

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Departments Biologie
Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

Cytokinin *profiling*
beim Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.-
Einflüsse von Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase
sowie Adenosin-Kinase

von

Marta Fernández Núñez
aus Oviedo (Spanien)



Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. LIEBEREI
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Prlv.-Doz. Dr. K. von SCHWARTZENBERG
Tag der Disputation: 30. Oktober 2009

Hamburg, den 16. Oktober 2009



A handwritten signature in black ink that reads 'Jörg Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

GLIEDERUNG

GLIEDERUNG	1
ZUSAMMENFASSUNG	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Cytokinine und ihr Metabolismus	8
1.2 Adenosin-Kinase (ADK)	13
1.3 Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX)	15
1.4 Modellsystem: <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) B.S.G.	17
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Pflanzen	21
2.2 Chemikalien	21
2.3 Bioinformatische Analysen	21
2.4 Plasmidmaterial	24
2.4.1 Oligonukleotide	25
2.4.2 Rekombinante DNA Techniken	27
2.4.2.1 Kultur von <i>E.coli</i>	27
2.4.2.2 Herstellung elektrokompenter Zellen von <i>E. coli</i> zur Elektroporation	28
2.4.2.3 Elektroporation	28
2.4.2.4 Gewinnung von Plasmid-DNA	29
2.4.2.5 DNA-Restriktionsverdau	29
2.4.2.6 Agarosegel-Elektrophorese	30
2.4.2.7 Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen	30
2.4.2.8 Ligation in Plasmid Vektoren	31
2.4.2.9 PCR-Kolonie-Screening	31
2.4.2.10 Überprüfung durch Sequenzierung	32
2.5 Kultivierung der Pflanzen	33
2.5.1 Medien und Kulturbedingungen für die Anzucht von <i>Physcomitrella</i>	33
2.6 Genetische Transformation von <i>Physcomitrella</i>	34
2.6.1 Vorbereitung der <i>Physcomitrella</i> -Kulturen für die Protoplastierung	34
2.6.2 Medien und Material	35
2.6.3 Protoplastierung	35
2.6.4 Transformation	36
2.6.5 Selektion	36
2.7 Nachweis der Transgenese	37
2.7.1 Gewinnung von genomischer DNA nach der CTAB-Methode	37
2.7.2 Nukleinsäurefällung	39
2.7.3 Restriktion und Gel-Elektrophorese von genomischer DNA	39
2.7.4 Southern-Blot-Analyse	40
2.7.5 Denaturierung der aufgetrennten DNA	40

2.7.6	Transfer der DNA auf die Nylon-Membran	40
2.7.7	Fixierung der DNA auf die Membran	41
2.7.8	Herstellung von DIG-markierten Sonden.....	41
2.7.9	Prä-Hybridisierung, Hybridisierung und Detektion der DNA.....	42
2.8	Nachweis der Expression des <i>AtCKX2</i> Transgens	42
2.8.1	Gewinnung von RNA	42
2.8.2	DNase-Behandlung der extrahierten Gesamt-RNA.....	42
2.8.3	Reverse Transkription (RT) von RNA zu cDNA.....	43
2.8.4	Amplifizierung von cDNA mittels PCR	44
2.9	Protein-Extraktion und Bestimmung der Protein-Konzentration.....	44
2.9.1	ADK Enzym Assay	45
2.10	<i>In vivo</i> Metabolismusstudien von <i>PpADK1</i> -Transformanten;.....	46
2.11	Cytokinin Bestimmung.....	47
2.11.1	Vorbereitung der Material aus <i>PpADK1</i> -Transformanten für die LC-MS Messung... 48	
2.11.1.1	C ₁₈ -Festphasenextraktion von Cytokininen aus Kulturmedium.....	48
2.11.2	Vorbereitung des Materials aus tCKX-Transformanten für die LC-MS Messung.....	49
2.11.3	Bestimmung der endogenen Cytokinine mittels LC-MS	50
2.12	Phänotypische Untersuchungen der Transformanten.....	52
2.12.1	Induktion der Sporophytbildung und Kreuzungsexperimente.....	52
2.12.2	Stabilität der Transgenese in der F ₁	53
2.12.3	Flowzytometrie zur Feststellung der Ploidy	53
3	ERGEBNISSE.....	54
3.1	CYTOKININE IN <i>Physcomitrella patens</i>	54
3.2	ADENOSIN-KINASE	57
3.2.1	ADENOSIN-KINASE IN <i>Physcomitrella</i>	57
3.2.1.1	Alignment von Motiv 1 Sequenzen	59
3.2.1.2	Subzelluläre Lokalisierung der <i>Physcomitrella</i> ADKs.....	60
3.2.1.3	Genomische Organisation von <i>PpADK1</i> , <i>PpADK2</i> und <i>PpADK3</i>	61
3.2.1.4	Phylogenetische Analyse von ADK Sequenzen.....	62
3.2.2	VERSUCHE ZUR VERÄNDERUNG DER ENDOGENEN ADK-AKTIVITÄT	65
3.2.2.1	Herstellung eines Transformationsvektors für das Gen Adenosin-Kinase (pHP_Act1_ <i>PpADK1</i>).....	65
3.2.2.2	Transformation von <i>Physcomitrella</i> mit den Vektor pHP_Act1_ <i>PpADK1</i>	66
3.2.2.3	Studien zur Ploidy der <i>PpADK1</i> -Transformanten.....	67
3.2.2.4	PCR-Nachweis der Integration der ADK-Kassette (<i>Actin1-PpADK1-nos3</i> - Terminator) in das Genom von <i>Physcomitrella</i>	68
3.2.2.5	Beschreibung des Phänotyps des <i>PpADK1</i> -Transformanten	70
3.2.2.5.1	Gametophoren	70
3.2.2.5.2	Vergilbung der Phylloide	71
3.2.2.5.3	Verstärkte Bildung mittelständiger Rhizoide am Cauloid von <i>PpADK1</i> - Transformanten	72
3.2.2.5.4	Längere basale Rhizoide am Cauloid von <i>PpADK1</i> -Transformanten.....	72
3.2.2.5.5	Generative Reproduktionskapazität von <i>PpADK1</i> -Transformanten	73
3.2.2.6	<i>In vivo</i> Markierung mit Tritium-markiertem Isopentenyl-Adenosin (³ H-IPR).....	74
3.2.2.7	Verteilung von endogen synthetisierten Cytokinine sowie von ABA und IAA bei den <i>PpADK1</i> -Transformanten im Vergleich zum Wildtyp.....	76
3.2.2.7.1	Isoprenoid-Cytokinine im Gewebe	77
3.2.2.7.2	Isoprenoid-Cytokinine im Medium.....	81

3.2.2.7.3	Verteilung der Hormone ABA und IAA.....	82
3.3	CYTOKININ-OXIDASE/DEHYDROGENASE.....	83
3.3.1	CYTOKININ-OXIDASE/DEHYDROGENASE IN <i>Physcomitrella</i>	84
3.3.1.1	Genomische Organisation von <i>Physcomitrella CKXs</i>	84
3.3.1.2	Vergleich der <i>PpCKX</i> AS-Sequenzen sowie <i>targeting</i> Vorhersagen.....	86
3.3.1.3	Vergleich der <i>Physcomitrella CKX</i> -Sequenzen mit denen anderer Organismen..	89
3.3.2	ÜBEREXPRESSION VON <i>AtCKX2</i> IN <i>Physcomitrella</i>	92
3.3.2.1	Herstellung eines Vektors zur Überexpression von <i>AtCKX2</i> : pHP_Act1_AtCKX2	92
3.3.2.2	Überprüfung des pHP_Act1_AtCKX2 Konstrukts.....	94
3.3.2.3	Transformation von <i>Physcomitrella</i> mit pHP_Act1_AtCKX2.....	95
3.3.2.4	Nachweis der Transgenese bei den tCKX-Transformanten.....	95
3.3.2.4.1	PCR Nachweis.....	95
3.3.2.4.2	Southern Blot.....	96
3.3.2.5	Nachweis der Expression des <i>AtCKX2</i> -Transgens durch RT-PCR.....	97
3.3.2.6	Vergleich der <i>in vitro CKX</i> -Aktivität beim Wildtyp und den tCKX-Transformanten (tCKX7/tCKX16).....	99
3.3.2.7	Studien zur Ploidy der tCKX-Transformanten.....	100
3.3.2.8	Beschreibung von Wachstum und Phänotyp der tCKX-Transformanten.....	100
3.3.2.8.1	Biomasseproduktion unter Flüssigkulturbedingungen.....	100
3.3.2.8.2	Protonema.....	102
3.3.2.8.3	Gametophoren und Rhizoide.....	103
3.3.2.8.4	Vergilbung der Phylloide.....	105
3.3.2.8.5	Generative Fortpflanzung.....	106
3.3.2.9	Verteilung der endogenen Cytokinine bei den tCKX-Transformanten.....	106
3.3.2.9.1	Isoprenoid-Cytokinine im Gewebe.....	107
3.3.2.9.2	Isoprenoid-Cytokinine im Medium.....	110
3.3.2.9.3	Vorkommen und Verteilung aromatischer-Cytokinine.....	111
4	DISKUSSION.....	113
4.1	Cytokinine bei <i>Physcomitrella</i>	113
4.2	Adenosin-Kinase (ADK).....	115
4.2.1	Verwandtschaft von <i>Physcomitrella ADKs</i> mit <i>ADKs</i> anderer Organismen.....	116
4.2.2	Untersuchungen zur Überexpression der Adenosin-Kinase <i>PpADK1</i>	118
4.2.3	Metabolismus von ³ H-[9R]iP.....	120
4.2.4	Veränderungen des Profils endogener Cytokinine bei <i>PpADK1</i> -Transformanten...	121
4.2.5	Phänotypische Beobachtungen bei den <i>PpADK1</i> -Transformanten.....	124
4.3	Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX).....	126
4.3.1	Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase Gene in <i>Physcomitrella</i>	126
4.3.2	Phylogenetische Analyse der <i>PpCKXs</i>	128
4.3.3	<i>CKX</i> Überexpression: Veränderung der <i>CKX</i> -Aktivität.....	130
4.3.4	Verteilung der endogenen Cytokinine bei den tCKX-Transformanten.....	131
4.3.5	Effekte von Cytokinin-Mangel auf den Phänotyp.....	134
4.4	UNGEKLÄRTE FRAGEN UND PERSPEKTIVEN.....	136
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	137
6	ANHANG.....	146
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	146
6.2	Restriktionskarte und vollständige Sequenz von pHP_Act1_ <i>PpADK1</i>	148
6.3	Restriktionskarte und vollständige Sequenz von pHP_Act1_ <i>AtCKX2</i>	150
6.4	Phylogenetische Analyse von <i>Physcomitrella ADKs</i>	152

6.5	Phylogenetische Analyse von <i>Physcomitrella CKXs</i>	153
6.6	Verteilung der endogenen Cytokinine beim Wildtyp und den <i>PpADK1</i> - Transformanten tADK1-21 und tADK1-26	155
6.7	Konzentrationen von ABA und IAA beim Wildtyp und den <i>PpADK1</i> - Transformanten tADK1-21 und tADK1-26	157
6.8	Darstellung der endogene Cytokinine beim WT und die tCKX-Transformanten tCKX7 und tCKX16	158
6.9	Vorträge, Kongresse und Publikationen:.....	161

ZUSAMMENFASSUNG

Cytokinine (CK) sind Phytohormone, die eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Pflanzen spielen. Sie bewirken u.a. das Austreiben von Seitenknospen, die Verzögerung von Seneszenz sowie die Proliferation von Chloroplasten. Die Homöostase der Cytokinine wird auf den Ebenen der Biosynthese, Interkonversion und Konjugation sowie über Abbau reguliert. In den letzten Jahren konnte durch Charakterisierung von Genen, die in die Homöostase der Cytokinine involviert sind, sowie durch die Herstellung von transgenen Pflanzen eine Korrelation zwischen dem Gehalt endogener Cytokinine und der Regulation von Entwicklungsprozessen festgestellt werden, wobei jedoch viele molekulare Mechanismen noch unklar sind.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Cytokinininterkonversion sowie mit dem Cytokinin-Abbau bei der Modellpflanze *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Ziele der Arbeit waren: (a) Die umfassende Analyse des Cytokinin-Spektrums für den Bryophyten *Physcomitrella*, (b) Beiträge zur Aufklärung der Rolle der beiden Cytokinin-metabolisierenden Gene - Adenosin-Kinase (ADK) und Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX) - mit Hilfe von transgenen Pflanzen, (c) Die bioinformatische Identifizierung und Charakterisierung der *ADK*- sowie *CKX*-Multigenfamilien in *Physcomitrella*.

Mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)-basierten Erstellung des Cytokinin-Spektrums konnten insgesamt beim *Physcomitrella* Wildtyp 21 verschiedene Cytokinin-Metabolite identifiziert werden, die sechs verschiedenen Cytokinin-Gruppen angehören. Neben den bereits bei *Physcomitrella* zuvor nachgewiesenen Derivaten von Isopentenyladenin (iP) und *trans*-Zeatin (tZ), wurden Metabolite von *cis*-Zeatin (cZ) und dihydro-Zeatin (dHZ) als weitere Isoprenoid-Cytokinine gefunden. Zum ersten Mal für Bryophyten wurden auch die aromatischen Cytokinine Benzyladenin (BA) und Topolin (T) nachgewiesen. Intrazellulär stellten die cZ-Formen die Hauptcytokinine dar, mit *cis*-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid als Hauptmetabolit; extrazellulär stellten dagegen die iP-Formen die Hauptcytokinine dar, mit dem Hauptmetaboliten Isopentenyladenosin-Monophosphat.

Das Enzym Adenosin-Kinase (ADK) katalysiert u.a. die Interkonversion von Cytokinin-Ribosiden zu den entsprechenden Nucleotiden. Zusätzlich zu dem bei *Physcomitrella* bekannten *PpADK1*-Gen (Schwartzberg *et al.*, 1998) wurden in genomischen Datenbanken zwei weitere *PpADK*-Gene identifiziert und bioinformatisch charakterisiert. Auf der Grundlage von EST-Evidenzen kann davon ausgegangen werden, dass auch diese *ADK*-Gene exprimiert werden. Die *PpADK*-Gene weisen zueinander eine hohe Identität auf (59-87%). Analog zu anderen *ADKs* besitzen die *PpADKs* mit 10-12 Introns eine sehr fragmentierte Genstruktur. Zur Aufklärung der Rolle von *PpADK1* wurde *Physcomitrella* mit einem Actin1:*PpADK1*-Konstrukt transformiert und die erhaltenen Transformanten (tADK1) wurden anschließend hinsichtlich Cytokininstatus und Phänotyp charakterisiert.

Durch LC-MS-Analysen konnte für die *ADK1*-Transformanten eine intrazelluläre Senkung der Konzentrationen von *cis*-Zeatin-Ribosid und *cis*-Zeatin-Ribosid-Monophosphat, mit Werten, die nur 6,8% bzw. 3,7% des Wildtyp Gehalts entsprechen, sowie eine intra- und extrazelluläre Steigerung von *cZROG* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Für die restlichen Cytokinin-Formen wurden keine einheitlichen Änderungen bei den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Als phänotypische Folgen der Transformation konnte eine Verlängerung der Rhizoide sowie die Bildung mittelständiger Rhizoide am Cauloid beobachtet werden. Zusätzlich trat eine vorzeitige Vergilbung der Phylloide auf.

Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX) katalysiert den irreversibeln Abbau der *iP*-, *cZ*-, *tZ*-Basen und -Riboside. Mittels bioinformatischer Sequenzanalysen wurden sechs Mitglieder der *CKX*-Multigenfamilie von *Physcomitrella* identifiziert und charakterisiert. Diese clustern in zwei Gruppen und enthalten 2 bis 5 Introns. Die *CKX*-Gene von *Physcomitrella* besitzen zusammen mit denen des Moosfarns *Selaginella moellendorffii* mit bis zu 5 Introns die größte Fragmentierung im Vergleich zu den bisher bekannten *CKX*-Genen.

Die hergestellten transgenen Pflanzen (tCKX), die das *Arabidopsis AtCKX2*-Gen konstitutiv überexprimierten, zeigten eine starke Erhöhung (bis ca. 220-fach) der extrazellulären *CKX*-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Mit Ausnahme einer Reduktion von *tZ* (16% des Wildtyp Gehalts), konnten intrazellulär keine wesentlichen Veränderungen des Cytokininprofils nachgewiesen werden. Extrazellulär hingegen trat eine starke Reduktion von *iP* bzw. *iPR* (auf 1,8% bzw. 5%

des Wildtyp Gehalts) sowie eine Reduktion des iPR-Nukleotids (auf 50% im Vergleich zum Wildtyp) auf. Die gesteigerte CKX-Aktivität bei den tCKX-Transformanten führte zu einer Senkung des Gesamt-Cytokinin-Gehalts, wobei nur 68 bis 80% des beim Wildtyp vorliegenden Gesamt-Cytokinin-Gehalts gemessen wurden.

Bei den tCKX-Transformanten konnten zahlreiche phänotypische Veränderungen nachgewiesen werden: (a) Die Protonema-Zellen waren kürzer und runder, (b) die cytokininabhängige Knospenbildung trat später ein, (c) die Gametophoren zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine verfrühte Vergilbung, (d) bedingt durch die vollständige Abwesenheit von Antheridien und Archegonien waren die Pflanzen nicht in der Lage, Sporophyten zu bilden.

Aus den präsentierten Daten werden Rückschlüsse auf die Bedeutung von Cytokinin für die Wachstumssteuerung von Laubmoosen gezogen. Während im Fall der Adenosin-Kinase der genaue Mechanismus der gezeigten Einflussnahme auf Cytokiningehalt und Phänotyp noch einer weiteren Klärung bedarf, wird die wichtige Rolle der Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase für die Regulation der endogenen Cytokininaktivität bei *Physcomitrella* anhand der dargelegten Untersuchungsergebnisse deutlich.

1 EINLEITUNG

1.1 Cytokinine und ihr Metabolismus

Das Wachstum und die Morphogenese von Pflanzen werden genetisch und umweltbedingt reguliert. Die externen und internen Regulationsfaktoren münden unter anderem in Konzentrationsänderungen von Signalmolekülen wie Phytohormonen, welche eine Kette von Regulationsmechanismen auf lokaler und systemischer Ebene auslösen. Unter den Phytohormonen spielen die Cytokinine eine entscheidende Rolle bei der pflanzlichen Entwicklung.

Cytokinine sind Pflanzenhormone, die zum ersten Mal bei Tabakgeweben als zellteilungsfördernde Substanzen beschrieben wurden (Miller *et al.*, 1955). Natürlich vorkommende Cytokinine sind Adeninderivate, bei denen das N^6 -Stickstoffatom bestimmte Substituenten trägt. Der Rest am N^6 -Terminus kann sowohl aliphatischer- als auch aromatischer-Natur sein. Beide Formen sind bei Samenpflanzen weit verbreitet (Mok und Mok, 2001; Auer, 1997; Strnad, 1997).

Cytokinine kommen in allen Pflanzengeweben vor und werden von Zelle zu Zelle transportiert (Oka, 2003). Cytokinine regulieren vielfältige Prozesse, wobei sich einige Hormonwirkungen mit denen anderer Hormone überschneiden. Bei Samenpflanzen bewirken Cytokinine neben der Förderung der Zellteilung z.B.: (1) das Austreiben von Seitenknospen und die Hemmung der Auxin-vermittelten Apikaldominanz, (2) die Entfaltung der Blätter, (3) eine Verzögerung der Seneszenz, (4) eine Förderung der Samenkeimung, (5) eine Förderung der Proliferation von Chloroplasten, (6) die Signalwirkung bei Nährstoffbedarf sowie (7) Interaktionen zwischen Pflanze-Pathogen (Mok, 1994; Sakakibara, 2003).

Die häufigsten Cytokinine sind Formen von N^6 -(Δ^2 -Isopentenyl)-Adenin (iP) und die mit einer hydroxylierten Seitenkette versehenen Derivate *trans*- bzw. *cis*-Zeatin (*tZ*, *cZ*). Allerdings variiert die Verteilung der Cytokinin-Typen bei den verschiedenen Pflanzengruppen. Aus der Literatur ist abzuleiten, dass iP und Z sowie deren Metabolite die am häufigsten vorkommenden Cytokinine bei Algen, Moosen und Farnen sind. (Auer, 1997). Bei *Physcomitrella patens*, Bakterien und Myxomyzeten wurde iP als Hauptcytokinin beschrieben (Wang *et al.*, 1981; Letham und Palni,

1983). Bei Gymnospermen und Angiospermen dominieren Z- und deren reduzierte Form dihydro-Zeatin (dHZ). Bei Pappeln sowie zahlreichen anderen Pflanzen einschließlich Algen wurden auch aromatische-Cytokininverbindungen wie N^6 -Benzyladenin (BA) gefunden. (Letham *et al.*, 1979; Gerhäuser und Bopp, 1990; Auer, 1997; Werner *et al.*, 2001; Stirk *et al.*, 2003).

Der Stoffwechsel der Cytokinine wird auf insgesamt vier Ebenen reguliert: (1) Biosynthese, (2) Interkonversion der verschiedenen Cytokinin-Metabolite und -Formen, (3) Inaktivierung über Konjugatbildung und (4) Abbau (Degradation). Die Homöostase der Cytokinine in Anpassung an externe und interne Faktoren trägt so zur Koordination der pflanzlichen Entwicklungssteuerung bei.

Cytokinin-Biosynthese

Obschon in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte erzielt wurden, sind noch nicht alle Details der Cytokininbiosynthesewege aufgeklärt. Zwei Hauptwege sind bei Samenpflanzen vorgeschlagen worden: Der Adenylat-Isopentenyltransferase-Weg, aus dem Cytokinin-Nukleotide durch Kopplung von DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) oder HMPDP (Hydroxymethylpropandiphosphat) an ATP/ADP oder AMP entstehen (Kakimoto, 2003; Takei *et al.*, 2004). Die resultierenden Cytokinin-Nukleotide werden durch verschiedene Interkonversions-Reaktionen (s. Abb. 1.1) in die entsprechenden Riboside sowie Basen umgewandelt. Astot *et al.* (2000) beschrieben einen DMAPP-unabhängigen Biosyntheseweg für die Zeatin-Formen bei der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, wobei aus AMP und einem unbekanntem hydroxylierten *Precursor* Zeatin-Ribosid-Monophosphat gebildet wird.

Interessanterweise wird die Aktivierung einiger ATP/ADP-Isopentenyltransferasen durch die Verfügbarkeit von IAA, Cytokinin und Stickstoff reguliert (Miyawaki *et al.*, 2004).

Beim zweiten tRNA-abhängigen Biosyntheseweg werden bestimmte tRNA-Spezies durch tRNA-Isopentenyltransferasen isopentenyliert, wobei tRNA-gebundene Cytokininribosid-Monophosphate gebildet werden, welche nach Abbau der tRNA wiederum durch Interkonversionsreaktionen in entsprechende freie Riboside und Basen umgewandelt werden (Kakimoto, 2003; Takei *et al.*, 2004).

Für *Physcomitrella* ergaben die von Yevdakova *et al.* (2008) durchgeführten Untersuchungen Hinweise darauf, dass die Isoprenoid-Cytokinine bei diesem Organismus überwiegend aus dem tRNA-abhängigen Biosyntheseweg gebildet werden.

Cytokinin-Interkonversion

Da Cytokinine Adeninderivate darstellen, wird die Interkonversion der Basen, Nucleoside und Nucleotide überwiegend durch solche Enzyme katalysiert, die auch beim Adenin-Metabolismus vorkommen (vgl. Abb. 1.1). Allerdings ist im Normalfall deren Affinität für Adenin, Adenosin und AMP höher als für die entsprechenden Cytokinin-Formen (Chen, 1997)

Die 5'-Nucleotidase (5'-N; EC 3.1.3.5) katalysiert die Umwandlung der Cytokinin-Monophosphate in entsprechende Cytokinin-Riboside. Dieser Prozess kann durch die Aktivität der Adenosin-Kinase (ADK; EC 2.7.1.20) revertiert werden, wobei die Cytokinine wieder in die Nucleotidform überführt und somit inaktiviert werden (Abb. 1.1). Das Enzym Adenosin-Kinase sowie Versuche zur Modulation seiner Aktivität bildeten einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Die Cytokinin-Riboside werden durch die Adenosin-Nucleosidase (ADN; EC 3.2.2.7) zu freien Basen umgewandelt. Aus Weizen wurde eine Adenosin-Phosphorylase (AP; EC 2.4.2.1) isoliert, welche die Umwandlung der Base zum Nucleosid katalysiert (Chen und Petschow, 1978). Die Adenin-Phosphoribosyltransferase (APT; EC 2.4.2.7) ribophosphoryliert die Basen direkt zu den entsprechenden Nucleotiden. Dieser Weg ist bei *Physcomitrella* nur schwach ausgeprägt, die Umwandlung von iP zu iPRMP erfolgt überwiegend *via* iPR durch die ADK (Schwartzberg *et al.*, 2003)

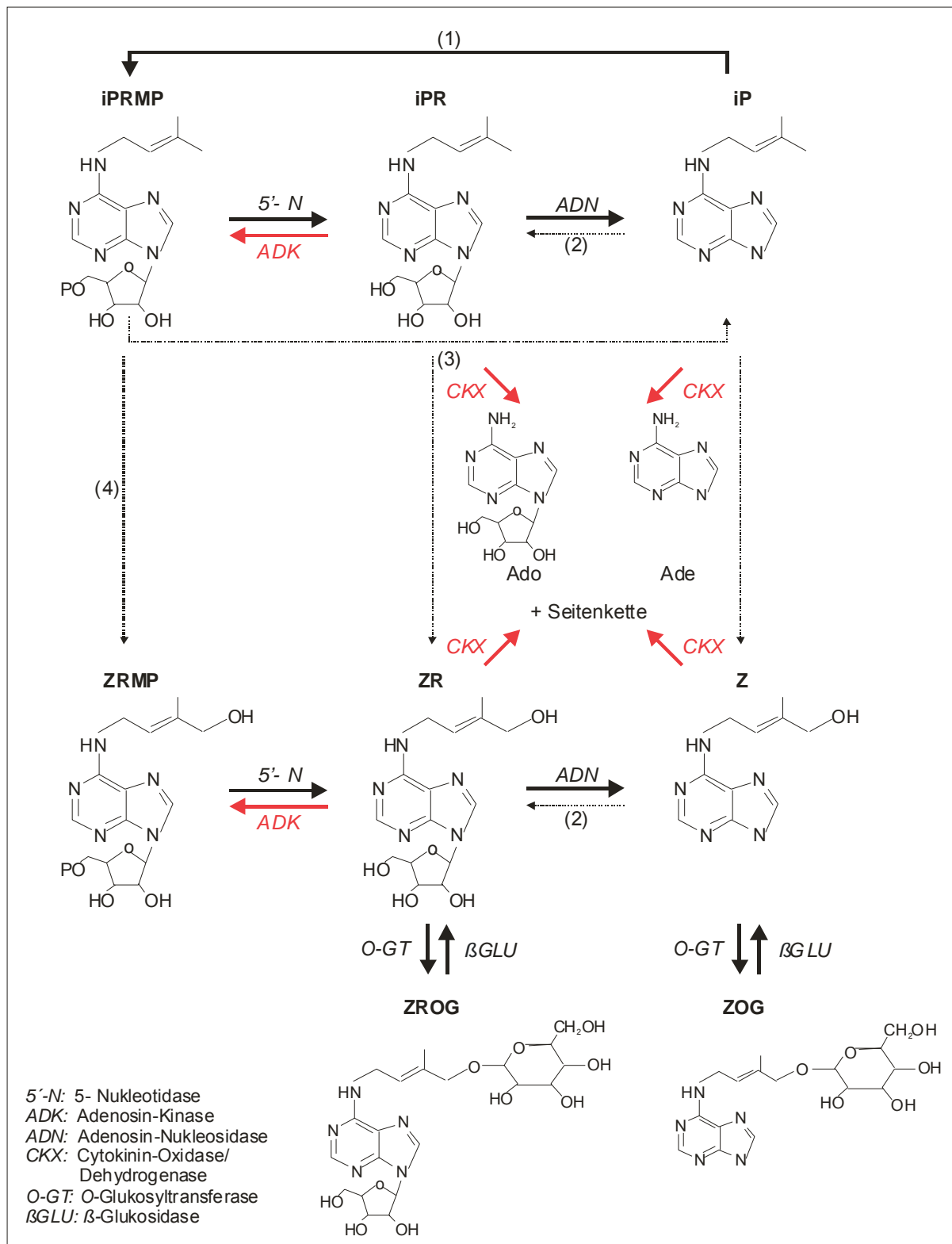


Abb. 1.1 Vereinfachtes Schema des Cytokininstoffwechsels mit den beteiligten Enzymen bei Samenpflanzen (verändert nach Chen, 1977; von Schwartzenberg *et al.*, 2003 und Kaminek *et al.*, 1997). (1) (APT) Adenin-Phosphoribosyltransferase (Base zu Nukleotiden) und (2) (AP) Adenosin-Phosphorylase (Base zu Nukleosiden), (3) (LOG) Phosphoribohydrolase (Nukleotide zu Base, Kurakawa *et al.*, 2007) (4) (CYP735) iPRMP zu iZRMP (Takei *et al.*, 2004). Cytokinine (CK): (iPRMP) Isopentenyl-5'-Monophosphat, (iPR) Isopentenyadenosin, (iP) Isopentenyadenin, (cZRMP) *cis*-Zeatin-5'-Monophosphat, (cZR) *cis*-Zeatin-Ribosid, (cZ) *cis*-Zeatin, (cZROG) *cis*-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid, (cZOG) *cis*-Zeatin-O-Glucosid. CKX-Reaktionsprodukte: (Ado) Adenosin und (Ade) Adenin.

In *Arabidopsis* wird die Hydroxylierung von iP-Nukleotiden zu den entsprechenden ϵ Z-Nukleotiden durch CYP735 (Cytochrom P450 Monooxygenasen) katalysiert (Takei *et al.*, 2004).

Inaktivierung

Cytokinin-Riboside und -Basen (*cisZ*, *transZ*, dHZ) können durch die Aktivität der O-Glucosyltransferase (O-GT; EC 2.4.1.118) (Abb. 1.1) zu O-Glucosiden umgewandelt werden, ein Prozess der durch β -Glucosidase revertiert werden kann. Cytokinin-O-Glucoside sind als solche biologisch aktiv. Sie sind in der Vakuole lokalisiert und sind resistent gegenüber der Inaktivierung durch die Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX) (McGaw und Horgan 1983; Kaminek *et al.*, 1997; McGaw und Burch, 1995). Cytokinine können durch N-Glucosyltransferasen auch zu N-Glucosiden (N^3 -, N^7 - und N^9 -) inaktiviert werden (Hou *et al.*, 2004), die höchstwahrscheinlich in der Vakuole lokalisiert sind (Kaminek *et al.*, 1997). Mit Ausnahme der N^3 -Glucoside scheinen diese Metabolite inaktiv zu sein (Faiss *et al.*, 1996). In *Physcomitrella* konnten bislang keine N-Glucoside gefunden werden (Schwartzberg *et al.*, 2003 und 2007).

