Pflanzen auch eine partielle Reversion des Wurzelphänotyps in der resultierenden Doppelmutante *cre1-2, 35S:CKX7* erreicht (Abbildung 20a). Das weist eindeutig darauf hin, dass der Phänotyp von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen durch *AHK4* ausgelöst wurde, die unter den cytokinindefizienten Bedingungen in *35S:CKX7* transgenen Pflanzen vermutlich stärker als Phosphatase denn als Kinase wirkt und die Cytokininsignalstärke stark reduziert. Diese Reduktion könnte durch Ausschalten von *AHK4* unterbunden worden sein, sodass eine Cytokininsignalleitung ausgehend von *AHK2* und *AHK3* wieder stattfindet. Auch in der Doppelmutante *cre1-2, 35S:CKX7* war die CKX Aktivität nach wie vor sehr hoch (Abbildung 20b) und die Reversion des Wurzelphänotyps vermutlich auf eine wieder gesteigerte Cytokininsignalleitung zurückzuführen. Das Ausschalten von *AHK2* oder *AHK3* bewirkte keine Reversion des *wol* Phänotyps der Primärwurzel *35S:CKX7* transgener Keimlinge, was mit der Hypothese in Einklang steht, dass dieser Phänotyp durch die erhöhte Phosphatase-Aktivität von *AHK4* ausgelöst wurde.

Warum zeigen 35S:CKX7 transgene Keimlinge den *wol* Phänotyp der Primärwurzel, jedoch andere 35S:CKX transgene Keimlinge nicht?

In 35S:CKX1 und 35S:CKX2 transgenen Keimlingen tritt kein *wol* Phänotyp der Primärwurzel auf. Als mögliche Ursachen kommen die verschiedenen subzellulären Lokalisationen und Substratpräferenzen der einzelnen CKX Enzyme in Betracht.

Die bereits angesprochenen Cytokininmetabolite *cZ*, *cZ9G* oder *iP9G*, die besonders stark in 35S:CKX7 transgenen Pflanzen reduziert sind, könnten einen spezifischen Einfluss auf die AHK4 Aktivität haben. AHK4 wirkt nur als Phosphatase, wenn kein Cytokinin gebunden werden kann, wie von der mutierten AHK4 Form WOL oder wenn nicht ausreichend Cytokinin vorhanden ist, um an den Rezeptor zu binden und dadurch dessen Dimerisierung und Autophosphorylierung durch die Kinase-Aktivität zu bewirken (Mähönen *et al.*, 2006b). Es könnte also die besonders starke Reduktion von *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* dafür verantwortlich sein, dass in den vaskulären Initialen 35S:CKX7 transgener Keimlinge nicht genug AHK4 Rezeptoren mit Liganden besetzt werden, sodass der Anteil an Rezeptormolekülen, die als Phosphatase aktiv sind erhöht ist. Es ist jedoch erstaunlich, dass zum Beispiel *iP* und *tZ*, die noch in etwa gleicher Konzentration in sowohl 35S:CKX1 und 35S:CKX2 Keimlingen als auch in 35S:CKX7 Keimlingen vorliegen nicht zu einer ausreichenden Aktivierung von AHK4 in 35S:CKX7 Keimlingen führt, obwohl beide Cytokinine sehr gute Liganden von AHK4 sind (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2005; Romanov *et al.*, 2006). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den vaskulären Initialen *iP* und *tZ* Metabolite nur geringfügig vorhanden sind und andere Metabolite wie zum Beispiel *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* die vorherrschenden Cytokinintypen in diesen Zellen darstellen, welche AHK4 aktivieren.

Es wurde bereits angesprochen, dass die Messung des Cytokiningehaltes einzelner Zellen bisher technisch schwierig ist und dazu kaum experimentelle Daten bekannt sind. Man kann jedoch die Orte der Expression der verschiedenen *IPT* Gene in den Organen und Geweben als Indiz für das Vorhandensein der von ihnen produzierten Cytokininmetabolite bewerten. Es konnte gezeigt werden, dass die tRNA *IPT* Gene, die hauptsächlich *cZ* Metabolite synthetisieren, gleichbleibend in der Wurzel exprimiert werden. Die Expression der AMP/ADP/ATP *IPT* Gene, die für die Bildung von *iP* und *tZ* Metaboliten verantwortlich sind, wird hingegen ab dem fünften bis siebenten Tage nach der Keimung reduziert (Birnbaum *et al.*, 2003; Miyawaki *et al.*, 2004). So werden möglicherweise ab diesem Zeitpunkt nur noch die tRNA *IPT* Gene in der Wurzelspitze und speziell in den vaskulären Initialen exprimiert und dadurch sind *cZ* Metabolite dort predominant. Ein verstärkter Abbau dieser Metabolite durch Überexpression von CKX7, welche *cZ* Metabolite bevorzugt, wäre demnach als Ursache für die Phosphatase Aktivität von AHK4 denkbar.

Eine Voraussetzung für diese Hypothese ist jedoch, dass *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* von AHK4 als Liganden gebunden werden. Über *cZ9G* und *iP9G* liegen bisher keine Erkenntnisse über deren Bindungsstärke zu den verschiedenen Rezeptoren vor. Für *cZ* wurde gezeigt, dass AHK4 dieses Cytokinin nur mit

extrem geringer Affinität bindet und mehrere μM *cZ* notwendig waren, gebundenes *tZ* vom Rezeptor zu verdrängen. Des Weiteren war *cZ* in einem bakteriellen Assay überhaupt nicht oder nur in sehr hoher Konzentration in der Lage *AHK4* zu aktivieren (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Pertry *et al.*, 2009). Man kann trotz dessen annehmen, dass die lokale Konzentration einzelner Cytokininmetabolite in speziellen Zellen, wie den vaskulären Initialen, viel höher ist, als die Konzentration, welche bei der Untersuchung ganzer Keimlinge gemessen wurde. Die Reduktion von *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* könnte demnach die Ursache für den beobachteten *wol* Phänotyp von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen sein.

In cytokinindefizienten Pflanzen, die ein in der Vakuole aktives CKX Enzym (*AtCKX1*) oder ein im Apoplasten aktives CKX Enzym (*ZmCKX1*) überexprimieren, wurde eine reduzierte *AHK4* Expression gemessen (Brenner *et al.*, 2005; Kopecný *et al.*, 2006), was vermutlich eine Feedback-Regulation darstellt. Durch eine verminderte *AHK4* Expression, könnte die Phosphatase-Aktivität in *35S:CKX1* Keimlingen vielleicht geringer sein und deshalb kein Xylemdefekt auftreten. Ob das der Fall ist und ob auch in *35S:CKX2* Keimlingen die *AHK4* Expression reduziert ist, ist nicht bekannt. Weder in *35S:CKX7* noch in *35S:CKX2* Pflanzen wurde die Expression von *AHK4* bisher gemessen. Eine Bestimmung des Transkriptlevel von *AHK4* in den drei verschiedenen cytokinindefizienten Linien könnte aufklären, ob die *AHK4* Expression in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen eventuell nicht reduziert ist und dadurch die Phosphatase Aktivität stärker ist.

Interessanterweise wurden in *35S:CKX7* transgenen Tabakpflanzen keine Primärwurzelveränderungen gefunden, die dem *wol* Phänotyp entsprechen. Dies könnte bedeuten, dass entweder die Metabolite *cZ*, *cZ9G* und *iP9G* in den vaskulären Initialen der Tabakwurzel nicht wichtig sind oder *iP* und *tZ* Metabolite dort ausreichend vorhanden sind. Es könnte auch sein, dass aufgrund unterschiedlicher Entstehung der vaskulären Gewebe während der embryonalen Entwicklung dieser Effekt bei Tabak weniger stark ausgeprägt ist oder es sich um einen für *Arabidopsis* spezifischen Effekt handelt. Möglicherweise ist die von der Cytokininkonzentration abhängige Phosphatase-Aktivität von *AHK4* bei Tabak weniger relevant oder es gibt keinen zu *AHK4* homologen Rezeptor mit Phosphatase-Aktivität in Tabak.

Ist die zytoplasmatische Lokalisation von CKX7 auch für den Wurzelphänotyp 35S:CKX7 transgener Keimlinge verantwortlich?

Die subzelluläre Lokalisation von *CKX7* und der daraus vermutlich resultierende geringere Cytokiningehalt im Zytoplasma könnten auch eine Ursache für die beobachteten Xylemdefekte sein. Da keines der untersuchten anderen CKX Enzyme bisher nach Überexpression eine sehr kurze Primärwurzel mit einem *wol*-artigen Xylemdefekt verursachte, ist auch denkbar, dass das Fehlen von spezifisch durch *CKX7* reduzierten Cytokininmetaboliten im Zytoplasma die Ursache für die beobachteten Phänotypen ist. Als Kandidaten kommen dafür wie bereits erläutert *cZ*, *cZ9G* und *iP9G*

in Frage. *cZ* Metabolite werden hauptsächlich von den tRNA IPT Enzymen IPT2 und IPT9 synthetisiert (Miyawaki *et al.*, 2006). Dass im Zytoplasma ein Großteil der Proteinsynthese stattfindet, für die tRNAs gebraucht werden, könnte ein Vorkommen von *cZ* Metaboliten, die aus tRNA stammen, im Zytoplasma erklären. IPT2 wurde zudem im Zytoplasma lokalisiert (Kasahara *et al.*, 2004).

Die Messung der Cytokininkonzentration in verschiedenen Kompartimenten ist bisher nur sehr eingeschränkt möglich. Es wurden zum Beispiel Messungen des Cytokiningehaltes von fraktionierten Vakuolen oder Chloroplasten beschrieben (Fusseder und Ziegler, 1988; Benková *et al.*, 1999). Eine Bestimmung der Cytokininkonzentration im Zytoplasma oder im Apoplasten wurde bisher noch nicht beschrieben. Deshalb sind die von ganzen Keimlingen gewonnenen Messergebnisse nur eine Annäherung an die Cytokiningehalte in den verschiedenen Geweben, Zellen und Kompartimenten. Auch die Detektion von Cytokinin mittels Antikörpern ist möglich (Dewitte und Van Onckelen, 2001). Zeatin wurde mit dieser Methode hauptsächlich im Zellkern detektiert (Dewitte *et al.*, 1999). Jedoch ist die quantitative Bestimmung mit dieser Methode nicht ausreichend und nur wenige Cytokinimetabolite sind bisher detektiert worden (Jacqumard *et al.*, 2002; Chiappetta und Innocenti, 2006).

Um zu überprüfen, ob ein geringer Cytokiningehalt im Zytoplasma durch Expression einer anderen CKX als CKX7 für die Etablierung des beobachteten Wurzelphänotyps ausreichend ist oder ob eventuell die Substratspezifität von CKX7 die wichtigere Rolle spielt, wurde das apoplastische CKX2 Protein ohne das Signalpeptid (*cCKX2*) im Zytoplasma misexprimiert. Die erstellten *35S:cCKX2* und *35S:cCKX2-GFP* transgenen Keimlinge zeigten den Wurzelphänotyp von *wol* und *35S:CKX7* Keimlingen nicht (Daten nicht gezeigt). Die Expression des *cCKX2* Transgens konnte jedoch nur auf Transkriptebene nachgewiesen werden (Abbildung 24). Weder eine höhere CKX Aktivität noch eine GFP Fluoreszenz waren nachweisbar und CKX7-GFP wurde in einem *Western Blot* nicht detektiert (nicht gezeigt). Es ist somit nicht klar, ob *cCKX2* im Zytoplasma überhaupt CKX Aktivität zeigte. Es könnte sein, dass durch die Entfernung des Signalpeptides oder durch fehlende Modifikation (wie Glykolysierungen im ER) die enzymatische Aktivität beeinflusst bzw. das Protein falsch gefaltet und somit abgebaut wurde. Daher wurde vermutlich keine zytoplasmatische Cytokinundefizienz in *35S:cCKX2* transgenen Keimlingen bewirkt. Es bleibt derzeit offen, ob die Lokalisation von CKX7 im Zytoplasma und die dort bewirkte Cytokinundefizienz der Hauptgrund für die beobachteten Phänotypen der Wurzel sind oder ob die dort spezifisch reduzierten Cytokinimetabolite eine besondere Rolle bei der frühen Wurzelentwicklung spielen.

Die Ergebnisse anderer Autoren weisen darauf hin, dass ein im Zytoplasma exprimiertes apoplastisches CKX Enzym dort als CKX funktionell ist. In der beschriebenen Arbeit wurde eine um das Signalpeptid verkürzte Form des apoplastischen Enzyms ZmCKX1 aus Mais, welches AtCKX2 sehr ähnlich ist, in *Arabidopsis* überexprimiert und eine Missexpression von ZmCKX1 im Zytoplasma

bewirkt (Kopečný *et al.*, 2006). Die Erhöhung der CKX Aktivität sowie das verstärkte Wurzelwachstum von *35S:ΔZmCKX1* Keimlingen glich dem von *35S:ZmCKX1* Keimlingen, war jedoch schwächer ausgeprägt. Ein vergleichbarer Wurzelphänotyp wie der von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen oder der von *wol* Mutanten wurde nicht beschrieben, obwohl die CKX Aktivität (etwa 20-mal höher als im WT) in der gleichen Größenordnung wie in den schwach exprimierenden Linien *35S:CKX7-92* und *-93* dieser Arbeit (10-fach höher als im WT, Abbildung 7) erhöht war (Kopečný *et al.*, 2006). Es scheint also eine zytoplasmatische Reduktion des Cytokiningehaltes allein nicht ausreichend zu sein, um den *wol* Phänotyp hervorzurufen. Eine Reduktion spezifischer Cytokininmetabolite, zurückzuführen auf die Substratpräferenzen von CKX7, scheint zusätzlich oder hauptsächlich wichtig zu sein. In einem reziproken Ansatz könnte man CKX7 mit der ER-Lokalisationssequenz von CKX2 fusionieren und so überprüfen, ob eine Überexpression von CKX7 im Apoplasten auch zu einem *wol*-artigen Wurzelphänotyp führt.

Andere Erklärungsmodelle für das reduzierte Primärwurzellängenwachstum in 35S:CKX7 transgenen Keimlingen

Es ist bekannt, dass Cytokinin neben den vaskulären Initialen auch einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf die Zelldifferenzierung an der Übergangszone von der Teilungs- zur Elongations-/Differenzierungszone hat (Dello Ioio *et al.*, 2007). In WT Pflanzen bewirkt die exogene Zugabe von Cytokinin oder eine endogen erhöhte Cytokininkonzentration eine frühere Differenzierung der Zellen (Dello Ioio *et al.*, 2007; Kuderova *et al.*, 2008). Die Zellen teilen sich demzufolge bis zum Einsatz der Differenzierung weniger und das RAM bleibt kleiner, was zu kürzeren Wurzeln führt. Eine negative regulatorische Wirkung von Cytokinin auf den polaren Auxintransport in der Übergangszone durch verminderte Expression der Auxin-Efflux-Transportproteine (PINs) wurde als mögliche Ursache diskutiert (Dello Ioio *et al.*, 2008). Der gegenteilige Effekt wurde an Wurzeln *35S:CKX* transgener Keimlinge und Wurzeln der Cytokininbiosynthesemutante *ipt3*, *ipt5*, *ipt7* beobachtet, deren Cytokiningehalte reduziert sind und welche deshalb längere Wurzeln als der WT bilden (Werner *et al.*, 2003; Miyawaki *et al.*, 2006; Dello Ioio *et al.*, 2007). Auch eine Reduktion der Cytokinin-signalleitung wie in *ahk3* oder *arr1* führte zu einem größeren RAM (Dello Ioio *et al.*, 2007). Dem beschriebenen Modell zu Folge würde man von *35S:CKX7* transgenen Keimlingen auch ein größeres RAM und längere Wurzeln wie im Fall der Überexpression von *CKX1* erwarten. Das Gegenteil wurde jedoch beobachtet (Abbildung 11). Damit kann man anhand dieses Modells die kurze Primärwurzel der *35S:CKX7* Keimlinge nicht erklären. Durch Einkreuzen einer *ahk3* Mutante konnte zudem in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen kein größeres RAM oder eine längere Primärwurzel bewirkt werden (siehe Punkt 3.3.7). Diese dosisabhängige Regulation der Zelldifferenzierung in der Übergangszone ist in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen als Konsequenz des Defektes der vaskulären Gewebe anscheinend gestört. Möglicherweise ist in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen, genau wie in

wol Mutanten, kein verstärkter polarer Auxintransport in der Übergangszone möglich, da aufgrund der reduzierten Leitgewebe Auxin nicht in ausreichender Menge vom Spross in die Wurzel gelangt. Dies wurde an der Mutante *wol3* bereits zum Teil bestätigt (Kuroha *et al.*, 2006).

35S:CKX7 transgene Keimlinge haben weitere strukturelle Defekte im radiären Wurzelbau

Ein weiterer Grund für den verringerten Durchmesser der Primärwurzel *35S:CKX7* transgener Keimlinge könnte neben den stark reduzierten Leitgeweben auch das Fehlen weiterer radiärer Zelltypen der Wurzel sein. Einkreuzen des Wurzelmarkers J0571, durch den im WT Hintergrund sowohl Endodermis als auch Cortex mit GFP Fluoreszenz markiert werden (Abbildung 19a), führte im *35S:CKX7* transgenen Hintergrund nur in einer Zelllinie zu einer Markierung (Abbildung 19c). Bisher war es nicht möglich, genau zu bestimmen, ob eventuell Cortex oder Endodermis nicht vorhanden ist oder aber ob in einer der Zelllinien die spezifische, für die Markergenexpression notwendige Differenzierung fehlt. Eine genauere Untersuchung könnte Aufschluss darüber geben, ob Cytokinin eventuell auch für die Bildung oder Differenzierung weiterer Zelltypen der Wurzel außer dem Leitgewebe wichtig ist. In einem Anschlussexperiment könnte man zunächst überprüfen, welcher Differenzierungsstatus in der durch J0571 markierten Zelllinie *35S:CKX7* transgener Keimlinge vorliegt. Dazu könnte man die Expression der Transkriptionsfaktorgene *SHORTROOT (SHR)* und *SCARECROW (SCR)* in *35S:CKX7* transgenen Wurzeln untersuchen. *SCR* wird spezifisch in der Endodermis gebildet (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Durch Einkreuzen von *SCR:GFP* (Sabatini *et al.*, 1999) wäre eine Endodermis-Differenzierung in Wurzeln nachweisbar. Eine Färbung des Casparischen Streifens (Nachweis von Suberin) und ein Arabinogalactan-Nachweis mittels JIM13 Antikörper wurde zum Nachweis der Endodermis-Identität bereits verwendet (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Sowohl in *scr* als auch in *shr* Mutanten fehlt die spezifische Zellteilung der ersten Tochterzelle der Cortex-/Endodermisinitialzelle, sodass nur eine Zelllinie entsteht (Benfey *et al.*, 1993; Di Laurenzio *et al.*, 1996). Dabei wirkt *shr* epistatisch. Es wurde gezeigt, dass die Wirkung von *SCR* auf die Zellteilung von einer positiven transkriptionellen Kontrolle des *SCR* Gens durch den Transkriptionsfaktor *SHR* abhängig ist. *SHR* wirkt also oberhalb von *SCR*. *SHR* wird im Leitgewebe exprimiert und das *SHR* Protein wandert durch Plasmodesmata in die angrenzenden Endodermiszellen, deren Differenzierung auf die *SHR* Wirkung zurückgeführt werden konnte (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001; Sena *et al.*, 2004). Das reduzierte Leitgewebe in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen könnte zu einer reduzierten Expression von *SHR* führen, was zum einen zu einer verminderten Endodermis-Differenzierung und zum anderen durch Reduktion von *SCR* zur Bildung von nur einer Zelllage anstelle von Cortex und Endodermis führen könnte. Durch die Messung des Transkriptlevels von *SHR* oder der Expression eines *SHR-GFP* Fusionsproteins unter Kontrolle des endogenen *SHR* Promotors in *35S:CKX7* transgenen Keimlingen könnte man beginnen diese Hypothese zu überprüfen.

5.2 Funktionelle Charakterisierung cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene

5.2.1 Bestätigung der cytokininabhängigen Regulation der Kandidatengene

Die cytokininabhängige Veränderung der Transkriptmenge ausgewählter Gene des *Microarray* aus Brenner *et al.* (2005) wurde mit mehreren Methoden verifiziert. Dabei konnte für die Gene *GATA22*, *bHLH64* und *HAT22* mit allen drei Methoden (*Northern Blot*-Analyse, RT-PCR und qRT-PCR) und für *HAT4* mit zwei Methoden (*Northern Blot*-Analyse, RT-PCR) eine Erhöhung des Transkriptlevel durch Cytokinin bestätigt werden (Abbildung 25 und Abbildung 46 im Anhang). Die Induktionsfaktoren, die in der qRT-PCR ermittelt wurden, waren jedoch nicht gleich hoch wie die bei der *Microarray*-Analyse festgestellten Induktionsfaktoren. Auch die quantitative Beurteilung der Signalstärke der *Northern Blot*-Analyse oder der RT-PCR Produkte stimmte nicht vollständig mit den ermittelten zeitlichen Verläufen des *Microarray* überein. *GATA22* Transkripte lagen nicht nur nach 15 Minuten sondern nach 15 und 120 Minuten Cytokininbehandlung in erhöhter Konzentration vor, ebenso wie *HAT22* Transkripte (*Northern Blot*-Analyse). Die Größenordnung der Erhöhung war jedoch mit der der *Microarray*-Analyse vergleichbar (1,5-2,5-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Für die in der *Microarray*-Analyse ermittelten Transkriptionsfaktorgene, deren Transkriptmengen durch Cytokininbehandlung nach zwei Stunden stark reprimiert war (*bHLH78*, *MYB48* und *HSFA2*: < 0,1 verglichen zur unbehandelten Kontrolle), konnte zwar eine Reduktion in der qRT-PCR bestätigt werden, die Reduktion war jedoch in keinem Fall unter 0,3-fach der Transkriptmenge unbehandelter Kontrollen.

5.2.2 Phänotypische Konsequenzen der Überexpression einzelner Transkriptionsfaktorgene und Cytokininsensitivität der transgenen Pflanzen

Da das Transkriptlevel einzelner Transkriptionsfaktorgene in Reaktion auf eine Behandlung des WT mit Cytokinin verändert war, stellte sich die Frage, ob und in welchem Maße diese Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung der Cytokininwirkung in Pflanzen beteiligt sein könnten. Es wurden zwei Strategien verfolgt, um diese Frage zu beantworten. Zum einen wurden in einem *loss-of-function* Ansatz gezielt die phänotypischen Konsequenzen des Funktionsverlusts der Kandidatengene anhand von T-DNA Insertionsmutanten untersucht (siehe Punkt 5.2.3). Es wurde jedoch beschrieben, dass die Untersuchung von Mutanten, in denen die Funktion eines Transkriptionsfaktorgens ausgeschaltet ist, häufig keine phänotypischen Veränderungen in den Pflanzen bewirkte. Die funktionelle Redundanz der Gene, die zu Familien mit einer sehr großen Anzahl an Mitgliedern gehören, wurde als Ursache diskutiert (Zhang, 2003). Deshalb wurde zum anderen von vier schnell durch Cytokinin induzierten Transkriptionsfaktorgen auch eine *gain-of-function* Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse und der Cytokininsensitivitätstest, die mit den überexprimierenden Linien durchgeführt wurden, werden im Folgenden diskutiert. Im Fall von

GATA22 und *HAT4* wird die Diskussion zusammen mit den verfügbaren Insertionsmutanten in diesem Abschnitt erfolgen.

5.2.2.1 *HAT22* ist ein positiver Regulator des Wurzellängenwachstums und vermittelt cytokininabhängige Prozesse in Spross und Wurzel gegensätzlich

HAT22 ist eines von drei Genen für HD-Zip Transkriptionsfaktoren, die unter den cytokinininduzierten Genen identifiziert wurden (Brenner *et al.*, 2005). *HAT22* gehört wie *HAT4* und *HAT3* zur Unterfamilie II der HD-Zip Faktoren. Eine biologische Rolle von *HAT22* ist bisher nicht bekannt. Vergleiche der verschiedenen Domänen des *HAT22* Proteins zeigten ein hohes Maß an Übereinstimmung zu den anderen Mitgliedern der Familie und eine Wirkung als transkriptioneller Repressor wurde aufgrund eines LxLxL Motives im N-terminalen Bereich von *HAT22* angenommen (Ciarbelli *et al.*, 2008).

In den durchsuchten T-DNA Insertionskollektionen konnte keine Insertionsmutante von *HAT22* identifiziert werden, die ein verändertes Transkriptlevel zeigte. Deshalb wurde die Funktion dieses Gens nur anhand von *35S:HAT22* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen untersucht.

Diese Pflanzen zeigten mehrere phänotypische Veränderungen als Keimling und auch während der reproduktiven Phase. *35S:HAT22* transgene Keimlinge bildeten sehr schmale Keimblätter, die eine leichte Hyponastie zeigten (Abbildung 37) und ähnelten damit WT Keimlingen, welche bei einem niedrigen Verhältnis aus Rotlicht (R) und Dunkelrotlicht (FR) gewachsen sind. Unter diesen Lichtverhältnissen kommt es in *Arabidopsis* zur so genannten Schattenvermeidungsreaktion (SAR) resultierend im *shade avoidance syndrom* (SAS) (Morelli und Ruberti, 2002). Der gleiche Phänotyp wurde auch bei *35S:HAT4* transgenen Keimlingen beobachtet (Abbildung 36). *HAT4* wurde als einer der hauptverantwortlichen Faktoren für viele morphologische Veränderungen der Pflanze während der SAR identifiziert und die Expression von *HAT4* wird spezifisch durch ein niedriges R/FR Verhältnis induziert (Carabelli *et al.*, 1993; Carabelli *et al.*, 1996; Steindler *et al.*, 1999). Trotz der hohen Ähnlichkeit zu *HAT4* und den anderen Mitgliedern der HD-Zip II Unterfamilie wird *HAT22* als eines der wenigen Mitglieder nicht durch ein niedriges R/FR Verhältnis induziert (Morelli und Ruberti, 2002; Ciarbelli *et al.*, 2008). Außer einem reduzierten Chlorophyllgehalt der *35S:HAT22* transgenen Pflanzen (Abbildung 38), der auch bei Pflanzen, die unter Schattenbedingungen gewachsen sind, vorkommt (Smith und Whitelam, 1997), wurden weitere phänotypische Veränderungen beobachtet, die darauf hinweisen, dass *HAT22* auch an anderen Aspekten des Pflanzenwachstums beteiligt ist.