Degradation

Die Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX; EC 1.5.99.12) ist bis jetzt das einzige bekannte Cytokinin-spezifische Enzym, welches Cytokinine irreversibel degradiert (s. Abb. 1.1). Substrate für dieses Enzym sind Cytokinin-Basen und -Riboside der iP- und Z-Formen sowie für einige CKX-Isoformen ebenfalls Nukleotide (Galuszka *et al.*, 2007).

CKX und Experimente zur Modulation ihrer Aktivität in *Physcomitrella* bilden (zusammen mit den Arbeiten zur ADK) die Schwerpunkte dieser Arbeit.

Die Kompartimentierung der Cytokinine innerhalb der Zellen und in verschiedenen Organen und Strukturen der Pflanzen ist auch entscheidend für die lokale- und systemische-Koordination des gesamten Pflanzenwachstums (Hirose *et al.*, 2007). In *Arabidopsis* wurden *IPT*-, *CKX*- sowie *ARR1*-Gene (Response-Regulatoren) in verschiedenen Organen und Gewebe, wie z.B. im Wurzel- und Sproßmeristem, in Lateralwurzeln, Stomata, Trichomen, jungen Blättern, jungen- und reifen-Blüten lokalisiert (Hirose *et al.*, 2007), was für eine lokale Bildung und Wirkung der

Cytokinine sprechen könnte. Hierbei ist die Funktion der einzelnen Cytokinin-Metabolite nicht ganz klar, jedoch wurde bei *Arabidopsis* festgestellt, dass *tZ*-Formen vorwiegend im Phloem vorkommen, während *iP*- und *cZ*-Formen überwiegend im Xylem auftreten, so dass jeweils eine systemische-Funktion in Aufwärts- und Abwärtsrichtung angenommen werden kann (Hirose *et al.*, 2007). Die Signaltransduktion der Cytokinine erfolgt durch ein Zwei-Komponenten-System (TCS) (Heyl und Schmülling, 2003), wobei je nach Wachstumsprozess entsprechende Gene hoch- oder herunterreguliert werden.

1.2 Adenosin-Kinase (ADK)

Das Enzym Adenosin-Kinase ist an verschiedenen Prozessen beteiligt: (1) Aufrechterhaltung der Konzentration von Nukleotiden, (2) Phosphorylierung und Recycling von Adenosin, welches aus dem SAM-Zyklus (S-Adenosylmethionin) in nennenswerten Mengen freigesetzt wird. Durch seinen Beitrag zur Aufrechterhaltung des SAM-Zyklus, ist die ADK indirekt an Methylierungsprozessen beteiligt (Weretilnyk *et al.*, 2001), z.B. der Bildung von Zellwand-Precursoren (Lignin, Pektin), sowie der DNA- und mRNA-Bildung (Schoor und Moffat, 2004), (3) Interkonversion von Cytokinin und (4) Abwehrreaktionen gegenüber pflanzlichen Pathogenen. Hierzu haben Wang *et al.* (2003) festgestellt, dass bei *Nicotiana tabacum* die ADK-Aktivität nach einer Infektion der Pflanze mit Geminiviren (Begomovirus und Curtovirus) sinkt und somit sowohl Methylierungsprozesse auch die virale DNA-Replikation reprimieren wird.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Beschreibung dieses Enzyms für die Interkonversion von Cytokinin-Ribosiden in entsprechende Nukleotide bei *Physcomitrella* sowie in der Identifizierung weiterer ADK-Isoformen im *Physcomitrella*-Genom.

Durch Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierten Cytokinin (iP und iPR) wurde gezeigt, dass bei der Cytokinin-Interkonversion in *Physcomitrella* die Bildung von Cytokinin-Nukleotiden im Gegensatz zu höheren Pflanzen nur zu einem geringen Teil über den zweistufigen ADN:APT-Weg erfolgt (s. Abb. 1.1), sondern

überwiegend direkt durch die Aktivität der ADK katalysiert wird (Schwartzenberg *et al.*, 2003).

Adenosin-Kinase (ADK) ist ein so genanntes *house-keeping*-Enzym, da es in der *up-stream*-Region seiner kodierenden Sequenz keine TATA- und CCAAT-Elemente enthält, sondern eine GC-reiche-Sequenz. Solche Gene werden in der Regel konstitutiv exprimiert (Moffatt *et al.*, 2000). Die ADK-Aktivität wurde in verschiedenen Organismen, wie Hefe (Caputto, 1951; Kornberg und Pricer, 1951), Säugetieren (Caputto, 1951), Samenpflanzen wie z.B. Lupine (Guranowski, 1979), Weizen (Chen und Eckert, 1977), Pfirsich (Faye und Le Floc'h, 1997) und dem Moos *Physcomitrella patens* (Schwartzenberg *et al.*, 1998) nachgewiesen. Auch für den Prokaryoten *Mycobacterium tuberculosis*, wurde ein *ADK*-Gen identifiziert und charakterisiert (Long *et al.*, 2003).

Die Phosphorylierung von Adenosin sowie der bioaktiven Cytokinin-Riboside zu den inaktiven Cytokinin-Nukleotiden erfolgt in Anwesenheit des Phosphatdonors ATP sowie eines bivalenten Metall-Ions wie Mg^{2+} . Das pH-Optimum liegt hierbei bei 6,8 bis 7,4 (Chen und Eckert, 1977; Anderson, 1977). Für eine aus Weizen partiell gereinigte ADK (Chen und Eckert, 1977) sowie für die beiden aus *Arabidopsis* isolierten *ADKs* (Moffat *et al.*, 2000), wurde eine höhere Affinität dieses Enzyms zu Adenosin als zu Isopentenyladenosin festgestellt. In *Arabidopsis* wurden beide Isomere, *AtADK1* und *AtADK2*, im Cytosol lokalisiert. Aus Tabak Bright Yellow 2 Zellen (TBY-2) wurde eine putative Cytokinin-spezifische *ADK* identifiziert und gereinigt (Laukens *et al.*, 2003).

In *Physcomitrella* wurde mit *PpADK1* bislang nur ein einziges *ADK*-Gen beschrieben (Schwartzenberg *et al.*, 1998). Die cDNA von *PpADK1* umfasst eine Länge von 1032 bp, welche für ein Protein mit ca. 37,2 kDa kodiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit anderen Sequenzen (Mensch, Ratte, Hamster) verglichen, und es wurden dabei zwei konservierte Bereiche festgestellt: der erste zwischen den Aminosäuren 86-109 und der zweite zwischen den Aminosäuren 289-301, welche möglicherweise für die Bindung der Pentose eine Rolle spielt (vgl. Spychala *et al.*, 1996). Der genomische *PpADK1*-Lokus in *Physcomitrella* (3565 bp)

wurde erstmals von Schulz (2001) charakterisiert, wobei 11 Introns beschrieben wurden.

1.3 Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX)

Cytokinine werden durch das Enzym Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase spezifisch und irreversibel inaktiviert (McGaw und Horgan, 1983), wobei eine Abspaltung der Isoprenoid-Seitenkette erfolgt. Die CKX gehört zu der Familie der Flavoproteine, welche eine FAD-Bindungsregion enthalten. Innerhalb dieser Familie können die verschiedenen Enzyme den FAD-Kofaktor jeweils entweder durch eine kovalente oder durch eine nicht kovalente-Bindung fixieren; Flavoproteine können auch je nach Umgebung, Substrat oder Elektronen-Akzeptor sowohl als Oxidase als auch als Dehydrogenase reagieren (Frébortová *et al.*, 2004).

Die CKX ist ein Holoenzym, bei dem das FAD durch eine kovalente Bindung an das Protein bindet (Galuszka *et al.*, 2001, 2005; Frébortová *et al.*, 2004). Diese Autoren stellten bei Mais fest, dass *ZmCKX1* sich wie eine Dehydrogenase verhält, so dass die Elektronen, nicht wie zunächst angenommen auf Sauerstoff übergehen (Whitty und Hall, 1974), sondern mit größerer Effektivität auf andere Elektronenakzeptoren übertragen werden (Malito *et al.*, 2004). Für *ZmCKX1* wurde ein zweites Redox-Zentrum für die Oxidation des Flavins gefunden, wobei verschiedene Substanzen (z.B. *p*-Chinone), die sowohl im Cytoplasma als auch in der Zellwand lokalisiert sein können, als Elektronakzeptoren vorgeschlagen wurden (Frébortová *et al.*, 2004). Verschiedene CKX-Isoformen mit einer molekularen Masse zwischen 56 und 64,9 kDa können entweder intra- oder extrazellulär vorkommen (Schmülling *et al.*, 2003). Substrate der CKX sind die Cytokinin-Formen N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-Adenin (iP) und Zeatin (Z) sowie ihre Riboside, wobei die Affinität gegenüber den verschiedenen Substraten je nach Enzym-Isoform variiert. Während in verschiedenen Arbeiten wie z.B. Whitty und Hall (1974), McGaw und Horgan (1983), Hare *et al.* (1994), Armstrong (1994) sowie Motyka *et al.* (1996) eine höhere Affinität der CKX zu iP-Formen als zu Z-Formen gemessen wurde, haben Galuszka *et al.* (2007) bei allen *AtCKX*-Isoformen festgestellt, dass Z ein besseres Substrat als iP ist. Als Produkte der Reaktion entstehen Adenin bzw. Adenosin sowie aus der Seitenkette hervorgehende Aldehyde (Galuszka *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004).

Andere Substrate, wie N^6 -Methyl-Isopentenyladenin, Kinetin, die aromatischen-Cytokinine Benzyladenin (BA), N^6 -(4-hydroxybenzyl)-Adenin und N^6 -(4-methoxybenzyl)-Adenin (Frébortová *et al.*, 2004) sowie N^6 -(2-isopentenyl)-Adenin-9-Glucosid und O-Acetylzeatin (Galuszka *et al.*, 2007) können ebenfalls durch CKX degradiert werden, obwohl dies z.T. mit deutlich niedrigeren Reaktionsraten geschieht.

Es besteht Unklarheit darüber, inwieweit CKX in der Lage ist Cytokinin-Nukleotide zu inaktivieren. Laloue und Fox (1989) haben bei Weizen-keimen gezeigt, dass iP-Nukleotide resistent gegenüber CKX-Aktivität sind. Untersuchungen mit *AtCKXs* bei transgenen Tabakpflanzen ergaben, dass die Nukleotide starke Substrate für einige CKX-Isoformen sind (Galuszka *et al.*, 2007).

O-Glucoside, dihydro-Zeatin-Formen sowie N^7 -Glucoside sind durch die CKX-Aktivität nicht degradierbar (McGaw und Horgan, 1983; Galuszka *et al.*, 2007). Verbindungen mit Cytokinin-Aktivität wie die Phenylharnstoff-Derivate, welche selbst keine CKX-Substrate sind, können dennoch eine Induktion der CKX-Aktivität hervorrufen (Chatfield und Armstrong, 1986; Kamínek und Armstrong, 1990). Kamínek und Armstrong (1990) haben für *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus lunatus* gezeigt, dass iP nicht so effizient wie Z bei der Induktion der CKX-Aktivität ist. Dagegen erwiesen sich iP- sowie Z-Formen bei *DsCKX1* aus *Dendrobium sonia* als schlechtere Induktoren im Vergleich zu Benzyladenin (BA) (Yang *et al.*, 2003).

In verschiedenen Arbeiten wurde eine Modulation der endogenen CKX-Aktivität beschrieben: (1) durch extern applizierte Cytokinine bei Kalluskulturen von *Phaseolus vulgaris* (Chatfield und Armstrong, 1986; Dietrich *et al.*, 1995), (2) durch die Inhibierung der CKX bei Sojabohnen (Hare und van Standen (1994), (3) durch endogene Akkumulation von Cytokinin bei IPT-transgenen Tabak-Kalli (Motyka *et al.*, 1996) sowie (4) durch Überexpression verschiedener *AtCKX*-Gene in *Arabidopsis* (Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007).

Die Cytokinin-gesteuerte CKX-Induktion ist begleitet von einem Anstieg der CKX-mRNA- sowie Protein-Synthese (Chatfield und Armstrong, 1986), obwohl der Anstieg der CKX-Aktivität höher als der Anstieg des gesamten CKX-Proteins war (Motyka und Kamínek 1990).

1.4 Modellsystem: *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.

Für die Erforschung von zellbiologischen Prozessen an Laubmoosen wurden bisher überwiegend die Arten *Physcomitrella patens*, *Funaria hygrometrica* und *Ceratodon purpureus* verwendet.

Physcomitrella zeigt, wie Moose im Allgemeinen, eine große vegetative Regenerationsfähigkeit. Eine sexuelle Reproduktion ist für die Vermehrung nicht erforderlich, da größere Gewebemengen durch vegetative Vermehrung unter *in vitro*-Kulturbedingungen gewonnen werden können.

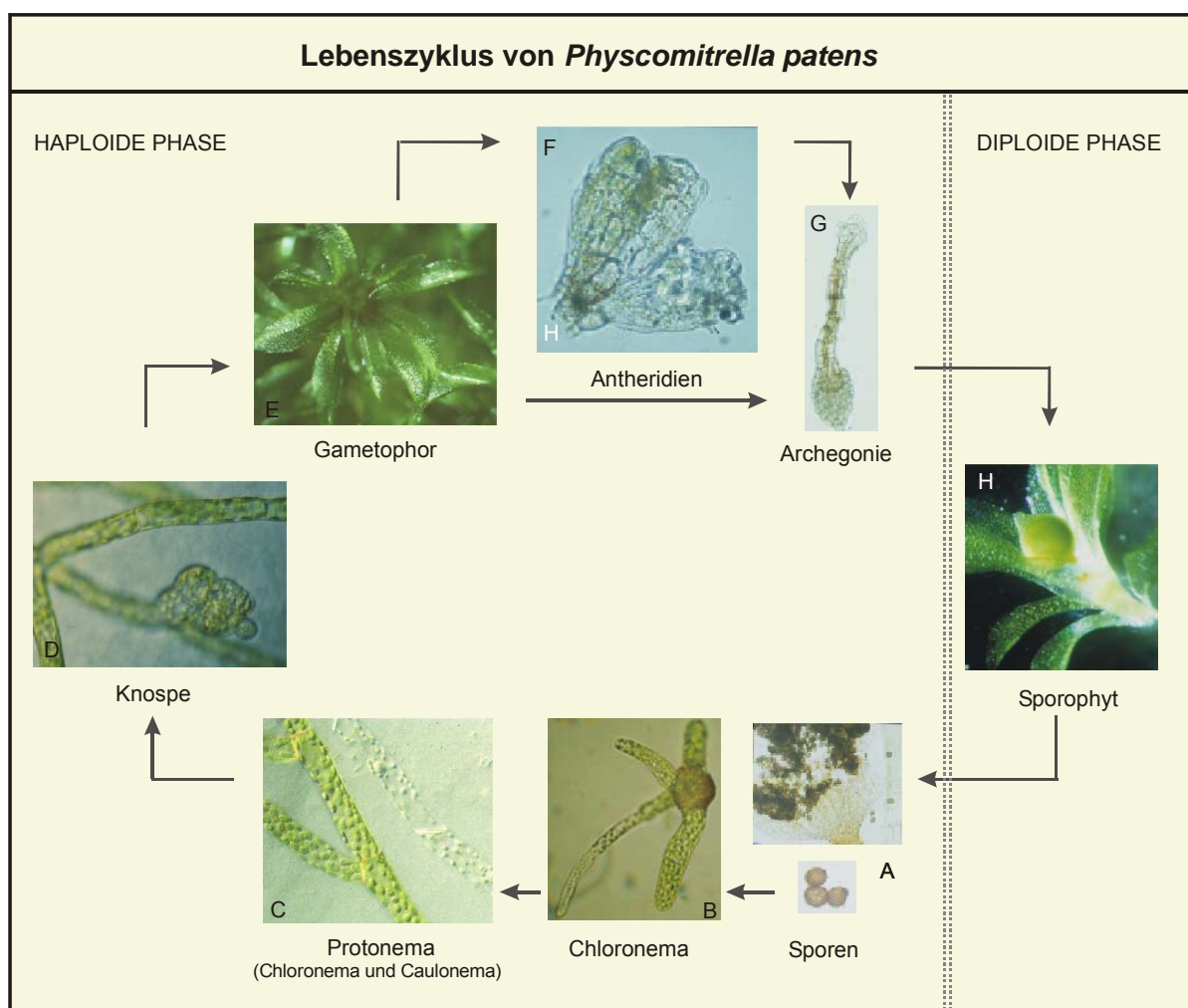


Abb. 1.2 Generationswechsel und Lebenszyklus des Laubmooses *Physcomitrella patens*. (A) Sporen die aus dem reifen Sporophyten freigesetzt werden. (B) Keimende Spore bildet primäres Chloronema. (C) Protonema, filamentöse Zellen die aus Chloronema- (rechts) und Caulonema-Zellen (links) bestehen. (D) Aus Caulonema-Zellen bilden sich die Knospen, welche eine dreidimensionale Struktur besitzen und sich zu (E) Gametophoren weiter entwickeln. (H, I) Apikal auf einem Gametophoren entwickeln sich die Antheridien und Archegonien (monözisch). Die Antheridien befinden sich basal neben den Archegonien, die Befruchtung erfolgt in Anwesenheit von Wasser. (H) Im diploiden Sporophyten findet die Meiose statt (jede Kapsel enthält ca. 5000 Sporen) (Bilder B, C und D stammen aus der Aufnahmesammlung von Dr. K. von Schwarzenberg).

Beim *Physcomitrella*-Lebenszyklus handelt es sich um einen typischen heterophasischen heteromorphen Generationswechsel, bei dem der Gametophyt überwiegt und der kleine Sporophyt in Abhängigkeit vom Gametophyten wächst (Abb. 1.2). Der Entwicklungszyklus beginnt mit der Keimung haploider Sporen (Bopp und Azorn, 1992). Bereits nach 48 h entwickeln sich aus den Sporen Chloronemafäden (Abb. 1.2 A, B). Die Chloronemazellen besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von ca. 18 µm und eine Länge von ca. 115 µm. Sie sind durch einen hohen Gehalt an Chloroplasten sowie durch in Bezug auf die Filamentachse senkrechte Zwischenwände charakterisiert. Die apikalen Chloronemazellen teilen sich innerhalb von ca. 20 h (Cove und Knight, 1993).

Ungefähr acht Tage nach der Sporenkeimung entstehen aus Chloronemafäden die Caulonemafäden, welche im Gegensatz zum Chloronema weniger Chloroplasten enthalten. Die Zellzwischenwand ist außerdem schräg (Abb. 1.2 C). Die Caulonemazellen sind mit 130-180 µm ein wenig länger, als die Chloronemafäden. Apikale Caulonemazellen teilen sich in einem zeitlichen Abstand von ca. acht h (Cove und Knight, 1993).

Das Auftreten von Caulonema wird durch Auxine induziert. An Caulonema entstehen an sogenannten *side branch initials* neue Verzweigungen. Cytokinine bewirken die Entwicklung von Knospen, welche sowohl aus Chloronema als auch aus Caulonema entstehen (Reski und Abel, 1985). Aus 3% der Caulonemaverzweigungen entstehen acht Tage nach der Caulonemabildung die Knospen (Cove und Knight, 1993), welche sich in eine dreidimensionale Struktur, den Gametophoren, entwickeln (Abb. 1.2 D, E). Am Cauloid entwickeln sich Rhizoide, die sich durch positiv gravitropes Wachstum auszeichnen. Am Gametophor bilden sich Antheridien und Archegonien (Abb. 1.2 F, G). Nach Befruchtung der Eizelle durch Spermatozoide entsteht aus der Zygote der diploide Sporophyt (Abb. 1.2 H), in welchem sich die Meiose vollzieht und nach Reifung die haploiden Sporen entstehen.

Physcomitrella als Modellpflanze

In den letzten 20 Jahren haben sehr viele Arbeiten und Veröffentlichungen dazu beigetragen, *Physcomitrella* als Modellsystem zu etablieren (Cove *et al.* 1997; Reski 1998 und 1999). Die hohe Regenerationskapazität von *Physcomitrella* sowie die dominierende haploide Phase des Gametophors erleichtern u.a. phänotypische und

genetische Analysen. Obwohl der Stoffwechsel von *Physcomitrella* durch Wachstumssubstanzen (z.B. Cytokinine, Auxine und Abscisinsäure) sowie abiotische Faktoren reguliert wird, erfolgt die Kultivierung und Vermehrung von *Physcomitrella* ohne externe Zugabe von Hormonen.

Die genetische Manipulation von *Physcomitrella* durch die Herstellung von modifizierten Pflanzen kann durch verschiedene Methoden erzielt werden: (1) Mutagenese durch Bestrahlung oder Chemikalien; (2) genetische Transformation mittels Polyethylenglycol (PEG), *gene gun* bzw. durch *Agrobacterium tumefaciens*; (3) effiziente homologe Rekombination bei PEG-vermittelter Protoplastentransformation (Cove, 2005); (4) RNA interference (RNAi, Benzanilla *et al.*, 2003) sowie (5) artificial microRNAs (amiRNAs, Khraiwesh *et al.*, 2008) machen das Moos für moderne Biotechnologie interessant.

Phylogenetische Analysen sowie die Entdeckung neuer Gene sind Dank der vielfältigen Ressourcen für *Physcomitrella* in Form von EST- und Genom-Datenbanken möglich (<http://www.cosmoss.org/>; <http://genome.jgi-psf.org/>; Rensing *et al.*, 2008).

Physcomitrella ist auf Grund der genannten Eigenschaften sowie durch die Verfügbarkeit eines breiten Methodenspektrums ein hochinteressantes pflanzliches System für molekulargenetische Studien.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Modellpflanze *Physcomitrella patens* wurde für diese Arbeit auf Grund physiologischer und genetischer Merkmale sowie auf Grund ihrer phylogenetischen Position zum Studium des Cytokinin-Haushaltes verwendet. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Beschränkt sich das Vorkommen von Cytokinin bei *Physcomitrella* auf die bereits identifizierten iP- und Z-Formen oder kommen weitere Formen vor?
- Wenn zusätzlichen Cytokinin-Formen vorhanden sind, kann ihnen eine biologische Funktion zugeordnet werden?
- Existiert bei *Physcomitrella* eine Multigenfamilie für ADK-Gene? Wenn ja, wie ist diese beschaffen?

- Wie ist die CKX-Multigenfamilie bei *Physcomitrella* beschaffen?
- Inwieweit lässt sich der Cytokininhaushalt von *Physcomitrella* über Modulierungen der ADK- und CKX-Aktivität steuern? Welche Folgen entstehen dabei im Profil der endogenen Cytokinine?
- Welche phänotypischen Merkmale zeigen die *Physcomitrella* ADK- und CKX-modifizierten Pflanzen?

Aus den resultierenden Ergebnissen werden Rückschlüsse auf die Bedeutung verschiedener Cytokinin-Formen sowie auf die Rolle der ADK- und CKX-vermittelten Regulation der Cytokininaktivität hinsichtlich der pflanzlichen Entwicklungssteuerung gezogen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzen

Für diese Arbeit wurde das Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. aus der Sammlung des Biozentrums Klein Flottbek der Universität Hamburg verwendet. Der Wildtypstamm (WTL4) geht auf den Stamm 16/14 zurück, der von H.L.K Whitehouse in Gransden Wood, Huntingdonshire (England) gesammelt und von Engel (1968) subkultiviert wurde.

2.2 Chemikalien

Die für Nährmedien (Pflanzen und Bakterien) verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Gibco (Karlsruhe), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Neolab (Frankfurt am Main) bezogen. Die Restriktionsendonukleasen, die Enzyme für die Klonierung und für die PCR sowie die dazugehörigen Puffer stammen von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Von der Firma Roche (Mannheim) wurden die Chemikalien für die Detektion von Nukleinsäuren mittels Southern-Blot bezogen, Röntgenfilme stammten von den Firmen Amersham (Freiburg) und Roth (Karlsruhe). Für die Extraktion von RNA wurden Kits der Firma Invitex (Berlin) verwendet.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Nährmedien und Lösungen mit Reinstwasser (Milli Q-Wasser System, Millipore, Eschborn) hergestellt.

2.3 Bioinformatische Analysen

Verschiedene annotierte-Proteinsequenzen von Landpflanzen, Tieren und Bakterien wurden aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) bezogen. Die nicht als Proteinsequenz annotierten Referenzsequenzen aus folgenden Landpflanzen stammen aus Recherchen in den Datenbanken des Joint Genome Institute (JGI, USA, <http://genome.jgi-psf.org/>): *Populus trichocarpa*, *Pichia stipitis*,

Ostreococcus lucimarinus, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*. Alle erhaltenen Referenz-Sequenzen wurden in weiteren Studien als Vergleich zu den in *Physcomitrella* identifizierten Genen bei phylogenetischen sowie Intro-Exon-Verteilungsanalysen verwendet.

Im folgenden sind die Namen der Spezies, sowie die entsprechenden Genbezeichnungen mit Accession-Nummern die für die Sequenzvergleiche der ADK verwendet wurden, angeben (vgl. 3.2.1): *Pichia stipitis* ADK (*PsADK*, XP_001383404, jgi: Chr_3.1), *Ostreococcus lucimarinus* ADK (*OIADK*, XP_001420220, jgi: Scaffold Chr_10) *Chlamydomonas reinhardtii* ADK (*CrADK*, XP_001693336, jgi: Scaffold 19), *Volvox carteri* (*VcADK*, C_180104, jgi: Scaffold 18), *Physcomitrella patens* ADK1 (*PpADK1*, O49923, jgi: Scaffold 74), *Physcomitrella patens* ADK2 (*PpADK2*, jgi: Scaffold 5), *Physcomitrella patens* ADK3 (*PpADK3*, jgi:Scaffold 415), *Selaginella moellendorffii* ADK1 (*SmADK1*, jgi: Scaffold 49), *Selaginella moellendorffii* ADK2 (*SmADK2*, jgi: Scaffold 3), *Nicotiana tabacum* ADK isoform 2S (*NtADKiso2S*, AAU14833), *Solanum tuberosum* ADK isoform 1T (*StADKiso1T*, ABB72823), *Arabidopsis thaliana* ADK1 (*AtADK1*, NP_187593), *Arabidopsis thaliana* ADK2 (*AtADK2*, NP_195950), *Populus trichocarpa* ADK (*PtADK*, ABK92937, jgi Scaffold 720), *Vitis vinifera* ADK (*VvADK*, CAO68929), *Medicago trunculata* ADK (*MtADK*, ABE81561), *Oryza sativa subsp. japonica* ADK (*OsjADK*, NP_001053323), *Zea mays* ADK (*ZmADK*, CAB40376), *Equus caballus* ADK long form (*EcADK*, XP_001503997), *Homo sapiens* ADK long form (*HsADK*, NM_006721), *Cricetulus griseus* ADK (*CgADK*, P55262) und *Rattus norvegicus* ADK (*RnADK*, U57042).

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine CKX-Sequenzen von *Physcomitrella* bekannt. Daher wurden in der JGI-*Physcomitrella*-Datenbank Aminosäure-Alignments aus den bekannten Sequenzen von Pflanzen und Bakterien erstellt, um die mögliche *PpCKX* identifizieren zu können. Da nicht alle beim JGI vorgegebenen Gen-Modelle komplett waren, wurden die fehlenden Teile der erhaltenen Gene mit Hilfe der *Physcomitrella*-Cosmoss-Datenbank (<http://www.cosmoss.org/bm/BLAST>) vervollständigt (Rensing *et al.*, 2008). Im Folgenden sind die Namen der Spezies, sowie die entsprechenden Genbezeichnungen mit Accession-Nummern, die für die

Sequenzvergleiche verwendet wurden (vgl. 3.3.1), angeben: *Zea mays* CKX1 (ZmCKX1, NP_001105591), *Zea mays* CKX2 (ZmCKX2, NP_00115526), *Zea mays* CKX3 (ZmCKX3, CAE55201), *Arabidopsis thaliana* CKX1 (AtCKX1, NP_181682), *Arabidopsis thaliana* CKX2 (AtCKX2, NP_565455), *Arabidopsis thaliana* CKX3 (AtCKX3, NP_200507), *Arabidopsis thaliana* CKX4 (AtCKX4, NP_194703), *Arabidopsis thaliana* CKX5 (AtCKX5, NP_177678), *Arabidopsis thaliana* CKX6 (AtCKX6, AAG30909), *Arabidopsis thaliana* CKX7 (AtCKX7, NP_850863), *Hordeum vulgare* CKX2 (HvCKX2, AF540382), *Populus trichocarpa* CKX1 (PtCKX1, JGI: Scaffold 220), *Populus trichocarpa* CKX2 (PtCKX2, JGI: Scaffold LgII), *Populus trichocarpa* CKX3 (PtCKX3, JGI: Scaffold LgIII), *Populus trichocarpa* CKX4 (PtCKX4, JGI: Scaffold LgV), *Populus trichocarpa* CKX5 (PtCKX5, JGI: Scaffold LgVI), *Populus trichocarpa* CKX6 (PtCKX6, JGI: Scaffold LgXVI), *Dendrobium cv. Sonia* CKX (DsCKX, AJ294542), *Dendrobium huoshanense* CKX (DhCKX, ABM98099), *Pisum sativum* CKX1 (PsCKX1, ABK32520), *Medicago truncatula* CKX1 (MtCKX, ABN05760), *Vitis vinifera putative* CKX (VvCKX, CAO43883), *Oryza sativa putative* CKX (OsCKX, BAD09964), *Oryza sativa* CKX2 (OsCKX2, BAB56095), *Oryza sativa* CKX3 (OsCKX3, NP_001064886), *Oryza sativa* CKX4 (OsCKX4, NP_001045353), *Oryza sativa* CKX5 (OsCKX5, NP_001044409), *Selaginella moellendorffii* CKX1 (SmCKX1, Scaffold 86), *Selaginella moellendorffii* CKX2 (SmCKX2, Scaffold 26), *Selaginella moellendorffii* CKX3 (SmCKX3, Scaffold 34), *Selaginella moellendorffii* CKX4 (SmCKX4, Scaffold 20), *Nostoc sp.* CKX1 (NsCKX1, NP_484368), *Legionella pneumophila* CKX (LpCKX, YP_094928)

Die Untersuchungen auf mögliche EST-Sequenzen für erhaltene Gen-Modelle wurden mit der *Physcomitrella*-Cosmos-Datenbank durchgeführt.

Multiple Sequence Alignments sowie phylogenetische Analysen wurden mit Hilfe des Programms CLUSTAL-W (<http://align.genome.jp/>, Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt und als NJ-tree (*neighbour-joining*-Stammbaum) dargestellt.

Die molekulare Masse von Proteinen anhand der AS-Sequenz wurde mit Hilfe des ExPASy-Servers (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>, Gasteiger *et al.*, 2005), abgeleitet.

Die erwartete subzelluläre Lokalisierung von Proteinen wurde mittels dreier Programme bestimmt: WOLF PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>, Horton 2007), MultiLoc: (<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/>,

Höglund *et al.*, 2006) sowie Target-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, Emanuelsson *et al.*, 2007). Signalpeptide sowie deren mögliche Spaltungsstelle wurde über Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) vorhergesagt.

2.4 Plasmidmaterial

Zur Überexpression eines heterologen *CKX*-Gens sowie zur Modulation der endogenen *PpADK1*-Expression wurden verschiedene Konstrukte hergestellt. Hierbei diente als Ausgangsmaterial (s. Abb. 2.1):

Das Plasmid pcAKPp_35S_nptII (Abb. 2.1, A), das die *PpADK1*-cDNA aus *Physcomitrella* (Acc. No. YT15430) enthält, wurde von Dr. Peter Schulz hergestellt (Schulz, 2001).

Das Plasmid PCR BluntII TOPO_CKO_cDNA wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Thomas Schmüling (FU-Berlin) zur Verfügung gestellt. Hierbei war die *AtCKX2*-cDNA aus *Arabidopsis* (Acc. No. AF303978) in den Vektor PCR® BluntII TOPO® (Invitrogen) kloniert worden (Abb. 2.1, B).

Der Vektor pBAS GFP enthält das *GFP*-Gen (*green fluorescence protein* aus *Aequorea victoria*, Acc. No. P42212), welches zur Expression in Pflanzen durch den Actin1-Promotor aus Reis (Acc. No. S44221) und den *nos3*-Terminator (Acc.No. AY560326) flankiert wird. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mathias Zeidler, (Univ. Gießen) zur Verfügung gestellt (Abb. 2.1, C).

Ein weiteres Konstrukt, ursprünglich von Dr. Pazkowski (FMI, Basel) bezogen, stand zur Verfügung. Das Konstrukt pHP23_S_B (ohne *Sall* und *BamHI*, Abb. 2.1, D) enthält das *nptII*-Gen (Neomycinphosphotransferase), welches eine Resistenz gegenüber dem Kanamycin-Derivat G418 vermittelt und hier unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors steht. Für Kontrollexperimente wurde ein weiteres Plasmid pBSKS_35S_nptII zur Verfügung gestellt (nicht dargestellt).

Die zur Verfügung gestellten sowie hergestellten Konstrukte wurden in das Wirtsbakterium *Escherichia coli* XL1blue^{a,b}, Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44* (Stratagene, La Jolla, USA) transferiert und vermehrt.

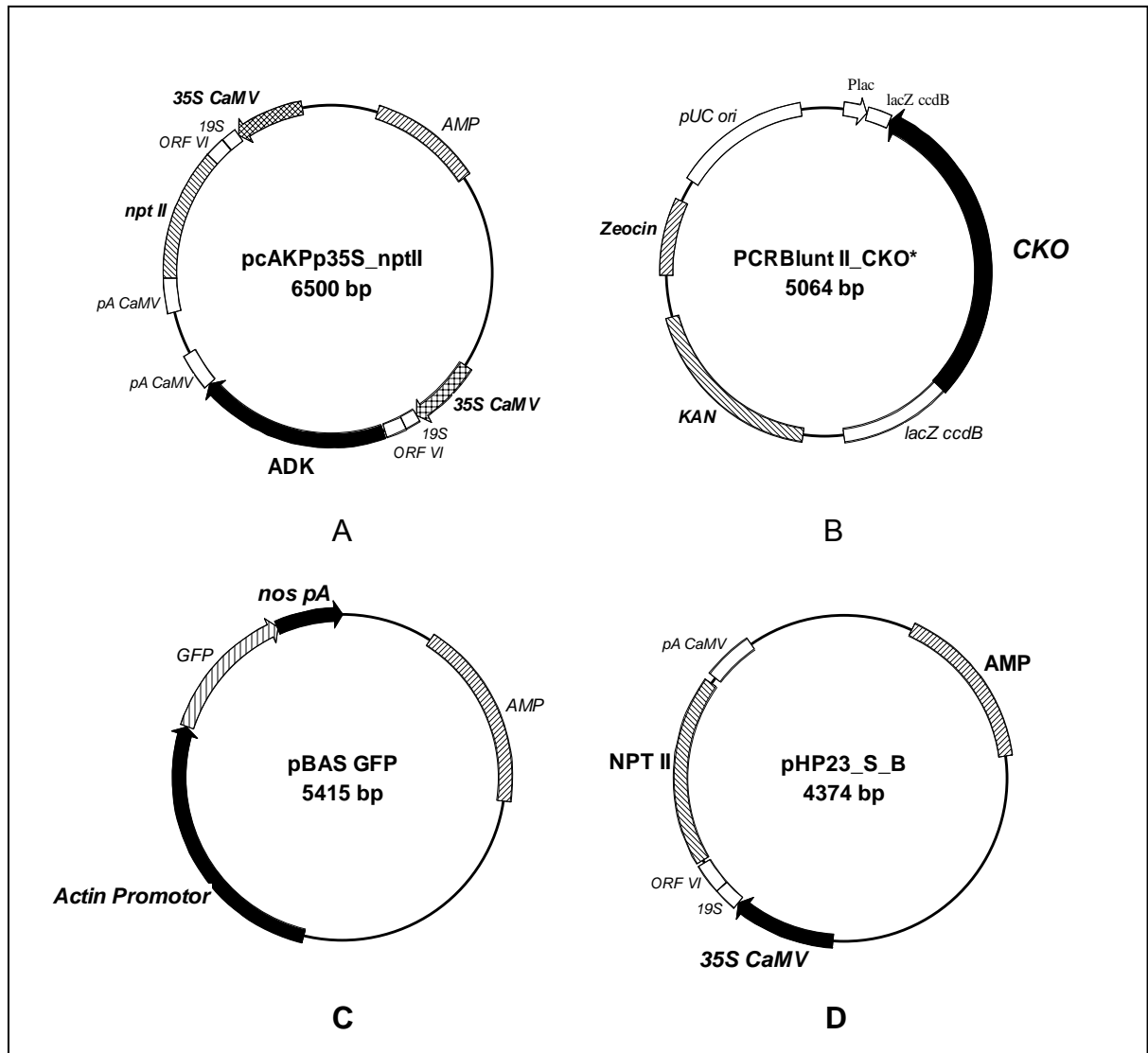


Abb. 2.1 Plasmidkarten der verwendeten Ausgangskonstrukte (A) pcAKPp_35S_nptII, (B) PCRBlunt II TOPO_CKOcDNA, (C) pBAS GFP und (D) pHP_S_B für die Herstellung der *PpADK1*- und *tCKX*-Transformationsvektoren.

2.4.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bestellt. Primer zur Überprüfung der Anwesenheit des *PpADK1*-Konstruktes und des *AtCKX2*-Konstruktes im Genom der transformierten Pflanzen sowie zum Nachweis der Expression der *AtCKX2* sind in Tab. 1 angegeben.

Tab. 1 Verwendete Primer für die Sequenzierung des inneren Bereiches der *AtCKX2* sowie zur Verifizierung der *pHP_Act1_AtCKX2*- und *pHP_Act1_PpADK1*-Konstrukten (Pr351 bis Pr124). Verwendete Primer für die Verifizierung der Anwesenheit des *PpADK1* im Genom (Pr195 bis Pr182). Verwendete Primer für den Expressions-Nachweis der *AtCKX2* (Pr92 bis Pr169). *gADK1*: genomische *ADK1*-Sequenz, *cADK1*: cDNA Sequenz.

	Primer	T(°C)	Sequenz	Beschreibung/Lokalisierung	
Verwendete Primer für die Klonierung der <i>tCKX</i> - und <i>tADK1</i> -Transformanten sowie die spätere PCR-Verifizierung und Sequenzierung	Pr351 (rev)	54,7	5'_AGT ACG CTG ACG TGG C_3'	5' <i>AtCKX2</i> -cDNA Ende	
	Pr352 (forw)	48,7	5'_ATG AGG AAG TTC CCC A_3'	3' <i>AtCKX2</i> -cDNA Anfang	
	Pr77 (forw)	55,4	5'_GTT GAG CAT ATA AGA AAC CC_3'	Ende CaMV Term	
	Pr76 (rev)	49,5	5'_TTG GAC TAT CCC GAC TCT CT_3'	Anfang des Actin 1-Promotors	
	Pr109 (forw)	53,2	5'_TCC CGT ATC GTA GTT ATC TA_3'	Ende der Ampicilin (reverse Seq)	
	Pr110 (forw)	59,4	5'_ATC ACC GTG AGT TGT CCG CA_3	Mitte des Actin1-Promotors	
	Pr111 (rev)	59,4	5'_TGC GGA CAA CTC ACG GTG AT_3'	Mitte des Actin1-Promotors	
	Pr112 (rev)	57,3	5'_CGT CAG CCA TCT TCT ACC TA_3'	Ende des Actin1-Promotors	
	Pr113 (forw)	55,3	5'_GAT ACC AGA GAT CGA TGA AG_3'	Ende der <i>AtCKX2</i> -cDNA	
	Pr114 (forw)	55,3	5'_CCA TCC TTC GAA AGT CAG TA_3'	Ende der <i>PpADK1</i> -cDNA	
	Pr115 (forw)	55,3	5'_TGC ACT CTC AGT ACA ATC TG_3'	Vektor, Bereich nach der Nos3T	
	Pr116 (forw)	57,3	5'_AGC TTG TCT GTA AGC GGA TG_3'	Zwischen Ampicilin und Nos3T	
	Pr117 (forw)	57,3	5'_AGA GAG TCG GGA TAG TCC AA_3'	Anfang des Actin 1-Promotors	
	Pr123 (rev)	59,4	5'_GTG CCA CCT GAC GTC TAA GA_3'	Vektor nach den Nos3T	
Pr124 (forw)	53,2	5'_GGT CTT GCG ATG ATT ATC AT_3'	Anfang der Nos3T		
Verwendete Primer für die Verifizierung der Anwesenheit von <i>PpADK1</i> in dem Genom von den <i>tADK1</i> -Transformanten	Pr195 (forw)	65	5'_TGC GAT CCG CCG TTG TTG_3'	-	Act1-Prom (1132 bp)
	Pr52 (rev)	64	5'_GGG AAG GTG CTT GTC CTC AG_3'	<i>PpgADK1</i> (792 bp)	<i>PpcADK1</i> (182 bp)
	Pr48 (forw)	64	5'_CTG AGG ACA AGC ACC TTC CC_3'	<i>PpgADK1</i> (774 bp)	<i>PpcADK1</i> (164 bp)
	Pr54 (rev)	58	5'_TCC TGA TGG TGT TCT GAG TA_3'	<i>PpgADK1</i> (1258 bp)	<i>PpcADK1</i> (258 bp)
	Pr53 (forw)	58	5'_TAC TCA GAA CAC CAT CAG GA_3'	<i>PpgADK1</i> (1238 bp)	<i>PpcADK1</i> (238 bp)
	Pr45 (rev)	62	5'_GAA GAT CCT CGT CCA CAT CG_3'	<i>PpgADK1</i> (1864 bp)	<i>PpcADK1</i> (394 bp)
	Pr43 (forw)	64	5'_CGA CCA CTT GAA GAA GCC AG_3'	<i>PpgADK1</i> (2100 bp)	<i>PpcADK1</i> (477 bp)
	Pr51 (rev)	68	5'_AAG AAC TGG CAG ATG AAC GG_3'	<i>PpgADK1</i> (2720 bp)	<i>PpcADK1</i> (653 bp)
	Pr40 (forw)	68	5'_TAA GGA CCC TCT TAT GGA GC_3'	<i>PpgADK1</i> (2721 bp)	<i>PpcADK1</i> (654 bp)
	Pr39 (rev)	62	5'_TGG GTG CCG CCA GCT TTC GG_3'	<i>PpgADK1</i> (3096 bp)	<i>PpcADK1</i> (809 bp)
	Pr38 (forw)	60	5'_TTG CGC AAG TTC AAG GCT GG_3'	<i>PpgADK1</i> (2882 bp)	<i>PpcADK1</i> (725 bp)
	Pr37 (rev)	56	5'_GAC AAG AAC CCT CCG ACA AA_3'	<i>PpgADK1</i> (3527 bp)	<i>PpcADK1</i> (960 bp)
	Pr196 (forw)	60	5'_TTT GTC GGA GGG TTC TTG TC_3'	<i>PpgADK1</i> (3527 bp)	<i>PpcADK1</i> (940 bp)
	Pr182 (rev)	55	5'_AGT AAC ATA GAT GAC ACC GC_3'	-	Nos3Term (239 bp)

Fortsetzung der Tab. 1

Nachweis AtCKX2 Expression	Pr92	57,3	5'_AGGAACGTTGTCGAATGGTG_3	5'3' AtCKX2_cDNA
	Pr93	55,3	5'_CATAGATGATACCGTGTTC_3'	3'5' AtCKX2_cDNA
	Pr 158	54,9	5'_ATCATCAGCAAGGTTATTGACAC_3'	5'3' AtCKX2_cDNA
	Pr 159	56	5'_TCATCGCCGACATACGATTG_3'	3'5' AtCKX2_cDNA
	Pr 214 ¹	74	5'_CGGAGAGGAAGTACAGTGTGTGGA_3'	<i>Ppactin3</i> (1190 bp)
	Pr 215 ¹	74	5'_ACCAGCCGTTAGAATTGAGCCCAG_3'	<i>Ppactin3</i>
	Pr 14 ²	58	5'_TCTGCCCTATCAACTTTCGA_3'	18S rRNA 5'3'
	Pr 15 ²	64	5'_AATTTGCGCGCCTGCTGCCT_3'	18S rRNA 3'5'
	Pr 168 ³	57	5'_ATTTAAGTGGA(GC)GGAAAA(AGC)CACT_3'	Bluni1 TMV-RNA
	Pr 169 ³	57	5'_GT(CT)GTTGATGAGTCC(AG)TGGA_3'	Bluni2 TMV-RNA

(1) Primersequenz nach Nakamura *et al.* (2005), (2) Primersequenz nach Köppel (1997), (3) Primersequenz nach Letscher *et al.* (2002)

2.4.2 Rekombinante DNA Techniken**2.4.2.1 Kultur von *E. coli***

Alle unten genannten Medien zur Anzucht von *E. coli* XL1-blue wurden nach den Vorschriften aus Sambrook *et al.* (1989) hergestellt; die Angaben gelten für 1 l Medium (Tab. 2):

Tab. 2. Benötigte Medien für die Anzucht von *E. coli* XL1blue.

LB-Medium (Agar)		2YT		SOC-Medium	
Trypton	10 g	Trypton	16 g	Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	10 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g	NaCl	5 g	NaCl	10 mM
				KCl	2,5 mM
(Agar-Agar	10 g)			Glucose	20 mM
mit 3 M NaOH auf pH-Wert 7,6 einstellen		pH 7,0 (mit NaOH einstellen)		MgSO ₄	20 mM
				MgCl ₂	10 mM
				anschließend steril filtriert	

LB- und 2YT-Medium wurden 20 min bei 121°C autoklaviert, die Antibiotika wurden nach dem Abkühlen auf 60°C hinzugegeben.

2.4.2.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli* zur Elektroporation

Die Herstellung der elektrokompetenten Zellen erfolgte nach einer veränderten Methode von Chuang *et al.* (1995). Es wurde eine Vorkultur des Bakterienstammes *E. coli* XL1blue in LB-Medium ü.N. bei 37°C angezogen. Anschließend wurden zwei Kulturen mit 250 ml 2YT-Kulturmedium in 2 l Erlenmeyer-Weithalskolben mit jeweils 500 µl der Vorkultur angeimpft und für ca. 2-3 h bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln (175 rpm) inkubiert. Die optische Dichte der Kultur wurde mit Hilfe eines Photometers kontrolliert (OD₆₀₀). Bei einer OD₆₀₀ von ~0,8 wurden die Kulturen in einen 250 ml Zentrifugenbecher überführt, 20 min auf Eis gehalten und anschließend 15 min bei 3500 rpm und 4°C in einer Sorvall Zentrifuge (SLA-Rotor, Du Pont, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien mit Hilfe eines sterilen Pinsels vorsichtig in 250 ml kaltem, sterilem Milli Q-Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt, wobei zwischendurch jeweils 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde das Pellet in 10-20 ml 10%igem, kaltem Glycerin aufgenommen, in ein neues 30 ml Zentrifugengefäß überführt und 10 min bei 5500 rpm (2600 x g) in einem vorgekühlten Rotor bei 4°C zentrifugiert (2K15 Sigma-Zentrifuge). Zum Schluss wurde der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 2-3 ml 10%igem, kaltem Glycerin aufgenommen und die Suspension aliquotiert (50 µl). Die Aliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2.3 Elektroporation

Zur Vermehrung von Plasmiden oder Ligationsprodukten erfolgte eine Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1-blue durch Elektroporation. Für die Transformation wurden jeweils 5 µl DNA Lösung (Ligationsansätze oder Plasmid) mit 50 µl elektrokompetenten Zellen sanft vermischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Biozym, Hamburg) überführt. Die Elektroporation wurde bei 1800 V (Elektroporator 2510, Eppendorf, Hamburg), mit einer durchschnittlichen Dauer von 2,4-3,0 ms durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl SOC-Medium (s. Tab. 2) aufgenommen und in einem 12 ml Kulturröhrchen 30 bis 60 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach dieser

Regenerationsphase wurde die Bakteriensuspension auf vorgewärmte LB-Antibiotika-Platten mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert und die darauf gewachsenen Kolonien anschließend untersucht.

2.4.2.4 Gewinnung von Plasmid-DNA

Nach der Transformation wurden gewachsene Kolonien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt. Die Kulturen wuchsen ü.N. bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (1-2 min, 6000 rpm, Sigma 2-MK Tischzentrifuge). Das Pellet wurde zur Plasmid-DNA Gewinnung mit Hilfe des Plasmid-DNA-Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) verwendet.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 250 ml Kulturen mit Hilfe des Plasmid Maxi Kits (Qiagen) gewonnen.

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde durch Restriktions-Analysen (siehe 2.4.2.5) überprüft.

2.4.2.5 DNA-Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erfolgte der Verdau der Plasmid-DNA. Die Reaktionen fanden in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Die Restriktion erfolgte nach folgendem Schema:

x µl	DNA (1-2 µg)
2 µl	Restriktionspuffer (10x)
2-5 U	Restriktionsendonukleasen
bis 20 µl	Milli Q-Wasser

Die Reaktionsansätze wurden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur mindestens 1,5 h inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.4.2.6)

2.4.2.6 Agarosegel-Elektrophorese

Analytische DNA/RNA-Gelelektrophorese

TBE-Laufpuffer (10x)

Tris Base*	108 g/l	<u>Ladepuffer (10x, 200 µl)</u>	
H ₃ BO ₃	55 g/l	50% Ficoll (w/v)	100 µl
EDTA-Lsg 0,5 M (pH 8,0)	100 ml/l	10% SDS (w/v)	20 µl
		EDTA-Lsg 0,5M (pH 8,0)	20 µl
		2,5% Bromphenolblau (w/v)	20 µl

Präparative DNA Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer (10x)		10x TBE	20 µl
Tris Base*	24 g/l	Milli Q-Wasser	20 µl
Eisessig	5,71 ml/l		
EDTA-Lsg 0,5M	10 ml/l		

*Tris Base-(Tris (hydroxymethyl)-aminomethane)

Je nach Fragmentgröße der aufzutrennenden DNA wurden Gele mit 0,8% bzw. 1,5% (w/v) Agarose mit dem gewünschten Laufpuffer gegossen. Der Agaroselösung wurde vor dem Abkühlen Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 0,5 µg/µl). Die Proben wurden mit Ladepuffer (10x) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgte bei 80-100 V für 20-50 min. Dokumentiert wurde das Gel mit Hilfe eines UV-Transilluminators sowie mit dem Computerprogramm BioPrint-Fotodokumentation (Version 96.07; Vilber Lourmat, Frankreich).

2.4.2.7 Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen

Für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten wurden 3-6 µg vorbehandelte DNA elektrophoretisch aufgetrennt (2.4.2.6). Danach wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll mittels Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden). Die DNA konnte anschließend für die Ligation (2.4.2.8) eingesetzt werden.

2.4.2.8 Ligation in Plasmid Vektoren

Bei einer *blunt-end* Ligation wurden die überhängenden Enden der linearisierten DNA mittels der kleinen Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), welche eine 5'3'-Polymerase-Funktion und die 3'5'-Endonuklease-Aktivität besitzt, aufgefüllt (s. Reaktion in Tab. 3). Hierauf folgte eine Ethanol/NH₄-Acetat-Fällung (s. 2.7.2). Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen Wasser resuspendiert.

Zur Verhinderung einer Rezirkulation wurden die Vektor-DNAs durch die alkalische Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIAP) dephosphoryliert (s. Tab. 3). Anschließend wurden sie wiederum mittels Ethanol/NH₄-Acetat gefällt.

Vor der Ligation wurden die Mengen der Vektor- und Insert-DNA elektrophoretisch abgeschätzt. Vektor- und Insert-DNA wurden zur *blunt-end*-Ligation in einem Verhältnis von ca. 1:2 eingesetzt.

Nach der Ligationsreaktion wurde die DNA vor der Transformation durch Elektroporation in kompetente *E. coli* Zellen (s. 2.7.2) erneut gefällt.

Tab. 3 Klenow-, Dephosphorylierungs- und Ligations-Reaktionsprotokolle (nach Fermentas)

Klenow-Reaktion		Dephosphorylierung		Ligation	
x µl	DNA	10-40 µl	DNA	10 µl	DNAmix
2 µl	10x reaction buffer	5 µl	10x reaction buffer	2 µl	10x ligaton buffer
0,5 µl (0,05 mM)	2 mM 4dNTP	0,05 µl	alkal. Phosphatase*	4 µl	50%(w/v) PEG4000
1-5 U	Klenow Fragment*	bis 50 µl	Milli Q-Wasser	2-4 U	T4 Ligase*
Bis 20 µl	Milli Q-Wasser			Bis 20 µl	Milli Q-Wasser
10 min bei 37°C		30 min bei 37°C		60 min bei 22°C	
10 min bei 75°C (Inaktivierung)		10 min bei 75°C (Inaktivierung)		Übernacht bei 14°C	

* Bezug: Fermentas

2.4.2.9 PCR-Kolonie-Screening

Die Untersuchung resistenter Klone nach der Elektrotransformation mit den Ligationsansätzen erfolgte bei einigen Experimenten mit Hilfe der PCR. Dabei wurden die Klone mit Hilfe geeigneter Primer (s. Tab. 1) auf gewünschte Ligationsprodukte „gescreent“. Als Template für die PCR (Tab. 4) wurde jede Kolonie mit einem Zahnstocher gepickt und direkt ohne Plasmidreinigung in ein PCR-Tube mit 5 µl sterilem Milli Q-Wasser überführt. Um eine Sicherungskopie


jedes Klons zu erhalten, wurde darüberhinaus eine Masterplatte, mit dem entsprechenden antibiotikumhaltigen LB-Medium angeimpft.

Die aus dem PCR-Screening als positiv hervorgegangenen Klone wurden jeweils in einer 2-5 ml Übernacht-Kultur unter Selektionsdruck vermehrt. Von dieser Kultur wurden je 500 µl in zwei Eppendorfgefäße mit Schraubdeckeln gefüllt und mit sterilem 80%igem Glycerol (1 ml) zu Cryopräservations-Zwecken (-80°C) überführt. Die übrige Kultur wurde zur Plasmid-DNA-Gewinnung mit Hilfe des Plasmid DNA Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) verwendet.

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde erneut durch Restriktions-Analysen (siehe 2.4.2.5) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Tab. 4 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie zur Programmierung des Gradientencyclers (Eppendorf Mastercycler-5330) verwendete Standardeinstellungen für Temperatur und Zeit.

PCR- Mix		PCR-Zyklus	
x µl	DNA*	96°C	2 min
2,5 µl	10x Reaktionspuffer	94°C	55 s
0,25 µl	4dNTP (jeweils 25 mM)	57°C**	55 s
0,5 µl	5'3' Primer (50 pmol/µl)	70°C	45 s
0,5 µl	3'5' Primer (50 pmol/µl)	70°C	10 min
0,25 µl	Taq- DNA- Polymerase (5 Units/µl, Genekraft)	hold	4°C
25 µl	Endvol.		

 30 Zyklen

* Plasmid-DNA (10 ng/µl), genomische-DNA (50-500 ng/µl) ** Vgl. Tab. 1 um die Angaben der optimalen Annealing-Temperatur auszuwählen.

2.4.2.10 Überprüfung durch Sequenzierung

Vor einer weiteren Verwendung wurden die Konstrukte auf ihre Richtigkeit hin durch Sequenzanalysen überprüft. Die Sequenzierung wurde kommerziell durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die für die Sequenzierung ausgewählten Primer sind in Tab. 1 zusammengefasst.

2.5 Kultivierung der Pflanzen

2.5.1 Medien und Kulturbedingungen für die Anzucht von *Physcomitrella*

Physcomitrella wurde sowohl in Flüssigmedien als auch auf Agarmedien kultiviert, die jeweils als A'BCDNT(V) (Wang *et al.*, 1980 und Knight *et al.*, 1988) und ABCNT(V) (Knight *et al.*, 1988) bezeichnet werden (Tab. 5).

Die Medien wurden mit KOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert (20 min bei 121°C und 1,1 bar).

Für die Selektion der Transformanten wurden den Medien nach Sterilisation und Abkühlung auf ca. 60°C die Antibiotika G418 (50 µg/ml) bzw. Hygromycin (30 µg/ml) zugefügt.

Tab. 5 Verwendete Medien für die Kultur von *Physcomitrella* (nach Wang *et al.*, 1980 und Knight *et al.*, 1988)

STOCKS	CHEMIKALIEN	ABC(N)TV ¹	A'BCD(N)TV ²	Stocks/l
A / A' (100x)	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	5 mM	0,359 mM	10 ml
B (100x)	MgSO ₄ 7H ₂ O	1,01 mM	1,01 mM	10 ml
C (100x)	KH ₂ PO ₄	1,84 mM	1,84 mM	10 ml
D (100x)	KNO ₃	-	10 mM	10 ml
T (1000x)	<u>Trace Elements (s. Text)</u>	1 ml/l	1 ml/l	1 ml
-	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,045 mM	0,045 mM	-
N	di-NH ₄ -Tartrat*	(5 mM)	(5 mM)	-
-	Agar-agar	1% (w/v)	-	-
V (1000x)	Nicotinsäure	1 mg/l	1 mg/l	1 ml
V (1000x)	p-Aminobenzosäure	0,25 mg/l	0,25 mg/l	1 ml
V (1000x)	Thiamin/HCl	5 mg/l	5 mg/l	1 ml

¹ n. Knight *et al.* (1988), ² n. Wang *et al.* (1980)

* di-NH₄-Tartrat: Dieser Zusatz wurde immer im Medium für zur Transformation vorgesehene Kulturen benutzt, um die Caulonema-Bildung zu hemmen.

Trace Element Solution (1000-fach) ist eine Mischung aus folgenden Spurenelementen: H₃BO₃ (614 mg/l); MnCl₂*4 H₂O (389 mg/l); CuSO₄*5 H₂O,

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (jeweils 55 mg/l); $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (38,6 mg/l); KI, SnCl_2 , LiCl (jeweils 28 mg/l) (nach Knight *et al.*, 1988).

2.6 Genetische Transformation von *Physcomitrella*

2.6.1 Vorbereitung der *Physcomitrella*-Kulturen für die Protoplastierung

Ausgehend von einer Wildtyp-ABCNTV-Platte wurden unter sterilen Bedingungen Protonemafäden bzw. Gametophoren mit einer Pinzette in ein Kulturröhrchen (50 ml, Typ Falcon) mit ca. 20 ml A'BCDNTV-Flüssigmedium überführt. Mit Hilfe eines Dispergiergerätes (Ultra-Turrax, Taunus) wurde das Gewebe zerkleinert. Dieses wurde in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit einer Schwammkappe (*silicone sponges*, Bellco, Vineland, NJ, USA) verschlossen.

Die Kultivierung erfolgte in Klimakammern bei 25 °C bzw. 15 °C unter Weißlicht mit einer Intensität von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Leuchtstoffröhren, Philips TLM) bei einem Licht/Dunkelwechsel von 16/8 h.

Nach ca. 7 Tagen Wachstum bei 25°C bzw. 10 Tagen bei 15 °C wurden die Kulturen in 500 ml Glasflaschen (Schott, Mitterteich) mit 200-250 ml A'BCNTV-Medium überführt. Diese Glasflaschen wurden mit einem Wattestopfen verschlossen, welcher mit Aluminiumfolie abgedeckt wurde. Mit Hilfe von Glasröhrchen wurden die Kulturen über einen Filter (0,2 μm , Schleicher & Schuell, Dassel) mit steriler Luft nach dem Airlift-Prinzip belüftet und gleichzeitig durchmischt.

Die Kulturmedien wurden wöchentlich (25°C) bzw. alle 10 Tage (15°C) erneuert. Um eine optimale Dichte der Kultur sowie ein gleichmäßiges Wachstum zu gewährleisten, wurde ein Teil der Kultur über ein Sieb gegossen, um Teile des Gewebes zu entfernen. Der Rest der Kultur wurde mit einem 15 cm Ultra-Turrax-Stab zerkleinert und in eine neue Kulturflasche mit frischem A'BCDNTV-Medium überführt. Eine Woche vor der Transformation wurden die Kulturen nicht mehr zerkleinert, jedoch ein Teil des Mediums erneuert. Nach 3 oder 4 Tagen Wachstum wurde das Gewebe über ein Sieb vom Medium getrennt und wiederum in frisches Medium überführt. Drei Tage später wurde die Protoplastierung durchgeführt.

Die Transformation mit den hergestellten Vektoren pHP_Act1_ArCKX2 und pHP_Act1_PpADK1 wurde modifiziert nach Schaefer *et al.* (1991) durchgeführt.