35S:HAT22 transgene Keimlinge bildeten längere Primärwurzeln als der WT und die cytokininabhängige Unterdrückung der Primärwurzelelongation war zumindest in der stark exprimierenden Linie signifikant geringer als im WT (Abbildung 41 und Abbildung 52 im Anhang). *HAT22* ist deshalb ein positiver Regulator des Wurzellängenwachstums und unterdrückt die inhibierende Wirkung von Cytokinin auf diesen Wachstumsprozess. Eine positive transkriptionelle

Regulation von *HAT22* durch Cytokinin führt also zu einer antagonistischen Reaktion der Wurzel, wie sie von Cytokinin in WT Wurzeln bewirkt wird und stellt somit eventuell eine Möglichkeit zur Feinabstimmung der Cytokininwirkung auf das Wurzellängenwachstum dar.

Die natürliche Seneszenz von Blättern *35S:HAT22* transgener Pflanzen setzte signifikant früher ein (Abbildung 38). Cytokinin bewirkt in Pflanzen sowohl im Licht als auch im Dunkeln eine verzögerte Seneszenz durch verminderten Chlorophyllabbau (Gan und Amasino, 1995; Gan und Amasino, 1996; Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007). Interessanterweise war die Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz abgetrennter Blätter in *35S:HAT22* transgenen Pflanzen aber sensitiver gegenüber Cytokinin (Abbildung 49, Anhang). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *HAT22* beide cytokininabhängigen Prozesse im Licht und Dunkeln in gegensätzlicher Weise vermittelt. Übereinstimmend mit dieser Annahme zeigten Expressionsanalysen, dass *HAT22* im Dunkeln sehr viel stärker als im Licht exprimiert wird und die Expression zudem in älteren Blättern höher ist (Winter *et al.*, 2007).

Da die Cytokininsensitivität des Primärwurzelwachstums *35S:HAT22* transgener Keimlinge reduziert war, jedoch die Cytokininsensitivität bei der Unterdrückung dunkel-induzierter Seneszenz im Spross erhöht war, werden möglicherweise cytokininvermittelte Prozesse im Wurzel und im Spross während des Keimlingsstadiums auch in gegensätzlicher Weise durch *HAT22* reguliert, nämlich positiv im Spross und negativ in der Wurzel. Interessanterweise wurde in *35S:HAT22* transgenen Keimlingen keine veränderte *ARR5* Transkriptmenge gemessen, die Induktion von *ARR5* durch Cytokinin war jedoch etwa doppelt so stark wie im WT.

Die schmalere Blattform und die reduzierte Größe der Rosettenblätter wurde ähnlich wie für *HAT4* auch in adulten *35S:HAT22* transgenen Pflanzen beobachtet (Abbildung 38). Dies ist ein Hinweis darauf, dass *HAT22* möglicherweise auch an einzelnen Aspekten der SAR des Sprosses, vor allem an den langfristigen Anpassungsreaktionen der Pflanze, beteiligt ist. Dazu gehört auch eine früher einsetzende Blüte, die in *35S:HAT22* transgenen Pflanzen jedoch nicht beobachtet wurde. Dass *HAT22* vielleicht erst an der späten Anpassungsreaktion der Pflanze an ein niedriges R/FR Lichtverhältnis beteiligt ist, könnte erklären, warum für *HAT22* bisher in keiner der Untersuchungen eine Induktion durch diese Lichtbedingungen gefunden wurde. Denn alle beschriebenen Messungen wurden an Keimlingen durchgeführt (Devlin *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2006; Ciarbelli *et al.*, 2008). In der Zukunft wäre es daher interessant zum einen transgene Pflanzen mit einer reduzierten *HAT22* Expression (zum Beispiel durch *antisense* oder RNAi Methoden) zu untersuchen und zum anderen die Expression von *HAT22* im WT unter Schattenbedingungen zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung zu messen.

5.2.2.2 GATA22 reguliert das Wurzelwachstum negativ und beeinflusst verschiedene Aspekte des Sprosswachstums

GATA22 ist ein durch Cytokinin positiv reguliertes Transkriptionsfaktorgen (Abbildung 25 und Abbildung 46; Brenner *et al.*, 2005) und bisher das einzige Gen der *GATA* Unterfamilie, von dem eine Regulation durch Cytokinin bekannt ist (Kiba *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2007). Die Expression von *GATA22* ist strikt licht- und organabhängig. Transkripte von *GATA22* wurden nur im Licht nachgewiesen. Die lichtinduzierte Expression ist von Phytochrom A und Phytochrom B abhängig. In der Wurzel kommen keine *GATA22* Transkripte vor (Manfield *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2007). Die Induktion von *GATA22* durch Cytokinin ist sehr spezifisch, denn die Zugabe der Phytohormone Abscisinsäure, Auxin, Gibberellin oder Ethylen führte in keinem Fall zur Induktion von *GATA22*. Es ist zudem bekannt, dass die Induktion der *GATA22* Expression durch Cytokinin größtenteils von der Wahrnehmung des Hormons durch die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 abhängig ist (Naito *et al.*, 2007).

Ob durch *GATA22* cytokininabhängige Aspekte des Pflanzenwachstums vermittelt werden, wurde anhand der in dieser Arbeit identifizierten Null-Mutante *gata22_IS2* und zwei *35S::GATA22* transgenen Linien untersucht. Die Null-Mutante hatte eine etwas längere Primärwurzel, die überexprimierenden Pflanzen hatten verglichen zum WT übereinstimmend viel kürzere Primärwurzeln und eine signifikant reduzierte Lateralwurzelzahl (Abbildung 27 und Abbildung 41). Obwohl *GATA22* aufgrund der bekannten Daten nicht in Wurzeln exprimiert wird, scheint dieser Transkriptionsfaktor eine negative Rolle während des Wurzelwachstums zu spielen. Die Lateralwurzelbildung war jedoch in den überexprimierenden Pflanzen durch Cytokinin deutlich geringer inhibiert als im WT, diese Pflanzen zeigten also ein reduziertes Wurzelwachstum und trotzdem eine reduzierte Cytokininsensitivität (Abbildung 42). Diese Beobachtung ist sehr erstaunlich. Pflanzen mit reduziertem Cytokiningehalt oder reduzierter Cytokininsignaltransduktion zeigten in allen bisher beschriebenen Arbeiten nämlich ein verstärktes Wurzelwachstum und dann auch eine reduzierte Cytokininsensitivität des Wurzelwachstums (Werner *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2005; Hutchison *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Argyros *et al.*, 2008). Im Falle einer erhöhten Cytokininsignaltransduktion war immer ein reduziertes Wurzelwachstum und verstärkte Cytokininsensitivität beobachtet worden (Sakai *et al.*, 2001; To *et al.*, 2004). Interessanterweise scheint die Funktion von *GATA22* während des Wurzelwachstum zudem spezifisch und nicht redundant zur Funktion von *GATA21* zu sein, denn die Doppelmutante *gata22_IS2, gata21_IS1* zeigte keine verstärkten Effekte bezüglich der leicht veränderten Wurzelwachstumsparameter von *gata22_IS2*. *GATA21* ist der nächste Verwandte von *GATA22* und beide Transkriptionsfaktoren haben überlappende Funktionen, die jedoch weder das Wurzelwachstum noch die Cytokinininduzierbarkeit einschließen (diese Arbeit und Naito *et al.*, 2007). Beide Faktoren haben einen positiven Einfluss auf den Chlorophyllgehalt und sind durch Nitrat induzierbar. Außerdem sind in den Null-Mutanten mehrere Gene für Zuckertransporter dereguliert,

weshalb der reduzierte Chlorophyllgehalt in den Null-Mutanten von *GATA21* und *GATA22* als eine Folge eines veränderten Stickstoff-Kohlenstoff-Metabolismus interpretiert wurde (Bi *et al.*, 2005; Mara und Irish, 2008). Ein reduzierter Chlorophyllgehalt wurde in *gata22_IS2* in dieser Arbeit nicht gemessen, im Gegensatz dazu jedoch in einer der *35S:GATA22* transgenen Linien (Abbildung 28 und Abbildung 35). Andere cytokininabhängige Reaktionen wie zum Beispiel das Primärwurzelwachstum oder die Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz waren nicht merklich verändert.

Ein auffälliger Phänotyp der *35S:GATA22* Keimlinge war die sehr dunkelgrüne Färbung der Keimblätter sowie ein grünes Hypokotyl und eine grüne Primärwurzel im ersten Drittel ab dem Übergang vom Spross zur Wurzel (Abbildung 35). Dies lässt darauf schließen, dass im Hypokotyl und der Wurzel, anders als im WT, Plastiden zu Chloroplasten differenziert sind. Eine detaillierte Analyse der Differenzierung der Plastiden wurde bisher nicht durchgeführt und sollte daher in weiteren Experimenten erfolgen. Eine grüne Wurzel wurde auch bei der cytokininüberproduzierenden Mutante *hoc* (*high shoot organogenic capacity*) beschrieben, die trotz dieser ektoischen Grünfärbungen wie *35S:GATA22* transgene Keimlinge einen reduzierten Chlorophyllgehalt aufwies (Catterou *et al.*, 2002). Es könnte sein, dass *GATA22* nach ektoischer Überexpression des Gens in Wurzeln dort durch seinen positiven Einfluss auf den Chlorophyllgehalt zu einer Differenzierung der Plastiden in Chloroplasten beiträgt.

Eine reduzierte Schotenlänge, wie sie bei *35S:GATA22* transgenen Linien festgestellt wurde, wurde auch von den cytokininüberproduzierenden Mutanten *hoc* und *amp1* beschrieben, jedoch auch von cytokinindefizienten *35S:CKX1 Arabidopsis* Pflanzen (Chaudhury *et al.*, 1993; Nogué *et al.*, 2000; Catterou *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2003). Dagegen bildet eine bestimmte *ckx* Doppelmutante ein größeres Gynoecium und infolgedessen längere Schoten (Bartrina, 2006). Es ist daher bisher unklar, ob kürzere Schoten einen durch *GATA22* vermittelten cytokininabhängigen Aspekt darstellen. Ob eine verminderte Füllung der Schoten mit Samen oder eine reduzierte Samengröße eventuell die Ursachen für die reduzierte Schotenlänge der *35S:GATA22* transgenen Linien sind, muss in der Zukunft erst untersucht werden. Die reduzierte Schotenlänge könnte durch die ektoische Expression von *GATA22* unter der Kontrolle des 35S Promotors bewirkt worden sein, denn die *gata22_IS2* Mutante hatte keine längeren Schoten. Es ist auch möglich, dass *GATA21* die Funktion von *GATA22* in diesem Prozess übernehmen kann, denn eine redundante Funktion von *GATA21* und *GATA22* in Blättern und Blüten wurde bereits beschrieben. Beide Gene sind in diversen Blütenorganen einschließlich des Karpells exprimiert (Mara und Irish, 2008).

5.2.2.3 HAT4 vermittelt wesentliche Aspekte des *shade avoidance syndrom* in auxinabhängiger Weise und ist möglicherweise an einer cytokininregulierten Feinabstimmung der Schattenvermeidungsreaktion beteiligt

HAT4 ist neben *HAT3* und *HAT22* das dritte Gen der HD-Zip II Unterfamilie, dessen Expression positiv durch Cytokinin reguliert wird (Abbildung 25 und Abbildung 46; Brenner *et al.*, 2005). Die Expression von *HAT4* wird zudem schnell und stark durch ein niedriges R/FR Verhältnis induziert. Pflanzen mit starker konstitutiver Expression von *HAT4* ähneln Pflanzen, die im Schatten, also unter einem niedrigen R/FR Verhältnis, gewachsen sind. Dazu gehören zum Beispiel ein reduziertes Wurzelsystem, schmale hyponastische Blätter, ein verlängertes Hypokotyl und eine früher einsetzende Blüte. Pflanzen mit reduzierter *HAT4* Expression zeigen entgegengesetzte Phänotypen (Carabelli *et al.*, 1993; Schena *et al.*, 1993; Carabelli *et al.*, 1996; Smith und Whitelam, 1997; Morelli und Ruberti, 2002).

Diese detailliert beschriebenen Phänotypen wurden in dieser Arbeit sehr gut anhand der identifizierten *hat4_IS1* Null-Mutante und den *35S:HAT4* transgenen Linien rekapituliert. Es wurde ein verstärktes Wurzelwachstum in *hat4_IS1* Keimlingen (Abbildung 27) und eine reduziertes Wurzelwachstums in *35S:HAT4* transgenen Keimlingen gemessen (Abbildung 41). Beide Linien zeigten zudem die charakteristische schmale und hyponastische Blattform (Abbildung 36).

Die Schattenvermeidungsreaktion (SAR) ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Auxinbiosynthese (Morelli und Ruberti, 2002; Tao *et al.*, 2008). Es wurde bereits gezeigt, dass neben *HAT4* viele auxinregulierte Gene, zum Beispiel *AUX/IAA* Gene, unter Schattenbedingungen eine stark erhöhte Genexpression zeigen (Devlin *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2006; Carabelli *et al.*, 2007). In WT Pflanzen kann die Hypokotylelongation unter Schattenbedingungen durch Inhibierung des Auxintransports unterdrückt werden und Phänotypen von *35S:HAT4* transgenen Pflanzen sind durch einen erhöhten Auxintransport im Spross sowie einem reduzierten Auxintransport in die Wurzel erklärt worden (Steindler *et al.*, 1999; Morelli und Ruberti, 2002). Da *HAT4* durch Cytokinin positiv reguliert wird und das Wurzellängenwachstum und die Verzweigung durch einen eng korrelierten Einfluss von Auxin und Cytokinin reguliert werden (Dello Ioio *et al.*, 2007; Laplaze *et al.*, 2007; Dello Ioio *et al.*, 2008) war es interessant, die beobachteten Wurzelphänotypen auf eine cytokininvermittelte Regulation von *HAT4* hin zu untersuchen.

Die Primärwurzelelongation und die Lateralwurzelbildung von *hat4_IS1* und *35S:HAT4* transgenen Keimlingen wurden verglichen zum WT gleichermaßen durch Cytokinin inhibiert. Nur bei der höchsten Cytokininkonzentration war die Lateralwurzelbildung *HAT4* überexprimierender Linien geringfügig weniger durch Cytokinin inhibiert. Der Einfluss von Cytokinin auf das Wurzelwachstum scheint demnach nicht oder nur geringfügig durch *HAT4* vermittelt zu werden. Die beobachteten Veränderungen in den transgenen Wurzeln gehen vermutlich hauptsächlich auf einen veränderten Auxintransport vom Spross in die Wurzeln zurück.

Die dunkel-induzierte Seneszenz wurde in *hat4_IS1* und *35S:HAT4* transgenen Keimlingen stärker bzw. vermindert durch Cytokinin unterdrückt (Abbildung 49, Anhang) was anzeigt, dass HAT4 eine negative Rolle bei der Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz spielt. Eine veränderte Seneszenz wurde in Pflanzen beobachtet deren Blätter teilweise beschattet wurden, die jedoch nicht vollständig im Schatten gewachsen sind (Rousseaux *et al.*, 1996; Rousseaux *et al.*, 2000; Weaver und Amasino, 2001; Boonman *et al.*, 2006). Ein reduzierter Transport von Cytokinin in die beschatteten Blättern aufgrund des reduzierten Transpirationsstromes wurde als Ursache der früheren Seneszenz identifiziert (Boonman und Pons, 2007; Boonman *et al.*, 2007; Boonman *et al.*, 2009). Es könnte also sein, dass HAT4 während der SAR eine Funktion bei der Vermittlung cytokininregulierter Aspekte im Spross hat. Der Chlorophyllgehalt in lichtgewachsenen *hat4_IS1* Keimlingen war auf ca. 55% des WT Gehaltes reduziert (Abbildung 28), was einen positiven Einfluss von *HAT4* auf den Chlorophyllgehalt anzeigt. Scheinbar ist die Funktion von HAT4 bezüglich der Regulation des Chlorophyllgehaltes also im Licht gegensätzlich zur Funktion im Dunkeln.

Über eine Beteiligung von Cytokinin während der SAR gibt es weitere Hinweise. So wird beispielsweise die Expression von *CKX* Genen (*CKX5* und *CKX6*) genau wie die von *HAT4* durch ein niedriges R/FR Lichtverhältnis schnell induziert (Sessa *et al.*, 2005; Carabelli *et al.*, 2007). Als Folge einer erhöhten *CKX5* und *CKX6* Genexpression nimmt die Cytokininkonzentration in den Expressionsdomänen beider Gene ab und die Aktivität des vegetativen Sprossmeristems wird reduziert, sodass weniger Blattprimordien gebildet werden (Carabelli *et al.*, 2007). Durch eine geringere Cytokininkonzentration würde dann auch der positive regulatorische Einfluss von Cytokinin auf die *HAT4* Expression reduziert. Es ist demnach denkbar, dass nach einer schnellen Antwort der Pflanze unter Schattenbedingungen, die mit der schnellen und starken Induktion der *HAT4* Expression einhergeht, eine langsame Reaktion der Pflanze folgt. Diese würde durch einen erhöhten Cytokininabbau zu einer Abschwächung der *HAT4* Induktion führen. Eine solche (die SAR abschwächende) Reaktion unter länger andauernden Schattenbedingungen ist bereits beschrieben worden. Dabei wird verzögert nach der ersten schnellen Induktion der Gene, die an der SAR beteiligt sind, diese durch einen so genannten Master-Regulator (den Transkriptionsfaktor HFR1) wieder abgeschwächt. In der Pflanze wird dadurch sichergestellt, dass die SAR nicht unbegrenzt abläuft, wenn die Pflanze nach einem längerfristigen erfolglosen Höhenwachstum keine besseren Lichtverhältnisse erreicht (Sessa *et al.*, 2005). Eine zusätzliche Regulation dieser verzögerten Abschwächung der SAR durch eine Reduktion der Cytokininkonzentration wäre ein interessanter Aspekt für zukünftige Untersuchungen, denn neben *HAT4* wurden auch die cytokinininduzierten Gene *HAT3* und *bHLH64*, die Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit waren, unter den schnell durch Schattenbedingungen induzierten Genen identifiziert (Carabelli *et al.*, 2007).

5.2.2.4 bHLH64 ist ein negativer Regulator des Chlorophyllgehaltes und der Lateralwurzelbildung und verschaltet möglicherweise die Signalwege von Cytokinin, Licht und Gibberellin

Die Expression von *bHLH64* aus Unterfamilie 18 der bHLH Faktoren wird schnell und anhaltend durch Cytokinin um den Faktor 1,5 bis 3,0 induziert (Abbildung 25 und Abbildung 46; Brenner *et al.*, 2005). Über die Funktion von bHLH64 gibt es bisher wenige Informationen. Es wurde neben einer Regulation durch Cytokinin auch eine erhöhte Expression des Gens bei Lichtbedingungen mit einem niedrigen Verhältnis aus R/FR oder durch Nitratzugabe beschrieben (Wang *et al.*, 2003; Carabelli *et al.*, 2007).

In den durchsuchten T-DNA Insertionskollektionen wurde keine Insertionsmutante von *bHLH64* mit einem veränderten Transkriptlevel identifiziert. Die Funktion dieses Gens wurde deshalb nur an *35S:bHLH64* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen untersucht. Die ausgewählten Linien zeigten eine unterschiedlich starke Expression des Transgens (Abbildung 34). Die Linie mit moderater Überexpression (*35S:bHLH64-10*) war phänotypisch nur geringfügig unterschiedlich zum WT. Die Primärwurzeln waren etwa 15% länger und die Anzahl der Lateralwurzeln war um 15% reduziert (Abbildung 41). Die Cytokininsensitivität beider Parameter des Wurzelwachstums war nur geringfügig (10%-15%) höher als im WT. Das Sprosswachstum glich dem des WT. Die Linie mit sehr starker Expression des Transgens (*35S:bHLH64-88*) unterschied sich sehr stark vom WT. Die Wurzellänge von Pflanzen der Linie *35S:bHLH64-88* entsprach nur 70% der Länge des WT und die Anzahl der Lateralwurzeln sogar nur 15%. Beide überexprimierenden Linien zeigten übereinstimmend eine verringerte Lateralwurzelanzahl und einen reduzierten Chlorophyllgehalt (Abbildung 41 und Abbildung 39). Das Gen *bHLH64* scheint somit die Lateralwurzelbildung und den Chlorophyllgehalt negativ zu beeinflussen. Es war auffällig, dass beide untersuchten *35S:bHLH64* transgenen Linien in mehreren untersuchten Parametern verglichen zum WT gegensätzliche Veränderungen in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration zeigten. Die Cytokininsensitivität der Lateralwurzelbildung und die cytokininabhängige Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz waren in der stark exprimierenden Linie deutlich gegenüber WT reduziert, wohingegen sie in der moderat überexprimierenden Linie leicht erhöht waren. Ohne die Untersuchung einer *bhlh64 loss-of-function* Mutante kann man aus den vorliegenden Daten keine Schlussfolgerung über eine positive oder negative Vermittlung von cytokininabhängigen Wachstumsprozessen durch bHLH64 ziehen.

Der Spross der stärker exprimierenden Linie wies besonders vielfältige phänotypische Veränderungen auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch die besonders starke ektopische Expression von *bHLH64* in der Linie *35S:bHLH64-88* mehrere Signalwege in diesen Pflanzen verändert sind. Ein gezackter Rand der Rosettenblätter (Abbildung 39b) wurde bereits mehrfach von Pflanzen beschrieben, die mit Cytokinin behandelt wurden oder die einen erhöhten Cytokininingehalt aufweisen (Rupp *et al.*, 1999; Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005). Weitere phänotypische Veränderungen des Sprosses, wie das lange Hypokotyl, die verlängerten Petiolen, ein reduzierter Chlorophyllgehalt, die blassgrüne Färbung der

Blätter und die langen Internodien zwischen den Rosettenblättern (Abbildung 39 und Abbildung 40), weisen in der Gesamtheit darauf hin, dass in den Linien *35S:bHLH64-88* und *-89* möglicherweise licht- und/oder gibberellinabhängige Signalwege verändert sind.

Auf der einen Seite ähneln die Phänotypen denen von Pflanzen, in welchen die Rotlichtrezeptoren Phytochrom B, C, D und E mutiert sind und die deshalb diese Lichtqualität nicht mehr wahrnehmen können (Franklin *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite wurden Pflanzen beschrieben, die ähnliche Phänotypen ausprägen und die eine verstärkte Antwortreaktion auf Gibberellin (GA) zeigen. Diese wurden entweder mit GA behandelt, wiesen einen erhöhten endogenen GA-Gehalt auf oder es war die Repression der GA-Antwort durch Mutationen in DELLA Faktoren reduziert (Huang *et al.*, 1998; King *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2001; Fleet und Sun, 2005; Lee *et al.*, 2006).

Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass die Linien *35S:bHLH64-88* und *-89* ein verändertes Hypokotyllängenwachstum in Reaktion auf exogen zugegebenes GA bzw. den GA-Inhibitor Paclobutrazol aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Es scheint also, dass durch die starke Überexpression von *bHLH64* eine verstärkte GA-Antwort der Pflanzen bewirkt wird. Es gibt bHLH Faktoren, die anhand ihrer N-terminalen APB (*active phytochrome binding*) Domäne mit der lichtaktivierten Form von Phytochrom B (P_{fr}) interagieren können und dadurch im Licht zielgerichtet vom 26S-Proteasom abgebaut werden (Khanna *et al.*, 2004; Duek und Fankhauser, 2005; Lorrain *et al.*, 2008). Diese Phytochrom-Interagierenden-Faktoren (PIFs) regulieren als Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen, welche an der Hypokotylverlängerung im Dunkeln beteiligt sind. Die gleichen PIFs werden bei geringer Konzentration von GA durch Protein-Interaktion mit den DELLA Proteinen (Repressor-Proteine der GA-Signalleitung) in einem Komplex eingebunden, der sie an der Bindung ihrer Zielgene hindert. Durch Wahrnehmung von GA und den dadurch vermittelten zielgerichteten Abbau der DELLA Proteine werden die PIFs aus diesem Komplex freigesetzt und können die Expression ihrer Zielgene aktivieren, sodass wie im Dunkeln das Hypokotyl länger wird (Davière *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Hirano *et al.*, 2008). Die PIFs bilden aufgrund ihrer APB Domäne eine eigene Unterfamilie der bHLH Faktoren (Unterfamilie 15). Das hier untersuchte Gen für *bHLH64* gehört jedoch zur Unterfamilie 18 und besitzt diese APB Domäne nicht (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Khanna *et al.*, 2004; Duek und Fankhauser, 2005). Eine direkte Interaktion von *bHLH64* mit Phytochrom ist daher unwahrscheinlich. Wie in der Einleitung bereits erläutert wurde, hängt die Spezifität der Funktion von bHLH Faktoren zu einem großen Teil von der Bildung von Dimeren mit anderen bHLH Faktoren, HLH Faktoren oder anderen Proteinen ab. Der pleiotrope Phänotyp der *35S:bHLH64* transgenen Linien, könnte also hypothetisch durch die starke ektopische Expression von *bHLH64* verursacht worden sein. Die überdosierte Menge an *bHLH64* Protein könnte zu einer massiven Störung der Dimerbildung von zum Beispiel PIF Proteinen mit Phytochrom und DELLA Proteinen führen, indem *bHLH64* mit den PIFs oder DELLA Proteinen interagiert. Das würde die veränderten Reaktionen auf Licht und GA erklären.

Es ist bisher unklar, ob die Signalwege von Licht, Gibberellin und Cytokinin über bHLH64 im WT tatsächlich interagieren. Möglicherweise führte die Expression von *bHLH64* in Geweben und zu Zeitpunkten, an denen dieses Gen sonst nicht exprimiert wird zu den pleiotropen Effekten. Auf der anderen Seite sind Interaktionen von sowohl phytochromabhängigen Lichtsignalwegen mit Cytokinin (Sweere *et al.*, 2001; Riefler *et al.*, 2006; Heyl *et al.*, 2008) als auch Interaktionen des Gibberellinsignalweges und des Gibberellinmetabolismus mit dem Cytokininsignalweg bereits beschrieben worden (Huang *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005; Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005).

Eine Untersuchung der lichtabhängigen Hypokotylreaktion in *bhlh64* Mutanten sowie eine detaillierte Analyse anderer Licht- und GA-abhängiger Prozesse, wie zum Beispiel der Keimung, wäre für die Beantwortung der Frage einer Interaktion der Signalwege hilfreich. Des Weiteren könnten die möglichen Interaktionspartner von bHLH64 zum Beispiel in einer *yeast two-hybrid* Analyse untersucht werden.