2.6.2 Medien und Material

Tab. 6 Medien für die PEG-vermittelte Transformation nach Schaefer *et al.* (1991)

Driselase Lösung		Mannitol-Lösung:	
Driselase 0,5% in		Mannitol 8,8% (w/v)	
8,8% Mannitol-Lsg lösen		(autoklavierbar)	
(sterilfiltrieren)			
MMM-Lösung:		PEG Lösung: für 12,12 ml	
Mannitol-Lsg 8,8%	100 ml	0,38 M Mannitol	0,692 g
MgCl ₂	0,143 g	0,1 M Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0,236 g
MES	0,1 g	33 % (w/v) PEG4000 (Serva)	4 g
pH-Wert 5,6 mit KOH einstellen		mit 1 M Tris auf pH-Wert 7,7-8 einstellen, sterilfiltrieren	
Regenerations-Medium:		Top Agar:	
ABCNTV (s. Tab. 5)		ABCNTV (s. Tab. 5)	
5%	Glucose	1,5% Agar (w/v)	
3%	Mannitol		
pH 5,6-5,8, (sterilfiltrieren)			

2.6.3 Protoplastierung

Aus einer 5 bis 6 Tage alten Protonema-Kultur wurden mit Hilfe eines Siebes (50 µm Porengröße) rund 500 mg Protonemafäden zum Protoplastieren gewonnen. Das Protonema wurde mit einem Überschuss von 8,8%iger Mannitol-Lösung gewaschen. Zur Isolierung der Protoplasten wurde eine 0,5%ige Driselase-Lösung (Fluka, Neu Ulm) in 8,8%igem Mannitol-Lösung verwendet. Die Driselase bestand aus einer Mischung von verschiedenen zellwandabbauenden Enzymen (Pektinase, Xylanase, Dextranase, Laminariase, Amylase und Protease, aus Basidiomyceten). Die Driselase-Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert und das Filtrat in eine Petrischale (Ø 9,5 cm) gegossen. Anschließend wurden die Protonemafäden

mit einer sterilen Pinzette in die Mannitol-Driselase-Lösung überführt und bei 100 rpm Übernacht im Dunkeln geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden die Protoplasten von den unprotoplastierten Protonemen mit Hilfe zweier Siebe (100 und 50 µm Porengröße) getrennt. Durch eine erste Zentrifugation bei 700 rpm (Universal 16A, Hettich Zentrifuge, Bäch, Schweiz) wurden die Protoplasten sedimentiert. Die Protoplasten wurden anschließend unter sanftem Schwenken in 10 ml 8,8%igem Mannitol-Lösung aufgenommen. Nach einer zweiten Zentrifugation wurden die Protoplasten erneut in 2,5-5 ml 8,8%igem Mannitol-Lösung vorsichtig resuspendiert, davon wurden 20-30 µl der aufgenommenen Protoplasten mit der Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,100 mm/0,0025 mm²) unter dem Inversmikroskop (Olympus Ix50) ausgezählt. Für die Transformation wurden nach einer dritten Zentrifugation 3-4x10⁵ Protoplasten in 300 µl MMM-Medium resuspendiert.

2.6.4 Transformation

In einem sterilen 12 ml Kulturröhrchen wurden 300 µl Protoplastensuspension (3-4x10⁵ Protoplasten) mit 30 µl DNA (1 µg/µl) und 300 µl PEG-Lösung durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Die Protoplasten wurden durch eine 5-minütige Inkubation bei 45 °C (im Wasserbad) einem Hitzeschock ausgesetzt und danach 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Transformationsansätze wurden anschließend vorsichtig in 10 ml Regenerations-Medium unter sanftem Schwenken aufgenommen, wobei alle zwei min 1 ml hinzugegeben wurde.

Die transformierten Protoplasten wurden in eine 5,5 cm Petrischale überführt und bei 25°C 24 h im Dunkeln regeneriert. Nach dieser Zeit wurden die Protoplasten zur weiteren Regeneration unter Standardbedingungen kultiviert und nach 6 Tagen mit Hilfe eines Inversmikroskops zur Bestimmung der Regenerationsrate ausgezählt.

2.6.5 Selektion

Zur Selektion transformierter Protoplasten wurden diese auf ein antibiotikumhaltiges ABCNTV-Medium überführt. Dabei wurden die Ansätze in flüssigem 1,5%igen Top-

Agar (s. Tab. 6) mit entsprechendem Antibiotikum aufgenommen und unverzüglich auf zwei mit Cellophanfolie bedeckte Kulturplatten verteilt.

Nach ein bis zwei Wochen wurde die Transformationsrate durch Auszählen der lebenden Pflanzen bestimmt. In diesem Stadium konnte noch keine Differenzierung zwischen stabilen sowie transienten Transformanten vorgenommen werden.

In Anlehnung an die Methoden von Schaefer *et al.* (1991) wurden zur Ermittlung stabiler Transformanten die Pflanzen abwechselnd auf nicht selektives bzw. selektives Medium transferiert. Dabei wurden die jeweiligen Kulturen mit der Cellophanfolie umgesetzt.

Nur diejenigen Pflanzen wurden als stabil eingestuft, welche trotz mehrfachen Umsetzens ihren durchgehend vitalen und grünen Phänotyp beibehielten. Im Gegensatz dazu zeigten instabile Pflanzen einen mosaikähnlichen Phänotyp, bei dem gleichzeitig vitale und tote Zellen zu beobachten waren.

2.7 Nachweis der Transgenese

2.7.1 Gewinnung von genomischer DNA nach der CTAB-Methode

Tab. 7 Benötigte Medien für die Isolierung genomischer DNA nach der CTAB-Methode (nach Rogers und Bendich, 1988, leicht verändert).

2x CTAB-Puffer	10% CTAB Lösung
2% CTAB (v/v)	10% CTAB
100 mM Tris (pH 8,0)	0,7 M NaCl
20 mM EDTA-Lsg (pH8,0)	
1,4 M NaCl	
1% PVP (Polyvinylpyrrolidone, unlöslich) Mr 40 000 (Serva)	
20 mM β -Mercaptoethanol-Lsg	
CTAB Präzipitationspuffer	„High salt“ TE
1% CTAB	10 mM Tris (pH 8,0)
50 mM Tris (pH 8,0)	1 mM EDTA-Lsg (pH 8,0)
10 mM EDTA-Lsg (pH 8,0)	1 mM NaCl

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *Physcomitrella* wurde 0,5 bis 6g frisches oder tiefgefrorenes-Gewebe (-20°C) verwendet. Das Gewebe wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser fein pulverisiert (unter konstanter Zugabe von Stickstoff) und anschließend in ein Falcon-Tube überführt. Die bei 65°C vorgewärmte 2 Mal CTAB-Lösung wurde mit 20 mM β -Mercaptoethanol-Lösung versetzt und in einem Verhältnis von 1:1 (mg/ml) dem pulverisierten Gewebe zugegeben und gut durchmischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 65°C im Wasserbad wurde das Homogenat auf RT abgekühlt. Das Homogenat wurde nun mit 10 ml Chloroform: Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, gut gemischt und bei 3000 rpm (1300 x g) (Swing out Universal 16A, Hettich Zentrifuge) 15 min zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein für Chloroform geeignetes Zentrifugenröhrchen überführt. CTAB-Lösung (10%) wurde in einer Menge, die 1/10 des Ansatzvolumens entsprach, hinzugefügt. Erneut wurde die Lösung mit 10 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) gut gemischt und bei 10.000 x g (Sorvall Zentrifuge, SS34 Rotor, Heraeus, Asheville, USA) 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 Volumen CTAB-Präzipitationspuffer 15 min bei RT präzipitiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit dem im Wasserbad vorgewärmten HSTE (100 μ l/g, 60°C, 5 min) resuspendiert. Die DNA Lösung wurde mit 2 Volumina Ethanol (absolut) 30 min bei -20°C präzipitiert und anschließend bei 10.000 x g (4°C) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen und getrocknet. und anschließend in 100-150 μ l 0,1 x TE + RNase (20 μ l/g FG) aufgenommen. Die Behandlung wurde zweim durchgeführt.

Da die genomische DNA von *Physcomitrella* sehr schwer mittels Restriktion zu verdauen war, wurde zur Verbesserung des Restriktionsverdaus die genomische DNA mit Proteinase K behandelt, um Störungen durch Proteine zu minimieren.

Proteinase K-Puffer (2x)			
0,2 M	Tris HCl		
25 mM	EDTA		
0,3 M	NaCl		
2% (v/v)	SDS		pH 7,5

Zu der Probe wurde 1 Volumen Proteinase K Puffer (2x) und 1/10 Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Proteine wurden anschließend mit Phenol extrahiert. Dazu wurde die Probe mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol (redestilliertes, in TE-Puffer equilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gemischt und bei 13000 rpm 5 min zur Phasen-Trennung zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt, mit demselben Volumen an Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit Chloroform gemischt. Nach Zentrifugation wurde die DNA aus dem wässrigen Überstand präzipitiert (s. 2.7.2).

2.7.2 Nukleinsäurefällung

Hierzu wurde die DNA-Probe mit einem Drittel des Volumens 7,5 molarem NH₄-Acetat und 2,5-fachem des Volumens an Ethanol (absolut) versetzt. Die Lösung wurde 15 bis 30 min bei 4°C, 15000 x g, (Sigma 2MK, München) zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag bis zu zwei Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder Luft- oder Vakuumgetrocknet (Speed Vac SC 110, Savant, Ramsey, Minnesota, USA).

2.7.3 Restriktion und Gel-Elektrophorese von genomischer DNA

Genomische DNA des *Physcomitrella* Wildtyps und der Transformante tCKX7 wurde mit den Enzymen *SspI* und *XhoI* geschnitten (5 µg gDNA jeweils mit 2 µl Enzym (10 U/µl), 2 h bei 37°C). Das Plasmid pHP_Act1_AtCKX2 enthält eine einzige *XhoI* Schnittstelle am Anfang des Actin1-Promotors. Für das Enzym *SspI* existieren zwei Schnittstellen, eine in der Mitte des *AtCKX2* Gens und eine zweite hinter dem Nos 3-Terminator (s. Abb. 3.21)

Die Proben wurden auf ein 0,7%iges (v/v) TBE-Gel mit 0,5 µg/µl Ethidiumbromid, aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte Übernacht bei 4°C und 20 V in TBE-Puffer.

2.7.4 Southern-Blot-Analyse

Mittels Hybridisierung von Nukleinsäuren mit DIG-markierten Sonden wurde die genomische DNA (s. 2.7.1) aus Wildtyp und den Transformanten tCKX7 verglichen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (s. 2.4.2.6) wurde die DNA denaturiert (s. 2.7.5), auf eine Membran transferiert und fixiert (2.7.6). Die Detektion der DNA erfolgte mittels einer DIG-markierten Sonde (2.7.8), welche durch den Detektionspuffer „CPSD ready to use“ (2.7.9) nachgewiesen werden konnte.

2.7.5 Denaturierung der aufgetrennten DNA

Durch Schütteln wurde das Gel erst mit sterilem Milli Q-Wasser 5 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel in 0,25 M HCl 30 min bei RT inkubiert. Das Gel wurde erneut für 5 min in Milli Q-Wasser gewaschen und anschließend mit einer 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH-Lösung 2 x 20 min zur Denaturierung der DNA behandelt. Nach einer fünfminütigen Behandlung mit sterilem Milli Q-Wasser wurde das Gel erneut gewaschen und mit einer 1,5 M NaCl/0,5 M Tris Cl pH 7-Lösung (2 x 20 min) neutralisiert.

Membran und Gel wurden durch eine fünfminütige Inkubation in Milli Q-Wasser equilibriert.

2.7.6 Transfer der DNA auf die Nylon-Membran

Der Transfer erfolgt durch die Kapillarkräfte Technik. In eine Plastikkuvette wurde der Schwamm mit einem Liter 20x SSC Lösung angefeuchtet. Die übrigen Materialien wurden in der folgenden Reihenfolge aufgebaut:

- 3-4 Folien Whatmann 3MM Papier
- Gel mit der Taschen Öffnung nach oben
- Parafilm um das Gel herum
- Membran (Schnitt oben links)
- 3-4 Folien Whatmann 3MM Papier
- Stapel trockenes saugfähiges Papier
- Glasscheibe
- Gewicht von 200-500 g

Der DNA Transfer erfolgte Übernacht bei RT. Sobald der Stapel mit saugfähigem Papier SSC-gesättigt war, wurde er durch einen neuen trockenen Stapel ersetzt.

2.7.7 Fixierung der DNA auf die Membran

Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min in 10x SSC inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben auf Whatmann-Papier, gelegt. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Crosslinkers bei 120 mJ auf der Membran fixiert. Durch einen dreiminütigen Waschschrift (mit Milli Q-Wasser) war die Membran fertig für die weitere Verwendung.

2.7.8 Herstellung von DIG-markierten Sonden

DIG (Digoxigenin-dUTP)-markierte DNA-Sonden zur spezifischen Detektion von DNA Fragmenten wurden mit den „DIG High Prime“ (Roche, Grenzach-Wyhlen) nach Anleitung des Herstellers angefertigt. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Sonde wurde das Plasmid pCR Blunt TOPO II_cCKO verwendet. Das Plasmid wurde mit dem Enzym *KpnI* verdaut (s. 2.4.2.5), welches an beiden Enden des *AtCKX2*-Inserts schneidet. Nach der Restriktion wurde das Reaktionsgemisch auf einem Agarose-Gel (s. 2.4.2.6) aufgetrennt. Anschließend wurde das *CKX*-Fragment (1506 bp) mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten. Mit Hilfe eines Gel-Extraktions Kit (Qiagen, Hilden) wurde die DNA (30 µl) gewonnen. In einem Verhältnis von 1 µg DNA auf 16 µl Milli Q-Wasser wurde die DNA durch eine 10-minütige Inkubation in einem kochenden Wasserbad denaturiert; anschließend wurde die Probe auf Eis abgekühlt. Danach wurde die Probe zur Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP mit 4 µl des DiG-High Prime-Reaktions-Mix versetzt und Übernacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8) gestoppt. Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte nach Herstellerangaben durch Vergleich mit fertig markierten Standards (Roche, Grenzach-Wyhlen).

2.7.9 Prä-Hybridisierung, Hybridisierung und Detektion der DNA

Die Prä-Hybridisierung, die Hybridisierung der Membran und die Detektion der DNA erfolgte nach Anleitung des CDP-Star Ready-to-use Kits von Roche (Grenzach-Wyhlen). Zum Nachweis der Banden wurde ein Chemoluminiszenz-Film auf die Membran gelegt. Dieser wurde 10 bis 25 min in einer Kassette exponiert.

2.8 Nachweis der Expression des *AtCKX2* Transgens

2.8.1 Gewinnung von RNA

Für die Gewinnung von RNA wurden verschiedene RNA-Extraktions Kits getestet. Aufgrund der geringeren Toxizität der verwendeten Chemikalien bei gleichzeitig zufriedenstellender Ausbeute wurde das Kit „Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit“ (Invitek, Berlin) verwendet. Hierfür wurden bis 100 mg FG Pflanzenmaterial (Flüssigkultur A'BCDNTV) in N₂ zermörsert und anschließend in 900 µl DCT Puffer (Bestandteil des Kits) resuspendiert. Nach der Elution von der Affinitätschromatographie-Säule wurde die RNA-Menge photometrisch bestimmt. Ein Teil der RNA (mindestens 500 ng) wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die Qualität und Reinheit zu überprüfen. Um jegliche DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde die restliche RNA mit DNase (RNase-frei) behandelt.

2.8.2 DNase-Behandlung der extrahierten Gesamt-RNA

Ca. 8 µg extrahierter RNA wurde mit der RQ1 DNase (RNase-frei) von Promega (Mannheim) behandelt. Der Abbau eventuell enthaltener DNA erfolgte laut Hersteller-Protokoll.

8 µg	RNA
8 µl	1 U/µl RQ1 DNase (RNase-frei)
8 µl	10x Reaktionspuffer (400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO ₄ und 10 mM CaCl ₂)
bis 80 µl	DEPC-Wasser

Die Reaktion erfolgte in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß bei 25°C für 30 min. Anschließend wurde die DNase mittels Zugabe von 25 mM EDTA-Lösung (1 µl/µg RNA) sowie durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Die RNA wurde über Nacht gefällt (siehe 2.7.2) und in DEPC-Wasser aufgenommen. Die RNA wurde nach der Aufnahme entweder sofort für die reverse Transkription benutzt oder bei -80°C gelagert.

2.8.3 Reverse Transkription (RT) von RNA zu cDNA

Für die Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription wurden zwischen 0,1 und 5 µg RNA eingesetzt. Zur Überprüfung der RT wurde TMV-RNA benutzt. Die Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Proben-Ansatz	TMV-Kontroll-Ansatz
x µl Gesamt RNA (0,1-5 µg)	1 µl TMV RNA (µg/µl)
2 µl Random hexamer Primer (0,2 µg/µl)	1 µl spezifische TMV Primer (10 pmol/µl)
x µl DEPC-Wasser	9 µl DEPC-Wasser
11 µl Endvolumen	11 µl Endvolumen

Die RNA wurde 5 min bei 70°C denaturiert und gleich danach auf Eis abgekühlt, damit die Bindung der Primer erfolgen konnte. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde folgender Reaktions-Mix hinzugefügt:

4 µl	5x Reaktion Puffer
1 µl	10 mM dNTP Mix
2 µl	DEPC-Wasser

Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 25°C (für *random hexamer* Primer) bzw. bei 37°C (für spezifische Primer) wurde 1 µl H-Minus MMuLV reverse Transkriptase (200 Units, Fermentas, St.Leon-Rot) dazugegeben. Die mit *random hexamer* Primern versehenen Proben wurden zunächst 10 min bei 25°C inkubiert, danach erfolgte die Elongation aller Reaktionsansätze (mit *random hexamer* Primern sowie mit spezifischen Primern) eine Stunde bei 42°C. Anschließend wurde die Reaktion

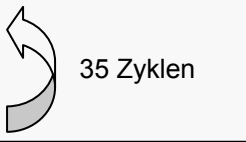
durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt und der Ansatz auf Eis abgekühlt.

2.8.4 Amplifizierung von cDNA mittels PCR

Als Vorlage für die PCR wurden Aliquots von 3-5 µl der umgeschriebenen cDNA (10 pg-1 µg) verwendet; der Ansatz wurde wie in Tab. 4 beschrieben angesetzt. Die PCR erfolgte nach folgendem Programm im Mastercycler 5330 (Eppendorf, Hamburg, Tab. 8):

Tab. 8 Programmierung des Gradientencyclers für die Umschreibung von cDNA

PCR-Zyklus	
96°C	0,5 s
96°C	2 min
94°C	55 s
56°C*	55 s
70°C	45 s
70°C	10 min
∞	4°C



*Annealingtemperatur

Der Auswahl der Annealingtemperaturen hing von den jeweiligen Primerpaaren ab. Die verwendeten Temperaturen sind in Tab. 1 aufgelistet.

2.9 Protein-Extraktion und Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Proteinextraktion erfolgt nach der Methode von Moffatt *et al.* (2000), welche für die Bestimmung der Aktivität der Adenosinkinase bei *Arabidopsis* etabliert wurde. Es wurden 100 mg bis 1 g frisches Protonema aus einer Flüssigkultur mit Hilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff zerkleinert, und in ein vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Zügig wurde 50 mM HEPES Puffer (pH 7,2) im Verhältnis 4:1 (µl Buffer/mg Gewebe) zugegeben. Die Gewebesuspension wurde gut gemischt und 20 Minuten zentrifugiert (Sorvall, SS-34, 10.000 x g). Der Überstand wurde auf einer Sephadex G25 Säule (Boehringer, Ingelheim) equilibriert mit 50 mM HEPES Puffer (pH 7,2) gebracht, um niedermolekulare Substanzen abzutrennen. Die Bestimmung

des Proteinsgehalts wurde nach einem modifizierten Bradford-Protokoll durchgeführt. Hierbei wurde 5 µl Probe mit 1 ml Bradford-Gebrauchslösung (Biorad, München) nach Herstellerangaben versetzt und gegen eine gleichbehandelte Wasserprobe photometrisch bei 595 nm vermessen. Anhand einer erstellten Eichgeraden (50, 100, 200, 500 und 1000 µg BSA/ml) wurde der Proteingehalt der Extrakte festgestellt.

2.9.1 ADK Enzym Assay

Die Bestimmung der ADK-Aktivität erfolgte durch die Konversion von radioaktivem Adenosin (Ado) zu AMP in Anwesenheit von ATP und MgCl₂. Die Aktivitätsbestimmung der ADK wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Je Pflanzenextrakt wurden Probenvolumina von 2, 4 und 6 µl mit folgenden Reagenzien versetzt:

2-6 µl		Extrakt
5 µl	0,5 M	HEPES, pH 7,2
2 µl	100 mM	ATP
2 µl	25 mM	MgCl ₂
5 µl	300 mM	NaF
1 µl	125 µM	DCF (Deoxycoformycin, Inhibitor der Ado-Deaminase)
0,5 µl	100 mg/ml	BSA
0,497 µl	179 µM	Adenosin
0,4 µl		³ H-Adenosin (40,9 Ci/mmol, 1 mCi, 1 ml) (in Abständen von 30 s zu einer neuen Probe pipettiert)

mit Milli Q-Wasser auf 50 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt

Nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C im Wasserbad wurde die Reaktion mit 1 ml eiskalter Stopplösung (50 mM NaOAc, 2 mM K₂HPO₄, pH 5,0) unterbrochen und auf Eis transferiert. Anschließend wurde bei allen Proben das AMP mit 200 µl eiskaltem 0,5 M LaCl₃ übernacht bei 4°C präzipitiert. Die Präzipitate wurden danach mittels einer Vakuumfiltration auf Glasfiltern (Whatman, Nr. 6) gesammelt, welche in einem Szintillationsgefäß mit 4 ml Szintillationscocktail (Quickszint 212, Zinsser Analytic, Frankfurt) bedeckt und mit dem Flüssigszintillationszähler (LSC, Beckmann LS 6000 IC, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) vermessen wurden.

2.10 *In vivo* Metabolismusstudien von *PpADK1*-Transformanten; Markierung mit Tritium-markiertem Isopentenyladenosin (^3H -[9R]iP)

Für *in vivo*-Metabolismusstudien mit Tritium-markiertem Isopentenyladenosin (^3H -[9R]iP) wurde jeweils 1 g Gewebe (Nassgewicht) in ein 50 ml Falcontube überführt und mit 4 ml frischem A'BCDTV-Medium (Tab. 5) vermischt. Über eine mit Watte gestopfte Pasteur-Pipette wurden alle Ansätze mit feuchter Luft belüftet und im Wasserbad bei 25°C unter konstanter Belichtung (Osram L, 15 Watt) bis zu 5,5 h inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe des Substrates ^3H -iPR (60 nmol/l) erfolgte die erste Probenentnahme (50 μl , T0), diese wurde mit 950 μl Stopplösung [je 5 μM Adenosin, Adenin, *trans*-Zeatin-Ribosid, *trans*-Zeatin, Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin, gelöst in Laufmittel A (10 mM TAE-Triethylamine/Essigsäure; 10% Methanol, pH 5,4)] versetzt. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach 1, 2, 4 und 5,5 h. Die Gesamtradioaktivität wurde nach jeder Probenahme mit jeweils 20 μl Probe und 4 ml Szintillationscocktail (Quickszint 212, Zinsser Analytic, Frankfurt) im Flüssigszintillationszähler (LSC, Beckman LS 6000 IC, Szintillation, Krefeld) ermittelt. Unmittelbar nach der Probenahme wurde das Gewebe vom Medium mit Hilfe einer Vakuumfiltrationseinheit (Vaccum filtration Manifold, Model 1225, Millipore, Schwalbach) über einen Filter (Porengröße 0,45 μm , Whatmann, Göttingen) getrennt. Das Gewebe wurde mit 4 ml eiskaltem A'BCDTV-Medium gewaschen und anschließend das Tropfnass Gewicht bestimmt. Sowohl das aufgenommene Medium als auch das Gewebe wurden nun mit 1 ml Bieleski-Reagenz (Methanol: Chloroform: Ameisensäure: Wasser; 15/5/1/2 (v/v/v/v), modifiziert nach Bieleski, (1964) versetzt, wodurch der Abbau von Cytokinin-Metaboliten verhindert werden sollte. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der intrazellulären iPR-Metabolite erfolgte nach der bei Schwarzenberg *et al.* (2003) beschriebenen Methode.

Mit Hilfe eines Fastprep-Homogenisators FP120/ Bio 101 Savant (speed 6, 20 s) wurde das Gewebe unter Zusatz von Glasperlen (1,7-2,0 mm Durchmesser, Roth, Karlsruhe) extrahiert. Die Gewebesuspension wurde dem Extraktionsgefäß entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, das Volumen ermittelt, mit 600 μl Wasser versetzt und gut durchmischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation

in einer Tischzentrifuge bei 14.000 x g wurde die obere wässrige Phase, welche die Cytokinin-Metabolite enthält, in ein neues Tube überführt. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurde das Volumen auf ca. 10 µl eingengt. Die Proben wurden nun in 1 ml Tris-Puffer (1 M TrisHCl + 0,1 M MgCl₂ Lösung, pH 9) aufgenommen, wovon 500 µl direkt mittels HPLC-*online*-LSC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-*online*-Flüssigszintillationszählung; Schulz *et al.*, 2001) analysiert wurden. Zur Überführung der Nukleotide in Riboside wurden die restlichen 500 µl vor der Injektion mit 15 Unit Phosphatase (CIAP, Fermentas, St. Leon-Rot) 1,5 h bei 37°C im Wasserbad behandelt. Gewebeextrakte mit und ohne Phosphatase-Behandlung wurden anschließend mittels HPLC-*online*-LSC analysiert. Hierbei wurden die markierten Metabolite iP, iPR sowie iPRMP aus den Proben ohne Phosphatase Behandlung quantifiziert. Aus den mit Phosphatase behandelten Proben wurde die Summe der Nukleotide iPDP und iPTP als Zunahme von ³H-iPR im Vergleich zu den nicht Phosphatase-behandelten Proben quantifiziert.

2.11 Cytokinin Bestimmung

Das Material für die Bestimmung der endogenen Cytokinine wurde auf zwei verschiedene Arten vorbereitet. Das Material der *PpADK1*-Transformanten (tADK1-21 und tADK1-26), sowie die Wildtyp-Kontrolle wurden wie in 2.11.1 beschrieben aufgearbeitet. Hierbei wurden die Cytokinine durch C₁₈-Festphasenextraktion aus dem Medium gewonnen und eingengt und die frischen Gewebe eingefroren. Nach der LC-MS (Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie)-Methode von Lexa *et al.* (2003) wurden die Proben von Dr. V. Motyka und Dr. J. Malbeck (Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag, Tschechische Republik) analysiert.

Das Material der tCKX-Transformanten (tCKX7 und tCKX16), sowie die Wildtyp-Kontrolle wurden wie in 2.11.2 beschrieben für die LC-MS Messung vorbereitet. Die mittels Gefriertrocknung getrockneten Proben (Medium und Gewebe) wurden im Labor von Prof. Dr. M. Strnad und Dr. A. Novak (Plant Growth Regulator Laboratory, University Olomouc, Tschechische Republik) nach einer modifizierten Methode von Faiss *et al.* (1997) analysiert.

2.11.1 Vorbereitung der Material aus *PpADK1*-Transformanten für die LC-MS Messung

Pflanzliches Material der Transformanten tADK1-21 und tADK1-26 sowie des Wildtyps wurden über mehrere Tage bei einer Temperatur von 25°C in Flüssigkultur vermehrt (s. 2.5.1). Vor Versuchsbeginn wurde das gesamte Gewebe mittels eines Siebes vom Medium getrennt und mehrmals mit frischem A'BCDTV-Medium gewaschen, um jegliche Cytokinin-Reste aus dem Gewebe zu entfernen.

Die Probennahme erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen täglich; die Kulturen wurden hierbei gut durchmischt und 50 ml Aliquots in ein Falcontube überführt. Umgehend wurde das Gewebe vom Medium über ein Sieb (Porengröße 50 µm) getrennt. Nach vollständiger Entfernung von Restmedium mittels Vakuumfiltration (Filter mit Porendurchmesser von 0,45 µm, Sartorius, Göttingen) wurde anschließend das Gewicht der Gewebeproben sowie das Volumen und der pH-Wert der Medienproben ermittelt. Die Proben wurden unmittelbar danach bei -80°C (Gewebe) bzw. -20°C (Medium) gelagert.

2.11.1.1 C₁₈-Festphasenextraktion von Cytokininen aus Kulturmedium

Mit Hilfe einer C₁₈-Kartusche (Sep-Pak Cartridges, Waters; Königstein, Taunus) wurden die Cytokinine aus dem Medium konzentriert, um eine spätere Quantifizierung mittels LC-MS durchzuführen. Um jegliche Verstopfungen der C₁₈-Kartuschen durch größere Partikel zu vermeiden, wurden die Medien zuvor mittels Glasfaserfilter (Rundfilter 100, Porendurchmesser 125 mm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Die C₁₈-Kartuschen wurden zuvor mit jeweils 5 ml 96%igem EtOH, 70%igem EtOH, 30%igem EtOH sowie 10 ml Milli Q-Wasser equilibriert. Der Filtrationsvorsatz wurde ebenfalls mit jeweils 70%igem EtOH, 96%igem EtOH und zweimal mit Milli Q-Wasser equilibriert.

Das Medium wurde mit einer Flussrate von ca. 2 ml/min über Filter und Sep-Pak Kartuschen gegeben. Die C₁₈-Kartuschen wurden anschließend mit 10 ml Milli Q-Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte nach der Entfernung des Filtrationsvorsatzes durch die Zugabe von 12,5 ml 96%iges Ethanol, in einen mit Ethanol gespülten 25 ml Spitzkolben. Die Entfernung des Ethanols aus den Proben

erfolgte mit Hilfe eines Rotationsverdampfers. Anschließend wurde der Rückstand in 300 µl 30%igem Methanol gelöst und bis zur Cytokininanalyse bei -20°C eingelagert.

Vor der LC-MS Analyse (s. 2.11.3) im Labor von Dr. V. Motyka wurden die Gewebe- und Mediumproben nach der Methode von Dobrev und Kaminek (2002) extrahiert und vorgereinigt.

2.11.2 Vorbereitung des Materials aus tCKX-Transformanten für die LC-MS-Messung

Das pflanzliche Material der tCKX7- und tCKX16-Transformanten sowie des Wildtyps wurden über mehrere Tage bei einer Temperatur von 25°C in Flüssigkultur vermehrt (s. 2.5.1). Das gesamte Gewebe wurde vor Versuchsbeginn mehrmals mit frischem A'BCDTV-Medium gewaschen, um jegliche Cytokinin-Reste aus dem Gewebe zu entfernen.

Die Probenahme erfolgte über einen Zeitraum von 20 Tagen alle 10 Tage. Ein Aliquot von ca. 250 ml Kultur wurde in einem ersten Gefäß (s. Abb. 2.2, B) gesammelt und später über drei Siebe (1x100 µm bzw. 2x 50 µm) vom Medium getrennt (s. Abb. 2.2, C). Die Gewebeproben wurden bis zur Gefriertrocknung bei -80°C gelagert. Aus dem Kulturüberstand wurde je Probe ein Aliquot von 200 ml abgemessen und bis zur Gefriertrocknung bei -80°C gelagert. Fotografisch wurde die Gewebe-Entwicklung mit dem Fotomikroskop Olympus BH-2 dokumentiert.

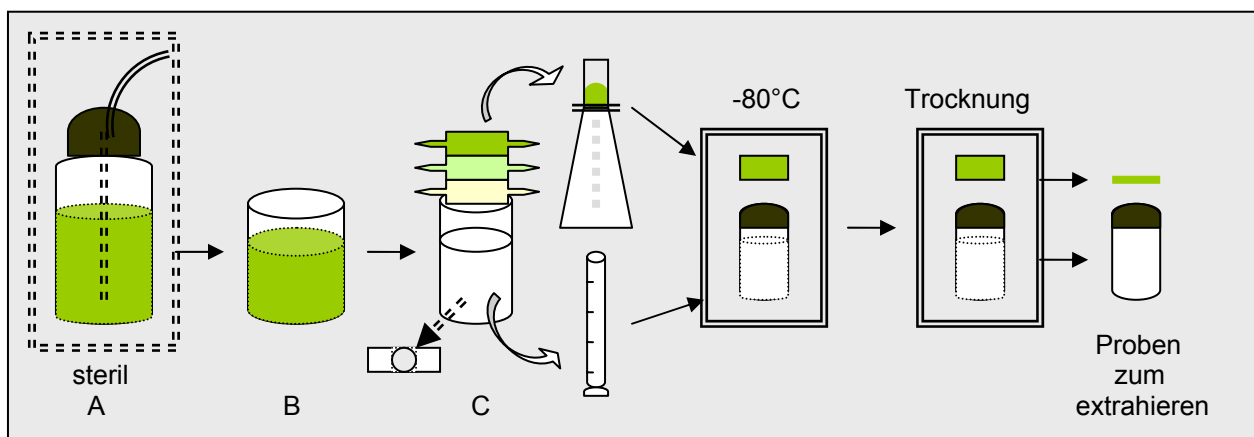


Abb. 2.2 Darstellung der Probenahme und Vorbereitung von Proben für die LC-MS (Beschreibung im Text).

Die Gefriertrocknung von Gewebe- und Mediumproben erfolgte mit einer Christ Alpha I-6 Anlage (Osterode/Harz). Nach der Gefriertrocknung wurde das Gewicht des Gewebes bestimmt.

Die Extraktion und Reinigung der Proben für die LC-MS Analyse (2.11.3) erfolgte nach der modifizierten Methode von Stirk *et al.* (2003) im Labor von Prof. Dr. M. Strnad (Univ. Olomouc, Tschechische Republik). Nach der Extraktion erfolgte die Reinigung der Proben durch die Verwendung von DEAE-Sephadex (1,0 cm Durchmesser x 5,0 cm) kombiniert mit Octadecylsilica-Säulen (0,5x1,5 cm) (Sep-Pak C18, Waters, Milford, MA, USA) und Immunoaffinitätschromatographie (IAC, Strnad *et al.*, 1997), wobei monoklonale Antikörper mit einem großen Bindungsspektrum benutzt wurden. Am Ende dieser kombinierten Vorreinigung standen drei Fraktionen, welche folgende Metaboliten enthielten: 1. Basen, Riboside und Glucoside; 2. Nukleotide; 3. O-Glucoside.

2.11.3 Bestimmung der endogenen Cytokinine mittels LC-MS

Die Studien zur Bestimmung und Quantifizierung endogener Cytokinine in *Physcomitrella* Wildtyp sowie der *PpADK1*- und *tCKX*-Transformanten wurden in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Dr. V. Motyka (Institut für Experimental Botany, Prag, CZ) bzw. von Prof. M. Strnad (University Olomouc, CZ, s. 2.11) durchgeführt.

Die LC-MS Messung der Proben der *PpADK1*-Transformanten sowie des Wildtyps wurde nach der Methode von Lexa *et al.* (2003) in Prag durchgeführt. Bei diesen Messungen wurden die Isoprenoid-Cytokinine *iP*, *cZ*, *tZ* sowie *dHZ* quantifiziert, wobei die jeweiligen Base-, Ribosid-, Nukleotid-, O-Glucoside sowie *N*⁷- und *N*⁹-Glucoside bestimmt und quantifiziert wurden. Parallel wurde bei den jeweiligen Proben das Vorkommen der Hormone ABA (Abscisinsäure) und Indol-3-Essigsäure (Auxine) quantifiziert.

Die Proben der *tCKX*-Transformanten sowie des Wildtyps wurden nach der Methode von Faiss *et al.* (1997) an der Univ. Olomouc (Labor Prof. Dr. M. Strnad, Dr. O. Novak) analysiert. Für die Analyse wurden drei Kulturen angezogen und getrennt analysiert. Die Bestimmung der einzelnen Cytokinine wurde nach der

Methode von Tarkowski *et al.* (2004) vorgenommen. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen endogenen Cytokinen und den deuterierten Standards als Berechnungsgrundlage für die Konzentrationsbestimmung verwendet. In diesem Labor wurden sowohl die Isoprenoid-Cytokine iP, cZ, tZ und dHZ als auch die aromatischen-Cytokine BA, o-T, m-T, p-T sowie K gemessen, wobei die jeweiligen Base-, Ribosid-, Nukleotid-, O-Glucoside sowie N⁹-Glucoside bestimmt und quantifiziert wurden.

Für die jeweiligen LC-MS Messungen wurden folgende 3H- bzw 15N-markierten Cytokine (3 pmol/Probe) als Standardsubstanzen verwendet. Insgesamt wurden in beiden Laboren ca. 50 Substanzen untersucht: [²H₆]iPRMP (Isopentenyladenosin-5'-Monophosphat), [²H₆]iPR (Isopentenyladenosin), [²H₆]iP (Isopentenyladenin), [²H₆]iP7G (Isopentenyladenin-7-Glucosid), [²H₆]iP9G (Isopentenyladenin-9-Glucosid), [²H₅]tZMP (trans-Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat), [²H₅]tZR (trans-Zeatin-Ribosid), [²H₅]tZROG (trans-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid), [²H₅]tZ (trans-Zeatin), [²H₅]tZOG (trans-Zeatin-O-Glucosid), [²H₅]tZ7G (trans-Zeatin-7-Glucosid), [²H₅]tZ9G (trans-Zeatin-9-Glucosid); [²H₅]cZMP (cis-Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat), [²H₅]cZR (cis-Zeatin-Ribosid), [²H₅]cZROG* (cis-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid), [²H₅]cZ (cis-Zeatin), [²H₅]cZOG* (cis-Zeatin-O-Glucosid), [²H₅]cZ7G* (cis-Zeatin-7-Glucosid), [²H₅]cZ9G* (cis-Zeatin-9-Glucosid), [²H₃]dHZMP (dihydro-Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat), [²H₃]dHZR (dihydro-Zeatin-Ribosid), [²H₃]dHZROG (dihydro-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid), [²H₃]dHZ (dihydro-Zeatin), [²H₃]dHZOG (dihydro-Zeatin-O-Glucosid), [²H₃]dHZ7G (dihydro-Zeatin-7-Glucosid), [²H₃]dHZ9G (dihydro-Zeatin-9-Glucosid), [²H₇]BARMP (Benzyladenosin-5'-Monophosphat), [²H₇]BAR (Benzyladenosin), [²H₇]BA (Benzyladenin), [²H₇]BA9G (Benzyladenin-9-Glucosid), [¹⁵N₄]o-TRMP, [¹⁵N₄]m-TRMP, [¹⁵N₄]p-TRMP (ortho-, meta-, para-Topolin-Ribosid-5'-Monophosphat), [¹⁵N₄]o-TR, [¹⁵N₄]m-TR, [¹⁵N₄]p-TR (ortho-, meta-, para-Topolin-Ribosid), [¹⁵N₄]o-TROG, [¹⁵N₄]m-TROG, [¹⁵N₄]p-TROG (ortho-, meta-, para-Topolin-Ribosid-O-Glucosid), [¹⁵N₄]o-T, [¹⁵N₄]m-T, [¹⁵N₄]p-T (ortho-, meta-, para-Topolin), [¹⁵N₄]o-TOG, [¹⁵N₄]m-TOG, [¹⁵N₄]p-TOG (ortho-, meta-, para-Topolin-O-Glucosid), [¹⁵N₄]o-T9G, [¹⁵N₄]m-T9G, [¹⁵N₄]p-T9G (ortho-, meta-, para-Topolin-9-Glucosid), [¹⁵N₄]KRMP (Kinetin-Ribosid-5'-Monophosphat), [¹⁵N₄]KR (Kinetin-Ribosid) und [¹⁵N₄]K (Kinetin).

Für diesen Metabolit stand im Labor von Dr. V. Motyka kein Standard zur Verfügung. Die Konzentrationen wurden aus der Kalibrierung mit Hilfe des *trans*-Isomers ermittelt.

2.12 Phänotypische Untersuchungen der Transformanten

2.12.1 Induktion der Sporophytbildung und Kreuzungsexperimente

In erster Linie sollte geprüft werden, ob die transgenen Pflanzen zur Entwicklung von Sporophyten befähigt waren. Die Bildung von Sporophyten konnte durch Überflutung gut entwickelter Gametophoren mit sterilem Milli Q-Wasser bei 15°C in einem Zeitraum von ca. 3 Wochen induziert werden. Die verwendeten Pflanzen wuchsen zuerst in Glasgefäßen bzw. -röhrchen bei 25 °C auf ABCTV-Medium (vgl. 2.5.1).

Bei denjenigen Pflanzen, bei denen die Induktion der Sporophyten nicht erreicht werden konnte, wurden auch Kreuzungsversuche durchgeführt. Hierbei sollten die transgenen Pflanzen sowohl auf eine mögliche männliche oder weibliche als auch auf eine totale Sterilität überprüft werden. Dafür wurden die transgenen Pflanzen, wie in der folgenden Tab. 9 beschrieben, einerseits mit dem Wildtyp, andererseits mit der Mutante *nicBS*, welche männlich steril ist, gekreuzt. Kreuzungen fanden durch Kultivierung zweier Genotypen im selben Kulturgefäß in unmittelbarer Nähe statt. Nach ca. 3 Wochen konnten Sporophyten mittels einer Stereolupe beobachtet und gezählt werden.

Tab. 9 Darstellung der bei den Transformanten durchgeführten Kreuzung, um die Sterilität zu prüfen

Kreuzungsversuch	Wildtyp	<i>nicBS</i>	Transformante
Wildtyp	WT+ WT*	-	WT+ Transformante
<i>nicBS</i>	-	<i>nicBS</i> + <i>nicBS</i> *	<i>nicBS</i> + Transformante
Transformante	-	-	Transform + Transform

*Versuchskontrollen

2.12.2 Stabilität der Transgenese in der F₁-Generation

Die transgenen Pflanzen, bei denen man eine Sporophytenbildung beobachten konnte, wurden auf die Stabilität der Transgenese hin überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Sporophyten vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette vom Gametophor getrennt und in ein mit 1 ml Milli Q-Wasser gefülltes Eppendorfgesäß überführt. Die Sporophyten wurden mittels einer Pinzette geöffnet. Anschließend wurden ca. 400 µl Sporensuspension auf ABCTV-Agarplatten mit und ohne Antibiotikum (G418) ausplattiert, die restlichen 200 µl wurden gekühlt aufbewahrt. Bereits nach 2 bis 4 Tagen Inkubationszeit bei 25°C konnte man die auskeimenden Sporen beobachten. Einzelne Pflänzchen, die aus den ausgekeimten Sporen herangewachsen waren, wurden später auf Rasterplatten mit Selektionsmedium transferiert.

2.12.3 Flowzytometrie zur Feststellung der Ploidie

Unabhängig von Kulturmedium und Alter der Kultur wurden die zu untersuchenden Pflanzen mit Hilfe eines Skalpell in 500 µl DAPI-Lösung (4', 6-Diamidino-2-phenylindol Nukleus-DNA-UV-Farbmittel, CyStain® UV Ploidy, Partec GmbH, Münster) zerkleinert. Anschließend wurde diese Suspension über einen 50 µm Filter (Partec Cell Trics™) gegeben. Mittels zusätzlicher 500 µl DAPI-Lösung wurde der Filter nachgespült und die Ploidie mit Hilfe des Ploidy Analysers PA II, (Partec GmbH) festgestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 CYTOKININE IN *Physcomitrella patens*

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals eine grundlegende qualitative und quantitative Erfassung der bei *Physcomitrella* vorkommenden Cytokinine vorzunehmen. Durch LC-MS wurden die endogenen Cytokinine beim *Physcomitrella* Wildtyp quantifiziert, wobei insgesamt 50 verschiedene Cytokinin-Substanzen untersucht wurden.

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit zwei verschiedenen Laboratorien, Dr. V. Motyka (Prag, CZ) sowie Prof. Dr. M. Strnad (Olomouc, CZ), mit jeweils unterschiedlichen Methoden (Lexa *et al.*, 2003, Faiss *et al.*, 1997, vgl. 2.11.3) durchgeführt, wobei insgesamt bis zu 22 verschiedene Cytokinin-Spezies nachgewiesen wurden (Abb. 3.1, A), (Abb. 3.1, B).

Ergebnisse zum Cytokininstatus bei *Physcomitrella* Wildtyp sind in Abb. 3.1 A, B wiedergegeben. Das Gewebematerial, welches für Abb. 3.1 B untersucht wurde, war im Gegensatz zu den für Abb. 3.1 A gewonnenen Proben vor der Analyse gefriergetrocknet worden (vgl. 2.11.1 und 2.11.2).

Bei den in Prag durchgeführten Messungen (2.11.1) wurden neben Cytokinen auch die Hormone Abscisinsäure (ABA) und Auxin (IAA) quantifiziert (Abb. 3.1, A). Die Probenahme erfolgte für dieses Experiment täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen.

Bei den an der Univ. Olomouc durchgeführten Messungen (2.11.2) wurden auch aromatische-Cytokinin-Formen, wie BA und T, nachgewiesen und quantifiziert (Abb. 3.1 B). Es erfolgten hierbei drei Probenahmen in 10-tägigem Abstand.

Bei beiden Messungen wurden übereinstimmend dieselben Isoprenoid-Cytokinin-Gruppen gefunden: iP-Formen, tZ- und cZ-Formen sowie dHZ-Formen. Allerdings konnten Abweichungen in der Menge dieser Substanzen festgestellt werden, was auf methodische und apparative Unterschiede zurückzuführen war. Die Gesamtsumme der nachgewiesenen Cytokinin-Spezies betrug 21.

In Abb. 3.1 sind die drei Hauptmetabolite der jeweiligen Messungen rot markiert. Bei Abb. 3.1 A ergibt sich die Reihung cZROG > cZRMP > iPRMP, bei Abb. 3.1 B

$cZROG > iPRMP > tZROG$. Aus beiden Experimenten kann übereinstimmend geschlossen werden, dass im Gewebe *cZ*- sowie *iP*-Formen bei *Physcomitrella*-Wildtyp die dominierenden Cytokinine darstellen.

In der Regel ergaben die Messungen für Abb. 3.1 B im Vergleich zu Abb. 3.1 A höhere Konzentrationen. Die größte Abweichung zwischen beiden Methoden wurde bei den *iP*-Formen (Base, Ribosid bzw. Nukleotid) festgestellt, wobei die Konzentrationen der jeweiligen Metabolite bei Abb. 3.1 B bei der ersten Probenahme 5-, 35- bzw. 80-fach repektive (jeweils am T0 12,9 vs. 2,3 pmol/g *iP*; 35,5 vs. 1,0 pmol/g *iPR*; 332 vs. 4,1 pmol/g *iPRMP*) höher waren.

In dem in Abb. 3.1 A dargestellten Experiment wurden im Gegensatz zu Abb. 3.1 B kaum *tZ*-Cytokinine gefunden. Für die *dHZ*-Cytokinine wurden in beiden Experimenten übereinstimmend geringe Konzentrationen gefunden.

Auch die *BA*- und *T*-Formen kommen nur in geringen Mengen vor (Abb. 3.1 B).

Während beim in Abb. 3.1 A dargestellten Experiment die Konzentration der Cytokinin-Substanzen in Verlauf des gesamten Versuchszeitraums auf ungefähr gleichem Niveau bleiben, sinken diese in dem in Abb. 3.1 B wiedergegebenen Experiment bei fast allen Metaboliten während des Messzeitraums.

Übereinstimmend wurde bei allen Messungen im Kulturmedium weitaus geringere Cytokininkonzentrationen gemessen als im Gewebe (vgl. Anhänge 6.6 und 6.8).

Die Niveaus der Hormone *ABA* und *IAA* wurden mitbestimmt, auffällig war die Steigerung von *IAA* im Verlauf des Experiments (Abb. 3.1 A).

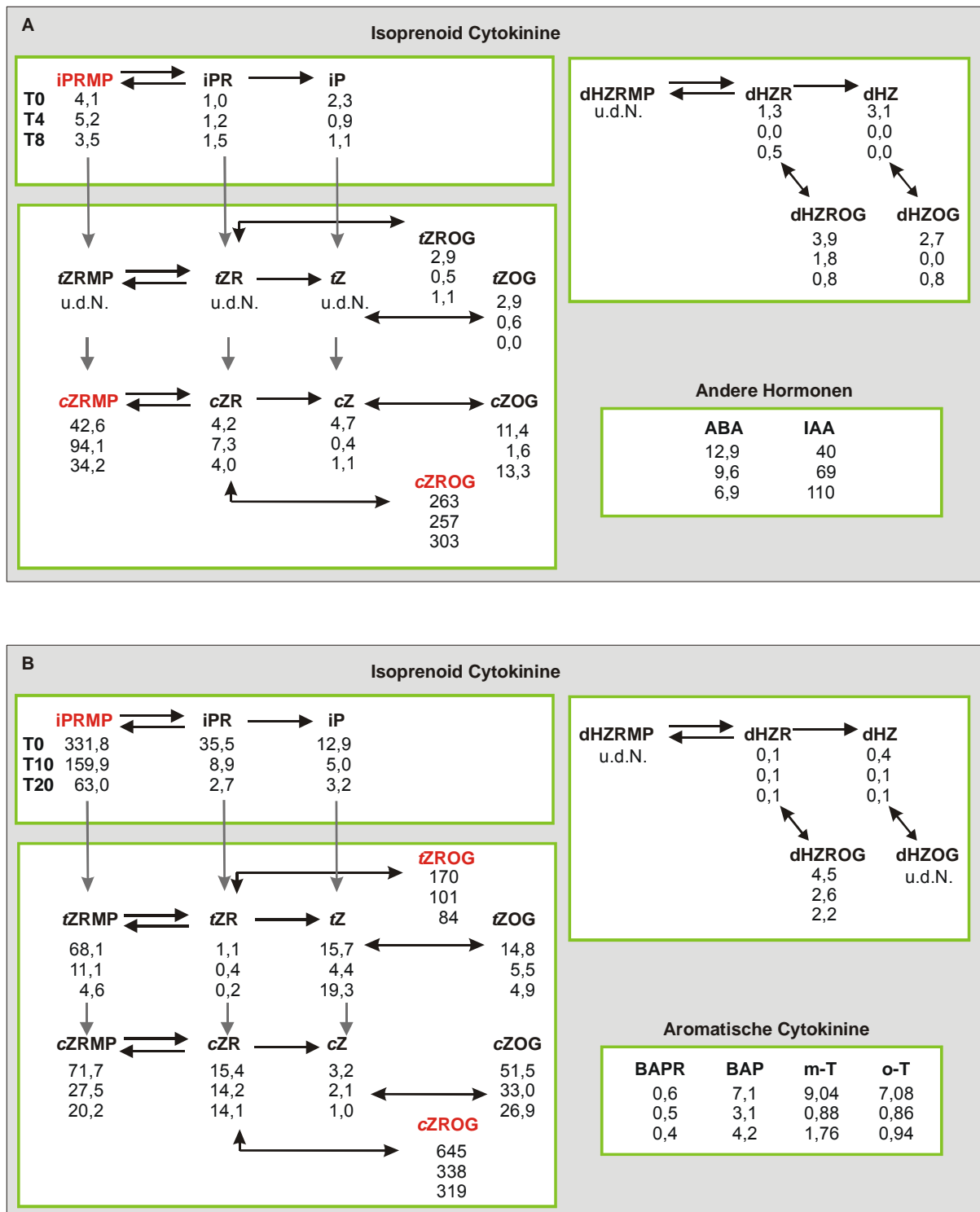


Abb. 3.1 Erfassung des Cytokinin Spektrums in *Physcomitrella*-Wildtyp Gewebe durch LC-MS. (A) Erste Messmethode (vgl. 2.11.1): dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppel-Bestimmung der Konzentrationen (pmol/g) der Isoprenoid-Cytokinine. Die Hormone ABA und IAA wurden zusätzlich quantifiziert. In der Graphik sind die Daten dreier von insgesamt 10 Probenahmen dargestellt (T0, T4 und T8, vgl. 6.6, **Tab. 25**) (B) Zweite Messmethode (vgl. 2.11.2): Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von Daten, die aus drei unabhängigen Kulturen und Quantifizierungen zu drei Probenahmetagen (T0, T10 und T20, vgl. 6.8, **Tab. 28**); u.d.N. unterhalb der Nachweisgrenze.

iPRMP (Isopentenyladenosin-5'-Monophosphat), **iPR** (Isopentenyladenosin), **iP** (Isopentenyladenin), **tZRMP** (*trans*-Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat), **tZR** (*trans*-Zeatin-Ribosid), **tZROG** (*trans*-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid), **tZ** (*trans*-Zeatin), **tZOG** (*trans*-Zeatin-O-Glucosid), **cZRMP** (*cis*-Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat), **cZR** (*cis*-Zeatin-Ribosid), **cZROG** (*cis*-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid), **cZ** (*cis*-Zeatin), **cZOG** (*cis*-Zeatin-O-Glucosid), **dHZR**

(dihydro-Zeatin-Ribosid), **dHZROG** (dihydro-Zeatin-Ribosid-O-Glucosid), **dHZ** (dihydro-Zeatin), **dHZOG** (dihydro-Zeatin-O-Glucosid), **BAR** (Benzyladenosin); **BA** (Benzyladenin), **o-T** (*ortho*-Topolin) und **m-T** (*meta*-Topolin)

3.2 ADENOSIN-KINASE

3.2.1 ADENOSIN-KINASE IN *Physcomitrella*

Für *Physcomitrella* konnten Hinweise auf das Vorhandensein bestimmter Gene bislang nur über die Analyse von cDNA-Banken sowie EST-Kollektionen gewonnen werden. Zu Beginn des Jahres 2008 wurden die Arbeiten des *Physcomitrella* Genom-Konsortiums publiziert (Rensing *et al.*, 2008), welche die nahezu vollständige Genomsequenz offenlegt und Genmodelle sowie zahlreiche weitere Informationen wie Gen-Annotierungen, Transposonsequenzen, u.v.a.m. bietet (<http://genome.jgi-psf.org>; <http://www.cosmoss.org/>).

Aus der *Physcomitrella* Genom-Datenbank des DOE JGI (<http://genome.jgi-psf.org>) wurden mögliche *Physcomitrella* ADKs gesucht. Nach der Eingabe verschiedener pflanzlicher ADK Sequenzen (vgl. 2.3), einschließlich der bereits bekannten *Physcomitrella* ADK *PpADK1*, wurden ADK Homologe auf drei Scaffolds gefunden. Der ADK-Lokus auf Scaffold 74 entspricht der bereits charakterisierten *PpADK1* (Schwartzberg *et al.*, 1998). Die zwei anderen erhaltenen Gene, genannt *PpADK2* und *PpADK3*, wurden auf das Vorhandensein ADK-typischer Domänen überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sowohl bei *PpADK2* als auch bei *PpADK3* wurden die ADK-Domänen Motiv 1 und 2 (cd01168) sowie jeweils eine ATP-Bindungsstelle nachgewiesen (Abb. 3.2).

Bei paarweisen Sequenzvergleichen mittels Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994) wurde eine Identität von 87% zwischen *PpADK1* und *PpADK2* festgestellt, gefolgt von 62% Identität zwischen *PpADK1* und *PpADK3*. Die Sequenzen von *PpADK2* und *PpADK3* zeigen hingegen nur 58% Identität.

<i>PpADK1</i>	MA SEGVLLGMGNPLLDIS CVVDDAF LEKY GLTLNNAILAEDKHLPMYKE LAANPDVEYIA	60
<i>PpADK2</i>	MA SEGVLLGMGNPLLDIS CVVDEAF LEKY GLTLNNAILAEDKHLPI YKE LAGR PDVEYIA	60
<i>PpADK3</i>	-----MGNPLLDVSAVVDAFLAKYGVKLNNAVLAEEKHMNMYKE LAQKSSTSFVP	51
	*****.*.*** ** * * * . * * * . * * * . * * * . * * * . * * * . * * *	
	Motif 1	
<i>PpADK1</i>	GGATQNTIRI AQWMLGESNATSY F GC V GK D EG D RM F KL A S E GG V NIRYDVDEDLPTGTC	120
<i>PpADK2</i>	GGATQNTIRI AQWMLREP KATSY I G C V G K D E F G D RM Y KL A S E GG V NIQYDVDEELPTGTC	120
<i>PpADK3</i>	GGATQNSIRI AQWLLQKSKATT F V G G I G K D E F G D KMERLIT L E G V N VAYHEDPSAATGSC	111
	*****.*****.* ** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
Konsensus Motif 1	[FFGCIGIKDFGGEILKRKAAEAHVDF] (*)	
Säugetiere (*)		
<i>PpADK1</i>	GV LVVKGERSLVANLSAANKYKIDHLKKEPNAFVEKAKYIYSAGFFLTVSPE SMMTVAK	180
<i>PpADK2</i>	GV LVVKGERSLVANLSAAKKYKIDHLKKEPNAFCVERAKFIYSSGFFLAVSPE SMMTVAR	180
<i>PpADK3</i>	AVLVVGDERSLVAYLAAAGMYKIEHMRKSETWALVEKAQYFYSAGFFLTVSPE SLMLVAK	171
	**** ***** *.** ** *.** * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
<i>PpADK1</i>	HAAETGKYYM INLAAPFI CQFFKDP LMELFPYVDF IFGNES EARAFAQVQGWETEDTKVI	240
<i>PpADK2</i>	HAAETGKYYM INLAAPFI CQ-FKD- LMELFPYVDF IFGNES EARTFAQVQGWETEDTKII	238
<i>PpADK3</i>	HAAATGKTFFMNLASAFVCERFKDPLMAAFYVDYMFGNNEA EAKAFGRVQGWSTTDLGRIT	231
	** * * * . * . * . * * . * . * * * * * * * * . * * * * . * . * * * * * . * . *	
	Motif 2	
<i>PpADK1</i>	AVKLAAALPKAGGTHKRVAVITQGTDPTIV AEDGKVTEFPVTPIPK EKLVD TNAAGDSFVG	300
<i>PpADK2</i>	AVKLAAALPKASGTHKRVAVITQGTDPTIV SVDGQVTEIPITVIPKNKLV DTNAAGDAFVG	298
<i>PpADK3</i>	ALKMAALPKICGTHKRIVVITQGVD PVVVADNGKLLMFVLSLPK EKLVD DTNAAGDAFVG	291
	* . * . * * * * * * * * . * * * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
Konsensus Motif 2	[DTNGAGDAFVG]	
Säugetiere (*)		
	Motif 2	
<i>PpADK1</i>	GFLS Q LVLGKDIAQCVRAGNYAASV I IQRS G CTF P SK P S F EQ 343	
<i>PpADK2</i>	GFLS Q LVLGKDI V ECVRA G NYASSI I IQRSG C T F PL K PC F Q S E 341	
<i>PpADK3</i>	G F MAQLV F GK N LAE C I RAGNYAANTVIQHLG C T F PK P N F S Y - 333	
	** . * . * * * * . * . * . * * . * . * * . * . * . * . * * * . * * . *	
	G] (*)	

Abb. 3.2 Aminosäuresequenz der *Physcomitrella* ADKs *PpADK1*, *PpADK2* und *PpADK3* sowie (*) Identifizierung der bei ADKs aus Säugetieren beschriebenen Motive 1 und 2 (Mensch-ADK, Acc. No. U50196, Ratte-ADK Acc. No. U57042 und Hamster-ADK Acc. No. U26588, s. Sychala *et al.*, 1996). Die AS-Sequenzen von *PpADK2* und *PpADK3* wurden aus der JGI-Datenbank bezogen.

Von Schwartzberg *et al.* (1998) beschreiben, dass die Motive 1 und 2 die bei Säugetier-ADKs vorkommen, auch bei *PpADK1* vorhanden sind. Wie aus Abb. 3.2 ersichtlich, sind die Motive 1 und 2 ebenfalls in den für *PpADK2* und *PpADK3* abgeleiteten AS-Sequenzen vorhanden. Wenn man alle *PpADKs* hinsichtlich dieser Motive vergleicht, stellt man fest, dass das Motiv 2 sehr konserviert ist. Beim Motiv 1 hingegen sind bei den *Physcomitrella* ADKs mehrere Unterschiede zu den Säugetier-ADKs zu erkennen (Abb. 3.2, Abb. 3.3).

3.2.1.1 Alignment von Motiv 1 Sequenzen

In einem Alignment von insgesamt 21 ADK-Motiv1-Sequenzen wurden die Konsensus Sequenzen von Pflanzen und Tieren mit den entsprechenden Sequenzen von Hefe, Alge, Moosfarn sowie *Physcomitrella* verglichen. Somit konnte festgestellt werden, dass bei allen *PpADKs* Sequenzen fünf der insgesamt 24 AS dieses Motivs (AS Nr: 3, 6, 8, 11, 23, schwarz markiert) vorkommen und sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren konserviert sind (Abb. 3.3). Vier der insgesamt 24 AS des ADK Motivs 1 der *PpADKs* sind nur bei der pflanzlichen Konsensus Sequenz vorhanden (AS Nr. 7, 14, 22, 24, grün markiert). Sechs AS in den Positionen 9, 12, 13, 15, 17 und 21 kommen weder bei der pflanzlichen noch bei den tierischen Konsensus-Sequenzen vor (orange markiert). Insgesamt zeigen die *PpADKs* mit 12 gegenüber 7 AS mehr Ähnlichkeit zur pflanzlichen- als zur tierischen-Konsensus Sequenz. Im Vergleich zu *Sellaginella* zeigen *PpADK2*, *PpADK3* und *PpADK1* mit jeweils 15, 14 und 13 AS die höchste Ähnlichkeit bei Motiv 1. Auch zu entsprechenden Sequenzen von Algen zeigen die *PpADKs* eine AS-Ähnlichkeit von bis zu 13 AS.