5.2.3 Phänotypische Konsequenzen des Verlustes der Genfunktion einzelner Transkriptionsfaktorgene und Cytokininsensitivität der Insertionsmutanten

In der *loss-of-function* Analyse wurden gezielt die phänotypischen Konsequenzen des Funktionsverlusts der Kandidatengene anhand von T-DNA Insertionsmutanten untersucht. Die Kandidatengene gehören jeweils großen Unterfamilien der verschiedenen Transkriptionsfaktorklassen an. In der Vergangenheit war es nur bei einem geringen Teil untersuchter Mutanten von Transkriptionsfaktorgen möglich, phänotypische Veränderungen zu identifizieren. Dies wurde auf die funktionelle Redundanz der Faktoren zurückgeführt (Zhang, 2003). Es gibt aber auch überzeugende Beispiele von Transkriptionsfaktoren, deren Funktionen sehr spezifisch sind und deren Verlust zu eindeutigen Veränderungen der Morphologie oder der Sensitivität gegenüber Hormonen führt (siehe Einleitung). Die Ergebnisse der *loss-of-function* Analyse werden im Folgenden diskutiert. Von sechs Kandidatengen (*GATA22*, *HAT4*, *HAT3*, *MYB48*, *bHLH78*, *HSFA2*) war es möglich, Null-Allele unter den untersuchten T-DNA Insertionsmutanten zu identifizieren und von einem weiteren Gen wurde eine Mutante mit stark reduzierter Expression des entsprechenden Gens (*MYB60*) gefunden (Abbildung 26 und Tabelle 5).

Die phänotypische Charakterisierung der Insertionsmutanten zeigte, dass nur geringfügige morphologische Veränderungen durch den jeweiligen Funktionsverlust der Gene hervorgerufen wurden. Die Veränderungen betrafen in den meisten Fällen das Wurzelwachstum und den Chlorophyllgehalt einiger Mutanten. Zusätzlich wurden bei einigen Insertionsmutanten Veränderungen in cytokininabhängigen Prozessen, wie dem Wurzelwachstum oder der Chlorophyllretention beobachtet. Auf molekularer Ebene wurde bei zwei Insertionsmutanten (*myb48_IS1* und *myb60_IS3*) eine veränderte Cytokininantwort anhand der *ARR5* Transkriptmenge oder einer veränderten Induktion

der *ARR5* Expression durch Cytokininbehandlung gemessen. Insertionsmutanten mit einer veränderten Morphologie oder Cytokinin sensitivität werden im Folgenden diskutiert. Die Insertionslinien der Gene *GATA22* und *HAT4* wurden bereits zusammen mit den überexprimierenden Linien dieser Gene diskutiert.

5.2.3.1 HSFA2 ist ein negativer Regulator der Lateralwurzelbildung

HSFA2 ist eins der Gene, dessen Transkriptmenge durch eine zweistündige Cytokininbehandlung reduziert wurde (Abbildung 46 im Anhang und Brenner *et al.*, 2005). Hitzestress-Transkriptionsfaktoren (HSF) sind als terminale Komponenten einer Signalkaskade für die Expression von Genen in Reaktion auf Hitzestress oder chemische Stimuli verantwortlich. Zu den Zielgenen gehören vor allem Gene für Hitzestress Proteine (HSP), die als Chaperone die Zellen zum Beispiel vor Schädigungen durch oxidativen Stress schützen, indem sie Proteine abschirmen und vor Abbau bewahren. *HSFA2* ist eines von 21 *HSF* Genen in *Arabidopsis* und wird aufgrund der Tatsache, dass *HSFA2* sowohl DNA-Bindefähigkeit als auch Aktivität als transkriptioneller Aktivator besitzt, der Untergruppe A zugeordnet (Nover *et al.*, 2001; Kotak *et al.*, 2004). *HSFA2* wurde als strikt hitzestress-abhängig exprimiertes Gen beschrieben, das von allen *HSF* Genen eine der stärksten Induktionen zeigt. Die Expression des Gens konnte bisher jedoch nur nach Hitzestress-Induktion oder unter Starklichtbedingungen aber nicht in Kontrollen nachgewiesen werden (Nover *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2006). Es ist daher erstaunlich, dass die Expression von *HSFA2* bei unbehandelten WT Keimlingen unter Standardbedingungen von 22°C nachgewiesen wurde und der Transkriptlevel zudem nach Cytokininbehandlung stark reduziert vorlag (Brenner *et al.*, 2005). Eine Funktion von Cytokinin bei der Hitzestressantwort ist bisher nicht bekannt. Eine Überexpression von *HSFA2* führte zu einer verstärkten Kallusbildung (Ogawa *et al.*, 2007). *HSFA2* Transkripte wurden außerdem in Wurzelexplantaten, die auf Kallusinduktionsmedium inkubiert wurden, exakt zum Zeitpunkt, wenn die volle Kompetenz zur Sprossbildung erreicht ist, nachgewiesen (Che *et al.*, 2002). Als einziger Unterschied zum WT wurde bei Keimlingen von *hsfa2_IS1* eine erhöhte Lateralwurzelanzahl ermittelt (Abbildung 27b). Bei verschiedenen Cytokinkonzentrationen im Medium wurden jeweils mehr Lateralwurzeln als im WT gebildet, was eine reduzierte Cytokinin sensitivität darstellt (Abbildung 31c und Abbildung 31d). Im Gegensatz dazu wurden von anderen Autoren keine phänotypischen Veränderungen der T-DNA Insertionsmutanten von *HSFA2* unter Standardbedingungen beschrieben (Schramm *et al.*, 2006; Charng *et al.*, 2007). Unter dem Gesichtspunkt, dass *HSFA2* ein transkriptioneller Aktivator ist und der Beobachtung einer erhöhten Anzahl Lateralwurzeln in *hsfa2_IS1* Keimlingen kann man schlussfolgern, dass *HSFA2* ein negativer Regulator der Lateralwurzelbildung ist und möglicherweise die Transkription von Genen anschaltet, deren korrespondierende Proteine an der Inhibierung der Lateralwurzelbildung beteiligt sind. Transkriptanalysen in *35S:HSFA2* transgenen Pflanzen und T-DNA Insertionsmutanten führten in

anderen Arbeiten zur Identifikation von potenziellen Zielgenen von HSFA2. Darunter wurden jedoch fast ausschließlich Gene für Hitzschock-Proteine und eine Ascorbat-Peroxidase gefunden (Nishizawa *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2007).

5.2.3.2 HAT3 ist ein positiver Regulator von Chlorophyllgehalt und cytokininabhängiger Chlorophyllretention und ist an der Lateralwurzelbildung beteiligt

HAT3 gehört zur Unterfamilie II der HD-Zip Transkriptionsfaktoren. Für HAT3 ist bisher nur sehr wenig über seine funktionale Rolle bekannt. Zum Teil resultieren die Erkenntnisse nur aus Vergleichen mit Funktionen nah verwandter HD-Zip Faktoren der gleichen Unterfamilie. Die HD-Zip II Faktoren sind auf der Aminosäureebene untereinander sehr ähnlich und ihre HD-Zip Domänen sind zwischen 60% und 90% homolog. Die Expression von *HAT3* ist stark lichtabhängig und wird beim Wechsel von einem hohen zu einem niedrigen Verhältnis aus R/FR induziert (Ciarbelli *et al.*, 2008). Die anderen Mitglieder der Unterfamilie werden zum größten Teil durch die gleiche Veränderung der Lichtqualität induziert, wie zum Beispiel *HAT2* und besonders stark *HAT4*. *HAT4* ist cytokininreguliert. (siehe Einleitung und Diskussion Punkt 5.2.2.3). *HAT2* ist ein auxinreguliertes Gen (Sawa *et al.*, 2002), was darauf hinweist, dass an der Schattenvermeidungsreaktion Phytohormone beteiligt sind.

Es ist bisher nicht bekannt, ob HAT3 als transkriptioneller Aktivator oder Repressor wirkt und es sind auch keine Zielgene von HAT3 beschrieben worden. Die hohe Ähnlichkeit zu HAT2 und HAT4, die beide als transkriptionelle Repressoren beschrieben sind (Steindler *et al.*, 1999; Sawa *et al.*, 2002) und das Vorkommen eines spezifischen LxLxL Motivs, welches in AUX/IAA Faktoren transkriptionelle Repressoraktivität vermittelt, macht eine Funktion als transkriptioneller Repressor wahrscheinlich (Ciarbelli *et al.*, 2008). Interessanterweise ist *HAT3* vermutlich ein Zielgen von B-Typ ARR, denn die *HAT3* Expression ist in *35S:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen reduziert (Heyl *et al.*, 2008).

HAT3 wird nach 15 Minuten und nach zwei Stunden Cytokininbehandlung leicht induziert (Abbildung 46 im Anhang). Eine fünfmal stärkere Transkriptmenge nach zwei Stunden Cytokininbehandlung wie im *Microarray* (Brenner *et al.*, 2005) konnte nicht bestätigt werden. Die phänotypische Charakterisierung von *hat3_IS1* Pflanzen zeigte, dass ein Funktionsverlust von *HAT3* zu geringfügigen Veränderungen während des Keimlingsstadiums führte. Der Chlorophyllgehalt von *hat3_IS1* Keimlingen war verglichen zum WT signifikant reduziert (Abbildung 28). Außerdem wurde eine reduzierte cytokininabhängige Chlorophyllretention ermittelt (Anhang Abbildung 49). Für Pflanzen mit reduzierter Cytokininsignaltransduktion wurden bereits reduzierte Chlorophyllgehalte beschrieben (Mason *et al.*, 2005; Riefler *et al.*, 2006; Argyros *et al.*, 2008). Pflanzen mit erhöhtem endogenen Cytokininegehalt bilden mehr Chlorophyll (Li *et al.*, 1992). Mutanten von der B-Typ ARRs oder Mutanten mit unterdrückter Expression von B-Typ ARR Zielgenen haben eine reduzierte Cytokininsensitivität sowohl bei der cytokininabhängigen Chlorophyllretention als auch beim Wurzelwachstum (Mason *et al.*, 2005; Heyl *et al.*, 2008). Diese Indizien deuten darauf hin, dass *HAT3*

bei der Regulation des Chlorophyllgehaltes benötigt wird und dass die cytokininabhängige Chlorophyllretention zum Teil durch HAT3 vermittelt wird. Die reduzierte Lateralwurzelanzahl in *hat3_IS1* Keimlingen deutet auf eine positive regulatorische Funktion von HAT3 für die Lateralwurzelbildung hin, die Sensitivität gegenüber Cytokinin war interessanterweise jedoch reduziert. Die Lateralwurzelbildung wird unter anderem durch Auxin und Cytokinin gesteuert. Der inhibierende Einfluss von Cytokinin auf die Lateralwurzelbildung geht auf eine gestörte Verteilung von Auxin in den Perizykelzellen zurück, da der Auxingradient durch verminderte Expression von PIN Proteinen unter Cytokinineinfluss nicht ausreichend gebildet werden kann (Laplaze *et al.*, 2007). Es könnte sein, dass HAT3 in diesen Prozess eingreift, jedoch liefern die bisher vorliegenden Daten keine klaren Indizien dafür. Die Ergebnissen verschiedenster *Microarray*-Experimente zeigten, dass *HAT3* neben Cytokinin auch durch Auxin induziert wird (Zimmermann *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2007), was mit der Annahme einer Beteiligung an der Cytokinin-Auxin abhängigen Lateralwurzelbildung in Einklang steht.

5.2.3.3 MYB48 könnte an der Vermittlung verschiedener cytokininabhängiger Aspekte des Wurzelwachstums beteiligt sein

MYB48 ist einer von zwei in dieser Arbeit untersuchten MYB Transkriptionsfaktoren der R2R3 Unterfamilie aus *Arabidopsis*. Die MYB Transkriptionsfaktoren bilden eine der größten Transkriptionsfaktorfamilien in *Arabidopsis* mit annähernd 200 Mitgliedern, die ein bis drei Helix-Turn-Helix (HTH) Motive besitzen (siehe Einleitung). Der größte Teil (ca. 126 Faktoren) gehört zur Unterfamilie R2R3 mit zwei HTH Motiven, welche in dieser Konstellation (R2R3) pflanzenspezifisch sind (Stracke *et al.*, 2001). Die bisher charakterisierten einzelnen R2R3 MYB Faktoren sind an sehr vielen pflanzlichen Prozessen beteiligt, so zum Beispiel am Sekundärmetabolismus, der Zellmorphogenese, der Meristembildung, der Zellzykluskontrolle, der Abwehr- und Stressantwort, der Lichtsignalleitung und auch an der Signalleitung von allen bekannten Phytohormonen (Yanhui *et al.*, 2006). Über die Vermittlung von cytokininabhängigen Prozessen durch MYB Faktoren ist wenig bekannt. Ein Beispiel ist die Unterdrückung der Cytokininbiosynthese durch Aktivierung von *AtMYB2* in axillären Knospen zu Beginn der Seneszenz (Guo und Gan, 2005; Guo und Gan, 2006). Auf der anderen Seite fungiert *AtMYB2* als transkriptioneller Aktivator für die ABA Signalleitung und die Vermittlung der Trocken- oder Salzstressantwort (Urao *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 2003).

Es gibt bisher einen wichtigen Hinweis zur Funktion von MYB48 während des Wachstums adulter *Arabidopsis* Pflanzen. Beim Einsetzen des sekundären Dickenwachstums durch Reaktivierung des Prokambiums und der Bildung von Holz und Bast durch sekundäre Xylem- und Phloemgewebe wurde eine Beteiligung von MYB48 angenommen. Es wurde nämlich im sekundären Xylem neben einer erhöhten Expression von *AUX/IAA* Genen und Genen für HD-Zip Faktoren auch eine stark erhöhte Expression von *MYB48* gefunden (Oh *et al.*, 2003). Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass Cytokinin

eine essentielle Rolle beim sekundären Dickenwachstum spielt. Die Cytokininbiosynthesemutante *ipt1*, *ipt3*, *ipt5*, *ipt7* mit stark reduziertem Cytokiningehalt war nicht fähig Kambium zu bilden, sodass kein sekundäres Phloem oder Xylem gebildet wurde (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008). Eine cytokininabhängige Regulation der *MYB48* Expression während des sekundären Dickenwachstums wäre somit denkbar. Dieser Prozess wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Expression von *MYB48* war nach zwei Stunden Cytokininbehandlung von Keimlingen im *Microarray*-Experiment von Brenner *et al.* (2005) stark reduziert. Diese Reduktion konnte mit der hier durchgeführten qRT-PCR nicht bestätigt werden. Es wurde nur eine leichte Reduktion des Transkriptlevel auf 0,8 des Wertes der unbehandelten Probe detektiert (Abbildung 46, Anhang), welche jedoch nicht als signifikant bewertet wurde. Dennoch scheint *MYB48* einige wichtige Aspekte des Wurzelwachstums negativ zu beeinflussen, denn *myb48_IS1* Keimlinge hatten etwa 30% mehr Lateralwurzeln (Abbildung 27b) und eine geringfügig längere Primärwurzel (Abbildung 27a), deren cytokininabhängige Verkürzung zudem reduziert war (Abbildung 30c und Abbildung 30d). Diese phänotypischen Veränderungen weisen auf einen verminderten Cytokiningehalt oder eine reduzierte Cytokininsignalleitung hin und sind ein Anhaltspunkt dafür, dass *MYB48* möglicherweise die Cytokininwirkung während des Wurzellängenwachstums positiv vermittelt. Eine Reduktion der *ARR5* Transkriptmenge in *myb48_IS1* Keimlingen auf 30% der Kontrolle unterstreicht diese Annahme (Abbildung 29). Die Lateralwurzeln von *myb48_IS1* Keimlingen zeigten trotz einer erhöhten Anzahl keine veränderte Sensitivität gegenüber Cytokinin. Demnach könnte diese Veränderung auch cytokininunabhängig durch *MYB48* beeinflusst werden.

5.2.3.4 MYB60 reguliert cytokininvermittelte Prozesse durch einen positiven Einfluss auf den Chlorophyllgehalt und einen negativen Einfluss auf das Wurzelwachstum

Das zweite in dieser Arbeit untersuchte *MYB* Gen kodiert für MYB60. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die *MYB60* Expression durch abiotische Stresseinflüsse wie Trockenstress oder unter UV-Bestrahlung in WT Pflanzen verändert ist. Auch andere Phytohormone wie Auxin und die stressverwandten Hormone Salicylsäure, ABA oder Jasmonsäure können die Expressionsstärke von *MYB60* positiv oder negativ beeinflussen (Kranz *et al.*, 1998; Cominelli *et al.*, 2005; Yanhui *et al.*, 2006).

Im *Microarray*-Experiment von Brenner *et al.* (2005) war *MYB60* im WT nach 15 Minuten etwa zweifach durch Cytokinin induziert. Diese Induktion konnte in der erst zum Ende dieser Arbeit möglich gewordenen qRT-PCR Analyse nicht bestätigt werden (Abbildung 46, Anhang). Die in dieser Arbeit identifizierte T-DNA Insertionsmutante *myb60_IS3* hatte eine stark reduzierte Transkriptmenge von *MYB60*, ein Null-Allel wurde nicht identifiziert (Abbildung 26). Die reduzierte *MYB60* Expression führte jedoch zu mehreren signifikanten Unterschieden im Keimlingswachstum. Es wurde ein leicht verstärktes Längenwachstum der Primärwurzel und eine um 30% höhere Anzahl Lateralwurzeln in *myb60_IS3* Keimlingen gemessen (Abbildung 27). Zudem war der Chlorophyllgehalt der Keimlinge um 30% gegenüber WT Keimlingen reduziert (Abbildung 28). Da jedoch kaum Hinweise auf eine veränderte Sensitivität der untersuchten Parameter gegenüber Cytokinin gefunden wurden, sind die Veränderungen außer im Fall der Lateralwurzelbildung vermutlich überwiegend cytokininunabhängig.

Möglicherweise ist die reduzierte Expression von *ERF2* (*Ethylene Response Factor2*) (McGrath *et al.*, 2005) oder *SUR2* (*SUPERROOT*) (Barlier *et al.*, 2000; Bak *et al.*, 2001), welche in *myb60* Null-Mutanten nachgewiesen wurde (Cominelli *et al.*, 2005), die Ursache für das verstärkte Wurzelwachstum in *myb60_IS3* Keimlingen. Eine De-Regulation beider Gene führt zu einem veränderten Wurzelwachstum (Delarue *et al.*, 1998; McGrath *et al.*, 2005). In *myb60* Null-Mutanten war zudem das Gen für das Lhcb-Protein (light-harvesting-chlorophyll-binding-protein) geringer exprimiert als im WT (Cominelli *et al.*, 2005), was den reduzierten Chlorophyllgehalt von *myb60_IS3* erklären könnte. Es ist erstaunlich, dass in der hier vorliegenden Arbeit bereits die starke Reduktion der *MYB60* Expression in *myb60_IS3* Keimlingen die beschriebenen phänotypischen Veränderungen bewirkte, obwohl außer einer stärkeren Resistenz gegenüber Trockenstress von *myb60* Null-Allelen keine phänotypischen Veränderungen in anderen Arbeiten beschrieben wurden.

Eine Funktion von MYB60 wurde bisher nur bei zwei stressvermittelten Prozessen beschrieben. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass MYB60 als transkriptioneller Repressor einen spezifischen Schritt bei der Anthocyan synthese hemmt und dadurch mehr Flavone gebildet werden können, die Pflanzen vor Schäden durch UV-Strahlung schützen (Park *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite ist MYB60 bei der Antwort der Pflanze auf Trockenstress wichtig. MYB60 ist positiv an der Spaltöffnungsreaktion

der Schließzellen in Blättern beteiligt. Reporterexperimente und Transkriptanalysen zeigten ein sehr spezifisches Expressionsmuster von *MYB60* in Schließzellen der Stomata (Cominelli *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2007). Die *MYB60* Expression wird durch Trockenstress oder ABA Behandlung reprimiert, sodass in der Folge eine reduzierte Stomataöffnung erreicht wird. Dementsprechend waren *myb60* Null-Mutanten aufgrund verminderter Öffnung der Stomata resistenter gegen Trockenstress (Cominelli *et al.*, 2005). Eine Regulation von *MYB60* durch Cytokinin würde den Gehalt dieses transkriptionellen Regulators und dadurch die Antwort der Pflanze gegenüber Trockenstress beeinflussen. Es wurde kürzlich der Cytokiningehalt in Tabakpflanzen untersucht, die verschieden starkem Trockenstress ausgesetzt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter Trockenstress der Cytokiningehalt in Blättern stark abnimmt (Havlová *et al.*, 2008). Die Abnahme würde demzufolge zu reduzierter *MYB60* Expression in Blättern führen und damit zu stärker geschlossenen Stomata. Cytokinin könnte also über *MYB60* einen Austrocknungsschutz unter Trockenstress vermitteln.

5.2.4 Gesamtbeurteilung der funktionellen Analyse cytokininregulierter Gene für Transkriptionsfaktoren

Für eine abschließende Beurteilung sind die ermittelten phänotypischen Veränderungen der transgenen Pflanzen cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene in Tabelle 8 zusammengestellt. Die funktionelle Analyse weist in einigen Fällen auf eine direkte Beteiligung der untersuchten Gene an der Vermittlung cytokininregulierter Wachstums- und Entwicklungsprozesse in *Arabidopsis* hin.

Die Untersuchung von T-DNA Insertionsmutanten führte in allen Fällen zur Schlussfolgerung, dass diese Gene als positive oder negative Regulatoren an der Lateralwurzelbildung beteiligt sein könnten. Für die Insertionsmutanten der Gene *HAT3*, *HSA2* und *MYB60* wurde auch tatsächlich eine veränderte Sensitivität dieses Parameters gegenüber Cytokinin ermittelt. Das Lateralwurzelwachstum reagiert auf viele hormonelle Stimuli oder auch Veränderungen in der Konzentration von Zuckern, Phosphat, Nitrat oder anderen Einflüssen wie Temperatur und Wasserversorgung meist sensitiver als das Primärwurzelwachstum. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Lateralwurzelbildung durch sehr viele Transkriptionsfaktoren reguliert wird, was sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit widerspiegelt. Eine positive Vermittlung der Cytokininwirkung auf das Primärwurzelwachstums kann für *MYB48*, *HAT3* und *HAT22* angenommen werden.

Bei allen ermittelten Veränderungen des Chlorophyllgehaltes der T-DNA Insertionsmutanten handelte es sich jeweils um eine Reduktion, unabhängig davon, ob das untersuchte Gen positiv oder negativ durch Cytokinin reguliert wird. Anhand der *loss-of-function* Analyse kann nur für *HAT3* eine Beteiligung an der Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin angenommen werden. Anscheinend ist *HAT3* nicht nur für die Regulation einzelner Prozesse zuständig, sondern reguliert mehrere cytokininabhängige Wachstumsprozesse

Tabelle 8: Phänotypen von Mutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene

Gen	phänotypische Veränderungen transgener Pflanzen	Sensitivität gegenüber Cytokinin
<i>HAT22</i>	Überexpression	
	Chlorophyllgehalt reduziert	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz weniger sensitiv in einer Linie
	frühere natürliche Seneszenz	
	Primärwurzelwachstum verstärkt	Primärwurzelelongation weniger sensitiv
		Lateralwurzelbildung sensitiver in 1 Linie
	Induktion von <i>ARR5</i> verstärkt	
<i>HAT4</i>	Überexpression	
	langes Hypokotyl schmale, hyponastische Keimblätter späterer Blühzeitpunkt in einer Linie	
	Chlorophyllgehalt reduziert	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz weniger sensitiv
	Primärwurzelwachstum reduziert	
	Lateralwurzelbildung reduziert	
	<i>ARR5</i> Expression reduziert in einer Linie	<i>ARR5</i> Induktion schwächer in einer Linie
	Knockout	
	Chlorophyllgehalt reduziert	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz sensitiver
Primärwurzelwachstum verstärkt		
Lateralwurzelbildung verstärkt		
<i>GATA22</i>	Überexpression	
	reduzierte Schotenlänge höherer Spross Ergrünung der Primärwurzel am Übergang zum Hypokotyl	
	Chlorophyllgehalt reduziert in einer Linie	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz weniger sensitiv in einer Linie
	Primärwurzelwachstum reduziert	
	Lateralwurzelbildung reduziert	Lateralwurzelbildung weniger sensitiv
	<i>ARR5</i> Expression reduziert in einer Linie	
	Knockout	
	Chlorophyllgehalt reduziert	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz weniger sensitiv
Primärwurzelwachstum verstärkt		
Lateralwurzelbildung reduziert		
<i>bHLH64</i>	Überexpression	
	langes Hypokotyl (in Linien mit starker Überexpression) blassgrüne Färbung (in Linien mit starker Überexpression) gezackter Blattrand (in Linien mit starker Überexpression) männlich steril (in Linien mit starker Überexpression)	
	reduzierter Chlorophyllgehalt	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz erste Linie sensitiver / zweite Linie weniger sensitiv
	Primärwurzelwachstum erste Linie verstärkt / zweite Linie reduziert	
Lateralwurzelbildung reduziert	Lateralwurzelbildung erste Linie sensitiver / zweite Linie weniger sensitiv	

Fortsetzung Tabelle 8 : Phänotypen von Mutanten cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene

Gen	phänotypische Veränderungen transgener Pflanzen	Sensitivität gegenüber Cytokinin
<i>HAT3</i>	<i>Knockout</i>	
	Chlorophyllgehalt reduziert	Unterdrückung dunkelinduzierter Seneszenz weniger sensitiv
		Primärwurzelelongation weniger sensitiv
	Lateralwurzelbildung reduziert	Lateralwurzelbildung weniger sensitiv
<i>MYB48</i>	<i>Knockout</i>	
		Primärwurzelelongation weniger sensitiv
	Lateralwurzelbildung verstärkt <i>ARR5</i> Expression reduziert	Induktion von <i>ARR5</i> verstärkt
<i>MYB60</i>	<i>Knockdown</i>	
	Chlorophyllgehalt reduziert	
	Primärwurzelwachstum verstärkt	
	Lateralwurzelbildung verstärkt	Lateralwurzelbildung weniger sensitiv
		Induktion von <i>ARR5</i> verstärkt
<i>HSFA2</i>	<i>Knockout</i>	
	Lateralwurzelbildung verstärkt	Lateralwurzelbildung weniger sensitiv

Veränderungen von Parametern, die fettgedruckt sind, sind im Fall der Überexpressionslinien in beiden untersuchten unabhängigen Linien gefunden worden. Nicht fettgedruckte Veränderungen betrafen jeweils nur eine untersuchte Linie. Ergebnisse der Cytokinin sensitivitätstests sind dem jeweiligen untersuchten Parameter unter Standardbedingungen gegenübergestellt. Kein Eintrag bedeutet, dass es im jeweiligen Prozess unter Standardbedingungen oder nach Cytokininzugabe keine signifikante Veränderung der Linien gab.

Die Analyse der molekularen Antwort auf Cytokinin mittels Bestimmung der *ARR5* Expressionsstärke und Cytokinininduzierbarkeit zeigte, dass die untersuchten Faktoren nur in Einzelfällen und nicht besonders stark zur Veränderung dieser Antwort in der Pflanze beitragen. Sie unterstützten die Annahme, dass die untersuchten Transkriptionsfaktoren einzelne, sehr spezifische Prozesse regulieren und nicht die gesamte Cytokinin signalleitung beeinflussen. Veränderungen des Sprosswachstums der T-DNA Insertionsmutanten wurden nicht beobachtet, sodass man annehmen kann, dass die Mitglieder der zugehörigen großen Genfamilien für viele der biologischen Funktionen der untersuchten Gene möglicherweise redundant sind.

Alle Ergebnisse, die an den T-DNA Insertionsmutanten gewonnen wurden, sind jedoch abschließend als vorläufig zu bewerten. Eine Bestätigung der Ergebnisse durch eine zweite unabhängige Linie der jeweiligen Null-Mutanten und eine Komplementation der identifizierten Phänotypen durch das entsprechende WT Allel sind für eine endgültige Bewertung in der Zukunft noch durchzuführen.

Bei der *gain-of-function* Analyse besteht das Problem der funktionellen Redundanz einzelner Mitglieder von Genfamilien nicht. Es wurde erwartet durch diesen Ansatz deutlichere Hinweise auf die Funktion der untersuchten Gene zu erhalten bzw. die an den T-DNA Insertionsmutanten gewonnenen Hinweise zu bestätigen. Die Überexpression der vier Gene *GATA22*, *HAT4*, *HAT22* und *bHLH64* zeigte, dass die Phänotypen der transgenen Pflanzen beim Wurzelwachstum tatsächlich in einigen Fällen gegensätzlich zu dem der Insertionsmutanten ausprägt waren. Anhand der Ergebnisse

kann für *GATA22* eine mögliche Beteiligung an der Vermittlung der cytokininregulierten Lateralwurzelbildung und für *HAT22* eine mögliche Beteiligung an der Vermittlung des cytokininregulierten Primärwurzelwachstums angenommen werden. Jedoch konnte für *HAT22* keine Insertionsmutante isoliert werden, sodass Pflanzen mit reduzierter *HAT22* Expression mittels anderer Methoden (RNAi oder *antisense*) hergestellt und analysiert werden sollten. Die phänotypischen Veränderungen des Sprosswachstums gaben in Einzelfällen Anlass zur Annahme, dass cytokininregulierte Prozesse durch die Funktion der untersuchten Gene vermittelt werden. So sind ein veränderter Chlorophyllgehalt und eine veränderte cytokininabhängige Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz ein Indiz für die Beteiligung von *HAT4* an der Vermittlung dieser Prozesse. *HAT22* fördert anscheinend die natürliche Seneszenz, diese Funktion konnte jedoch, wie erläutert, bisher nicht an einer entsprechenden *loss-of-function* Mutante von *HAT22* überprüft werden und ist dementsprechend auch als vorläufiges Ergebnis zu bewerten. Dass die gefundenen Sprossphänotypen nicht in gegensätzlicher Weise bei den entsprechenden untersuchten T-DNA Insertionsmutanten beobachtet wurden, kann an der bereits erwähnten funktionellen Redundanz der Gene liegen. Es ist jedoch auch möglich und im Fall der Phänotypen der *35S:GATA22* (grüne Primärwurzel und kürzere Schoten) und *35S:bHLH64* (langes Hypokotyl, blassgrüne Blätter mit gezacktem Rand und längere Internodien) transgenen Linien wahrscheinlich, dass diese Phänotypen durch die starke ektopische Expression der Gene in einem zeitlich und örtlich anderen Kontext als im WT verursacht wurden und nicht unbedingt die biologische Funktion der Transkriptionsfaktoren widerspiegeln.

6. Zusammenfassung

Das Pflanzenhormon Cytokinin beeinflusst auf vielfältige Weise das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen. Cytokininoxidase/-dehydrogenase Enzyme (CKX) bauen Cytokinine irreversibel ab. Die *CKX* Gene von *Arabidopsis* werden differentiell in der Pflanze exprimiert und die CKX Enzyme kommen in verschiedenen subzellulären Kompartimenten vor. Verschiedene Substratspezifitäten der Enzyme und unterschiedliche phänotypischen Auswirkungen einer Überexpression der einzelnen *CKX* Gene in Pflanzen weisen darauf hin, dass die Cytokininpools verschiedener Kompartimente anscheinend unterschiedlich reguliert werden und möglicherweise einzelne Cytokinintypen spezifische Prozesse unterschiedlich beeinflussen.

In dieser Promotionsarbeit wurde *CKX7* funktionell charakterisiert. Durch die Expression von *CKX7* unter Kontrolle des starken, konstitutiv aktiven 35S Promotors in *Arabidopsis* und Tabak wurde gezeigt, dass *CKX7* ein funktionelles cytokininabbauendes Enzym ist. Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte, dass *CKX7* als einziges Mitglied der CKX Familie zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Überexpression von *CKX7* führte nur zu einer geringfügigen Veränderung des Sprosswachstums. Durch *CKX7* abgebaute Cytokininmetabolite oder der Ort ihres Abbaus haben demnach keine große Bedeutung für das Sprosswachstum. Die Expression von *CKX7* beschränkte sich auf das Leitgewebe im Keimlingsstadium sowie spezifische Domänen des weiblichen Gametophyten. Das Wurzelwachstum *CKX7* überexprimierender Keimlinge war im Gegensatz dazu stark reduziert. Die Primärwurzel war extrem kurz, unverzweigt und wies strukturelle Defekte im radiären Aufbau auf. Die Wurzelmeristemaktivität war stark reduziert. Das Leitgewebe war vollständig zu Protoxylem differenziert, sodass kein Metaxylem und kein Phloem gebildet wurden. Dieser Defekt ist von Mutanten mit starker Reduktion der Cytokinintransduktion in den vaskulären Initialen der embryonalen Wurzel bekannt, zum Beispiel von der *AHK4/CRE1* Mutante *wooden leg (wol)*. Die jeweils durch Ausschalten von *AHP6* und *AHK4/CRE1* bewirkte Komplementation des Wurzelphänotyps zeigte, dass in *CKX7* überexprimierenden Keimlingen die Cytokinintransduktion vermutlich stark reduziert ist. Das Auftreten eines *wol* ähnlichen Wurzelphänotyps ist möglicherweise die Folge einer den Signalweg negativ regulierenden Phosphatase-Aktivität von *AHK4/CRE1*. Da in anderen cytokinindefizienten Keimlingen, die *CKX1* oder *CKX2* überexprimieren, dieser *wol* ähnliche Wurzelphänotyp nicht auftritt, sind spezifische, durch *CKX7* abgebaute Cytokininmetabolite wahrscheinlich in den vaskulären Initialen besonders wichtig oder stellen die Mehrheit in diesen Zellen dar. Potenzielle, besonders wichtige Cytokininmetabolite sind *cZ*, *cZ9G* und *iP9G*, welche in *CKX7* überexprimierenden Keimlingen sehr stark reduziert waren. Zusammenfassend hat die funktionelle Analyse von *CKX7* neue Hinweise auf die Bedeutung der subzellulären Kompartimentierung von Cytokinin und auf die mögliche Bedeutung der Wirkung spezifischer Cytokininmetabolite während der Wurzelentwicklung geliefert.

Der zweite Schwerpunkt lag in dieser Arbeit auf der Identifizierung cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren und der Untersuchung einer möglichen Beteiligung dieser an der Vermittlung cytokininregulierter Wachstums- und Entwicklungsprozesse in der Pflanze. Dreizehn in einem *Microarray*-Experiment im Vorfeld identifizierte cytokininregulierte Gene für Transkriptionsfaktoren wurden untersucht und ihre Regulation durch Cytokinin mittels unabhängiger Methoden größtenteils bestätigt. In einer *loss-of-function* Analyse wurden für sieben der Gene T-DNA Insertionsmutanten isoliert. Vier durch Cytokinin positiv regulierte Gene wurden zusätzlich in einer *gain-of-function* Analyse untersucht, indem transgene Pflanzen, die diese Gene unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren, hergestellt und analysiert wurden. Die phänotypischen Veränderungen der T-DNA Insertionsmutanten waren von geringem Ausmaß und betrafen ausschließlich das Wurzelwachstum oder den Chlorophyllgehalt. Eine Beteiligung von HSFA2, MYB60 und HAT3 an der cytokininvermittelten Lateralwurzelbildung ist anzunehmen. MYB48 spielt vermutlich eine Rolle beim cytokininregulierten Primärwurzellängenwachstum. Von HAT3 ist zudem eine Beteiligung an der cytokininregulierten Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz wahrscheinlich. Die phänotypischen Veränderungen der Pflanzen, welche einzelne Transkriptionsfaktorgene überexprimieren, betrafen sowohl das Wurzel- als auch das Sprosswachstum. GATA22 spielt eine Rolle während der Wurzelentwicklung, die im Falle der Lateralwurzelbildung zudem cytokininabhängig ist. Die Bildung von Chlorophyll in der Primärwurzel als Folge der ektopischen Expression von GATA22 weist darauf hin, dass GATA22 eine Rolle bei der Chloroplastenentwicklung spielt. Weiterhin wurde eine Hypothese aufgestellt, nach der Cytokinin die Schattenvermeidungsreaktion durch eine Regulation von HAT4 beeinflusst. HAT22 reguliert das Primärwurzelwachstum positiv, den Chlorophyllgehalt negativ und fördert die natürliche Seneszenz. Veränderungen der Cytokininsensitivität der einzelnen untersuchten Prozesse deuten darauf hin, dass HAT22 die Cytokininwirkung vermutlich sowohl im Licht und im Dunkeln als auch im Spross und in der Wurzel gegensätzlich vermittelt. bHLH64 wurde als negativer Regulator der Lateralwurzelbildung und des Chlorophyllgehaltes identifiziert. Eine cytokininabhängige Veränderung dieser Prozesse in *bHLH64* überexprimierenden Pflanzen konnte jedoch nicht eindeutig ermittelt werden. Der pleiotrope Phänotyp der stark exprimierenden Linie *35S:bHLH64-88* gab Anlass zur Vermutung, dass in dieser Linie durch die ektopische Expression von *bHLH64* auch Veränderungen des Licht- und des Gibberellinsignalweges verursacht wurden.

Für eine abschließende Beurteilung der funktionellen Relevanz der untersuchten cytokininregulierten Gene für Transkriptionsfaktoren sind weitere Experimente notwendig.

7. Summary

The plant hormone cytokinin influences many different aspects of plant growth and development. Cytokinin oxidase/dehydrogenase enzymes are cytokinin degrading enzymes. *CKX* genes in *Arabidopsis* are differentially regulated and the enzymes are localized to different subcellular compartments. The differences of the substrate specificities of individual *CKX* enzymes and of the phenotypic consequences of an overexpression of the individual *CKX* genes indicated that cytokinin pools in different compartments are differentially regulated and that different cytokinin metabolites possibly influence specific developmental processes in the plant.

In this work, the *CKX7* gene was functionally characterized. By expressing *CKX7* under the control of the strong, constitutively active 35S promoter in *Arabidopsis* and tobacco it was shown that *CKX7* is a functional cytokinin degrading enzyme. Analysis of the subcellular localisation revealed that *CKX7* is the only enzyme of the family located in the cytosol. Plants overexpressing *CKX7* did not show dramatic phenotypic changes in shoot growth indicating that cytokinin metabolites which are degraded by *CKX7* and the place of their degradation are less important for the shoot growth. Supporting this assumption, *CKX7* expression was detected only in the vasculature of young seedlings and in specific domains of the female gametophyte.

Surprisingly, the root growth of *CKX7* overexpressing seedlings was strongly reduced. The primary root was extremely short, unbranched and displayed structural defects in the radial pattern. The root meristem activity was strongly reduced. The vascular tissues were completely differentiated to protoxylem. No metaxylem and phloem were formed. These defects in vascular tissue development were previously described in mutants with severe reduction in cytokinin signalling in the vascular initials of the embryonic root; e.g. the *AHK4/CRE1* mutant *wooden leg (wol)*. Loss of *AHK4/CRE1* or *AHP6* function led to partial complementation of the severe root phenotype of *CKX7* overexpressing seedlings. This indicated that cytokinin signalling was strongly reduced in the vascular initials of *CKX7* overexpressing seedlings possibly due to a strong phosphatase activity of *AHK4/CRE1* which negatively regulates cytokinin signaling in those cells. Other *CKX* overexpressing seedlings do not display a *wol*-like root phenotype. Therefore it was hypothesised that specific cytokinin metabolites degraded by *CKX7* are important during the development of the vascular tissues from the initials and that these metabolites are eventually predominant in those cells. Based on their strong and specific reduction in *CKX7* overexpressing seedlings *cZ*, *cZ9G* and *iP9G* were identified as putative important cytokinin metabolites. In summary, the functional characterization of *CKX7* gave new indications to a relevance of the subcellular localisation of cytokinins and a possible relevance for the function of specific cytokinin metabolites in root development.

The main focus of the second part of this work was the identification of cytokinin regulated transcription factor genes and their functional analysis concerning an involvement of these factors in cytokinin regulated growth and developmental processes. Thirteen cytokinin regulated genes identified

by an initial microarray experiment were chosen for the analysis and their regulation by cytokinin was confirmed by independent methods in most cases. In a *loss-of-function* approach, knockout mutants for seven of these genes were isolated. Four genes, positively regulated by cytokinin were also analyzed in a *gain-of-function* approach by expressing them under the control of the strong constitutively active 35S promoter and by phenotypic characterization of the resulting transgenic plants.

The obtained phenotypic changes in the T-DNA insertion mutants were relatively weak and the most prominent changes were detected for the root growth and for the chlorophyll content. For HSFA2, MYB60 and HAT3 a role in mediating cytokinin effects on lateral root development can be assumed. Furthermore MYB48 seems to influence cytokinin-mediated primary root growth. Additionally, it was demonstrated that HAT3 might be important for the regulation of the chlorophyll content and the cytokinin-mediated suppression of dark-induced leaf senescence.

The phenotypic alterations of plants overexpressing single transcription factor genes included changes in the root development as well as the shoot growth. GATA22 might play a negative role during root development, and this regulatory function is cytokinin-dependent at least in lateral root formation. The formation of chlorophyll in the primary root as a consequence of the ectopic *GATA22* expression points to a role of GATA22 in chloroplast development. Furthermore a hypothesis was proposed, in which cytokinin influences the shade avoidance response via regulation of *HAT4*. It was shown that HAT22 positively regulates the primary root growth, negatively regulates the chlorophyll content and accelerates the natural senescence of leaves. *HAT22* overexpressing plants displayed changes in cytokinin sensitivity in the analyzed processes, and it was proposed that HAT22 differentially mediates cytokinin responses in light and dark as well as in the shoot and root. For *bHLH64* a role during lateral root development and for the regulation of the chlorophyll content was proposed. Because no *bhlh64 loss-of-function* mutant is currently available and both overexpressing lines showed partial opposite reactions towards cytokinin, the involvement of *bHLH64* during cytokinin-mediated growth and developmental processes remains unclear. However the pleiotropic phenotype of plants with a strong ectopic *bHLH64* expression indicated that light and gibberellin signalling pathways are also affected in these plants.

For a final conclusion about the functional relevance of the analyzed transcription factor genes for the mediation of cytokinin effects additional experiments are necessary.

8. Literatur

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**, 63-78.
- Akiyoshi, D.E., Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W. und Gordon, M.P.** (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 5994-5998.
- Akiyoshi, D.E., Regier, D.A., Jen, G. und Gordon, M.P.** (1985) Cloning and nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. *Nucleic Acids Research*, **13**, 2773-2788.
- Allen, M., François, W. und Moffatt, M.** (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum*, **115**, 56-68.
- Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M. und Suzuki, M.** (1998) A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, **17**, 5484-5496.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Lisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. und Ecker, J.R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- An, Y.-Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S. und Meagher, R.B.** (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant Journal*, **10**, 107-121.
- Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.-H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J. und Schaller, G.E.** (2008) Type B Response Regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell*, **20**, 2102-2116.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A. und Chan, R.L.** (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, **12**, 419-426.
- Armstrong, D.J., Burrows, W.J., Skoog, F., Roy, K.L. und Söll, D.** (1969) Cytokinins: Distribution in transfer RNA species of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **63**, 834-841.
- Armstrong, D.J.** (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In *Cytokinins: Chemistry, activity, and function* (Mok, D.W.S. und Mok, M.C., eds). Boca Raton: CRC, pp. 139-154.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. und Matsuoka, M.** (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309**, 741-745.

- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.-H. und Sandberg, G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 14778-14783.
- Bae, E., Bingman, C.A., Bitto, E., Aceti, D.J. und Phillips Jr., G.N. (2008) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **70**, 303-306.
- Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M. und Weisshaar, B. (2003) Update on the Basic Helix-Loop-Helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **15**, 2497-2502.
- Bak, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A., Galbraith, D.W. und Feyereisen, R. (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 101-111.
- Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A., Ljung, K., Bhalerao, R., Bennett, M., Sandberg, G. und Bellini, C. (2000) The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 14819-14824.
- Barry, G.F., Rogers, S.G., Fraley, R.T. und Brand, L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 4776-4780.
- Bartrina, I. (2006) Molekulare Charakterisierung von *ckx* Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokinindefizienzsyndroms in *Arabidopsis thaliana* (Dissertation). *Institut für Biologie - Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin.
- Baskin, T.I., Cork, A., Williamson, R.E. und Gorst, J.R. (1995) *STUNTED PLANT 1*, a gene required for expansion in rapidly elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. *Plant Physiology*, **107**, 233-243.
- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. und Harrison, B.D. (1986) Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature*, **321**, 446-449.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **316**, 1194-1199.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T. und Aeschbacher, R.A. (1993) Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, **119**, 57-70.
- Benková, E., Witters, E., Van, D.W., Kolar, J., Motyka, V., Brzobohaty, B., Van, O.H.A. und Macháková, I. (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology*, **121**, 245-251.
- Berleth, T. und Jürgens, G. (1993) The role of the *MONOPTEROS* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*, **118**, 575-587.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **62**, 293-300.

- Bi, Y.-M., Zhang, Y., Signorelli, T., Zhao, R., Zhu, T. und Rothstein, S.** (2005) Genetic analysis of *Arabidopsis* GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. *Plant Journal*, **44**, 680-692.
- Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey, J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D. und Morris, R.O.** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*, **125**, 378-386.
- Bilyeu, K.D., Laskey, J.G. und Morris, R.O.** (2003) Dynamics of expression and distribution of cytokinin oxidase/dehydrogenase in developing maize kernels. *Plant Growth Regulation*, **39**, 195-203.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. und Benfey, P.N.** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*, **302**, 1956-1960.
- Blackwell, J.R. und Horgan, R.** (1993) Cloned *Agrobacterium tumefaciens ipt1* gene product, DMAPP: AMP isopentenyl transferase. *Phytochemistry*, **34**, 1477-1481.
- Boonman, A., Anten, N.P.R., Dueck, T.A., Jordi, Wilco J.R.M., van der Werf, A., Voesenek, L.A.C.J. und Pons, Thijs L.** (2006) Functional significance of shade-induced leaf senescence in dense canopies: an experimental test using transgenic tobacco. *The American Naturalist*, **168**, 597-607.
- Boonman, A. und Pons, T.L.** (2007) Canopy light gradient perception by cytokinin. *Plant Signaling & Behavior*, **2**, 489 - 491
- Boonman, A., Prinsen, E., Gilmer, F., Schurr, U., Peeters, A.J.M., Voesenek, L.A.C.J. und Pons, T.L.** (2007) Cytokinin import rate as a signal for photosynthetic acclimation to canopy light gradients. *Plant Physiology*, **143**, 1841-1852.
- Boonman, A., Prinsen, E., Voesenek, L.A.C.J. und Pons, T.L.** (2009) Redundant roles of photoreceptors and cytokinins in regulating photosynthetic acclimation to canopy density. *Journal of Experimental Botany*, ern364.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brandstatter, I. und Kieber, J.J.** (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1009-1020.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L. und Schmölling, 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 Journal*, **44**, 314-333.
- Brownlee, B.G., Hall, R.H. und Whitty, C.D.** (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl) adenine. *Canadian Journal of Biochemistry*, **53**, 37-41.
- Brugière, N., Jiao, S., Hantke, S., Zinselmeier, C., Roessler, J.A., Niu, X., Jones, R.J. und 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 Physiology*, **132**, 1228-1240.

- Brugière, N., Humbert, S., Rizzo, N., Bohn, J. und Habben, J.E.** (2008) A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (*ZmIPT2*), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. *Plant Molecular Biology*, **67**, 215-229.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. und Palme, K.** (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, **262**, 1051-1054.
- Buck, M. und Atchley, W.** (2003) Phylogenetic analysis of plant basic Helix-Loop-Helix proteins. *Journal of Molecular Evolution*, **56**, 742-750.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C. und Frommer, W.B.** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **34**, 13-26.
- Carabelli, M., Sessa, G., Baima, S., Morelli, G. und Ruberti, I.** (1993) The *Arabidopsis Athb-2* and *-4* genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant Journal*, **4**, 469-479.
- Carabelli, M., Morelli, G., Whitelam, G. und Ruberti, I.** (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the *Athb-2* homeobox gene in green plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 3530-3535.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Cioffi, A., Sassi, M., Morelli, G. und Ruberti, I.** (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes and Development*, **21**, 1863-1868.
- Catterou, M., Dubois, F., Smets, R., Vaniet, S., Kichey, T., Van Onckelen, H., Sangwan-Norreel, B.S. und Sangwan, R.S.** (2002) *hoc*: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high in vitro organogenic capacity. *Plant Journal*, **30**, 273-287.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B. und Frommer, W.B.** (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology*, pp.108.128454.
- Charng, Y., Liu, H., Liu, N., Chi, W., Wang, C., Chang, S. und Wang, T.** (2007) A heat-inducible transcription factor, *hsfA2*, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **143**, 251-262.
- Chatfield, J.M. und Armstrong, D.J.** (1986) Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern. *Plant Physiology*, **80**, 493-499.
- Chatfield, J.M. und Armstrong, D.J.** (1987) Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus tissues : Enhanced in vitro activity of the enzyme in the presence of copper-imidazole complexes. *Plant Physiology*, **84**, 726-731.
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S. und Dennis, E.S.** (1993) *amp1* - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant Journal*, **4**, 907-916.
- Che, P., Gingerich, D.J., Lall, S. und Howell, S.H.** (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 2771-2785.
- Chen, C.-M. und Eckert, R.L.** (1977) Phosphorylation of cytokinin by adenosine kinase from wheat germ. *Plant Physiology*, **59**, 443-447.

- Chen, C.-M. und Petschow, B.** (1978) Metabolism of cytokinin: Ribosylation of cytokinin bases by adenosine phosphorylase from wheat germ. *Plant Physiology*, **62**, 871-874.
- Chiappetta, A. und Innocenti, A.M.** (2006) Immunocytochemical localization of cytokinin in *Azolla filiculoides*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **140**, 229 - 233.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T. und Brenner, M.** (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, **104**, 339-347.
- Ciarbelli, A., Ciolfi, A., Salvucci, S., Ruzza, V., Possenti, M., Carabelli, M., Fruscalzo, A., Sessa, G., Morelli, G. und Ruberti, I.** (2008) The *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper II gene family: diversity and redundancy. *Plant Molecular Biology*, **68**, 465-478.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. und Doerner, P.** (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal*, **20**, 503-508.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L. und Tonelli, C.** (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology*, **15**, 1196-1200.
- D'Agostino, I.B., Deruere, J. und Kieber, J.J.** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, **124**, 1706-1717.
- Davière, J.-M., de Lucas, M. und Prat, S.** (2008) Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current Opinion in Genetics & Development*, **18**, 295-303.
- Davis, S.J. und Vierstra, R.D.** (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology*, **36**, 521-528.
- de Lucas, M., Daviere, J.-M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E. und Prat, S.** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**, 480-484.
- Delarue, M., Prinsen, E., Van Onckelen, H., Caboche, M. und Bellini, C.** (1998) *sur2* mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant Journal*, **14**, 603-611.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P. und Sabatini, S.** (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, **17**, 678-682.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P. und Sabatini, S.** (2008) a genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, **322**, 1380-1384.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. und Kay, S.A.** (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **133**, 1617-1629.

- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, D. und Van Onckelen, H.** (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology*, **119**, 111-122.
- Dewitte, W. und Van Onckelen, H.** (2001) Probing the distribution of plant hormones by immunocytochemistry. *Plant Growth Regulation*, **33**, 67-74.
- Di Laurenzio, L., Wysocka, D.J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Fledmann, K.A. und Benfey, P.N.** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, **86**, 423-433.
- Dietrich, J.T., Kaminek, M., Blevins, D.G., Reinbott, T.M. und Morris, R.O.** (1995) Changes in cytokinins and cytokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**, 327-336.
- Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T. und Heyl, A.** (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, **273**, 4631-4644.
- Duek, P.D. und Fankhauser, C.** (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends in Plant Science*, **10**, 51-54.
- Eklöf, S., Åstot, C., Moritz, T., Blackwell, J., Olsson, O. und Sandberg, G.** (1996) Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin over-production. *Physiologia Plantarum*, **98**, 333-344.
- Eklöf, S., Astot, C., Blackwell, J., Moritz, T., Olsson, O. und Sandberg, G.** (1997) Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 225-235.
- Faiss, M., Zalubilová, J., Strnad, M. und Schmülling, T.** (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant Journal*, **12**, 401-415.
- Falk, A. und Rask, L.** (1995) Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, **108**, 1369-1377.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L.-M. und Deng, X.W.** (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, **451**, 475-479.
- Fleet, C.M. und Sun, T.-p.** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 77-85.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J. und Whitelam, G.C.** (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **131**, 1340-1346.
- Frébort, I., Šebela, M., Galuszka, P., Werner, T., Schmülling, T. und Pec, P.** (2002) Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: Optimized procedures and applications. *Analytical Biochemistry*, **306**, 1-7.

- Frébortová, J., Fraaije, M.W., Galuszka, P., Šebela, M., Pec, P., Hrbáč, J., Novák, O., Bilyeu, K.D., English, J.T. und Frébort, I.** (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal*, **380**, 121-130.
- Frébortová, J., Galuszka, P., Werner, T., Schmölling, T. und Frébort, I.** (2007) Functional expression and purification of cytokinin dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologia Plantarum*, **51**, 673-682.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M. und Chory, J.** (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics*, **162**, 1445-1456.
- Fusseder, A. und Ziegler, P.** (1988) Metabolism and compartmentation of dihydrozeatin exogenously supplied to photoautotrophic suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta*, **173**, 104-109.
- Galichet, A., Hoyerova, K., Kaminek, M. und Gruissem, W.** (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **146**, 1155-1164.
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., Sauer, P., Jacobsen, S. und Pec, P.** (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 450-461.
- Galuszka, P., Frébortová, J., Werner, T., Yamada, M., Strnad, M., Schmölling, T. und Frébort, I.** (2004) *Cytokinin oxidase/dehydrogenase* genes in barley and wheat: cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 3990-4002.
- Galuszka, P., Frébortová, J., Luhová, L., Bilyeu, K.D., English, J.T. und Frébort, I.** (2005) Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant and Cell Physiology*, **46**, 716-728.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmölling, T. und Frébort, I.** (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 255-267.
- Gan, S. und Amasino, R.M.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gan, S.S. und Amasino, R.M.** (1996) Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play. *Bioessays*, **18**, 557-565.
- Garcia-Ponce de Leon, B.G., Zorrilla, J.M., Rubio, V., Dahiya, P., Paz-Ares, J. und Leyva, A.** (2004) Interallelic complementation at the *Arabidopsis CRE1* locus uncovers independent pathways for the proliferation of vascular initials and canonical cytokinin signalling. *Plant Journal*, **38**, 70-79.
- Gatz, C., Froberg, C. und Wendenburg, R.** (1992) Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant Journal*, **2**, 397-404.
- Gillissen, B., Bürkle, L., Andre, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B. und Frommer, W.B.** (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 291-300.

- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. und Yoshida, S.** (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **134**, 1555-1573.
- Golovko, A., Sitbon, F., Tillberg, E. und Nicander, B.** (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **49**, 161-169.
- Göran, S.** (1982) Cytokinins as inhibitors of root growth. *Physiologia Plantarum*, **56**, 500-506.
- Greenboim-Wainberg, Y., Maymon, I., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N., Eshed, Y. und 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.
- Guo, Y. und Gan, S.** (2005) *The transcription factor AtMYB2 regulates whole plant senescence through cytokinin anabolic pathway*. 16TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH, Berlin. Germany.
- Guo, Y. und Gan, S.-S.** (2006) *AtMYB2 inhibits branching by controlling cytokinin production in Arabidopsis: a post-apical dominance mechanism*. Plant Biology (Conference), Boston, Massachusetts, USA.
- Haberlandt, G.** (1913) Zur Physiologie der Zellteilung. *Sitzungsberichte der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften*, Berlin, 318-345.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hare, P.D. und van Staden, J.** (1994) Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, **91**, 128-136.
- Haseloff, J. und Hodge, S.** (2001) Targeted gene expression in plants using GAL4. <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/laboratory/patents/GAL4patent2001.pdf>, United States of America: BTG International Limited, London (GB).
- Havlová, M., Dobrev, P.I., Motyka, V., Torchová, H., Libus, J., Dobrá, J., Malbeck, J., Gaudinová, A. und Vanková, R.** (2008) The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing *trans*-zeatin *O*-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters. *Plant, Cell and Environment*, **31**, 341-353.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J., Verboom, R.E. und Millar, A.H.** (2005) Combining experimental and predicted datasets for determination of the subcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **139**, 598-609.
- Heazlewood, J.L., Verboom, R.E., Tonti-Filippini, J., Small, I. und Millar, A.H.** (2007) SUBA: the *Arabidopsis* subcellular database. *Nucleic Acids Research*, **35**, D213-218.
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. und Rohdich, F.** (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 14837-14842.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. und Bailey, P.C.** (2003) The Basic Helix-Loop-Helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 735-747.

- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.-T. und Benfey, P.N.** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, **101**, 555-567.
- Heyl, A. und Schmülling, T.** (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 480-488.
- Heyl, A., Werner, T. und Schmülling, T.** (2006) Metabolism and signal transduction of cytokinin. In *Plant hormone signalling, Annual Plant Reviews* (Hedden, P. und Thomas, S., eds). Oxford: Blackwell Publishing Ltd., pp. 93-123.
- Heyl, A., Ramireddy, E., Brenner, W.G., Riefler, M., Allemeersch, J. und Schmülling, T.** (2008) The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **147**, 1380-1395.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R. und Kakimoto, T.** (2004) *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8821-8826.
- Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M. und Matsuoka, M.** (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends in Plant Science*, **13**, 192-199.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology*, **138**, 196-206.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. und Sakakibara, H.** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 75-83.
- Hoth, S., Ikeda, Y., Morgante, M., Wang, X., Zuo, J., Hanafey, M.K., Gaasterland, T., Tingey, S.V. und Chua, N.H.** (2003) Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **554**, 373-380.
- Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S. und Bowles, D.J.** (2004) *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 47822-47832.
- Houba-Hérin, N., Pethe, C., d'Alayer, J. und Laloue, M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant Journal*, **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. und 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 Research*, **29**, 102-105.
- Huang, S., Raman, A.S., Ream, J.E., Fujiwara, H., Cerny, R.E. und Brown, S.M.** (1998) Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **118**, 773-781.

- Huang, S., Cerny, R.E., Qi, Y., Bhat, D., Aydt, C.M., Hanson, D.D., Malloy, K.P. und Ness, L.A.** (2003) Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology*, **131**, 1270-1282.
- Hutchison, C.E. und Kieber, J.J.** (2002) Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S47-59.
- Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Kieber, J.J.** (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, **18**, 3073-3087.
- Hwang, I. und Sheen, J.** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C. und Mizuno, T.** (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2691-2696.
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T. und Mizuno, T.** (1999) Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 733-742.
- Imamura, A., Yoshino, Y. und Mizuno, T.** (2001) Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**, 2113-2117.
- Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T. und Mizuno, T.** (2003) *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 Response Regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 122-131.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. und Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, **409**, 1060-1063.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A. und Mizuno, T.** (2008) Three type-B Response Regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 47-57.
- Jacqmard, A., Detry, N., Dewitte, W., Van Onckelen, H. und Bernier, G.** (2002) In situ localisation of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition. *Planta*, **214**, 970-973.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. und Tsiantis, M.** (2005) KNOX Action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, **15**, 1560-1565.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. und Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, **6**, 3901-3907.
- Jones, R.J., Schreiber, B.M.N., McNeil, K., Brenner, M. und Foxon, G.** (1992) Cytokinin levels and oxidase activity during maize kernel development. In *Physiology and biochemistry of cytokinins in*

plants (Kaminek, M., Mok, D.W.S. und Zazimalova, E., eds): The Hague: SPB Academic Publishing, pp. 235–239.

Jones, R.J. und Schreiber, B.M.N. (1997) Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regulation*, **23**, 123-134.

Kakimoto, T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 677-685.

Kakimoto, T. (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 605-627.

Kamínek, M. und Armstrong, D.J. (1990) Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. *Plant Physiology*, **93**, 1530-1538.

Kamínek, M., Motyka, V. und Vankova, R. (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia Plantarum*, **101**, 689-700.

Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. und Sakakibara, H. (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14049-14054.

Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C. und Quail, P.H. (2004) A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific Basic Helix-Loop-Helix transcription factors. *Plant Cell*, **16**, 3033-3044.

Kiba, T., Taniguchi, M., Imamura, A., Ueguchi, C., Mizuno, T. und Sugiyama, T. (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 767-771.

Kiba, T., Yamada, H. und Mizuno, T. (2002) Characterization of the ARR15 and ARR16 Response Regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 Histidine Kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **43**, 1059-1066.

Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H. und Mizuno, T. (2004) *Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1063-1077.

Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H. und Mizuno, T. (2005) Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His->Asp phosphorelay circuitry. *Plant and Cell Physiology*, **46**, 339-355.

Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G. und Hwang, I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 814-819.

King, K.E., Moritz, T. und Harberd, N.P. (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of *GAI* and *RGA*. *Genetics*, **159**, 767-776.

Köllmer, I. (2004) Regulation der *AtCKX* Genexpression und Charakterisierung cytokinindefizienter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Diplomarbeit). *Institut für Biologie - Angewandte Genetik*, Berlin: Freie Universität Berlin.

- Koncz, C. und Schell, J.** (1986) The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics*, **204**, 383-396.
- Kopecný, D., Pethe, C., Sebela, M., Houba-Herín, N., Madzak, C., Majira, A. und 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. und 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.
- Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., Bicker, F. und von Koskull-Döring, P.** (2004) Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant Journal*, **39**, 98-112.
- Krall, L., Raschke, M., Zenk, M.H. und Baron, C.** (2002) The tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters*, **527**, 315-318.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. und Weisshaar, B.** (1998) Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 263-276.
- Kraus, J.E., de Sousa, H.C., Rezende, M.H., Castro, N.M., Vecchi, C. und Luque, R.** (1998) Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. *Biotechnic and Histochemistry*, **73**, 235 - 243.
- Kuderova, A., Urbankova, I., Valkova, M., Malbeck, J., Brzobohaty, B., Nemethova, D. und Hejatko, J.** (2008) Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 570-582.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. und Kyojuka, J.** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652-655.
- Kuroha, T., Ueguchi, C., Sakakibara, H. und Satoh, S.** (2006) Cytokinin receptors are required for normal development of auxin-transporting vascular tissues in the hypocotyl but not in adventitious roots. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 234-243.
- Kwade, Z., Swiaatek, A., Azmi, A., Goossens, A., Inze, D., Van Onckelen, H. und Roef, L.** (2005) Identification of four adenosinekinase isoforms in tobacco BY-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 17512-17519.
- 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., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T. und Bennett, M.** (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, **19**, 3889-3900.

- Laskey, J.G., Patterson, P., Bilyeu, K. und Morris, R.O.** (2003) Rate enhancement of cytokinin oxidase/dehydrogenase using 2,6-dichloroindophenol as an electron acceptor. *Plant Growth Regulation*, **40**, 189-196.
- Lee, D. und Moffatt, B.** (1993) Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **87**, 483-492.
- Lee, S., Lee, S., Yang, K.-Y., Kim, Y.-M., Park, S.-Y., Kim, S.Y. und Soh, M.-S.** (2006) Overexpression of *PRE1* and its homologous genes activates gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 591-600.
- Letham, D.S.** (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences*, **2**, 569-573.
- Letham, D.S.** (1994) Cytokinins as phytohormones. Sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In *Cytokinins: Chemistry, activity, and function* (Mok, D.W.S. und Mok, M.C., eds). Boca Raton: CRC, pp. 57-80.
- Li, G., Liu, K., Baldwin, S.A. und Wang, D.** (2003) Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 35732-35742.
- Li, X., Mo, X., Shou, H. und Wu, P.** (2006) Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 1112-1123.
- Li, Y., Hagen, G. und Guilfoyle, T.J.** (1992) Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Developmental Biology*, **153**, 386-395.
- Libreros-Minotta, C.A. und Tipton, P.A.** (1995) A colorimetric assay for cytokinin oxidase. *Analytical Biochemistry*, **231**, 339-341.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 47-65.
- Lim, P.O., Kim, H.J. und Gil Nam, H.** (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 115-136.
- Lincoln, C., Britton, J.H. und Estelle, M.** (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**, 1071-1080.
- Liu, L., White, M.J. und MacRae, T.H.** (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, **262**, 247-257.
- Lohrmann, J., Buchholz, G., Keitel, C., Sweere, C., Kircher, S., I., B., Kudla, J. und Harter, K.** (1999) Differentially-expressed and nuclear-localized response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana* with transcription factor properties. *Plant Biology*, **1**, 495-506.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baeurle, I., Keitel, C., Kozma, B.L., Brennicke, A., Schaefer, E., Kudla, J. und Harter, K.** (2001) The response regulator ARR2: A pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, **265**, 2-13.

- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C. und Fankhauser, C.** (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant Journal*, **53**, 312-323.
- Ma, Q.-H., Wang, X.-M. und Wang, Z.-M.** (2008) Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development. *Journal of Plant Growth Regulation*, **27**, 68-76.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N. und Helariutta, Y.** (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development*, **14**, 2938-2943.
- Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. und Helariutta, Y.** (2006a) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, **311**, 94-98.
- Mähönen, A.P., Higuchi, M., Tormakangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y. und Kakimoto, T.** (2006b) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current Biology*, **16**, 1116-1122.
- Malito, E., Coda, A., Bilyeu, K.D., Fraaije, M.W. und Mattevi, A.** (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology*, **341**, 1237-1249.
- Manfield, I.W., Devlin, P.F., Jen, C.-H., Westhead, D.R. und Gilmartin, P.M.** (2007) Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the *Arabidopsis* GATA gene family. *Plant Physiology*, **143**, 941-958.
- Mara, C.D. und Irish, V.F.** (2008) Two GATA transcription factors are downstream effectors of floral homeotic gene action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **147**, 707-718.
- Martin, R.C., Mok, M.C. und Mok, D.W.** (1999) Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 284-289.
- Martin, R.C., Mok, D.W., Smets, R., Van Onckelen, H. und Mok, M.C.** (2001a) Development of transgenic tobacco harboring a zeatin *O*-glucosyltransferase gene from *Phaseolus*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant*, **37**, 354-360.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E. und Mok, D.W.** (2001b) A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 5922-5926.
- Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J. und Schaller, G.E.** (2004) Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **135**, 927-937.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Schaller, G.E.** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 3007-3018.
- Massonneau, A., Houba-Hérin, N., Pethe, C., Madzak, C., Falque, M., Mercy, M., Kopecny, D., Majira, A., Rogowsky, P. und Laloue, M.** (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2549-2557.

- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K. und Kakimoto, T.** (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 20027-20031.
- McGaw, B.A. und Horgan, R.** (1983) Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. *Phytochemistry*, **22**, 1103-1105.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.-R., Udvardi, M.K. und Kazan, K.** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, **139**, 949-959.
- Meissner, R. und Michael, A.J.** (1997) Isolation and characterisation of a diverse family of *Arabidopsis* two and three-fingered C₂H₂ zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Molecular Biology*, **33**, 615-624.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., von Saltza, M.H. und Strong, F.M.** (1955a) Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 2662-2663.
- Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, M.H. und Strong, F.M.** (1955b) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 1392-1392.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., von Saltza, M.H. und Strong, F.M.** (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. **78**, 1375-1380.
- Miller, C.O.** (1961) A kinetin-like compound in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **47**, 170-174.
- Miyata, S.-i., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K.** (1998) Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **437**, 11-14.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. und Kakimoto, T.** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, **37**, 128-138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. und Kakimoto, T.** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 16598-16603.
- Moffatt, B. und Somerville, C.** (1988) Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyl transferase-activity. *Plant Physiology*, **86**, 1150-1154.
- Moffatt, B., Pethe, C. und Laloue, M.** (1991) Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiology*, **95**, 900-908.
- Moffatt, B.A., Wang, L., Allen, M.S., Stevens, Y.Y., Qin, W., Snider, J. und von Schwartzenberg, K.** (2000) Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology*, **124**, 1775-1785.
- Mok, D.W. und Mok, M.C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 89-118.

- Mok, M.C.** (1994) Cytokinins and plant development: an overview. In *Cytokinins: Chemistry, activity, and function* (Mok, D.W.S. und Mok, M.C., eds). Boca Raton: CRC, pp. 155-166.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y. und Quail, P.H.** (2004) The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 16091-16098.
- Morelli, G. und Ruberti, I.** (2002) Light and shade in the photocontrol of *Arabidopsis* growth. *Trends in Plant Science*, **7**, 399-404.
- Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G. und Cheikh, N.N.** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **255**, 328-333.
- Motyka, V. und Kamínek, M.** (1994) Cytokinin oxidase from auxin- and cytokinin-dependent callus cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, **13**, 1-9.
- Motyka, V., Faiss, M., Strand, M., Kamínek, M. und 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 Physiology*, **112**, 1035-1043.
- Motyka, V., Vankova, R., Capkova, V., Petrasek, J., Kamínek, M. und Schmölling, T.** (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum*, **117**, 11-21.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction., **155**, 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Naito, T., Kiba, T., Koizumi, N., Yamashino, T. und Mizuno, T.** (2007) Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 1557-1560.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. und Benfey, P.N.** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, **413**, 307-311.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Ueguchi, C.** (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 1365-1377.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K. und Shigeoka, S.** (2006) *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant Journal*, **48**, 535-547.
- Nogué, N., Hocart, H., Letham, D.S., Dennis, E.S. und Chaudhury, A.M.** (2000) Cytokinin synthesis is higher in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation*, **32**, 267-273.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K. und Sandberg, G.** (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential

importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8039-8044.

Novak, O., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Dolezal, K., Lenobel, R. und Strnad, M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **480**, 207-218.

Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A. und Scharf, K.-D. (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress & Chaperones*, **6**, 177-189.

Ogawa, D., Yamaguchi, K. und Nishiuchi, T. (2007) High-level overexpression of the *Arabidopsis HsfA2* gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 3373-3383.

Oh, S., Park, S. und Han, K.-H. (2003) Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2709-2722.

Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I. und Aoyama, T. (2001) Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*. *Plant Journal*, **25**, 389-398.

Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1992) Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, **61**, 1053-1095.

Paces, V., Werstiuk, E. und Hall, R.H. (1971) Conversion of N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, **48**, 775-778.

Palni, L.M.S., Burch, L. und Horgan, R. (1988) The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta*, **174**, 231-234.

Park, J.-S., Kim, J.-B., Cho, K.-J., Cheon, C.-I., Sung, M.-K., Choung, M.-G. und Roh, K.-H. (2008) *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor AtMYB60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell Reports*, **27**, 985-994.

Persson, B.C., Esberg, B., Ólafsson, Ó. und Björk, G.R. (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie*, **76**, 1152-1160.

Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W., Stes, E., Schmülling, T., Kakimoto, T., Van Montagu, M.C.E., Strnad, M., Holsters, M., Tarkowski, P. und Vereecke, D. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 929-934.

Porra, R.J., Thompson, W.A. und Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **975**, 384-394.

Price, J., Laxmi, A., St, M.S.K. und Jang, J.C. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2128-2150.

Rashotte, A.M., Carson, S.D.B., To, J.P.C. und Kieber, J.J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **132**, 1998-2011.

- Rashotte, A.M., Chae, H.S., Maxwell, B.B. und Kieber, J.J.** (2005) The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia Plantarum*, **123**, 184-194.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. und Kieber, J.J.** (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11081-11085.
- Redig, P., Shaul, O., Inze, D., Van Montagu, M. und Van Onckelen, H.** (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters*, **391**, 175-180.
- Reyes, J.C., Muro-Pastor, M.I. und Florencio, F.J.** (2004) The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, **134**, 1718-1732.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-ali, T. und Harberd, N.P.** (2001) How gibberellin regulates plant growth and development : A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 67-88.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. und Yu, G.L.** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science (Washington D C)*, **290**, 2105-2110.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, **18**, 40-54.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A. und Murray, J.A.H.** (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, **283**, 1541-1544.
- Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P.F. und Martinez-Garcia, J.F.** (2006) Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **141**, 85-96.
- Romanov, G.A., Spíchal, L., Lomin, S.N., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Analytical Biochemistry*, **347**, 129-134.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N. und 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. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 4051-4058.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B.** (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology*, **53**, 247-259.
- Rousseaux, M.C., Hall, A.J. und Sánchez, R.A.** (1996) Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiologia Plantarum*, **96**, 217-224.
- Rousseaux, M.C., Hall, A.J. und Sánchez, R.A.** (2000) Basal leaf senescence in a sunflower *Helianthus annuus* canopy: responses to increased R/FR ratio. *Physiologia Plantarum*, **110**, 477-482.

Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (Krawetz, S. und Misener, S., eds). Totowa, NJ,: Humana Press, pp. 365-386.

Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S. und Morelli, G. (1991) A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, **10**, 1787-1791.

Rupp, H.M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. und Schmülling, T. (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant Journal*, **18**, 557-563.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. und Scheres, B. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, **99**, 463-472.

Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M. und Scheres, B. (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes and Development*, **17**, 354-358.

Sakai, H., Aoyama, T., Bono, H. und Oka, A. (1998) Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. *Plant and Cell Physiology*, **39**, 1232-1239.

Sakai, H., Aoyama, T. und Oka, A. (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant Journal*, **24**, 703-711.

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Oka, A. (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, **294**, 1519-1521.

Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T. und Yamaguchi, S. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9972-9977.

Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 431-449.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S. und Koshiba, T. (2002) The *HAT2* gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **32**, 1011-1022.

Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K. und Stitt, M. (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, **136**, 2483-2499.

Schena, M. und Davis, R.W. (1992) HD-Zip proteins: members of an *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 3894-3898.

- Schena, M., Lloyd, A.M. und Davis, R.W.** (1993) The *HAT4* gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes and Development*, **7**, 367-379.
- Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek, P. und Benfey, P.N.** (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, **121**, 53-62.
- Scheres, B., Benfey, P. und Dolan, L.** (2002) Root development. In *The Arabidopsis book*: American Society of Plant Biologists.
- Schindler, U., Beckmann, H. und Cashmore, A.R.** (1993) HAT3.1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant Journal*, **4**, 137-150.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E. und Bartrina y Manns, I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, **116**, 241-252.
- Schnorr, K.M., Gaillard, C., Biget, E., Nygaard, P. und Laloue, M.** (1996) A second form of adenine phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* with relative specificity towards cytokinins. *Plant Journal*, **9**, 891-898.
- Scholl, R.L., May, S.T. und Ware, D.H.** (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **124**, 1477-1480.
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., Englich, G., Walch, D. und von Koskull-Döring, P.** (2006) The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **60**, 759-772.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flugge, U.-I. und Kunze, R.** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology*, **131**, 16-26.
- Sena, G., Jung, J.W. und Benfey, P.N.** (2004) A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development*, **131**, 2817-2826.
- Sessa, G., Morelli, G. und Ruberti, I.** (1993) The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, **12**, 3507-3517.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G. und Ruberti, I.** (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, **19**, 2811-2815.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. und Goff, S.A.** (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell*, **14**, 2985-2994.
- Skoog, F. und Armstrong, D.J.** (1970) Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*, **21**, 359-384.
- Smith, H. und Whitelam, G.C.** (1997) The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment*, **20**, 840-844.

- Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1299-1305.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. und Ruberti, I.** (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*, **126**, 4235-4245.
- Stracke, R., Werber, M. und Weisshaar, B.** (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 447-456.
- Sun, J., Niu, Q.W., Tarkowski, P., Zheng, B., Tarkowska, D., Sandberg, G., Chua, N.H. und Zuo, J.** (2003) The *Arabidopsis AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiology*, **131**, 167-176.
- Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H. und Zuo, J.** (2005) *Arabidopsis SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**, 588-603.
- Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C. und Mizuno, T.** (1998) Histidine-containing phosphotransfer (Hpt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **39**, 1258-1268.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C. und Mizuno, T.** (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 2486-2489.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. und Mizuno, T.** (2001a) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 107-113.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C. und Mizuno, T.** (2001b) Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 37-45.
- Suzuki, T., Ishikawa, K., Yamashino, T. und Mizuno, T.** (2002) An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (Hpt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of *AHP2* in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant and Cell Physiology*, **43**, 123-129.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E. und Harter, K.** (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, **294**, 1108-1111.
- Tajima, Y., Imamura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T. und Mizuno, T.** (2004) Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 28-39.
- Takei, K., Sakakibara, H. und Sugiyama, T.** (2001a) Identification of genes encoding adenylyl isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 26405-26410.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M. und Sugiyama, T.** (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 85-93.

- Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 971-977.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2004a) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1053-1062.
- Takei, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2004b) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 41866-41872.
- Tanaka, Y., Suzuki, T., Yamashino, T. und Mizuno, T.** (2004) Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in his-to-asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **68**, 462-465.
- Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T. und Sugiyama, T.** (1998) Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Letters*, **429**, 259-262.
- Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T. und Oka, A.** (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant and Cell Physiology*, **48**, 263-277.
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P. und Chory, J.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.
- Taya, Y., Tanaka, Y. und Nishimura, S.** (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **271**, 545-547.
- Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F. und Gilmartin, P.M.** (2002) *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Molecular Biology*, **50**, 43-56.
- To, J.P.C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruere, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Kieber, J.J.** (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, **16**, 658-671.
- To, J.P.C., Deruere, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. und Kieber, J.J.** (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell*, **19**, 3901-3914.
- To, J.P.C. und Kieber, J.J.** (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*, **13**, 85-92.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. und Quail, P.H.** (2003) The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix transcription factor family. *Plant Cell*, **15**, 1749-1770.
- Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T. und Mizuno, T.** (2001a) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 231-235.

- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T. und Tabata, S.** (2001b) The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 751-755.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. und Guilfoyle, T.J.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. und Shinozaki, K.** (1993) An *Arabidopsis* MYB homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, **5**, 1529-1539.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. und Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*, **390**, 287-289.
- Van Overbeek, J., Conklin, M.E. und Blakeslee, A.F.** (1941) Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, **94**, 350-351.
- Veach, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W., Malbeck, J., Vankova, R. und Mok, M.C.** (2003) *O*-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology*, **131**, 1374-1380.
- von Schwartzenberg, K., Kruse, S., Reski, R., Moffatt, B. und Laloue, M.** (1998) Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *Plant Journal*, **13**, 249-257.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X. und Crawford, N.M.** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, **132**, 556-567.
- Weaver, L.M. und Amasino, R.M.** (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, **127**, 876-886.
- Weigel, D. und Glazebrook, J.** (2002) *Arabidopsis: A laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. und Schmülling, T.** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, **15**, 2532-2550.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. und Schmülling, T.** (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, **8**, 1-12.
- Whitty, C.D. und Hall, R.H.** (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Botany*, **52**, 789-799.

- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. und Provart, N.J. (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, **2**, e718.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T. und Mizuno, T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 1017-1023.
- Yang, S., Yu, H., Xu, Y. und Goh, C.J. (2003a) Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid *DSCKX1*. *FEBS Letters*, **555**, 291-296.
- Yang, S.H., Yu, H. und Goh, C.J. (2003b) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Molecular Biology*, **51**, 237-248.
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G. und Li-Jia, Q. (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, **60**, 107-124.
- Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y.-I., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H. und Mizuno, T. (2007) Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **48**, 84-96.
- Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiology*, **134**, 1654-1661.
- Zhang, J.Z. (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 430-440.
- Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D.S., McKinney, S.A. und Higgins, T.J.V. (1995) The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *IPT* gene. *Planta*, **196**, 84-94.
- Zhang, X.D., Letham, D.S., Zhang, R. und Higgins, T.J.V. (1996) Expression of the isopentenyl transferase gene is regulated by auxin in transgenic tobacco tissues. *Transgenic Research*, **5**, 57-65.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. und Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, **136**, 2621-2632.

9. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L. und Schmölling, 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 Journal*, **44**, 314-333.

Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmölling, T. und Frébort, I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 255-267.

Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. und Schmölling, T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, **8**, 1-12.

10. Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Prof. Thomas Schmülling für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und die vielen hilfreichen Anmerkungen für meine schriftliche Arbeit.

Bei Prof. Wolfgang Schuster bedanke ich mich für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Betreuung und Aufrechterhaltung des Computersystems und für seine Bereitschaft, sich als Gutachter für meine Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Tomáš Werner für die großartige Betreuung meiner Arbeit sowie die vielen anregenden Diskussionen und Anmerkungen bei der Verfassung der Dissertation.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Schmülling insbesondere bei Labor 107 für die Unterstützung bei der Umsetzung meiner Projekte und die schöne Zeit während und nach der Arbeit.

Ein großes Dankeschön richte ich an Britt, die mir bei unzähligen Messungen eine große Hilfe war sowie an Wolfram für seine Hilfe beim Umgang mit der qRT-PCR und vielen Computerprogrammen.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern, meinem Freund Danny und allen guten Freunden, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten, mir Kraft und Motivation gegeben haben und ohne die ich diese Aufgabe nicht gemeistert hätte.