<i>P. stipitidis</i> ADK (Hefe)	-VVYFGSVGNDVYAKKLNEANAKYGLRTEYQIQPDIETGKCAALINGVHR
<i>O. lucimarinus</i> ADK (Alge)	ATAYMGCVGEDKfATQM RASCENDGVLANYMVDASTPTGTCAVIVKDGERR
<i>C. reinhardtii</i> ADK (Alge)	ATSYMGCIGDDEFGRKMT EVATAEGVN-----
<i>V. carteri</i> ADK (Alge)	ACSYMGCIGDDEFGRKMT EVATKEGVNVRYQVDASTPTGTCACTIVSSER
<i>S. moellendorffii</i> ADK (Moosfarn)	ATTFIGICIGKDEFGKEMKSSSTAGGVNVRYVEDESTPTGTCAVLVVGGER
<i>P. patens</i> ADK1	ATSYFGCVGKDEY GDRMFKLASEGGVNIRYDVDEDLPTGTGCVLVVKGER
<i>P. patens</i> ADK2	ATSYIGCVGKDEF GDRMYKLASEGGVN IQYDVDEELPTGTGCVLVVKGER
<i>P. patens</i> ADK3	ATTfVGGIGKDEF GDKMERLITLEGVNVAYHEDPSAATGSCAVLVVGDER
Konsensus <i>Physcomitrella</i>	[yxGcvGKDEfGDRMxkLasegGVN] [f gi y k r itl]
<i>N. tabacum iso2S</i>	ATSYMGSIGKDKYGEEMKKNADAGIN VHYE DE-SPGTCAVCVLDGER
<i>S. tuberosum isolT</i>	ATSYMGSIGKDKYGEEMKKNADAGVN VHYE DEETAPGTCAVCVLDGER
<i>A. thaliana</i> ADK2	ATSYMGSIGKDKYGEAMKKDAT AAGVN VHYE DESAPTGTGCVVVGGER
<i>A. thaliana</i> ADK1	ATSYMGSIGKDKYGEAMKKDAT AAGVY VHYE DEEATPTGTGCVVVGGER
<i>P. trichocarpa putative</i> ADK1	ATSYMGCIGKDKYGEEMKKNAMKAGVN VHYE DEEAAPTGTCAVCVVGGER
<i>V. vinifera</i>	ATSYMGCIGKDKYGEEMKKNL LAGVN VHYE DEETAPGTCAVCVVGGER
<i>M. trunculata</i>	ATSYIGCIGKDKYGEEMTKNSKQAGVN VHYE DENTPTGTCAVCVVGGER
<i>O. sativa</i> (japonica) ADK1	ATSYMGCIGKDKYGEEMKKDAQTAGVN AHYE DDNAPTGTCAVCVVGGER
<i>Z. mais</i>	ATSYMGCIGKDKYGEEMKKNADAGVT AHYE DEETAPGTCAVCVVGGER
Konsensus Samenpflanzen	[YMGcIGKDKfGEeMKKnaxxAGVn] ¹ [s y a ds]
<i>E. caballus</i> (Pferd)	AATFFGCI GIDKFGE ILLKKTAEVHVD AHYE QNEQP TGTCACVITDDNR
<i>H. sapiens</i> (Mensch)	AATFFGCI GIDKFGE ILLKRAAEAHVD AHYE QNEQP TGTCACITGDNR
<i>C. griseus</i> (Rate)	AATFFGCI GIDKFGE ILLKSKAAEAHVD AHYE QNEQP TGTCACITGDNR
<i>R. norvegicus</i> (Hamster)	AATFFGCI GIDKFGE ILLKSKAAEAHVD AHYE QNEQP TGTCACISGGNR
Konsensus Säugetiere	[FFGCI GIDKFGE ILLKsKAAEAHVD] ²

Abb. 3.3 Alignment der AS-Sequenzen aus Motiv 1 der *Physcomitrella* ADKs *PpADK1*, *PpADK2* und *PpADK3* sowie ADK-Sequenzen aus 1 Hefe, 3 Algen, 1 Moosfarn, 9 Samenpflanzen und 4 Säugetieren. Die größere Übereinstimmung der *Physcomitrella* Motiv 1-Sequenzen mit denen aus Pflanzen ist deutlich erkennbar. Oben wird die Konsensus Sequenz für *Physcomitrella* dargestellt. Hierbei werden mit großen Buchstaben die AS repräsentiert, die in allen drei Sequenzen vorkommen.

Die kleinen Buchstaben zeigen mögliche AS auf, die nur in einer Sequenz vertreten sind (*1) Verteilung des Motivs 1 bei den im mittleren Kästchen markierten vaskulären Pflanzen und unten (*2) deren Vergleich bei vier Säugetieren. Die Spezies-Namen zu den verwendeten Sequenzen sowie die entsprechende Accessions-Nummern sind in 2.3 erfasst.

Definition der verwendeten Farben für die AS: (pink) Ein Unterschied innerhalb der jeweiligen Pflanzen- oder Tier-Gruppe; (blau) mehrere Unterschiede innerhalb der jeweiligen Pflanzen- oder Tier-Gruppe; (rot) kommt nur bei tierischer Konsensus Sequenz vor; (grün) kommt nur bei pflanzlicher Konsensus Sequenz vor; (orange) kommt bei keiner Konsensus Sequenz vor; (schwarz) gleich zu beiden (pflanzlichen/tierischen) Konsensus Sequenzen.

Für alle 3 *PpADK*-Gene wurden über die *Physcomitrella*-Cosmoss-Datenbank (<http://www.cosmoss.org/bm/BLAST>) jeweils EST-Einträge gefunden (Daten nicht gezeigt), sodass in *Physcomitrella* von 3 exprimierten *ADK*-Genen ausgegangen werden kann.

3.2.1.2 Subzelluläre Lokalisierung der *Physcomitrella* ADKs

Studien zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung der *Physcomitrella* ADKs anhand der N-terminalen AS-Sequenzen wurden mit Hilfe der *online*-Programme Target-P, Signal-P und PSORT (s. 2.3, Tab. 10) durchgeführt. Die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisierung von *PpADK2* sind widersprüchlich: während für dieses Protein nach PSORT und MultiLoc eine Lokalisierung in der Membran bzw. im Cytoplasma wahrscheinlich ist, wird es nach Vorhersage von Target-P sekretiert, allerdings mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit. Für *PpADK1* und *PpADK3* wird keine Sekretion vorausgesagt und die genaue intrazelluläre Lokalisierung ist unklar.

Tab. 10 Vorhergesagte Lokalisierung der ADK Proteine von *Physcomitrella* mit Hilfe der Programme PSORT (<http://wolfsort.org/>; Horton, 2007), Target-P/Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>; Emanuelsson *et al.*, 2007) und MultiLoc (<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/>; Höglund *et al.*, 2006)

Name	PSORT	Target P/Signal P	MultiLoc
<i>PpADK1</i>	membrane	-	cytoplasmatic 0,8
<i>PpADK2</i>	membrane	S/5 (TPlen 26)/ -	cytoplasmatic 0,9
<i>PpADK3</i>	cytoplasma	-	peroxisomal 0,8

Target-P Wahrscheinlichkeitsklasse (1 = hoch bis 5 = niedrig), (S) Secretory Pathway

3.2.1.3 Genomische Organisation von *PpADK1*, *PpADK2* und *PpADK3*

Die für *PpADK1*, *PpADK2* und *PpADK3* (3.2.1) vom JGI-Server vorhergesagten Gen-Modelle weisen eine respektive Gesamtlänge von 3565 bp, 3364 bp und 3574 bp auf. Hinsichtlich der Intron-Exon-Verteilung sind zwei Varianten zu erkennen. Während *PpADK1* und *PpADK2* jeweils 13 Exons und 12 Introns besitzen, enthält *PpADK3* hingegen nur 11 Exons und 10 Introns (Abb. 3.4).

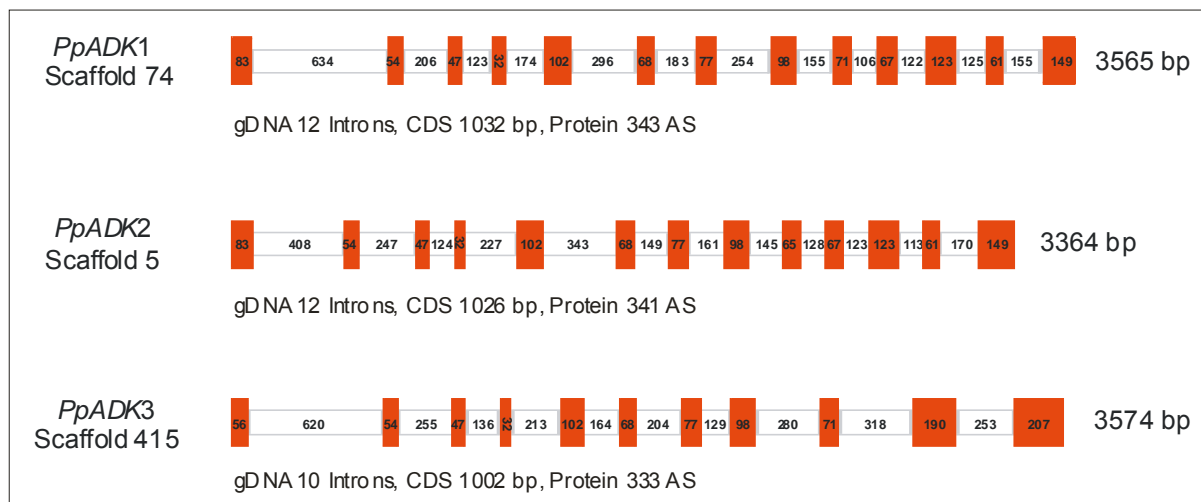


Abb. 3.4 Vergleich der Genmodelle für *PpADK1*, *PpADK2* und *PpADK3*. Verteilung sowie Größe von Introns (weiße Boxen) und Exons (rote Boxen) laut des jeweils vom JGI-Server favorisierten Genmodells (<http://genome.jgi-psf.org/>).

Bei allen drei ADKs ist die Größe einiger Exons stark konserviert: Exon 2 mit jeweils 54 bp, Exon 3 mit 47 bp, Exon 4 mit 32 bp, Exon 5 mit 102 bp, Exon 6 mit 68 bp, Exon 7 mit 77 bp, Exon 8 mit 98 bp. Ähnliche Größen dieser Exons sind ebenfalls bei beiden ADKs von *Populus trichocarpa* sowie bei *AtADK2* nachweisbar (nicht gezeigt).

Bei *PpADK1* und *PpADK2* sind die Größen der Exons 1, 10, 11, 12 und 13 ebenfalls konserviert (mit jeweils 83 bp, 67 bp, 123 bp, 61 bp und 149 bp). Ebenso besitzen *PpADK1* und *PpADK3* für Exon 9 eine übereinstimmende Länge von 71 bp.

PpADK1 besitzt eine bekannte 5'-UTR Sequenz von 133 bp sowie eine 3'-UTR Sequenz von 262 bp. Der ORF enthält 343 Kodons (37,2 kDa) und endet mit dem Stop-Kodon TAG. Für *PpADK2* und *PpADK3* ist die Länge der jeweiligen UTR Regionen noch unbekannt. Die *PpADK2* Sequenz kodiert für ein vorhergesagtes

Protein von 341 AS (37,2 kDa, Stop TAG), die Sequenz von *PpADK3* kodiert für ein Protein von 333 AS (36,1 kDa, Stop TAA).

Die prozentuale Identität der genomischen Sequenzen bei den verschiedenen *PpADKs* variiert zwischen 48% bei *PpADK1* und *PpADK2* und 39% bei *PpADK1* und *PpADK3*.

3.2.1.4 Phylogenetische Analyse von ADK-Sequenzen

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der *Physcomitrella* ADKs mit den entsprechenden Genen von Bäckerhefe (1), Algen (4), Moosfarn (2), Gefäßpflanzen (9) und Säugetieren (4) ist in Tab. 23 dargestellt. Die Identität der *Physcomitrella* ADKs zu den ADKs von Gefäßpflanzen beträgt 64-71%. Zur Alge *Volvox carteri* besteht eine Homologie von 54-57%. Zu den Säugetier-ADKs besteht ebenfalls eine Homologie von jeweils ca. 50%. Innerhalb der Organismengruppen zeigen die Säugetiere ADKs die höchste Homologie mit Werten von bis zu 94%. Die ADKs der Algen *Volvox* und *Chlamydomonas* zeigen eine Homologie von 90%. Die höchste Homologie zwischen ADKs innerhalb einer Spezies wurde bei *Sellaginella* mit 98% festgestellt, gefolgt von *Arabidopsis* (92%). Die *Physcomitrella* ADKs zeigen die höchste Homologie zwischen *PpADK1* und *PpADK2* mit 87% Identität.

Das ADK-Gen der Hefe *Pichia stipitis* weist trotz der großen phylogenetischen Distanz eine Homologie von bis zu 43% zu den *Physcomitrella* ADKs und 46% zur Hamster ADK (*Cricetulus griseus*) auf.

In der Tab. 23 sind die Daten eines paarweisen-Vergleichs (Clustal-W) für 21 ADK-Sequenzen verschiedener Organismen dargestellt (AS-Sequenzen). Aus dieser Tabelle ließ sich der in Abb. 3.5 dargestellte NJ-Stammbaum erstellen, wobei insgesamt vier ADK-Hauptgruppen zu erkennen sind:

Gruppe I beinhaltet die Gefäßpflanzen, inklusive Samenpflanzen sowie das Moosfarn *Sellaginella*. Gruppe II wird von den drei *Physcomitrella* ADKs gebildet. Gruppe III beinhaltet die Algen und die Gruppe IV enthält die tierischen ADK Sequenzen.

Da bislang in keiner der mir bekannten *ADK*-Publikationen die Intron-Exon-Verteilungen dargestellt und verglichen sind, wurden diese Information aus genomischen Datenbanken bezogen (NCBI und JGI) und ebenfalls in Abb. 3.5 aufgenommen. Die Anzahl der Intons variiert zwischen 7 bei *Chlamydomonas* und 12 bei Reis, *Selaginella* und *Physcomitrella* (*PpADK1* und *PpADK2*). Andere Organismen wie die Hefe *Pichia stipitis* (nicht dargestellt) und die unizelluläre Alge *Ostreococcus lucimarinus* haben dagegen keine Introns. Alle ausgewählten Säugetier-*ADK*-Gene besitzen 9 Introns. Der Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* besitzt 6 Introns im *ADK*-Gen (nicht dargestellt).

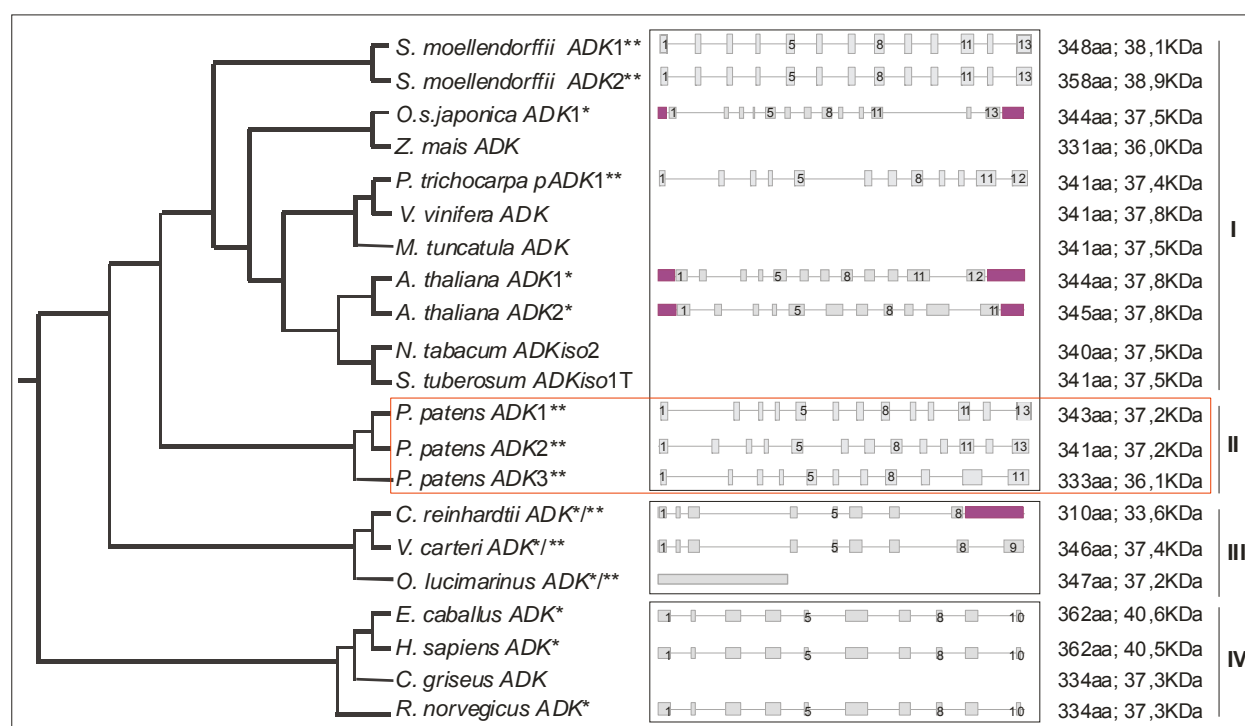


Abb. 3.5 Vergleich von 21 *ADK*-Genen verschiedener Organismen. Links: *Neighbor-Joining* Stammbaum zeigt die Ähnlichkeit der abgeleiteten AS-Sequenzen. Hierbei werden vier Hauptgruppen (I, II, III und IV) differenziert. Mitte: Intron-Exon-Verteilung den jeweiligen *ADK*-Gene. Als graue Kästchen sind die Exons dargestellt, Graue wagerechte Linien stellen die Introns dar, hierbei ist die Intron-Größe der Säugetier-*ADK*s nicht bekannt und daher als nicht durchgezogene Linien dargestellt. Violette Kästchen repräsentieren die bekannten untranslatierten Bereiche (UTRs). Die Intron-Exon-Größen sind schematisch dargestellt und unterliegen keinem genauen Maßstab. Rechts sind die Längen der jeweiligen AS-Sequenzen sowie das errechnete Molekulargewicht der Genprodukte angegeben.

(*) Daten wurden aus den NCBI-Datenbank bezogen. (**) Angegeben sind die im JGI-Server vorgeschlagene Intron-Exon-Verteilung (Stand Feb. 2008). (aa): Aminosäuren.

Die Längen der abgeleiteten AS-Sequenzen der jeweiligen Genprodukte liegen zwischen 310 AS bei *Chlamydomonas* und 362 AS bei Mensch und Pferd. Die *Physcomitrella ADKs* nehmen mit 333 bis 343 AS eine mittlere Position ein mit einer molekularen Masse von 35,1 und 37,2 kDa.

3.2.2 VERSUCHE ZUR VERÄNDERUNG DER ENDOGENEN ADK-AKTIVITÄT

3.2.2.1 Herstellung eines Transformationsvektors für das Gen Adenosin-Kinase (pHP_Act1_PpADK1)

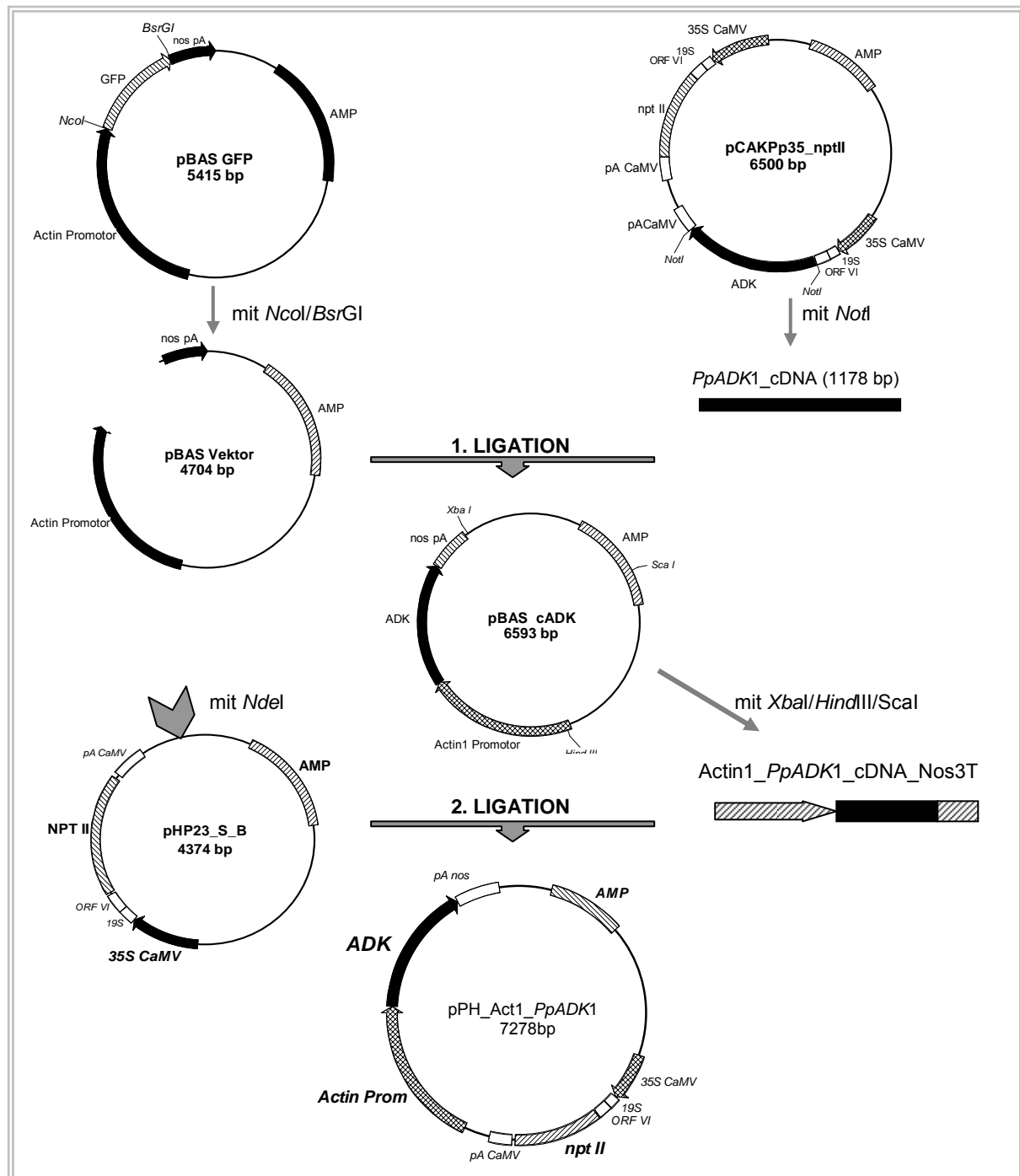


Abb. 3.6 Klonierungsschritte zur Fusion des Actin1-Promotors aus Reis (Acc. No. S44221) mit der *PpADK1*-cDNA aus *Physcomitrella* (Acc. No. Y15430) und Herstellung des pflanzegeeigneten Transformationsvektors pHP_Act1_PpADK1 (G418-Resistenz).

Zur Aufklärung der Rolle von *PpADK1* für die Homöostase von Cytokinin wurde eine Überexpression mittels Transgenese angestrebt. Hierzu wurde der Überexpressionsvektor pHP_Act1_*PpADK1* wie folgt hergestellt (s. Abb. 3.6): Aus dem pBAS_GFP-Vektor wurde mittels der *NcoI*- und *BsrGI*-Restriktionsendonukleasen, das *GFP*-Gen entfernt. Anschließend wurde die *PpADK1*-cDNA (Acc. No. Y115430) aus pcAKPp_35S_nptII (Schulz, 2001, siehe 2.4, Abb. 2.1) mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *NotI* gewonnen. Dieses Fragment wurde durch *blunt end* Ligation in den pBAS-Vektor inkloniert und ergab das Zwischenprodukt pBAS cADK.

Durch Restriktionsschritte mittels *XbaI*, *HindIII* und *ScaI* konnte die gesamte Expressions-Kassette (Actin1-Promotor_*PpADK1*-cDNA_Nos 3T) aus pBAS cADK entnommen werden.

Die Kassette aus Actin-Promotor, *PpADK1* und nos3-Terminator wurde in den Vektor pHP23_S_B (s. Abb. 3.6), welche nach der Behandlung mit *NdeI* geöffnet war, durch *blunt end* Ligation inkloniert. Der hergestellte pHP_Act1_*PpADK1* Vektor enthält den für Pflanzen geeigneten Selektionsmarker *NPTII*, welcher eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 vermittelt. Der Transformationsvektor pHP_Act1_*PpADK1* wurde nach dem Desoxy-Verfahren sequenziert, wobei keine Fehler in den relevanten Bereichen (Actin1-Promotor, *PpADK1*-Gen und nos3-Terminator) festgestellt wurden (komplette Sequenz und Plasmidkarte siehe Anhang 6.2).

3.2.2.2 Transformation von *Physcomitrella* mit dem Vektor pHP_Act1_*PpADK1*

Um die Adenosin-Kinase-Aktivität in *Physcomitrella* zu modulieren, wurden in zwei unterschiedlichen Ansätzen ca. 300.000 Wildtyp-Protoplasten mit 30 µg zirkulärem pHPAct1_*PpADK1* Vektor transformiert (s. Tab. 11). Aus insgesamt 451 erhaltenen G418 resistenten Linien wurden nach dem dritten Selektionsprozess (abwechselndes Wachstum auf Medium mit und ohne G418) 8 stabile Transformanten isoliert.

In Bezug auf die überlebenden Protoplasten konnte hinsichtlich der gewonnenen resistenten Linien eine Transformationsrate von 2% und 6,39% bestimmt werden.

Die Rate in Bezug auf stabile Integrationsereignisse lag mit 0,26% pro μg Plasmid-DNA innerhalb des von Schaefer *et al.* (1994) beschriebenen Bereichs von 0,05-2%.

Tab. 11 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Transformationsexperimenten mit pHP_Act1_PpADK1. Die erhaltenen stabilen *Physcomitrella* Transformanten stammen aus zwei unabhängigen Transformationen. Die zur Transformation verwendete Wildtyp-Kultur wurde bei 15°C kultiviert.

Anzahl eingesetzter Protoplasten (ca.)	Überlebende Protoplasten nach der Transformation	Resistente	Gesamtanzahl stabile Transformanten
3×10^5	8.980	184	8
3×10^5	4.176	267	

3.2.2.3 Studien zur Ploidie der PpADK1-Transformanten

Bei den acht erhaltenen PpADK1-Transformanten wurde mittels Durchfluss-Zytometrie der Ploidiegrad untersucht (s. 2.12.3). Dies ist bedeutend, um bei der Transformation gelegentlich auftretende Polyploidisierungen zu erfassen und bei der Auswahl der Pflanzen für die anschließenden biochemischen und phänotypischen Analysen zu berücksichtigen. Auf den Histogrammen in Abb. 3.7 ist für den haploiden Wildtyp ein typischer Fluoreszenz-Peak (1) auf den Kanälen 75-110 zu erkennen.

Dieser Peak findet sich ebenfalls bei allen untersuchten Transformanten wieder, was auf einen haploiden Zustand schließen lässt.

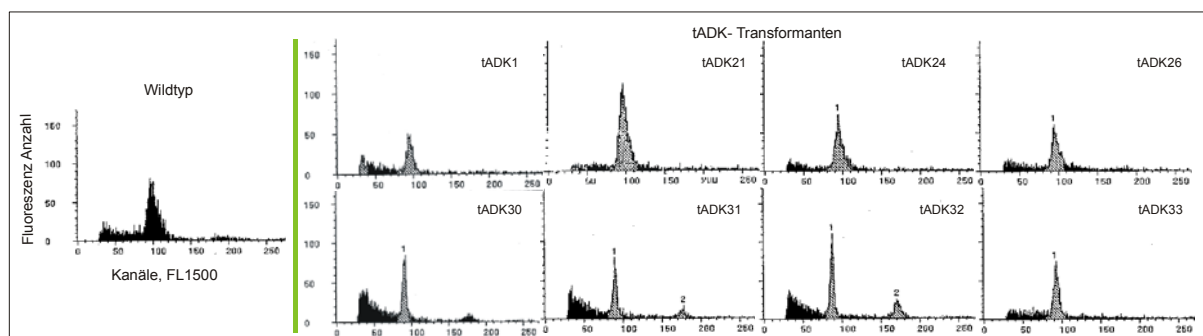


Abb. 3.7 Flowzytometrie-Histogramme zur Ploidie-Analyse der Transformanten, tADK1-1, tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26, tADK1-30, tADK1-31, tADK1-32 und tADK1-33 im Vergleich zum Wildtyp.

Bei den Linien tADK1-31 und tADK1-32 ist zusätzlich ein zweiter niedrigerer Peak in der Höhe von Kanal 170 erkennbar, der möglicherweise bei Moosen vorkommende Endopolyploidisierungen widerspiegelt.

Übereinstimmend mit den primären *PpADK1*-Transformanten wiesen auch die generativen F1-Tochterlinien F1-tADK1-1, F1-tADK1-21, F1-tADK1-26 einen haploiden Genotyp auf (nicht gezeigt).

3.2.2.4 PCR-Nachweis der Integration der ADK-Kassette (Actin1-*PpADK1*-nos3-Terminator) in das Genom von *Physcomitrella*

Die genomische DNA von 5 *PpADK1*-Transformanten wurde nach der CTAB-Methode (s. 2.7.1) gewonnen. Der Nachweis der Integration der gesamten Actin1-Promotor-*PpADK1*-nos3-Terminator-Kassette wurde mittels PCR unter Verwendung verschiedener Primerpaare durchgeführt (s. 2.4.1). Die genomische *PpADK1*-Sequenz unterscheidet sich von der *PpADK1*-cDNA durch die Präsenz der 12 Introns (s. 3.2.1.3, Abb 3.4). Die Primerpaare wurden daher so ausgewählt, dass die Amplifikate der gDNA nicht größer als 700 bp und die der cDNA nicht kleiner als 50 bp waren.

In der folgenden Abb. 3.8 ist in den Teilen A und B die Lokalisierung der Primer in der genomischen *PpADK1*-Sequenz sowie der Actin1-*PpADK1*-nos3T-Kassette dargestellt. Die Größen der erwarteten Amplifikate sind als graue bzw. weiße Balken wiedergegeben. Ein Bereich in der Mitte des Gens von ca. 236 AS *Pp_gADK1* und 53 AS bei *Pp_cADK1* wurde nicht analysiert und daher sind diesbezügliche Balken in Abb. 3.8 (A, B) nicht dargestellt.