Dankeschön

11. Anhang

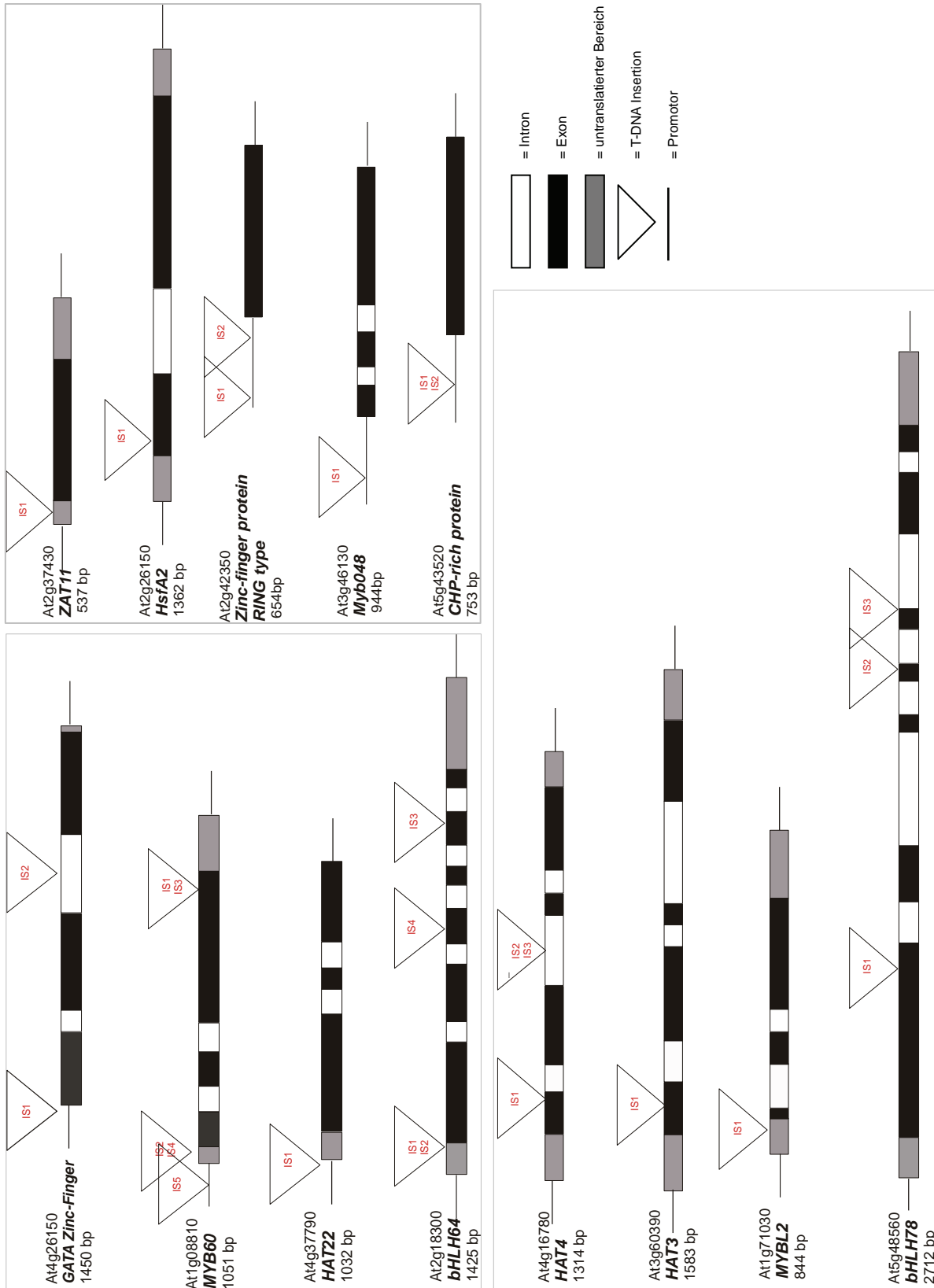


Abbildung 45: Genstruktur der für den *loss-of-function* Ansatz ausgewählten Gene und die Position verfügbarer T-DNA Insertionen.

Tabelle 9: Alle verfügbaren T-DNA-Insertionslinien der Kandidatengene aus Tabelle 5.

At4g26150 GATA22 zinc finger			At2g26150 HSFA2		
Salk_021362	5'UTR	IS1	Salk_008978	Exon	IS1
Salk_003995	Intron	IS2	Salk_081069	Prom	IS2
Salk_003997	Intron	IS3	Salk_080820	Prom	IS3
Salk_003999	Intron	IS4			
At1g08810 AtMYB60			At2g42350 rinc-zinc-finger		
Salk_133309	Exon	IS1	Salk_065843	Prom	IS1
Salk_148646	Exon	IS3	Salk_065842	Prom	IS2
Salk_089775	Prom	IS2	Gabi_611E12		IS3
Salk_008005	Prom	IS4			
Salk_033737	Prom	IS5			
At4g37790 HAT22			At3g46130 MYB48		
Salk_085964	Prom	IS1	Salk_103847	5'UTR	IS1
Sail_5_H03	5'UTR	IS2			
At2g18300 bHLH64			At5g43520 CHP rich protein TF		
Salk_090958	5'UTR	IS1	Sail_743_B09	5'UTR	IS1
Salk_015771	5'UTR	IS2	Sail_894_G10	5'UTR	IS2
Sail_540_E05	Ende 5. Exon	IS3	Sail_864_F04	5'UTR	IS3
Sail_77_D01	Anfang 5. Exon	IS4			
At4g16780 HAT4			At5g48560 bHLH78		
Salk_106790	Exon	IS1	Salk_091522	Exon	IS1
Salk_054977	Intron	IS2	Salk_076836	Exon	IS2
Salk_055169	Intron	IS3	Salk_048464	Exon	IS3
			Salk_055827	Exon	IS4
			Salk_127100	Exon	IS5
			Salk_076834	Exon	IS6
			Salk_091535	Exon	IS7
			Salk_091536	Exon	IS8
			Salk_091537	Exon	IS9
			Salk_055840	Exon	IS10
			Salk_091538	Exon	IS11
			Gabi_863A12		IS12
			Sail_415_A07		IS13
At3g60390 HAT3			IS: Insertion		
Salk_014055	Exon	IS1	prom: Promotor		
Salk_114847	Exon	IS2	UTR: untranslatierter Bereich		
Salk_083383	Exon	IS3			
Salk_114852	Exon	IS4			
At1g71030 MYBL2					
Salk_107780	Prom	IS1			
Salk_002284	Prom	IS2			
Salk_062446	Prom	IS3			
Salk_020433	Prom	IS4			
At2g37430 C2H2 ZAT11					
Salk_110012	Prom	IS1			
Salk_013996	5'UTR	IS2			

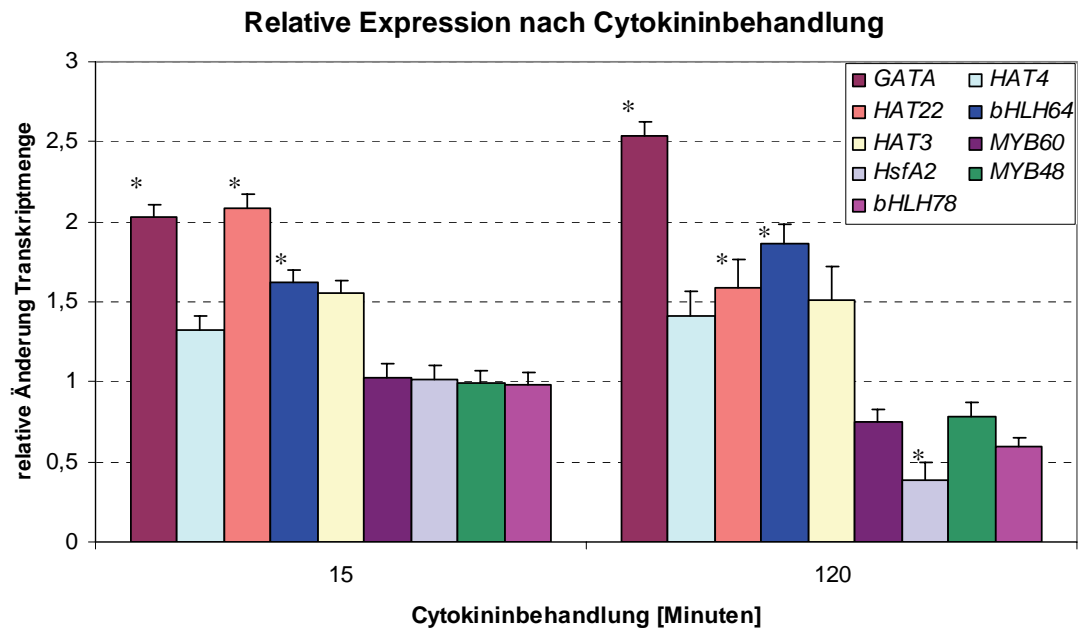


Abbildung 46: Relative Änderung der Transkriptmenge ausgewählter Gene im WT durch Cytokininbehandlung ermittelt mit qRT-PCR.

Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von mit 5 μ M BA behandelten Keimlingen verglichen mit der jeweiligen Kontrolle. Das heißt, für die 15 Minuten mit BA behandelte Probe ist die Kontrolle eine Probe, die 15 Minuten mit KOH behandelt wurde und für die 120 Minuten mit BA behandelte Probe ist die Kontrolle eine Probe, die 120 Minuten mit KOH behandelt wurde. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Die Daten sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen der Standardabweichung. Es wurden je Probe ca. 50 zehn Tage alte, *in vitro* gewachsene WT Keimlinge verwendet, die zur Cytokinininduktion in Flüssigkultur überführt wurden. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur nicht induzierten Kontrolle ($p < 0,05$).

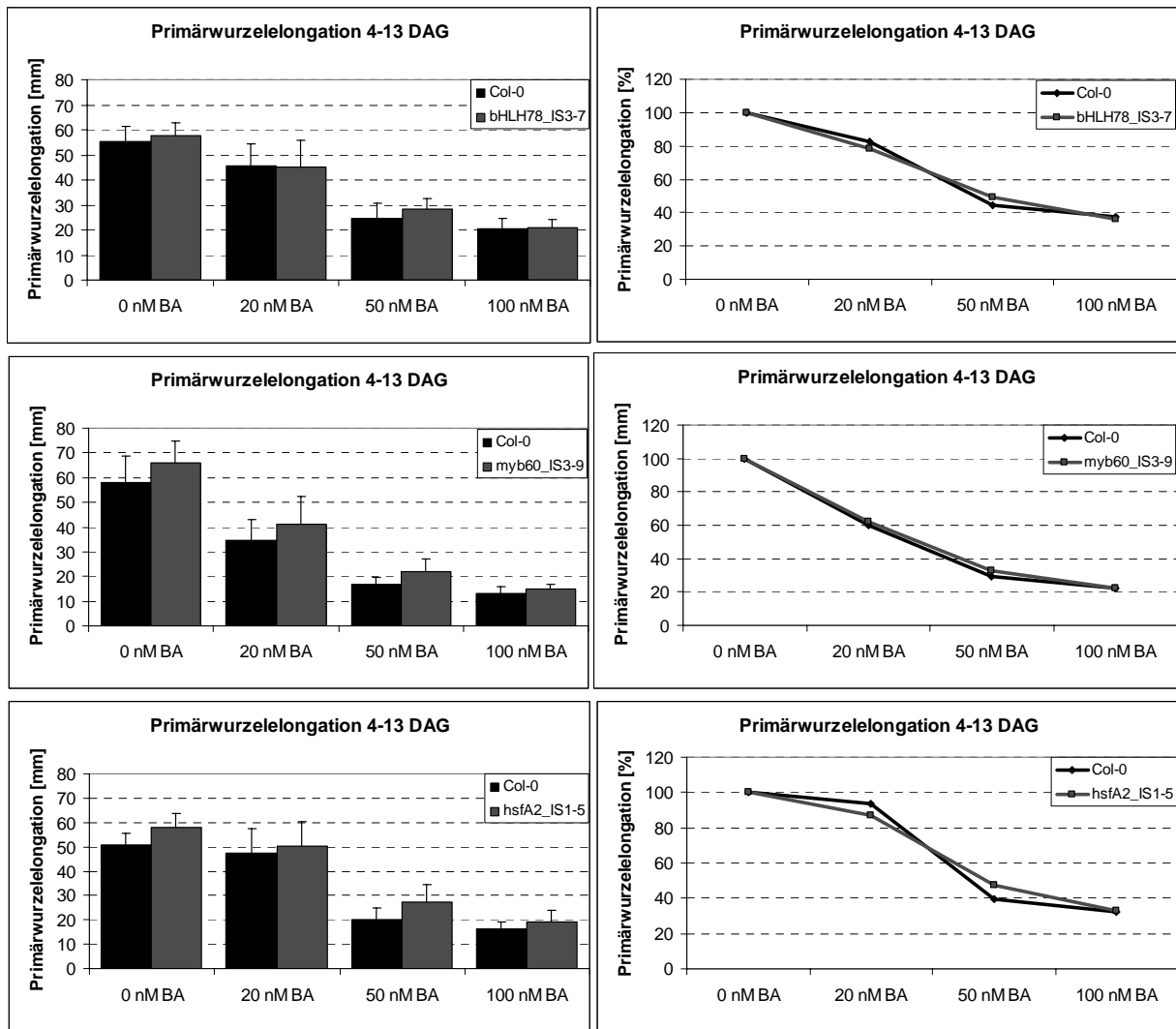
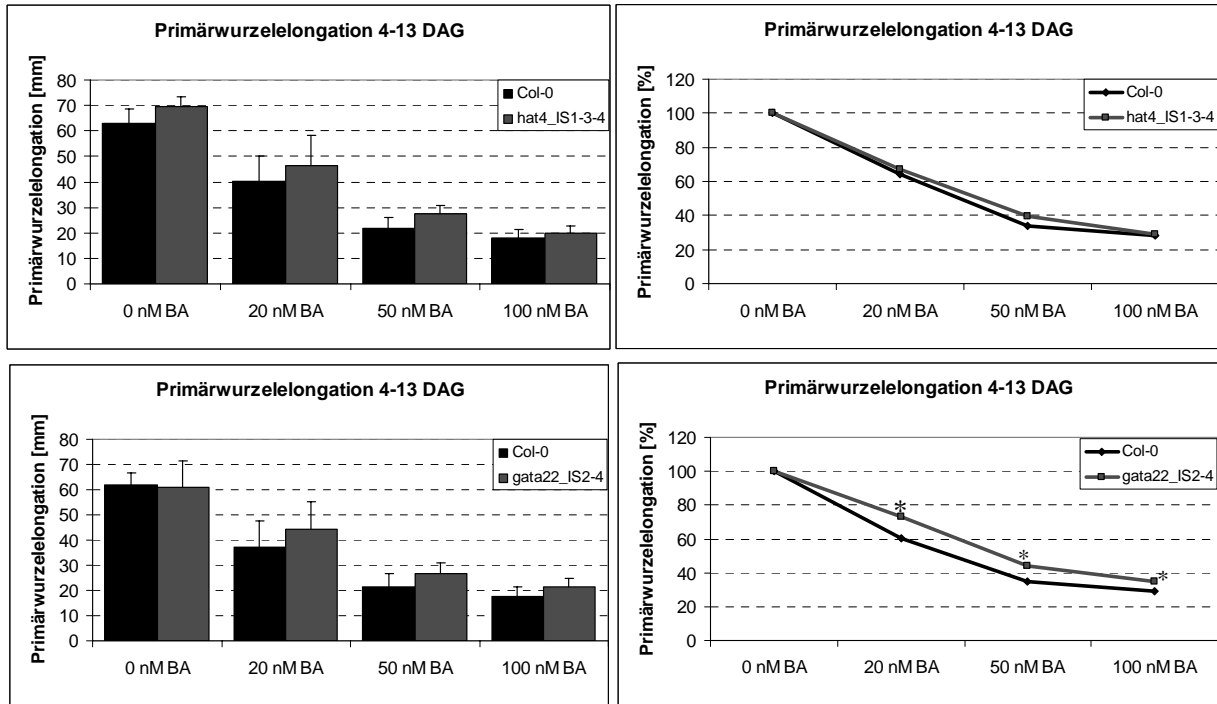


Abbildung 47: Primärwurzelelongation von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.

Das Wurzelwachstum wurde untersucht anhand der Längenzunahme der Primärwurzel von Insertionsmutanten bei verschiedenen Cytokininkonzentrationen im Vergleich zum WT (jeweils links). Zusätzlich wurde die prozentuale Reduktion der Längenzunahme mit steigender Cytokininkonzentration vergleichend zum Wert ohne Cytokinin dargestellt (jeweils rechts). Das Wurzelwachstum von *in vitro* vertikal gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium mit verschiedenen Cytokininkonzentrationen untersucht. Die Primärwurzelelongation wurde vom vierten bis zum 13. Tag nach der Keimung gemessen. Als Cytokinin wurde BA verwendet. Die Balken entsprechen der Standardabweichung (n=40). Signifikante Unterschiede zum WT sind jeweils in der prozentualen Darstellung mit einem Stern markiert ($p < 0,01$)



Fortsetzung Abbildung 47: Primärwurzelelongation von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.

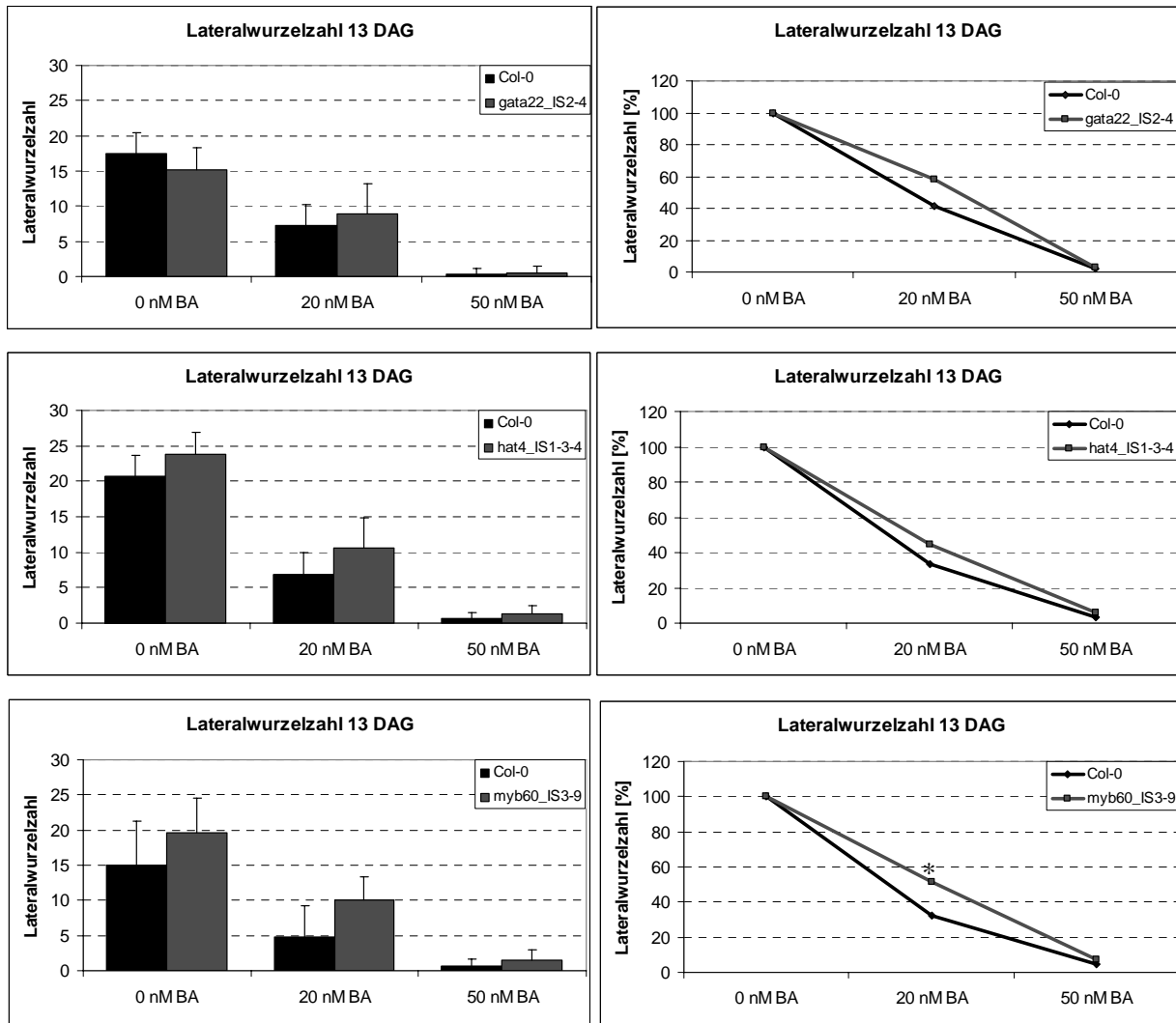
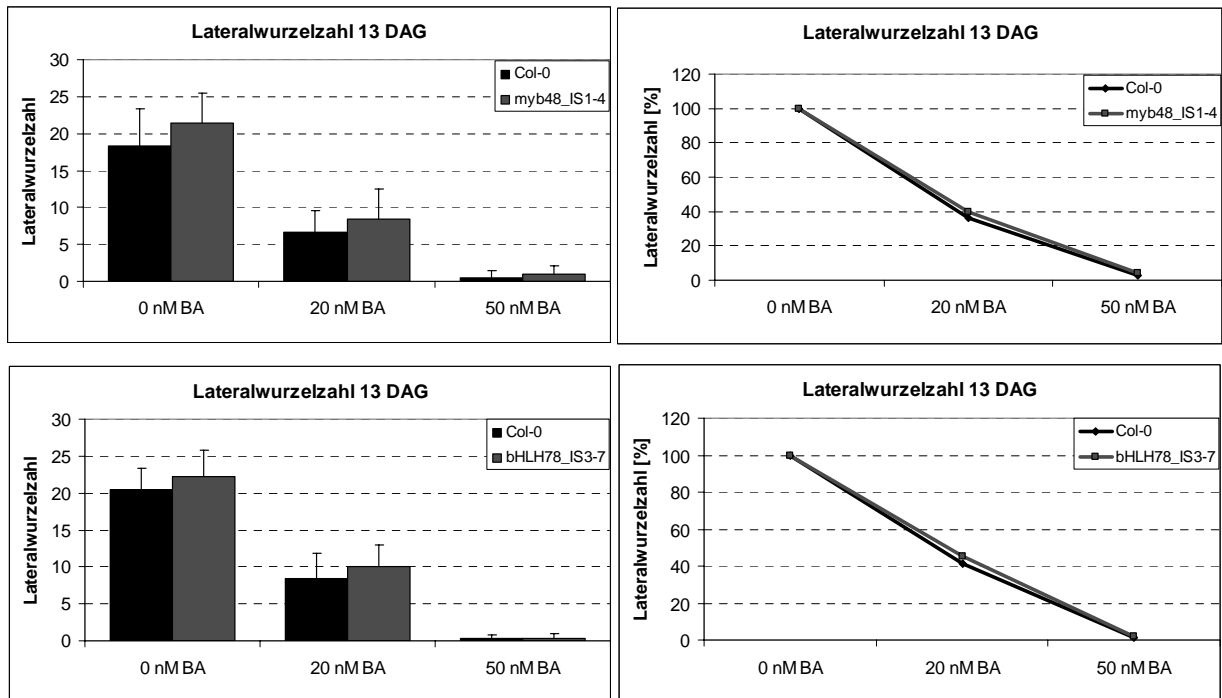


Abbildung 48: Lateralwurzelwachstum von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.

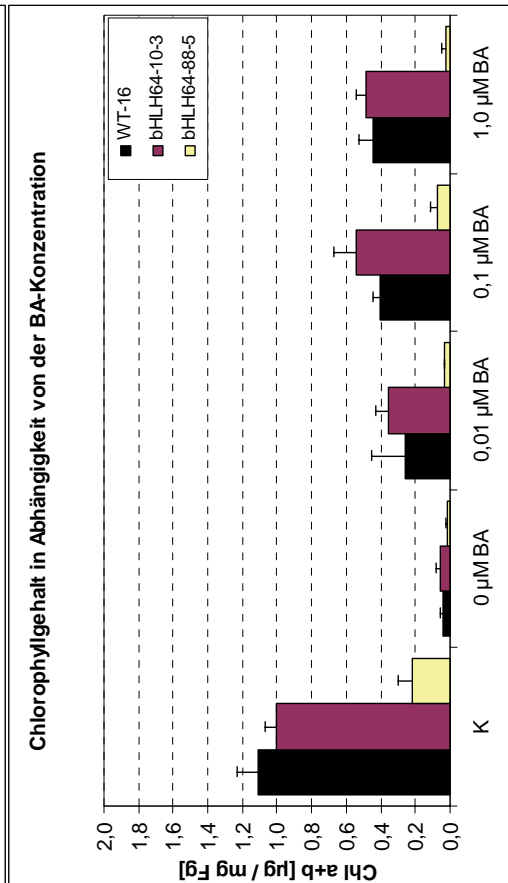
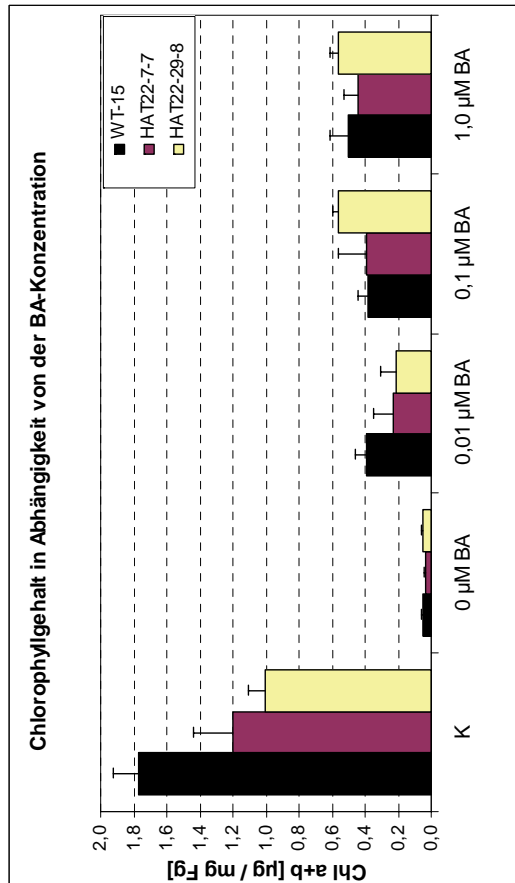
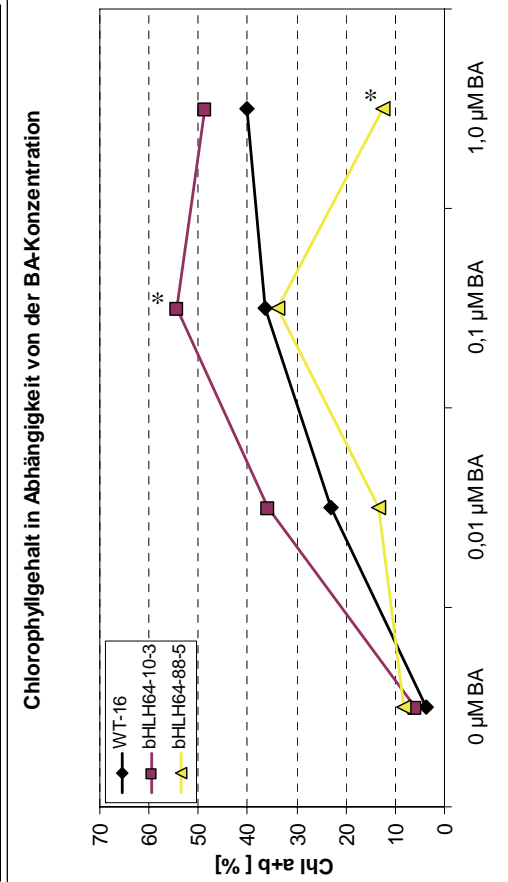
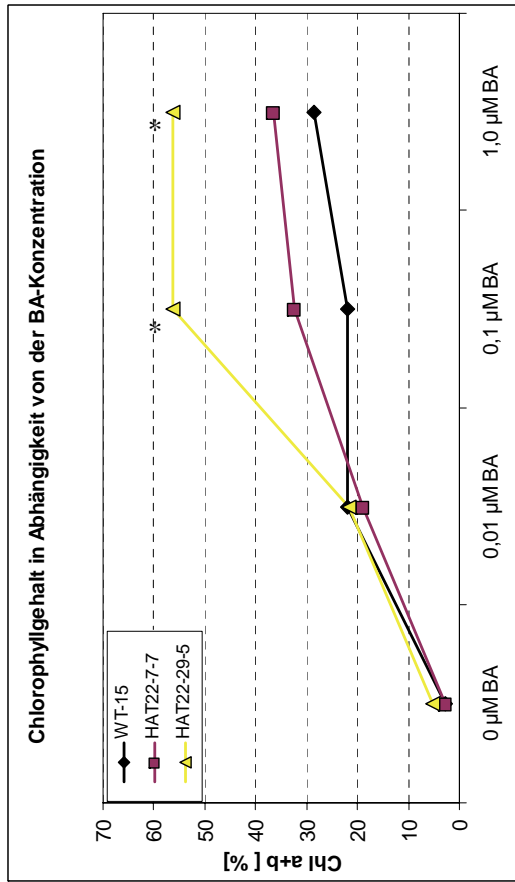
Die Anzahl an Lateralwurzeln wurde 13 Tage nach der Keimung bestimmt (jeweils links). Die Lateralwurzelanzahl ist bei steigender Cytokininkonzentration reduziert und korreliert negativ mit der Cytokininkonzentration. Der cytokininabhängige Verlauf der Lateralwurzelanzahl wurde bezogen auf den Wert ohne Cytokinin prozentual dargestellt (jeweils rechts). Das Wurzelwachstum von *in vitro* vertikal gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium mit verschiedenen Cytokininkonzentrationen untersucht. Als Cytokinin wurde BA verwendet. Die Balken entsprechen der Standardabweichung (n=40). Signifikante Unterschiede zum WT sind jeweils in der prozentualen Darstellung mit einem Stern markiert ($p < 0,01$).



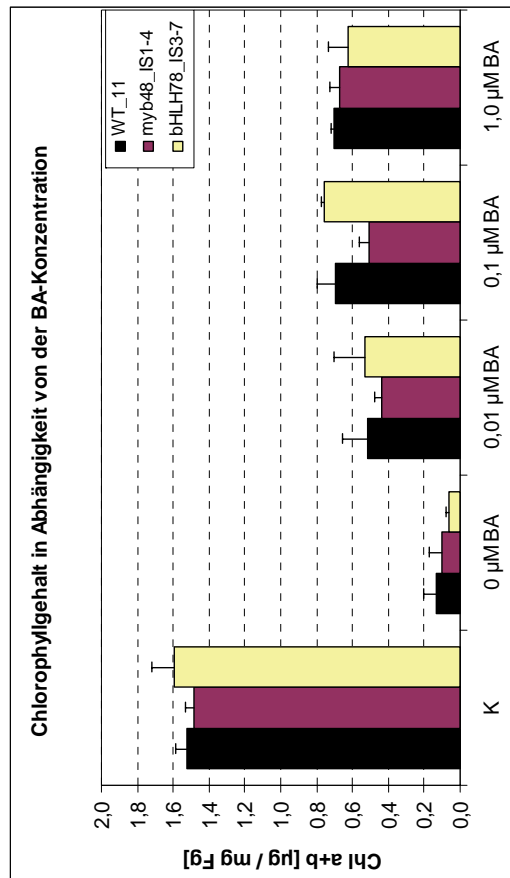
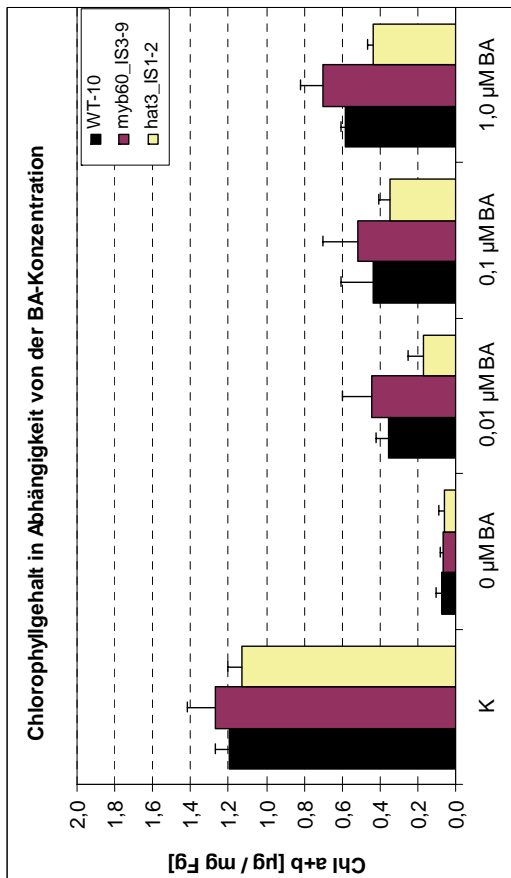
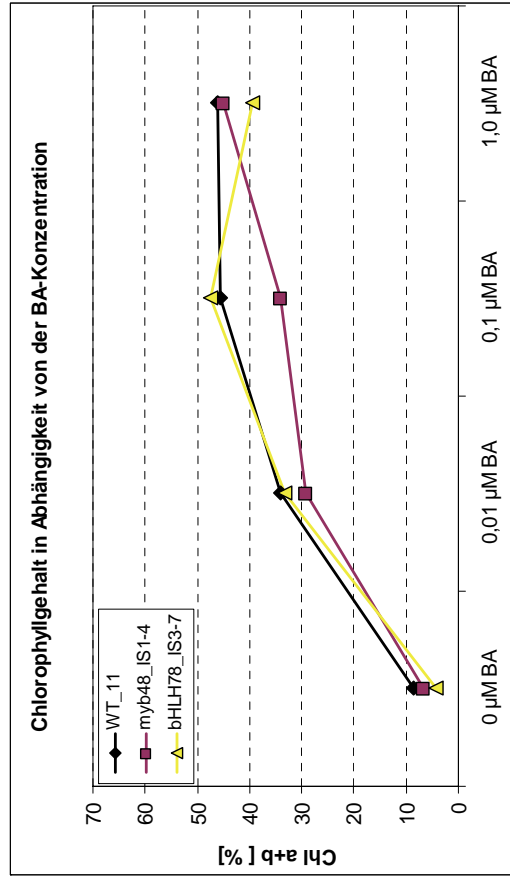
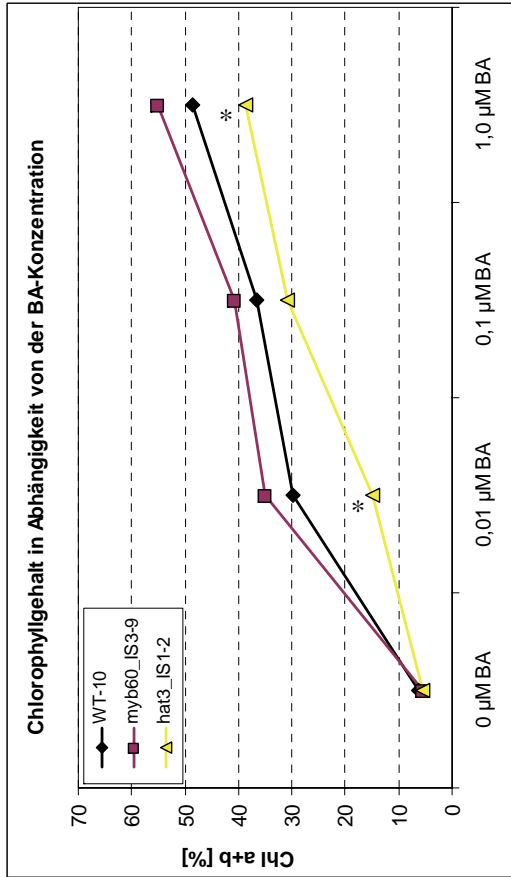
Fortsetzung Abbildung 48: Lateralwurzelwachstum von Insertionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren auf cytokininhaltigem Medium im Vergleich zum WT.

Abbildung 49: Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.

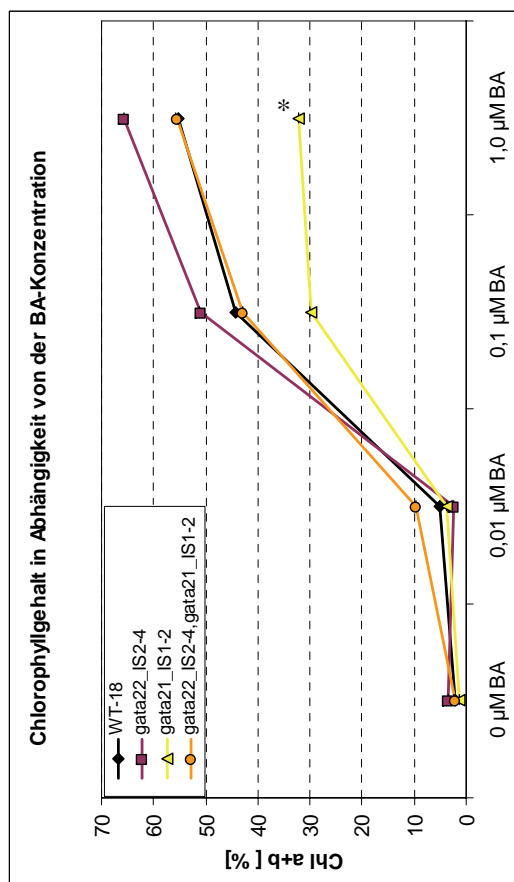
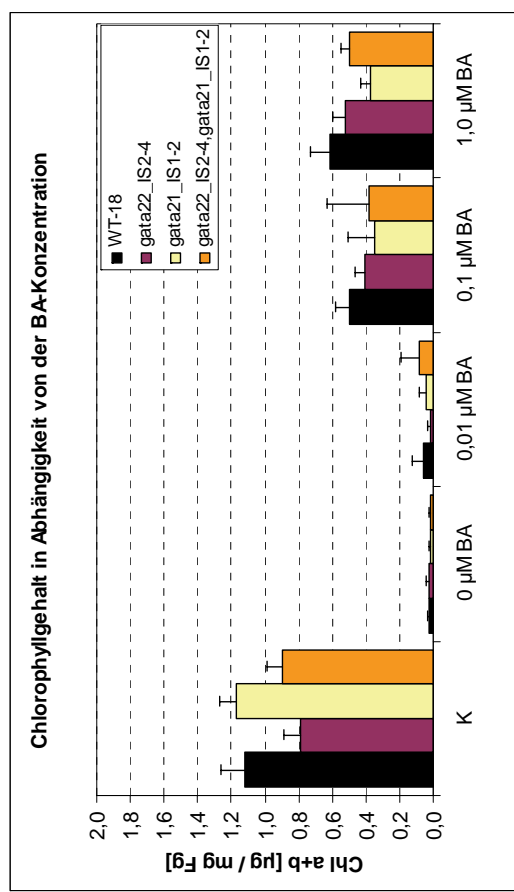
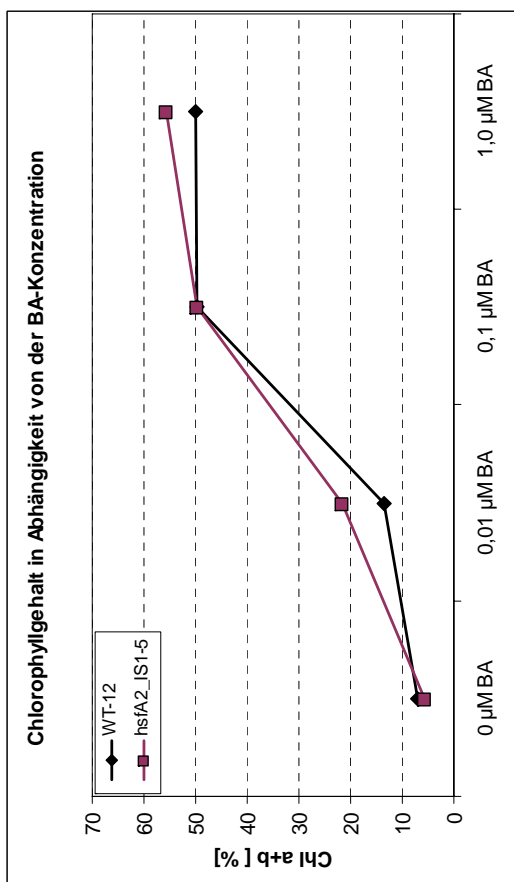
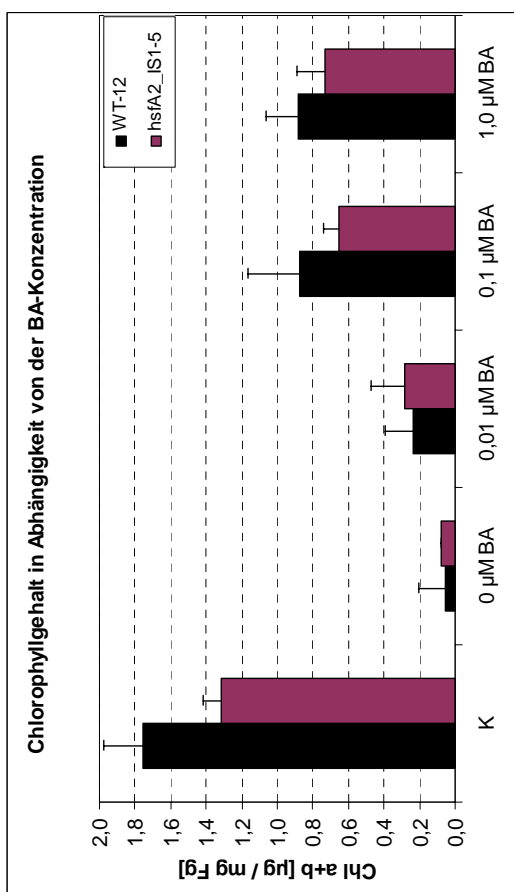
Der Gesamtchlorophyllgehalt in abgetrennten Blättern, die 10 Tage im Dunkeln inkubiert wurden, wurde gemessen (a) und prozentual zum Anfangschlorophyllgehalt (K) nicht im Dunkeln inkubierter Blätter dargestellt (b). Jeweils ein definiertes Blatt von 20 Tage alten Keimlingen wurde untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Proben und deren Standardabweichung (n=3). Die Blätter von fünf *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurden je Probe verwendet und der Messwert auf 1 mg Frischgewicht (FG) bezogen. Der Anfangschlorophyllgehalt ohne Dunkelbehandlung wurde gemessen und jeweils als 100% festgelegt. Die Proben wurden für 10 Tage entweder in Wasser und DMSO (0 μ M BA) oder in Wasser mit verschiedenen Cytokininkonzentrationen (0,01 μ M BA, 0,1 μ M BA und 1,0 μ M BA) inkubiert. Ein Stern markiert signifikante Unterschiede in der Cytokininsensitivität verglichen mit dem WT ($p < 0,05$).



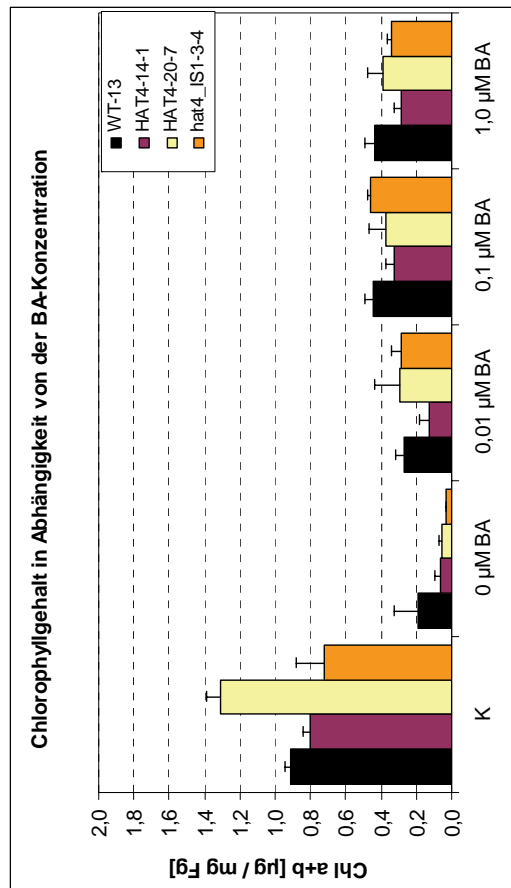
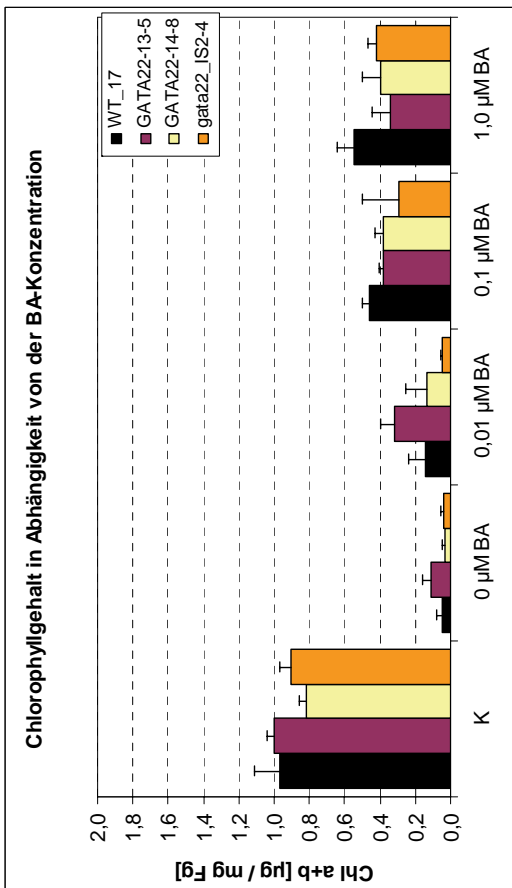
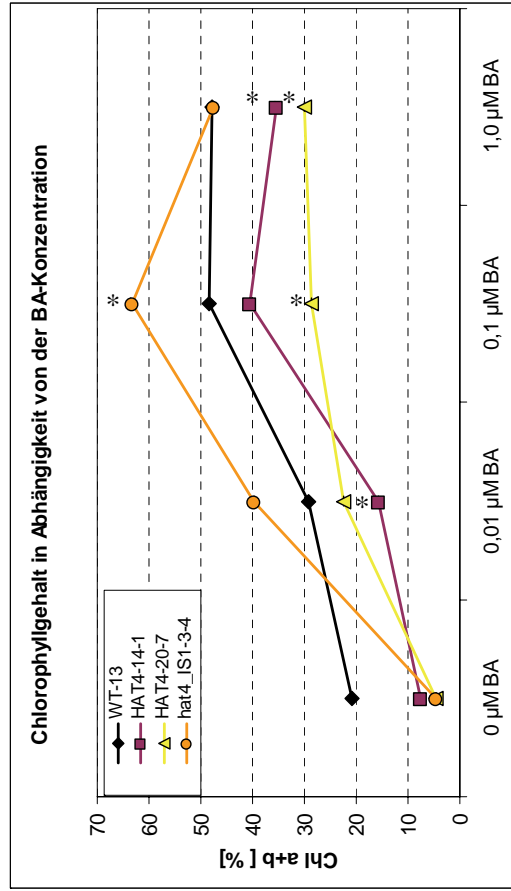
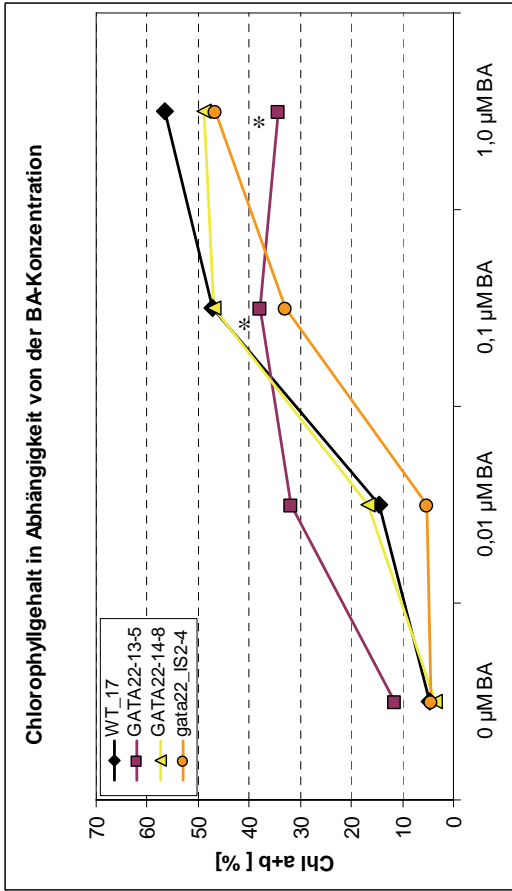
Fortsetzung Abbildung 49: Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.



Fortsetzung Abbildung 49: Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.



Fortsetzung Abbildung 49: Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.



Fortsetzung Abbildung 49: Unterdrückung der dunkel-induzierten Seneszenz durch Cytokinin in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktoren.

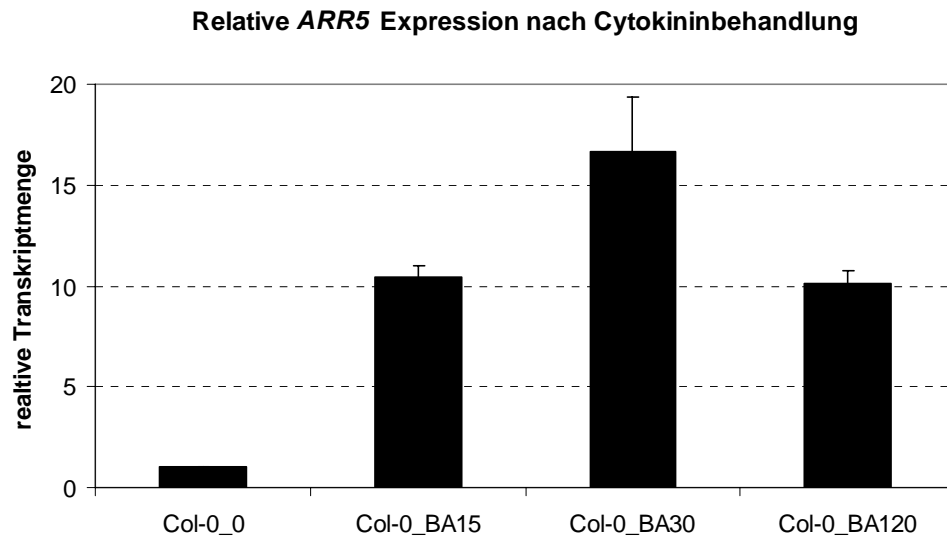


Abbildung 50: Veränderung der *ARR5* Transkriptmenge durch Cytokinin im WT.

Dargestellt ist die relative Transkriptmenge von *ARR5*, die mittels qRT-PCR ermittelt wurde. Eingesetzt wurde cDNA eines Pools von 50 zehn Tage alten Keimlingen je Probe. Die Keimlinge wurden in Flüssigkultur für 15 Minuten, 30 Minuten und 120 Minuten mit DMSO oder 5 μ M BA behandelt. Die *ARR5* Menge in cytokininbehandelten Proben wurde ins Verhältnis gesetzt zu den Proben, die gleich lang mit DMSO behandelt wurden. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von drei technischen Wiederholungen. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (*At5g53300*), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde.

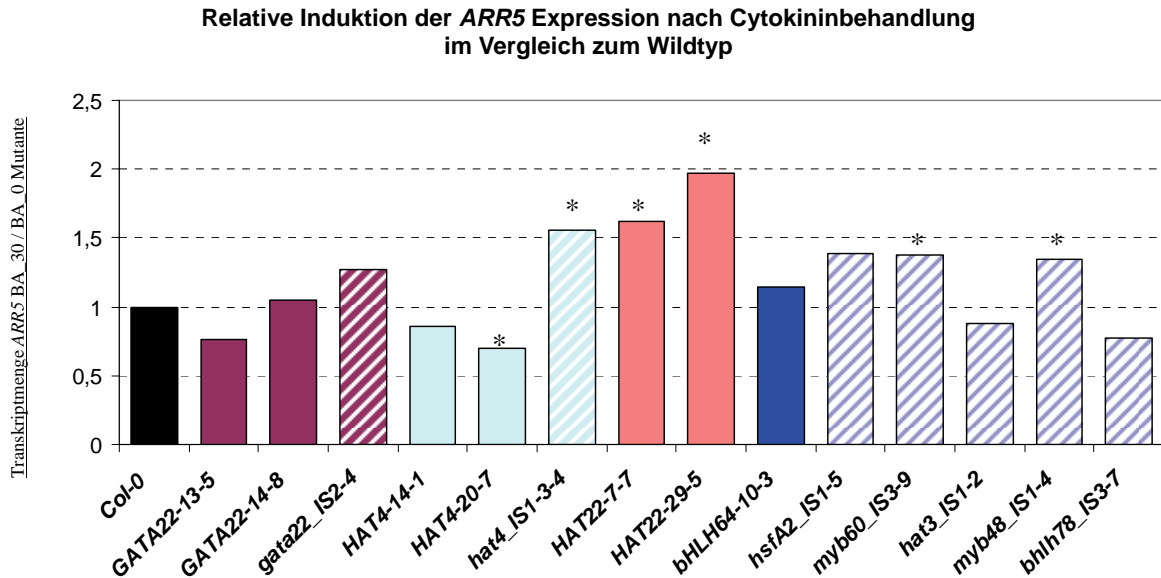


Abbildung 51: Relative Induktionsrate von *ARR5* in Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene durch Cytokinin im Vergleich zum WT.