In der Abb. 3.8 sind die PCR-Ergebnisse aller benutzten Primerpaare dargestellt. In der zweiten Spur der Teilabbildungen wurden jeweils PCR-Reaktionen mit template DNA aus Wildtyp, gefolgt von tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26, tADK1-31 und tADK1-33 aufgetragen. In Spur 8 wurde die Reaktion mit dem zur Transformation verwendeten Plasmid pHP_Act1-*PpADK1* aufgetragen (Kontrolle).

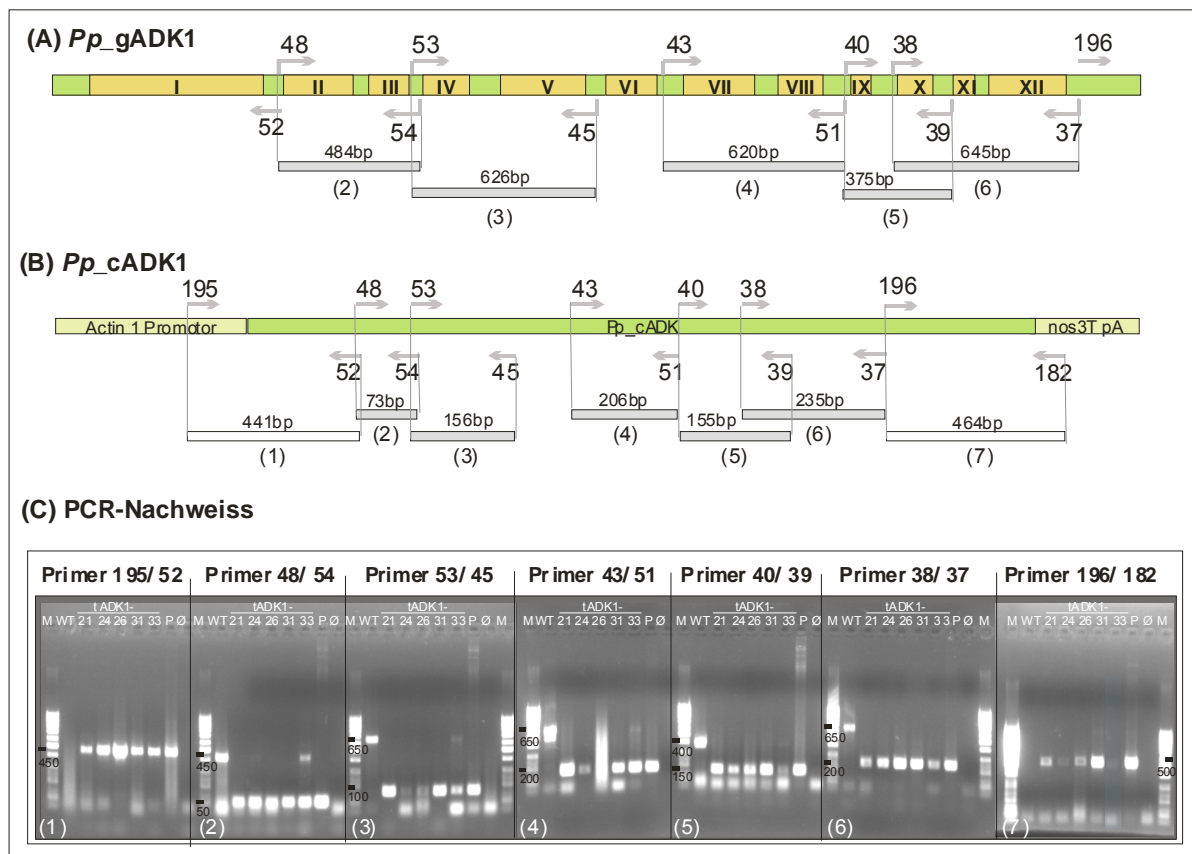


Abb. 3.8 Strategie und PCR-Nachweis der Integration des pHP_Act1_PpADK1-Konstruktes im Genom der *Physcomitrella*-Transformanten.

(A) Darstellung des genomischen *PpADK1*-Lokus mit den bei den jeweiligen Primer-Kombinationen erwarteten Fragmentgrößen. Die grünen Balken repräsentieren die Exons; gelbe Balken sowie römische Zahlen repräsentieren die Introns.

(B) pHP_Act1_PpADK1-Konstrukt mit erwarteten Fragmentgrößen. Die Amplifikate, die die Promotor- und Terminator-Bereiche abdecken, sind als weiße Balken dargestellt. Die Integration des Promotors wurde mit dem Primerpaar Pr195/54, die des Terminators mit Pr182/196 überprüft

(C) Von links nach rechts sind die erhaltenen Amplifikate jedes Primerpaars bei Wildtyp und den Transformanten tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26, tADK1-31, tADK1-33 dokumentiert. Mit den 7 verschiedenen Primerpaaren wurden die erwarteten Amplifikate amplifiziert. Mit den externen Primern 155/52 (1) sowie 196/182 (7) wurde nur Vektor-DNA amplifiziert, mit den internen Primern (2-5) wurden sowohl Vektor-DNA als auch Teile des ursprünglichen *PpADK1*-Lokus amplifiziert. Nur im Einzelfall, konnte bei tADK-1 gleichzeitig Vektor- und *ADK1*-DNA amplifiziert werden (z.B. (2) tADK1-24 und -33).

Die PCR Produkte wurden auf eine 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. (M) 50 Kb Ladder Fermentas, (P) Plasmid Kontrolle pHP_Act1_PpADK1. Als Kontrolle für alle Reaktionen wurde das Plasmid pHP_Act1_PpADK1 verwendet.

In Abb. 3.8 C-1 wurde, wie erwartet, bei allen *PpADK1*-Transformanten ein Amplifikat von ca. 400 bp nachgewiesen, wodurch die Anwesenheit des Promotors sowie der Anfang der *ADK1*-cDNA im Genom belegt ist. In den Abb. 3.8 C-2 bis 6 wurden für den Wildtyp die erwarteten großen Amplifikate mit Intron-Anteilen erhalten (vgl. Abb. 3.8 A, B). Bei den *PpADK1*-Transformanten wurden mit denselben Primerpaaren die erwarteten kleineren Amplifikate für die *PpADK1*-cDNA

aus dem Transformationskonstrukt erhalten. Nur bei einigen Transformanten wurden gleichzeitig auch genomische *ADK1*-Fragmente amplifiziert (s. Abb. 3.8 C-2 und C-3). Höchstwahrscheinlich wurde bei der PCR die Amplifikation der kleineren cDNA-Fragmente gegenüber den größeren genomischen Fragmenten favorisiert. Mit den Primern 196/182 wurde bei allen *PpADK1*-Transformanten im Gegensatz zum Wildtyp ein Amplifikat von ca. 460 bp erhalten. Dies belegt die Anwesenheit des *nos3*-Terminators. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die gesamte *Actin1*-Promotor_*PpADK1*_nos3T-Kassette ins Genom der untersuchten Transformanten tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26, tADK1-31, tADK1-33 transferiert wurde.

3.2.2.5 Beschreibung des Phänotyps des *PpADK1*-Transformanten

3.2.2.5.1 Gametophoren

Zur phänotypischen Beschreibung wurden die Pflanzen in Glasbechern auf nicht selektivem Medium (ABCTV) kultiviert (s. 2.5.1). Dieses Experiment wurde zweimal jeweils bei 15 und 25°C durchgeführt; in beiden Fällen waren die Ergebnisse vergleichbar.

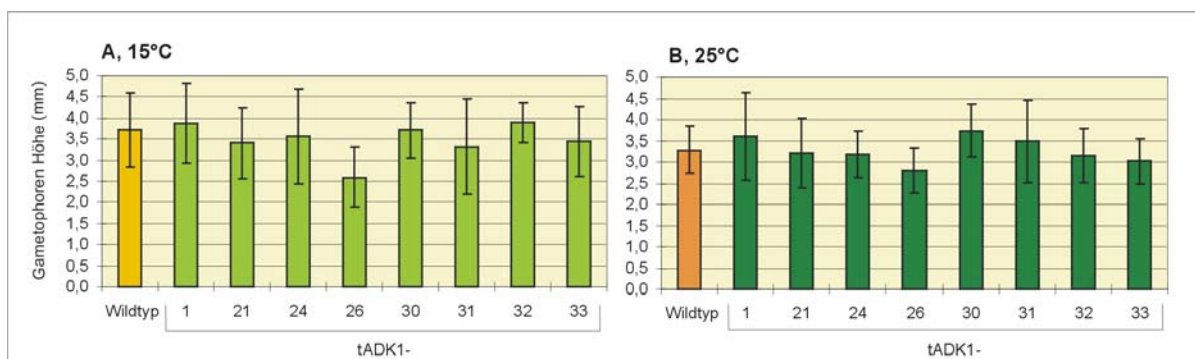


Abb. 3.9 Höhe der Gametophoren von Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten bei 15°C und 25°C. Daten sind Mittelwerte mit SD aus jeweils 13 Pflanzen pro Genotyp. Pflanzen waren zwei Monate in Glasgefäßen auf ABCTV gewachsen.

Auffallend war, dass alle bei 15°C gewachsenen Pflanzen zum Untersuchungszeitpunkt im Mittel ca. 0,4 mm höher waren als die bei 25°C gewachsenen. Allerdings konnten weder bei 15 noch bei 25°C einheitliche Unterschiede bei der Wachstumshöhe der Gametophoren zwischen Wildtyp und den *PpADK1*-Transformante festgestellt werden (s. Abb. 3.9). Obwohl

Transformanten mit abweichender Höhe im Vergleich zum Wildtyp vorkommen (tADK1-1 und tADK1-26), konnte kein gleichgerichteter Effekt der *PpADK1* Transformation auf die Gametophorenhöhe beobachtet werden.

3.2.2.5.2 Vergilbung der Phylloide

Ein deutlicher phänotypischer Unterschied zwischen Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten bestand hinsichtlich der Vergilbung der Phylloide, unter Starklichtbedingungen (ca. $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), die übereinstimmend bei allen *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich früher erfolgte. Dieser Effekt wurde sowohl bei 15- als auch bei 25°C beobachtet, wobei er bei 15°C ausgeprägter war.

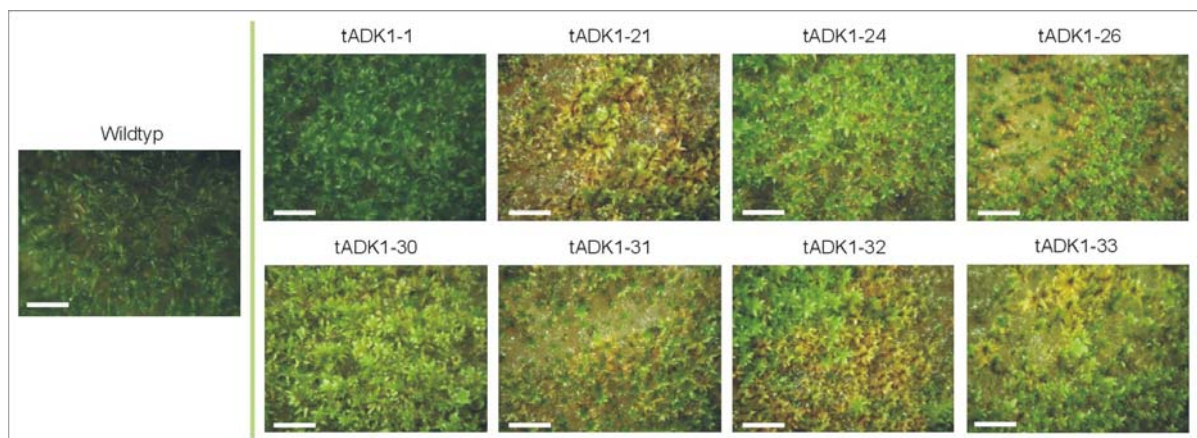


Abb. 3.10 Vergilbungserscheinungen beim Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten unter Starklicht (ca. $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Alle Pflanzen wurden zwei Monate bei 15°C kultiviert. Der Maßstab entspricht 200 mm.

In Abb. 3.10 sind die Ergebnisse des 15°C-Experiments dargestellt, wobei leichte Unterschiede in der Intensität der Vergilbung zwischen den Transformanten erkennbar sind. Die Blättchen wurden im Gegensatz zum Wildtyp zunächst gelblich, dann später glasig, wobei diese Vergilbung im unteren Teil der Gametophoren begann. Das Stämmchen wurde dunkel-braun, so dass, wenn man die Gametophoren vom Apex aus betrachtete, oftmals braune Punkte in der Scheitelregion zur erkennen waren. Die tADK1-1 Transformante zeigte die Vergilbung der Phylloide nur im unteren Bereich der Gametophoren, sodass diese im Übersichtsbild dem Wildtyp ähnlich war.

3.2.2.5.3 Verstärkte Bildung mittelständiger Rhizoide am Cauloid von *PpADK1*-Transformanten

Der Wildtyp zeigte unter Standard-Wachstumsbedingungen im mittleren Bereich der Gametophoren nur selten Rhizoide (s. Sakakibara *et al.*, 2003). Bei allen untersuchten *PpADK1*-Transformanten hingegen war die Bildung solcher Filamente sehr ausgeprägt. Teilweise war die Bildung dieser sogenannten mittelständigen Rhizoide entlang des ganzen Cauloids zu beobachten (Abb. 3.11 C). Die Dichte der Rhizoide variierte zwischen den Transformanten, so dass im Extremfall (z.B. tADK1-24) spinnweben-artige Strukturen zwischen den Gametophoren zu erkennen waren (vgl. Abb. 3.11 B). Die beobachtete Segmentierung der verbräunten Filamente bestätigte, dass es sich um Rhizoid-artige Strukturen handelte (Abb. 3.11, D).

Möglicherweise trug das verstärkte Vorkommen der mittelständigen Rhizoide zum dunkleren Aussehen (am Cauloid) sowie zur Vergilbung der Phylloide der *PpADK1*-Kulturpflanzen bei (vgl. Abb. 3.10, Abb. 3.11).

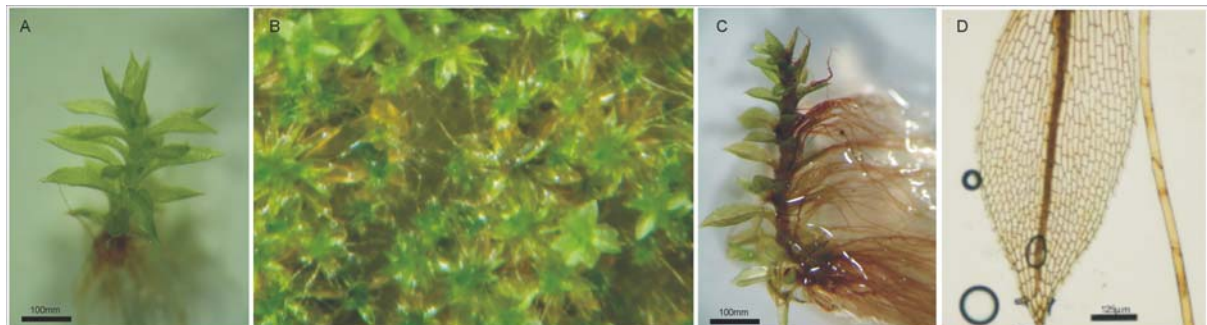


Abb. 3.11 Bildung von mittelständigen Rhizoiden an Gametophoren von *PpADK1*-Transformanten. A) Wildtyp Gametophor B) Spinnwebenartige Filamente bilden sich zwischen den Gametophoren (tADK1-24), C) Verbräunte Rhizoide an Cauloid (tADK1-21), D) untere Phylloide werden glasig, die Filamente sind multizellulär mit typischer für Rhizoide obliquen Querwand (tADK1-32).

3.2.2.5.4 Längere basale Rhizoide am Cauloid von *PpADK1*-Transformanten

In Abb. 3.12 ist das Ergebnis der Längenmessung von basalen Rhizoiden unterschiedlicher *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

Aus beiden Graphiken lässt sich ableiten, dass bei 25°C generell sowohl beim Wildtyp als auch bei den Transformanten eine Tendenz zur Bildung von kürzeren basalen Rhizoiden als bei 15°C besteht.

Übereinstimmend bei beiden Kultivierungs-Temperaturen (15°C und 25°C) ist bei den Transformanten eine deutliche Tendenz zu längeren Rhizoiden erkennbar. Ausnahmen bilden lediglich tADK1-1 bei 15°C und tADK1-30 bei 25°C. Die größte

Länge bei 15°C weist tADK1-32 mit 16,59 mm auf, während die Länge des Wildtyps nur 8,25 mm beträgt. Bei 25°C betragen diese Werte beim tADK1-33 (dieser weist die größte Länge auf) 16,09 mm, beim Wildtyp 3,47 mm (jeweils Durchschnittswerte).

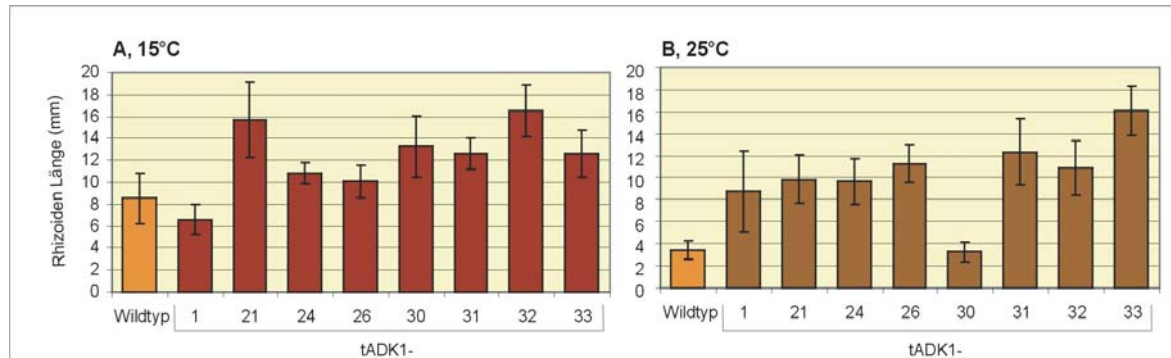


Abb. 3.12 Darstellung der Länge von basalen Rhizoiden von acht *PpADK1*-Transformanten sowie Wildtyp nach Kultivierung bei 15°C und 25°C in Glasgefäßen. Das Alter der Pflanzen betrug zum Messzeitpunkt zwei Monate. Daten entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen von jeweils 13 Pflanzen.

3.2.2.5.5 Generative Reproduktionskapazität von *PpADK1*-Transformanten

Die Induktion der Sporophyten erfolgte bei 15°C nach Überschichtung mit Wasser (s. 2.12.1). Die Transformanten zeigten übereinstimmend, wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung, eine Reduktion bei der Anzahl der gebildeten Sporophyten (s. Tab. 12). Bei tADK1-31 konnten während der Beobachtungszeit keine Sporophyten beobachtet werden. Folglich kann angenommen werden, dass die Integration des *PpADK1*-Genkonstruktes eine Einschränkung der generativen Reproduktionskapazität bewirkt hat.

Tab. 12 Anzahl der Sporophyten bei Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten sowie Daten zur Keimungsfähigkeit der Sporen.

Genotyp	Wildtyp	tADK1-							
		1	21	24	26	30	31	32	33
Sporophyten Anzahl	>100	1	3	3	<25	>50	1	0	>70
Sporenkeimung beobachtet*	ja	ja	ja	Nein	ja	ja	nein	-	ja

*Bei allen Transformanten wurde die Resistenz der Sporen gegenüber dem Antibiotikum G418 überprüft. Die dargestellten Angaben geben die Sporenkeimung auf selektivem Medium wieder.

In dieser Arbeit wurden die Sporophyten auch photographisch dokumentiert (nicht gezeigt), allerdings wurden Größe und Form nicht weiter erforscht.

Die erhaltenen Sporen wurden auf ihre Viabilität untersucht sowie die Weiterübertragung des Resistenzmarkers überprüft. Bereits drei Tage nach Ausbringung auf nicht selektives Medium konnte man die ersten ausgekeimten Sporen beobachten. Auf selektivem Medium (ABC G418) konnte man ausgekeimte Sporen erst nach insgesamt ca. 5 Tagen erkennen, wobei die Keimungsrate bei tADK1-1, tADK1-21, tADK1-26 und tADK1-33 in Bezug auf nicht selektives Medium z.T. deutlich reduziert war (nicht gezeigt). Bei tADK1-30 war die Anzahl der ausgekeimten Sporen auf beiden Medien vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich aus der Ausbildung resistenter Haplosporen ableiten, dass die über das Transformationskonstrukt vermittelte Resistenz meiotisch übertragen wurde.

Sieben der acht Transformanten waren in der Lage, Sporophyten zu bilden. Von diesen sieben Transformanten zeigen nur fünf viable und gegenüber G418 resistente Sporen. Das heißt, dass bei 37% der Transformanten die Vermehrung über die sexuelle Phase gestört ist und bei den restlichen 63% dieser Weg durch eine Reduktion der Sporophyten-Bildung partiell gestört ist (vgl. Tab. 12).

3.2.2.6 *In vivo* Markierung mit Tritium-markiertem Isopentenyl-Adenosin (³H-iPR)

Im Unterschied zu höheren Pflanzen, bei denen die Konversion zu Isopentenyladenosin-monophosphat (iPRMP) sowohl durch die Aktivität von APT (Adenosin-Phosphorybosyltransferase) als auch von ADK erfolgen kann (Mok & Martin 1994), erfolgt diese Konversion bei *Physcomitrella* überwiegend über den ADK-Weg (Schwartzberg *et al.*, 2003).

Bei den *PpADK1*-Transformanten ist noch nicht klar, was die zusätzliche Integration des *PpADK1*-Gens auf Cytokininebene bewirkt hat. Hierzu wurden *in vivo* Studien zur Charakterisierung des Cytokinin-Metabolismus bei den Transformanten tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26 und tADK1-33 durchgeführt. Hierbei sollte nach der Applikation von markiertem iPR festgestellt werden, ob eine gesteigerte oder reduzierte ADK-Aktivität vorlag. Als Maß für die *in vivo* ADK-Aktivität diente hierbei die Menge des in einer bestimmten Zeit gebildeten iPRMP.

In der folgenden Tab. 13 sind zwei unterschiedliche Analysen der Protonemaextrakte nach *in vivo* Markierung zusammengefasst.

In einem ersten Experiment wurden der Wildtyp und tADK1-21 5,5 h mit ^3H -iPR inkubiert. In einem zweiten Experiment wurden die *PpADK1*-Transformanten tADK1-24, tADK1-26 und tADK1-33 sowie der Wildtyp 4 h lang mit ^3H -iPR inkubiert.

Experiment 1

Da die extrahierte Gesamtradioaktivität bei tADK1-21 doppelt so hoch war wie beim Wildtyp, ist eine Schlussfolgerung nur mit Einschränkungen möglich.

Der absolute Gehalt an markiertem iPR und iP (pmol/ml) ist beim Transformanten erhöht, allerdings ist keine deutliche Veränderung des iPRMP-Gehaltes gegenüber dem Wildtyp nachweisbar. Betrachtet man hingegen die relative Verteilung der Radioaktivität, so lässt sich bei tADK1-21 eine Halbierung der iPRMP-Gehalte und eine Verdoppelung der iPR- und iP-Gehalte feststellen. Aus der Reduktion des iPR-Nukleotids sowie der Akkumulation des Substrates iPR lässt sich ableiten, dass die Integration der *PpADK1*-Expressionskassette nicht zu einer Steigerung, sondern zur Senkung der ADK-Aktivität geführt hat.

Tab. 13 Verteilung der radioaktiv markierten Metabolite nach ^3H -iPR-Zugabe (60 nmol/l) beim Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26 und tADK1-33. Dargestellt sind die jeweiligen Konzentrationen (pmol/l) von Abbauprodukten, iPRMP, iPR, iP und von anderen nichtidentifizierten Metaboliten sowie die prozentuale Verteilung im Protonemaextrakt.

	Genotyp	Gesamt pmol/l [%]	Abbau pmol/l[%]	iPRMP pmol/l[%]	iPR pmol/l[%]	iP pmol/l[%]	Anderen pmol/l[%]
Expt.1	Wildtyp	49,7 [100]	11,4 [23]	30,3 [61]	5,1 [10,2]	2,1 [4,2]	0,8 [1,56]
	tADK1-21	85,7 [100]	19,5 [22,70]	31,9 [37,20]	23,7 [27,70]	9,5 [11,10]	1,1 [1,27]
Expt.2	Wildtyp	33,4 [100]	8,2 [24,52]	13,8 [41,45]	7,1 [21,18]	3,5 [10,50]	0,8 [2,35]
	tADK1-24	39,4 [100]	6,3 [15,94]	7,6 [19,19]	22,4 [56,75]	1,4 [3,51]	1,8 [4,59]
	tADK1-26	30,8 [100]	9,3 [30,09]	14,7 [47,79]	3,2 [10,47]	2,3 [7,52]	3,9 [4,13]
	tADK1-33	38,5 [100]	8,4 [24,11]	14,2 [40,50]	8,7 [24,77]	3,1 [8,75]	0,7 [1,86]

Experiment 2

Hierbei wurde beim Transformanten tADK1-24 übereinstimmend mit tADK1-21 aus Expt. 1 ebenfalls eine deutliche Akkumulation der absoluten und relativen iPR Menge festgestellt. Der Gehalt an extrahierbarem iPRMP war gegenüber dem Wildtyp halbiert, was sowohl aus der Betrachtung der absoluten, als auch der relativen Gehalte, hervorgeht. Somit kann auch für tADK1-24 eine Reduktion der ADK-Aktivität festgestellt werden.

Für die Transformanten tADK1-26 und tADK1-33, sprechen die Gehalte an extrahiertem iPRMP sowie iPR allerdings für eine nahezu unveränderte ADK-Aktivität.

3.2.2.7 Verteilung von endogen synthetisierten Cytokininen sowie von ABA und IAA bei den *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp

Zur weiteren Klärung der Frage, ob die *PpADK1*-Transformanten Veränderungen beim Hormonstoffwechsel zeigen, wurden LC-MS basierte Messungen vorgenommen. Hierzu wurden Wildtyp und die *PpADK1*-Transformanten tADK1-21 und tADK1-26 nach der Methode von Lexa *et al.* (2003) untersucht (s. 2.11.1). Neben Cytokininen wurden ebenfalls die Hormone ABA und IAA untersucht.

Aus insgesamt 29 Isoprenoid-Cytokininen, die mit der hier verwendeten LC-MS Methode nachweisbar waren (s. 2.11.1 und 2.11.3), konnten folgende 12 Substanzen sowohl im Wildtyp als auch in den Transformanten sicher identifiziert werden: iPRMP, iPR, iP; tZROG, tZOG, cZRMP, cZR, cZROG, cZ, cZOG, dHZ sowie dHZOG.

In Abb. 3.13 und Abb. 3.14 sind die Ergebnisse für Gewebe bzw. Medium erfasst. Für den Wildtyp liegen die Werte einer Doppelbestimmung vor, während für die beiden Transformanten nur eine Messung erfolgte. Anzumerken ist, dass die Teildiagramme für die verschiedenen Cytokinine eine abweichende Skalierung der Ordinate besitzen. Innerhalb der Teildiagramme ist die Skalierung zum Vergleich der Genotypen jeweils identisch. Die in den Diagrammen angegebenen Werte stellen die Maxima beim jeweiligen Genotyp dar. Ergänzend sind die Daten im Anhang 6.6 tabellarisch dargestellt (s. Tab. 25 und Tab. 26). Im folgenden Text wird lediglich auf starke Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp

eingegangen. Eine detailliertere und grundlegende Erläuterung des Cytokininspektrums bei *Physcomitrella* befindet sich in 3.1 (Abb. 3.1 A)

3.2.2.7.1 Isoprenoid-Cytokinine im Gewebe

Der Status der intrazellulären Cytokinine bei Wildtyp und zwei *PpADK1*-Transformanten ist in Abb. 3.13 dargestellt. Bei der Betrachtung der zeitlichen Verläufe innerhalb des Messzeitraums von 10 Tagen ist übereinstimmend für die meisten der untersuchten Cytokinine bei den verschiedenen Genotypen keine einheitliche Tendenz zu verzeichnen.

iP-Formen

Bei tADK1-26 war das Niveau von iPRMP als Produkt der ADK Reaktion nach iPR-Phosphorylierung während des gesamten Experiments niedriger als beim Wildtyp. Bei der Transformante tADK1-21 hingegen war keine deutliche Reduktion von iPRMP feststellbar.

Der Gehalt an iP war in den Transformanten tADK1-21 bzw. tADK1-26 bei T0 respektive 7- bzw. 4-fach höher als beim Wildtyp. Auch gegen Ende des Messzeitraums (T8) war die iP-Konzentration in den Transformanten ca. 2-fach höher.

tZ-Formen

Bei den *tZ*-Formen wurden weder Monophosphat, noch Ribosid oder Base detektiert (Abb. 3.13). Es konnten nur die O-Glucosid-Formen *tZROG* sowie *tZOG* nachgewiesen werden, die jedoch bei den Transformanten gegenüber dem Wildtyp keine einheitlichen Veränderungen erkennen lassen.

cZ-Formen

Während des gesamten Messzeitraumes wurden für *cZRMP* bei beiden Transformanten deutlich niedrigere Gehalte im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Bei T0 war der Gehalt an *cZRMP* bei beiden Transformanten halbiert im Vergleich zum Wildtyp, bei T8 repräsentiert dieser Metabolit nur 3,7% des Wildtyp Gehalts (vgl. Abb. 3.13 und Anhang Tab. 25).

Die *cZR* Gehalte waren bei beiden Transformanten ebenfalls reduziert und lagen anders als beim Wildtyp zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze.

Für *cZROG*, welches mit Gehalten von bis zu 1029 pmol/g FG das mit Abstand häufigste Cytokinin bei *Physcomitrella* darstellt, waren die Werte bei den Transformanten erhöht. *tADK1-21* und *tADK1-26* zeigten eine leichte Erhöhung im zeitlichen Verlauf (bis 2,8-fach bei T10), obwohl der maximale Wert von *tADK1-21* gleich dem des Wildtyps war.

dHZ-Formen

Bei den *dHZ-Formen* waren im Fall der Transformanten z.T. starke Absenkungen vor allem bei *dHZR*, *dHZROG* und *dHZOG* zu messen.

Zusammenfassend lässt die Transformation mit der *PpADK1*-Kassette nur einen begrenzten Effekt auf die Homöostase der Cytokinine erkennen. Jedoch ist insbesondere ein Effekt bei den *cis*-Zeatin-Formen erkennbar, bei denen vor allem die Base *cZ*, das Ribosid *cZR* und das Nukleotid *cZRMP* im Vergleich zum Wildtyp abgesenkt waren.