Dargestellt ist die relative Induktion der Transkriptmenge von *ARR5* durch Cytokinin, die in einer qRT-PCR ermittelt wurde. Die Induktionsrate des WT wurde gleich eins gesetzt. Verwendet wurden Keimlinge, die in Flüssigkultur 30 Minuten mit DMSO oder 5 μ M BA behandelt wurden. Die *ARR5* Transkriptmenge in cytokininbehandelten Proben (BA_30) wurde ins Verhältnis gesetzt zu den Proben, die gleich lang mit DMSO (BA_0) behandelt wurden. Die so ermittelten Induktionsraten für die untersuchten transgenen Linien (siehe Tabelle 10) wurden anschließend zur Induktionsrate des WT ins Verhältnis gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei technischen Replikaten. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Großgeschriebene Linien sind Linien, in denen das jeweilige Gen unter der Kontrolle des 35S Promotor exprimiert wird. Die Daten aus fünf verschiedenen Experimenten wurden zusammengefasst und sind daher als relative Induktionsraten vergleichend zum WT dargestellt. Ein Stern markiert Linien, bei denen anhand der absoluten Induktionsraten signifikante Unterschiede zum WT gefunden wurden ($p < 0,05$).

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller qRT-PCR Experimente von Insertions- und Überexpressionslinien cytokininregulierter Transkriptionsfaktorgene, in denen die *ARR5* Induktion nach 30 Minuten Cytokininbehandlung bestimmt wurde.

	Linie	<i>ARR5</i> Induktionsfaktor nach 30' BA	<i>ARR5</i> Induktionsfaktor nach 30' BA relativ zum WT
Experiment 1	Col-0	16,8	1,00
	GATA13-5	12,8	0,76
	GATA14-8	17,7	1,05
	HAT4-14-1	14,4	0,85
	HAT4-20-7	11,7	0,70
Experiment 2	Col-0	12,9	1,00
	bHLH64-10-3	14,7	1,14
Experiment 3	Col-0	7,4	1,00
	HAT22-7-7	12,0	1,63
	HAT22-29-5	14,5	1,97
Experiment 4	Col-0	17,8	1,00
	gata22_IS2-4	22,7	1,27
	hat4_IS1-3-4	27,7	1,56
	hsfA2_IS1-5	24,7	1,38
Experiment 5	Col-0	19,1	1,00
	myb60_IS3-9	26,3	1,38
	hat3_IS1-2	16,7	0,88
	myb48_IS1-4-7	25,8	1,35
	bHLH78_IS3-2	14,8	0,78

Dargestellt ist die relative Veränderung der Transkriptmenge von *ARR5* durch Cytokininbehandlung, die in einer qRT-PCR ermittelt wurde. Eingesetzt wurde cDNA von zehn Tage alten Keimlingen. Die Keimlinge wurden in Flüssigkultur 30 Minuten mit DMSO oder 5 μ M BA behandelt. Die *ARR5* Transkriptmenge in cytokininbehandelten Proben wurde ins Verhältnis gesetzt zu den Proben, die gleich lang mit DMSO behandelt wurden. Normalisiert wurden die Ergebnisse zum Gen *UBC10* (At5g53300), welches als stabil exprimiertes Haushaltsgen verwendet wurde. Großgeschriebene Linien sind Linien in denen das jeweilige Gens unter der Kontrolle des 35S Promotor exprimiert wird.

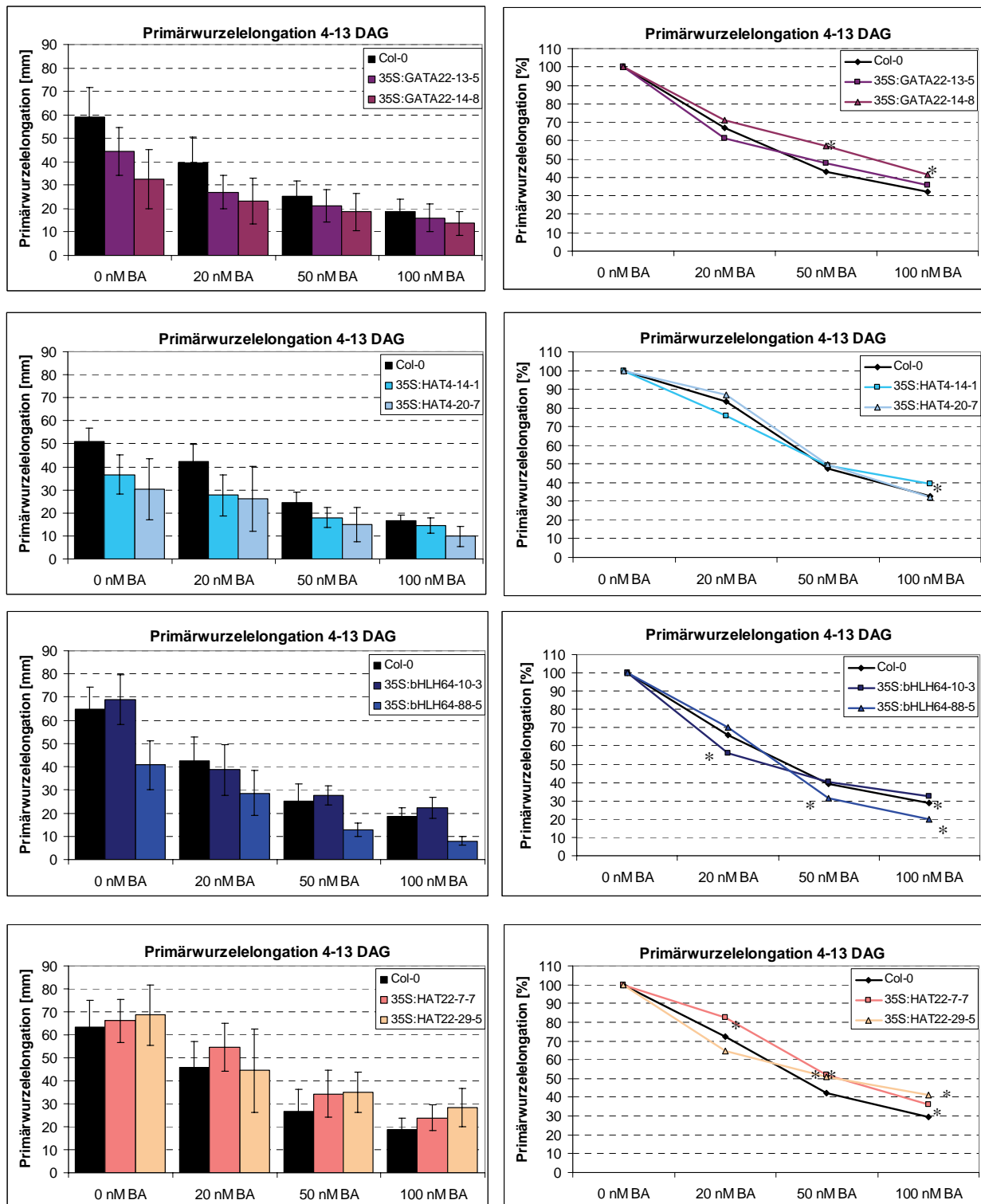


Abbildung 52: Primärwurzelelongation von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorene nach Cytokininbehandlung.

Die Primärwurzelelongation wurde bei verschiedenen Cytokininkonzentrationen im Medium gemessen (jeweils links). Der prozentuale Verlauf in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration ist bezogen auf den Kontrollwert ohne Cytokinin im Medium dargestellt (jeweils rechts). Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard *Ats*-Medium untersucht. Die Primärwurzelelongation wurde zwischen 4. und 13. DAG gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 40). Signifikante Unterschiede zum WT sind mit einem Stern markiert (p < 0,01).

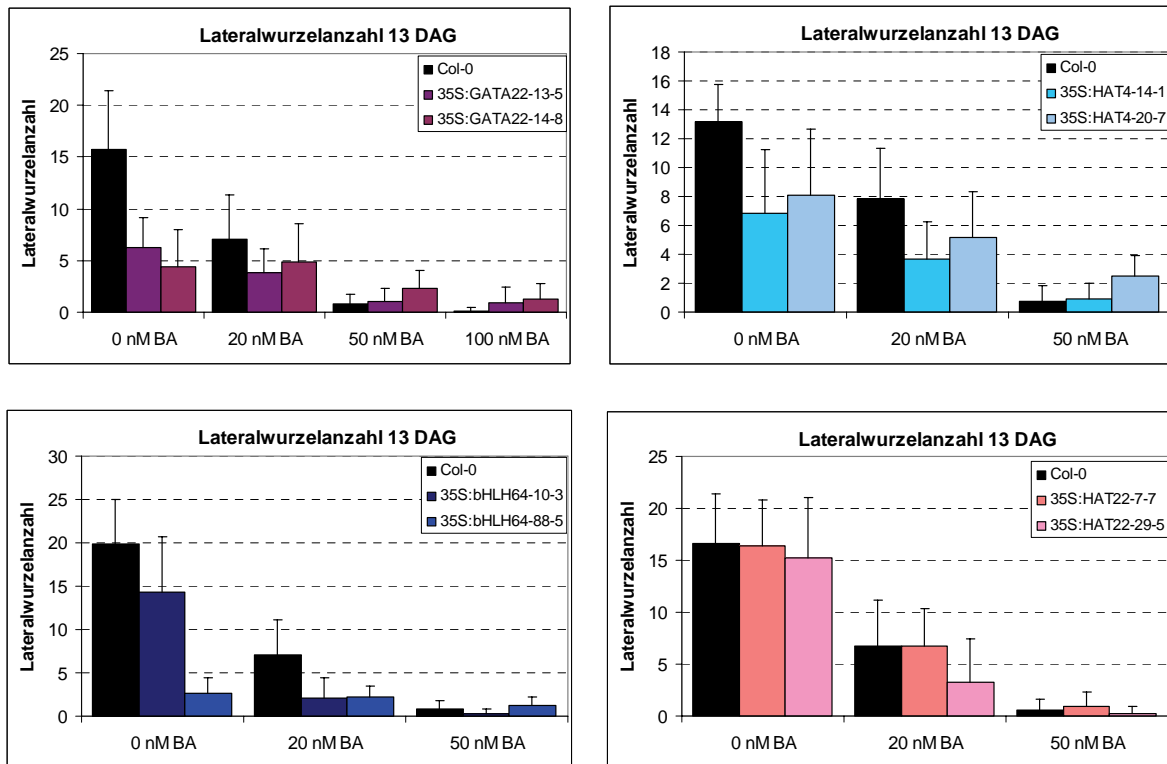


Abbildung 53: Lateralwurzelanzahl von Überexpressionslinien cytokinininduzierter Transkriptionsfaktorgene nach Cytokininbehandlung.

Die Lateralwurzelanzahl wurde bei verschiedenen Cytokininkonzentrationen im Medium 13 DAG gemessen. Das Wurzelwachstum von *in vitro* gewachsenen Keimlingen wurde auf Standard Ats-Medium untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 40). Statistische Berechnungen wurden nur für die auf die Lateralwurzelanzahl ohne Cytokininbehandlung bezogenen prozentualen Werte durchgeführt.

Vektorkarten

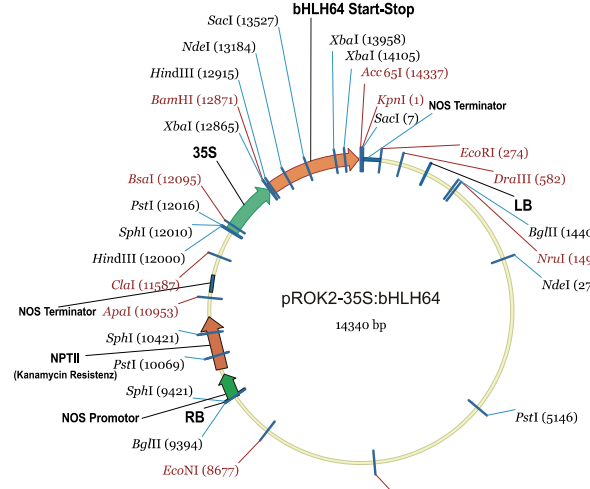
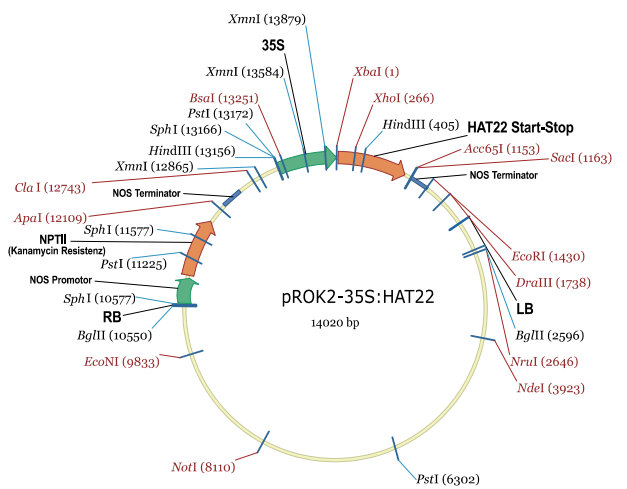
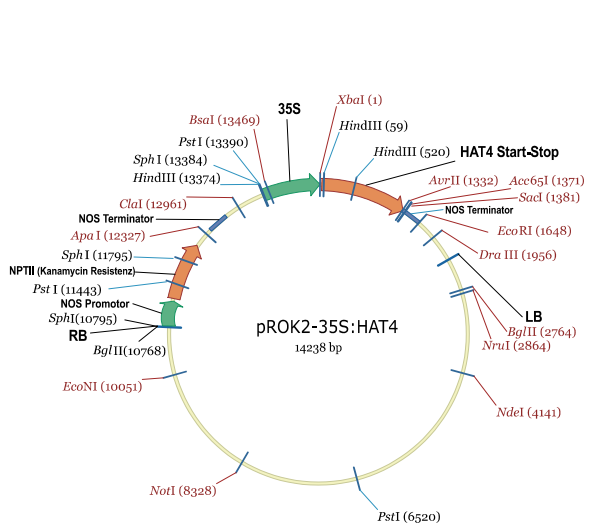
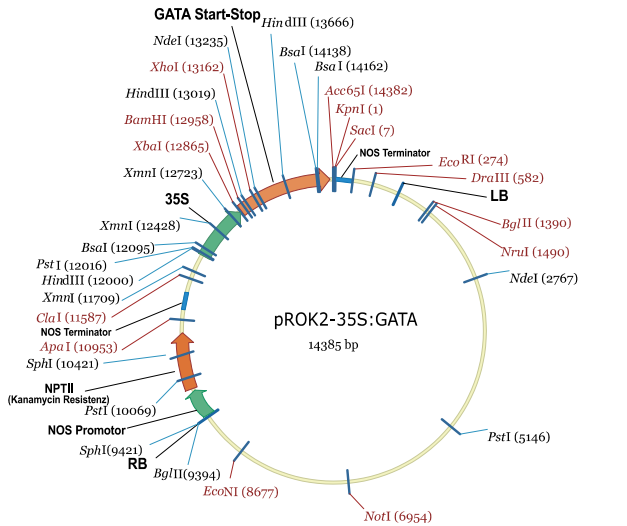
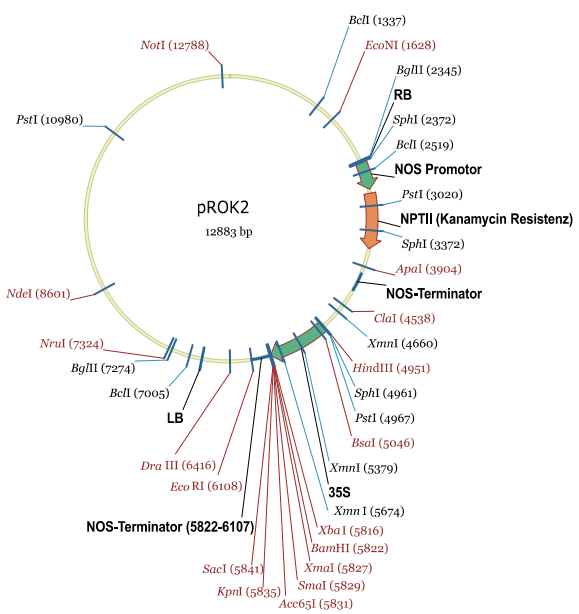
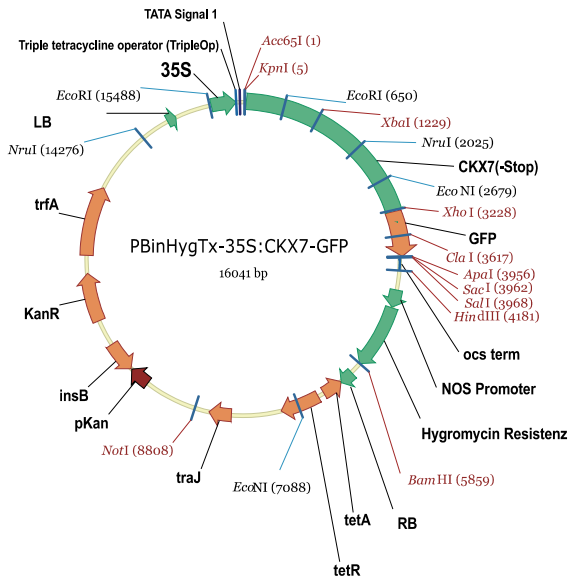


Tabelle 11: Verwendete Primer zur Bestätigung von T-DNA-Insertionslinien mit verändertem Transkriptlevel des korrespondierenden Gens

	Primer	Sequenz	Orientierung im Gen	Verwendung
Primer zum Nachweis der T-DNA in T-DNA-Insertionslinien und zur Genotypisierung (Jeweils der Primer mit der Bezeichnung "RP" im Namen wurde mit dem T-DNA spezifischen Primer zum Nachweis der T-DNA in der Nachweis-PCR kombiniert)	HsfA2_Is1_LP_3'	TGGAGAAGGAAAAACAAACAACC	rückwärts	Genotypisierung von hsfA2_IS1
	HsfA2_Is1_RP_5'	TGATTGCAGGGATTCAGAAAAG	vorwärts	
	Myb48_Is1_LP_3'	TTGGAAAATGAGGAAGTTGGG	vorwärts	Genotypisierung von myb48_IS1
	Myb48_Is1_RP_5'	CATATTCGAGATAGTGCCTGCC	rückwärts	
	Myb60_Is1_LP_5'	GCTTTATTTGGTTGTCCACTGC	vorwärts	Genotypisierung von myb60_IS3
	Myb60_Is1_RP.1_3'	GAATCAACGGGGATGATGAC	rückwärts	
	bhlh078_Is3_LP_3'	CCCATCAATCCTTTTTCTCTTG	rückwärts	Genotypisierung von bHLH78_IS3
	bhlh078_Is2_RP_5'	TTCTTTGTTTATACGATGAAAGG	vorwärts	
	Gata_IS2_RP-2_5'	TATTACCACCAGCGACAGCA	vorwärts	Genotypisierung von gata22_IS2
	Gata_RT2_r	AACCATTCCGTGCGATAGAG	rückwärts	
	Hat4_Is1_LP_5'	TTCCAATAATTGTCAAAGAGGATTC	vorwärts	Genotypisierung von hat4_IS1
	Hat4_Is1_RP_3'	TGGAAGTCATGCATAAGATTG	rückwärts	
	Hat3_Is1/2/3/4_LP_5'	ATTTCTACCTTGCCCTTCGGT	vorwärts	Genotypisierung von hat3_IS1
	Hat3_Is1/2/3/4_RP_3'	TCATTGAAACCTAAGCCTCC	rückwärts	
	gnc_LP_3'	GCC ACC ATT GGA GGA GAG TGA	rückwärts	Genotypisierung von gata21_IS1
	gnc_RP_5'	CAG GCC AAG ATG TTT GTG GCT	vorwärts	
	ahk2_IT2-f_RP	GCAAGAGGCTTTAGCTCCAA	vorwärts	Genotypisierung von ahk2_IT2
	ahk2_IT2-r_LP	TTGCCCGTAAGATGTTTTCA	rückwärts	
	ahk3_IG1-f_LP	CCTTGTTGCCTCTCGAACTC	vorwärts	Genotypisierung von ahk3_IG1
	ahk3_IG1-r_RP	CGCAAGCTATGGAGAAGAGG	rückwärts	
	cre1-2-E-f_LP	GGGCACTCAACAATCATCAA	vorwärts	Genotypisierung von ahp6-3
	cre1-2-E-r_RP	TCCACTGATAAATCCCACTGC	rückwärts	
	ahp6-3-f_LP	GAGCAGTTCTTGCAGCTTCAGCAG	vorwärts	Genotypisierung von cre1-3
	ahp6-3-r_RP	AGGGTTTCGCTTCGGTAGC	rückwärts	
	LB-IT1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTCC		T-DNA Sail (IT)
	LB-IG1	CCCATTTGGACGTGTAGACAC		T-DNA GABI (IG)
	creT-DNA-1	ATAACGCTGCGGACATCTAC		T-DNA cre1-2
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG		T-DNA Salk (IS)	
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		T-DNA Salk (IS)	

Die Schmelztemperatur der Primer ist zum Teil sehr unterschiedlich, sodass in den PCR Reaktionen abhängig von der Primerkombination Annealing Temperaturen von 53°C bis 63° verwendet wurden. Die Primer wurden erstellt mit dem iSect-Tool von SignAL-T-DNA Express und wenn nötig mit Primer3 optimiert und ergänzt

Tabelle 12: Verwendete Primer in der RT-PCR und der qRT-PCR

	Primer	Sequenz	Orientierung im Gen	Verwendung
Primer zur genspezifischen Bestimmung der Transkriptmenge in der RT-PCR	Gata_RT1_f	GATACCCATATCTCCCAACCTC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von GATA22 in RT-PCR
	Gata_RT2_r	AACCATTCCGTGCGATAGAG	rückwärts	
	gnc_RT1_5'	GCGTGATTAGGGTTTGTTCGG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von GATA21 in RT-PCR
	gnc_LP_3'	GCCACCATTGGAGGAGAGTGA	rückwärts	
	HsfA2_RT_5'	GCGGCTTCTTCATCTGTAGG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HsFA2 in RT-PCR
	HsfA2_RT_3'	CGCTGCTTCCAAATTACCAT	rückwärts	
	Myb48_RT1_f	AAGAGGAGGGAAACCGAAAA	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von MYB48 in RT-PCR
	Myb48_IS1_LP_3'	TTGGAAAATGAGGAAGTTGGG	rückwärts	
	Myb60_RT1_f	GGACCATGGACTCCTGAAGA	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von MYB60 in RT-PCR
	Myb60_IS1_RP_3'	CCTCCAAAAGCCATTTCTCAA	rückwärts	
	bHLH78_IS1_RP.1	TCCGGTGAGATCTACGGAAC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von bHLH78 in RT-PCR
	bHLH78_RT_r	CAAGCATCAGTGCTTTTCCA	rückwärts	
	Hat3_RT1_f	GAGATGATGGATTGGGGCTA	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HAT3 in RT-PCR
	Hat3_RT2_r	CCTTTTGAATCTCCGATTC	rückwärts	
	hat4_RT1_f	CGAGAAAGACGATCTGGGTCTA	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HAT4 in RT-PCR
	hat4_RT2_r	CTAGGACGAAGAGCGTCAAAG	rückwärts	
	hat22_RT1_f	TGATGATTCATGCAACACAGGT	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HAT22 in RT-PCR
	hat22_RT2_r	ACATGCTGCAGAAGGATTAGTG	rückwärts	
	bhlh64_RT1_f	AAGACAAGGGAAGAGCAAAAGAC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von bHLH64 in RT-PCR
	bhlh64_RT1_r	TTAGTAATGAAAACCGAGGCTAGA	rückwärts	
ACTIN2-RT-F	TACAACGAGCTTCGTGTTGC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von ACTIN2 in RT-PCR	
ACTIN2-RT-R	GATTGATCCTCCGATCCAGA	rückwärts		
Primer zur genspezifischen Bestimmung der Transkriptmenge in der qRT-PCR	GATA_qRT_f	CCGTCTCTTTCCTACTTTCCTT	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von GATA22 in qRT-PCR
	GATA_qRT_r	TCACTTGATGATGAACCACC	rückwärts	
	bHLH64_qRT_f	GCTTGGATCTGGTTTTGG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von bHLH64 in qRT-PCR
	bHLH64_qRT_r	GGTTTCTTACCAGGCTTTC	rückwärts	
	ARR5_qRT_f	CTACTCGCAGCTAAAACGC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von ARR5 in qRT-PCR
	ARR5_qRT_r	GCCGAAAGAATCAGGACA	rückwärts	
	MYB60_qRT_f	ATTTCCCGCCTTCTTGAG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von MYB60 in qRT-PCR
	MYB60_qRT_r	GCTGCTCGTATGGAAACTG	rückwärts	
	HsfA2_qRT_f	ACGGAGGCTTACTTCTACTCC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HsFA2 in qRT-PCR
	HsfA2_qRT_r	CCTCCTTAGTAGGCATCGAA	rückwärts	
	bHLH78_qRT_f	GTCAACAACCTCCGGGAAG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von bHLH78 in qRT-PCR
	bHLH78_qRT_r	GAGAAGCTGTAGAAATGGGG	rückwärts	
	MYB48_qRT_f	ACTGCAGCTCGTCATCTG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von MYB48 in qRT-PCR
	MYB48_qRT_r	CATCTCTTAGTGGATCGGG	rückwärts	
	HAT3_qRT_f	CAATGTGTCCTTCTTGCG	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HAT3 in qRT-PCR
	HAT3_qRT_r	CTAATGAGAACCAGCAGCAG	rückwärts	
	HAT22_qRT_f	TCCGGTGAGAGCTACAAGAT	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HAT22 in qRT-PCR
	HAT22_qRT_r	TTCGGCTCGAGAAAGATG	rückwärts	
	HAT4_qRT-f	CTACTTTGACCATGTGCC	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von HAT4 in qRT-PCR
	HAT4_qRT-r	ACCTAGGACGAAGAGCGTC	rückwärts	
UBC10 qPCR fw	CCATGGGCTAAATGGAAA	vorwärts	Bestimmung der Transkriptmenge von UBC10 (At5g53300) in qRT-PCR	
UBC10 qPCR rv	TTCATTTGGTCTGTCTTCAG	rückwärts		

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass diese Arbeit an keiner anderen Hochschule als der Freien Universität Berlin eingereicht wurde.

Berlin, den 17.03.2009

Ireen Köllmer