Hierbei ist die festgestellte Reduktion von *cZRMP* bei beiden Transformanten mit dem Ergebnis von 3.2.2.6 vereinbar, dass über das *pHP_Act_PpADK1*-Konstrukt eine verminderte Phosphorylierung von Cytokininribosiden bewirkt wurde. Für die erwartete *ADK*-Überexpression und Aktivitätssteigerung lassen sich aus den Cytokininbestimmungen überraschenderweise keine Hinweise ableiten.

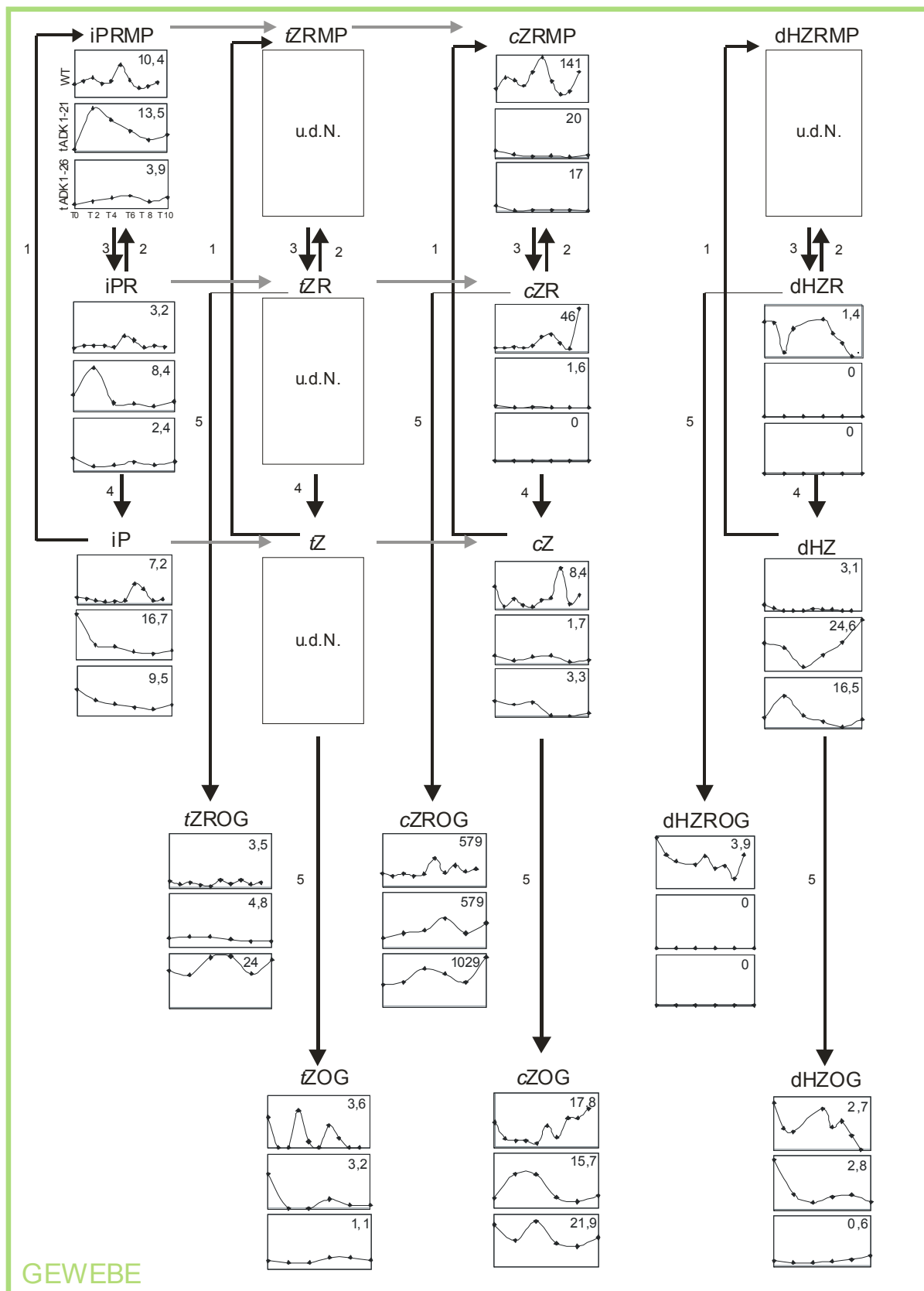


Abb. 3.13 Isoprenoid-Cytokinine pmol/g im Gewebe von *Physcomitrella* Wildtyp (oben) und *PpADK1*-Transformanten tADK1-21 (mitte) und tADK1-26 (unten). Bestimmung mittels LC-MS (Methode 1, s. 2.11.1) u.d.N. - unter der Nachweisgrenze; (1) APT (Adenin-Phosphoribosyltransferase); (2) ADK (Adenosin-Kinase), (3) 5'-N (5'-Nukleotidase); (4) AN: Adenosin Nukleosidase; (5) O-GT: O-Glucosyltransferase. Bei den jeweiligen Metaboliten ist die Skalierung für die drei Genotypen identisch. Die dargestellten Daten repräsentieren den Cytokinin-Status bei T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 und T10. Angegebene Werte stellen die Maxima beim jeweiligen Genotyp und jeweiligem Metabolit dar.

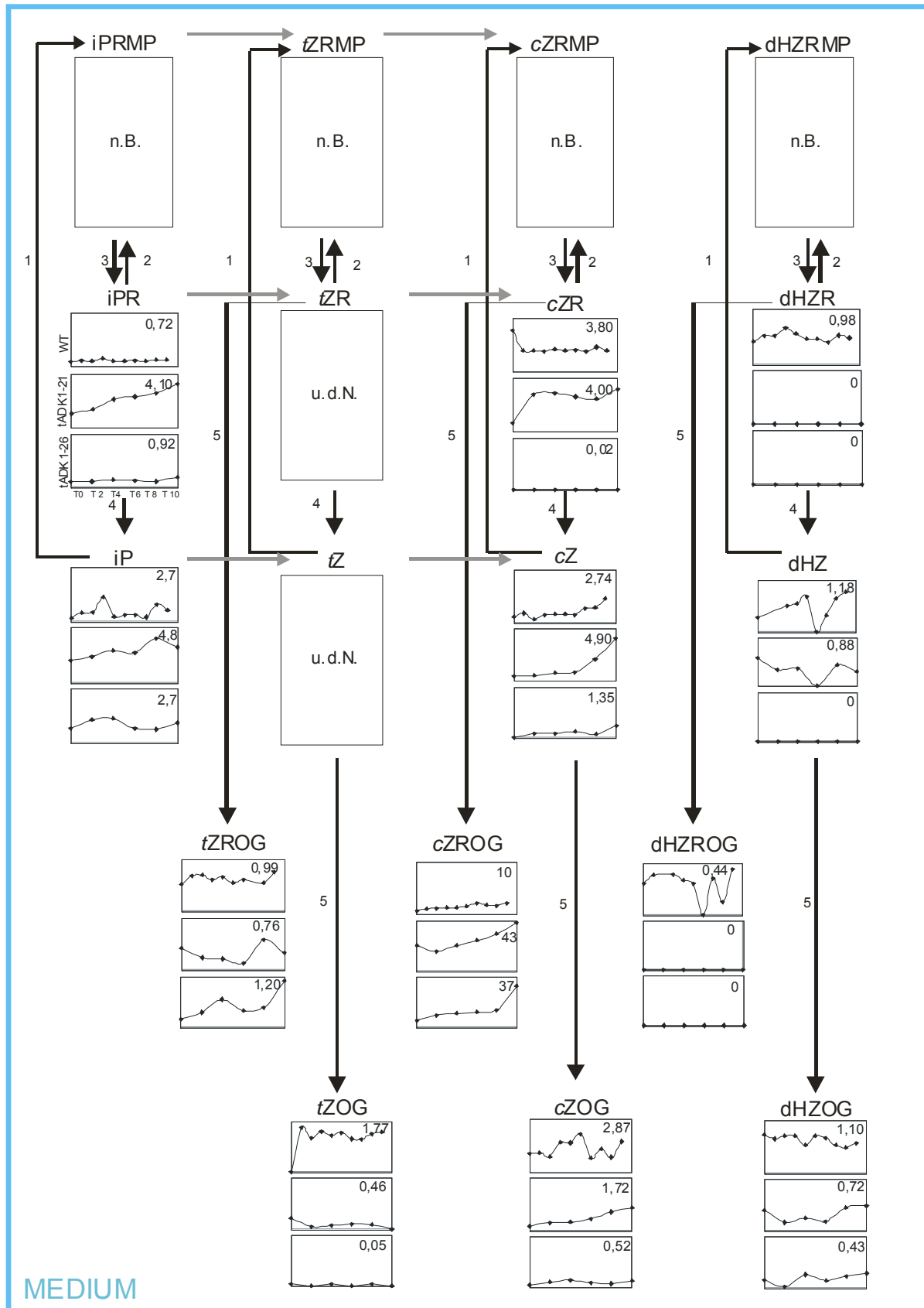


Abb. 3.14 Isoprenoid-Cytokinine im Medium (pmol/100 ml) von *Physcomitrella* Wildtyp (oben) und *PpADK1*-Transformanten *tADK1-21* (mitte) und *tADK1-26* (unten). n.B. nicht bestimmt. Weitere Angaben siehe Abb. 3.13

3.2.2.7.2 Isoprenoid-Cytokinine im Medium

Der Status der extrazellulären Cytokinine bei Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten ist in Abb. 3.14 wiedergegeben.

Generell waren die Konzentrationen der Cytokinine im extrazellulären Raum (angegeben als pmol/100 ml) deutlich geringer als im Gewebe.

iP-Formen

Bei beiden Transformanten war eine leichte Steigerung der iP-Gehalte gegenüber dem Wildtyp nachweisbar.

tZ-Formen

Im Medium (genauso wie im Gewebe) konnte nur *tZ*-O-Glucosid detektiert werden. Hierbei war *tZOG* bei beiden Transformanten deutlich (auf 3,3% bzw. 12,5% der Wildtyp Konzentration) reduziert. Bei *tZROG* bestand ebenfalls bei Transformanten eine Tendenz zu verringerten Werten.

cZ-Formen

Lediglich für *cZROG* ist bei beiden Transformanten eine bis zu 4-fache Steigerung zu sehen. Hingegen sind die Gehalte von *cZOG* auf 23% der Wildtyp Konzentration abgesenkt.

Alle dHZR-Formen kommen im Medium der Transformanten in stark reduzierten Konzentrationen vor.

Verteilung der Cytokinin-Familien sowie Vergleich der Gesamt-Cytokinin-Gehalte

In der Tab. 14 ist ein Vergleich der verschiedenen Cytokinin-Familien in Gewebe und Medium zusammengefasst. Bei der *PpADK1*-Transformanten ist im Gewebe eine Akkumulation der iP- sowie *tZ*-Familie (iP, iPR, iPRMP sowie *tZ*, *tZOG*, *tZR*, *tZROG*, *tZRMP*) nachzuweisen. Die *cZ*-Familie (*cZ*, *cZOG*, *cZR*, *cZROG*, *cZRMP*) wird bei den jeweiligen Transformanten anders akkumuliert. Während bei *tADK21* die Akkumulierung extrazellulär ist, ist sie bei *tADK26* intrazellulär.

Im Medium ist eine Reduktion der *tZ*- sowie dHZ-Familie (dHZ, dHZOG, dHZR, dHZROG, dHZRMP) festzustellen.

Bei tADK26 ist eine Verdopplung der Gesamt-Cytokinine gegenüber dem Wildtyp festzustellen. Der Gehalt an Gesamt-Cytokinin bei tADK21 bleibt dagegen auf Wildtyp-Niveau.

Tab. 14 Vergleich der verschiedenen Cytokinin-Familien, iP-, tZ-, cZ- sowie dHZ-Familie, beim Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten an drei Tagen (T0, T4 und T8). Rot: Reduktion der Konzentration bei den *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp; fett: Konzentrationszunahme bei den *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Daten in pmol/Kultur (Angaben zu Gewicht und Volumina sind in 6.7 dargestellt). Fam: Familie

Name	Gewebe					Tag	Medium					Total
	iP-Fam	tZ-Fam	cZ-Fam	dHZ-Fam			iP-Fam	tZ-Fam	cZ-Fam	dHZ-Fam		
Wildtyp	1,5	1,3	68	2,3		0	0,41	1,5	4,4	1,2		80,5
	1,9	0,3	93	0,5		4	0,50	2,0	5,6	1,4		104,8
	2,3	0,4	135	0,8		8	1,26	1,5	6,5	1,3		149,4
tADK1-21	3,0	1,1	32	2,4		0	1,88	0,5	12,3	0,7		54,1
	4,0	1,2	87	0,5		4	3,05	0,2	14,1	0,5		110,7
	2,8	1,1	117	5,9		8	4,00	0,5	20,0	0,7		152,2
tADK1-26	5,3	7,2	196	2,2		0	1,02	0,1	2,8	0,1		215,1
	3,8	10,9	378	3,0		4	1,70	0,4	6,7	0,2		404,7
	3,1	9,6	302	0,4		8	1,03	0,3	8,1	0,2		325,1

Zusammenfassend lässt sich für alle Daten dieses Experimentes (3.2.2.7.1; 3.2.2.7.2) zum Cytokininstatus festhalten, dass Transformanten insbesondere bei den intrazellulären Konzentrationen der cZ-Formen, mit einer Reduktion von cZRMP, cZR sowie mit einer Akkumulierung von cZROG zum Teil deutlich vom Wildtyp abweichen.

3.2.2.7.3 Verteilung der Hormone ABA und IAA

Neben den Cytokinin wurden auch die Konzentration von ABA und IAA beim Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten tADK1-21 und tADK1-26 gemessen. Bei allen drei Genotypen konnte das Vorkommen beider Hormone sowohl intra- als auch extrazellulär festgestellt werden.

Abcisinsäure (ABA)

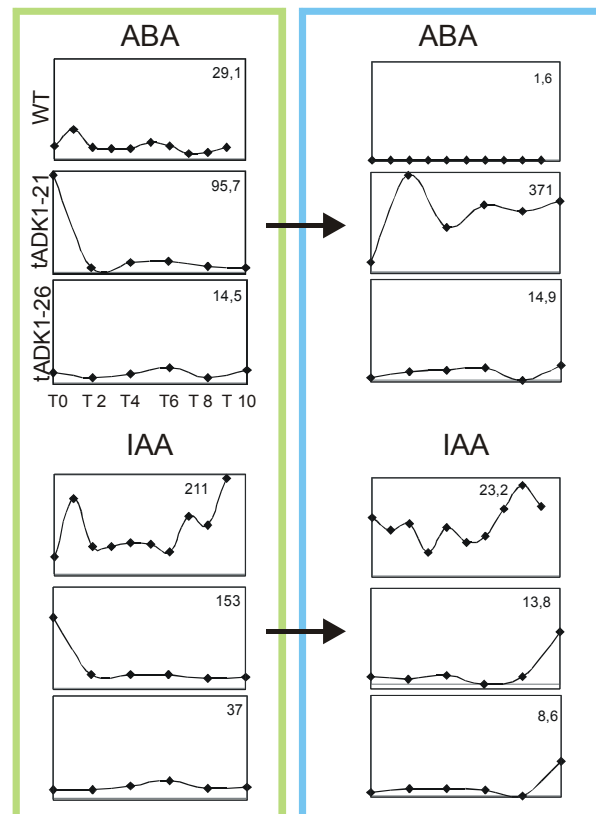
Die ABA-Konzentrationen bei den *PpADK1*-Transformanten zeigten intrazellulär dem Wildtyp vergleichbare Werte. Im Medium dagegen stieg die Konzentration von ABA bei beiden Transformanten. Auffallend sind hohe extrazelluläre Konzentrationen bei tADK1-21, dessen Werte im Vergleich zum Wildtyp bis 125-fach erhöht sind.

Auxin (IAA)

Das Vorkommen von IAA beim *Physcomitrella* Wildtyp und beiden *PpADK1*-Transformanten ist überwiegend intrazellulär. Der Effekt der Transformation mit dem Konstrukt pHP_Act1_*PpADK1* auf den Gehalt an IAA bei den Transformanten zeigte im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Konzentrationen dieses Hormons im Gewebe und im Medium, mit jeweils einer Halbierung des Hormongehaltes (Abb. 3.15).

Abb. 3.15 Konzentrationsverlauf der Hormone ABA und IAA im Gewebe (grüner Kasten) und Medium (blauer Kasten) von *Physcomitrella* Wildtyp (jeweils oben) und *PpADK1*-Transformanten, tADK1-21 (jeweils mitte) und tADK1-26 (jeweils unten). Die Daten für Gewebekulturen sind in pmol/g angegeben und für das Medium in pmol/100 ml.

Die dargestellten Daten repräsentieren den ABA- und IAA-Status bei T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 und T10. Die angegebenen Werte stellen die



Übereinstimmend bei beiden *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp war die extrazelluläre Steigerung an ABA sowie die Reduktion an IAA.

3.3 CYTOKININ-OXIDASE/DEHYDROGENASE

Als weiteres Cytokinin-metabolisierendes Enzym wurde die Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX) untersucht, die den Cytokiningehalt über irreversible Inaktivierung reguliert. Analog zu den Arbeiten zur ADK wurden zunächst die *CKX*-Gene in *Physcomitrella*-Genom-Datenbanken identifiziert und anschließend mit *CKX*-Genen anderer Organismen verglichen.

In einem weiteren Teil wurde die endogene CKX-Aktivität mittels Transgenese modifiziert, um somit Informationen zum Einfluss der CKX auf die Cytokinin-Homöostase sowie zu den phänotypischen Auswirkungen von Cytokininmangel bei *Physcomitrella* zu erhalten.

3.3.1 CYTOKININ-OXIDASE/DEHYDROGENASE IN *Physcomitrella*

In der JGI-Datenbank (<http://genome.jgi-psf.org>) wurden mögliche *Physcomitrella* CKX-Gene gesucht. Nach der Eingabe von CKX-Sequenzen aus verschiedenen Pflanzen und Bakterien (s. 2.3) konnten auf mehreren Scaffolds CKX-Homologe gefunden werden. Die abgeleiteten Sequenzen wurden auf das Vorhandensein der typischen Bindungsregion für den FAD-Kofaktor (PF01565) sowie die CKX-Substratbindungsregion (PF09265) untersucht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; <http://pfam.sanger.ac.uk/>). In 5 verschiedenen Scaffolds wurden anhand dieser Kriterien insgesamt 6 CKX-ähnliche-Gene *PpCKX1* - 6 identifiziert (s. Abb. 3.16).

Für alle erhaltenen CKX-Sequenzen wurden über die für *Physcomitrella* Cosmoss-Datenbank (<http://www.cosmoss.org/bm/BLAST>) EST Einträge gefunden (Daten nicht gezeigt), so dass gefolgert werden kann, dass alle *PpCKX*-Gene exprimiert werden.

3.3.1.1 Genomische Organisation von *Physcomitrella* CKXs

Die genomische Organisation der sechs *PpCKX*-Gene wurde anhand von korrigierten Vorhersagen von *PpCKX* Genmodellen aus dem JGI-Genome-browser untersucht.

PpCKX1 und *PpCKX2* erhalten bei einer Gesamtlänge von 1997 bzw. 2030 bp nur 2 Introns. Die Größe des dritten Exons beträgt in beiden Fällen ca. 1030 bp.

PpCKX3 (2751 bp) enthält 5 Exons mit einer Größe zwischen 190 und 400 bp. Drei der vier Introns haben eine Größe zwischen 100-300 bp, das Intron3 besitzt allerdings 720 bp. Bei alle drei *PpCKX1* - 3-Genen ist die Größe des Exons 2 mit 283 bp konserviert. Bei *PpCKX3* entspricht die Summe der Größen der Exons 3, 4 und 5 (1022 bp) der Größe des Exons 3 bei *PpCKX1* und *PpCKX2*.

Sowohl *PpCKX4*, *PpCKX5* als auch *PpCKX6*, mit einer jeweiligen Größe von 2789 bp, 3514 bp bzw. 3610 bp, besitzen 5 Introns und 6 Exons. Das Intron 1 ist bei allen drei Genen das Größte, wobei dieses bei *PpCKX4* 650 bp lang ist. Bei *PpCKX5* und

PpCKX6 beinhaltet dieses Intron ca. 1300 bp. Aufgrund der Introns ist die Gesamtlänge von *PpCKX5* und *PpCKX6* mit über 3300 bp deutlich größer als die der übrigen *PpCKX*-Gene.

Zwischen *PpCKX4*, -5 und -6 ist die Größe einiger Exons sehr konserviert: Exon 4 mit jeweils 270 bp und Exon 5 mit 263 bp. Bei *PpCKX4* und *PpCKX6* ist das Exon 1 mit 399 bp ebenfalls konserviert. Das Exon 3 der *PpCKX5* und *PpCKX6* hat mit 117 bp auch eine übereinstimmende Länge.

PpCKX1 enthält ein ORF von 551 Kodons (61,5 kDa) und endet mit dem Stop-Kodon TGA. *PpCKX2* kodiert für ein Protein von 548 AS (60,5 kDa) und endet mit dem Stop-Kodon TAA. Für *PpCKX3* wurden am 3'- und 5'-Ende UTRs von jeweils 33 bzw. 318 bp festgestellt. Dieses Gen kodiert für ein Protein von 498 AS (55,5 kDa) und endet mit dem Stop-Kodon TGA. Für *PpCKX4* wurde ein 3'-UTR vorgeschlagen mit einer Länge von 635 bp. Dieses Gen kodiert für ein Protein von 565 AS (62,6 kDa, Stop-Kodon TGA). Weder für *PpCKX5* noch für *PpCKX6* sind UTR's bekannt.

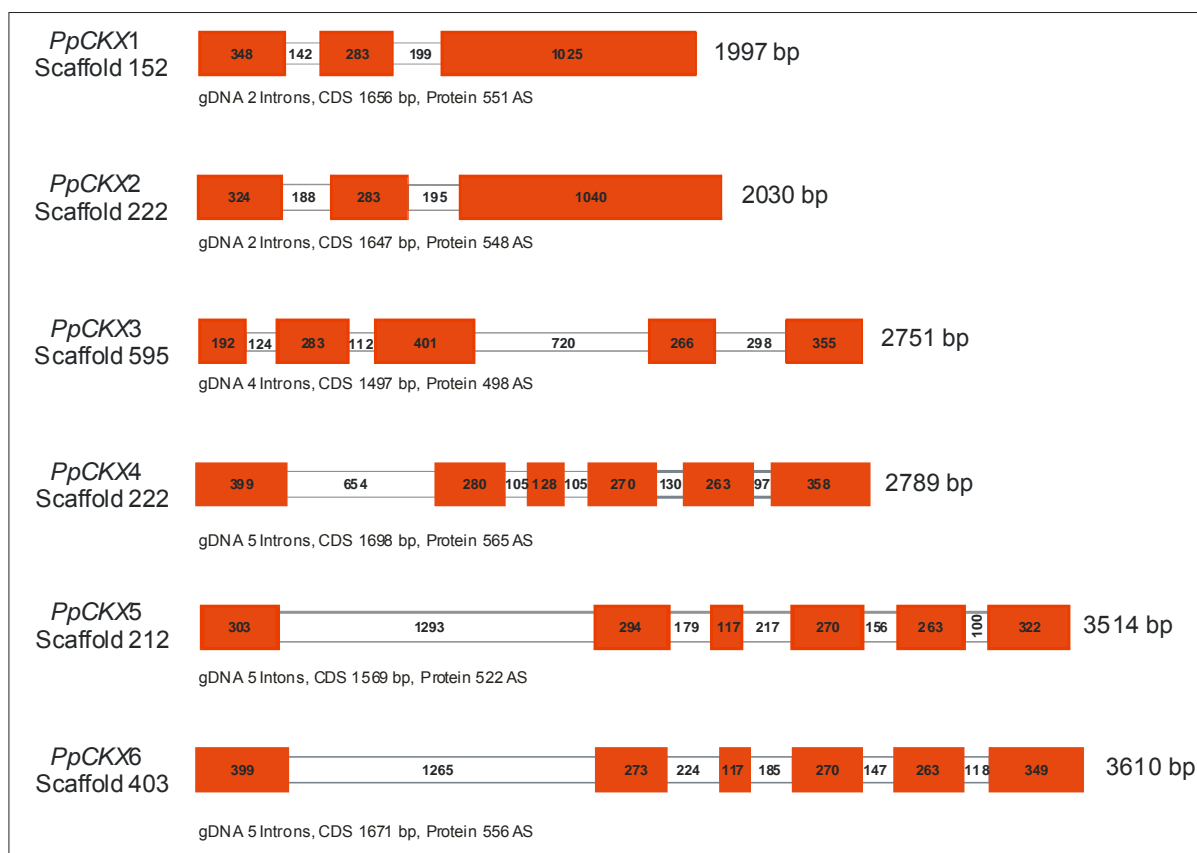


Abb. 3.16 Aufbau der Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase-Gene von *Physcomitrella*. Darstellung der Verteilung und Größe von Introns (weiße Boxen) und Exons (rote Boxen) anhand der bei JGI-erhaltenen und korrigierten Genmodelle. Angaben zu der Länge des gesamten ORFs (bp) sowie Größe der Proteine sind ebenfalls dargestellt.

Diese Gene kodieren jeweils für ein Protein von 522 AS (57,6 kDa, Stop-Kodon TGA) bzw. von 556 AS (62,6 kDa, Stop-Kodon TAA).

Ein paarweises Alignment der genomischen Sequenzen ergab, dass die höchste Homologie auf Nukleotidebene zwischen den Genen *PpCKX1* und *PpCKX2* (mit 74,5% besteht, gefolgt von *PpCKX5* und -6 mit 63,4% sowie *PpCKX4* und -6 mit 40,4%). Das Alignment der anderen Sequenzkombinationen zeigte dagegen eine niedrigere Homologie von lediglich 25% bis 38% (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.2 Vergleich der *PpCKX* AS-Sequenzen sowie *targeting* Vorhersagen

Ein Vergleich der AS-Sequenzen der 6 *PpCKX*-Gene mittels Clustal-W zeigt (<http://align.genome.jp/>) (s. Abb. 3.17), dass alle Proteine in hohem Maße konserviert sind. Eine Homologie von bis zu 80% wurde festgestellt (vgl. Tab. 24), wobei die Gene in zwei Gruppen unterteilt werden konnten. *PpCKX1*, -2 und -3 befinden sich in einer Gruppe mit jeweils einer Homologie zwischen 68-80%. Die zweite Gruppe wird von *PpCKX4*, -5 und -6 gebildet, welche untereinander eine Homologie von bis zu 75% zeigen. Innerhalb dieser Gruppen kann ebenfalls eine große Ähnlichkeit bei der Intron-Exon-Verteilung festgestellt werden (Abb. 3.17).

Schmülling *et al.* (2003) beschreiben für *CKX*-Gene drei konservierte Motive. Das erste Motiv, GHS, ist bei allen *Physcomitrella* *CKX*-Isoformen sehr konserviert, allerdings zeigen *PpCKX1* und *PpCKX2* abweichend statt des Histidin-Restes ein Serin (GSS-Motiv).

Das Motiv 2 kommt ebenfalls bei allen *Physcomitrella* *CKX*-Genen vor, allerdings existieren Abweichungen von der bei Schmülling *et al.* (2003) angegebenen Konsensus-Sequenz „GIW eVPHPWLNL“, so dass für *Physcomitrella* die Konsensus-Sequenz GLW xiPHPWLNL angegeben werden kann.

Ein weiteres C-terminales-Motiv ist bei den *Physcomitrella* *CKXs* ebenfalls konserviert. In Abweichung von der PGQxIF-Konsensus-Sequenz (Schmülling *et al.*, 2003) liegt dieses Motiv bei *PpCKX1* als „ssQNIF“ und bei *PpCKX2* als „PGfNIF“ vor.

<i>PpCKX1</i>	-----MASRIWAHLIVALGILASCLRVCYSDSDSRSPISPGDRKYLESLSLQGKL	53
<i>PpCKX2</i>	-----MGCILAFGSPSTCHCSGNSSEADSRSGISASDRMYLESLSLQGTL	45
<i>PpCKX3</i>	-----ML	2
<i>PpCKX4</i>	MRFVCILGIWTKLAWGSASWTLVCLLLARGRKQHSNEYTQSSSSYSDSNLSYRDRVLLSSLHLDGAL	70
<i>PpCKX5</i>	-----MGEHGDLSPLSTIHEQSSLSFRDHALLSSLRLDGS	38
<i>PpCKX6</i>	MIGASILGSWTCIAWSIASWTLVCLLLPRTRKQSYDENAYILTNYEDGSCLSHEHRDLLSSLHLDGSL	70
	*	
<i>PpCKX1</i>	TFENTTASAKDWGQLRRVTAPAVLHPTSVDIATVVRSVARLESELVAARGL GSS IGSQSQARNRIVV	123
<i>PpCKX2</i>	TFDNTTASAKDWGQLRRVFAPAGVLQPASVEDIATVVGAVGRLESDLTVAARGL GSS VGQQSQARNGI II	115
<i>PpCKX3</i>	SFDNTTAAAKDWGQLR-SLKPAVVYPTAVEDIATILQAVARSESELVAARGL GHS INGQAQAHNGIVI	71
<i>PpCKX4</i>	TFSNTSSAASDFGLIHFSLPGAILYPKSVRDIQVVI RAVHSATSSSELTLAARG GHS VHGQAQALNGVIV	140
<i>PpCKX5</i>	TFSNTSSAASDFGRIRYSLPGAILYPKSVRDVELAVRAVQSSKSGSLTLAAKGS GHS VHGQAQALRGVVI	108
<i>PpCKX6</i>	TFSNLSAATDFGLVRFSLPGAVIYPKSVRDVQAVRAVRSRGRFDLTAAKGR GHS VHGQAQALNGVVM	140
	:*. * :.:*. * :. * : * : : : . : . : **:*:* * * . :.* * . :.:	
	GHS Motif ¹	
<i>PpCKX1</i>	EMTSLNGIMVAPSGDSASNGVPFVEAMGGALWVDVLKASLEHRLAPRSWTDYLYLTVGGTSLNAGVSGQT	193
<i>PpCKX2</i>	EMTTMKGIADVPLGDKASQGVPFVEAMGGALWVDVLKASLEHGVAPRSWTDYLYLTVGGTSLNAGVSGQT	185
<i>PpCKX3</i>	EMTAMKGI RVMPLGDLGSLHVPYVEAMGGDLWIDLKASLEFLAPRSWTDYLYLTIGGTLNAGVSGQA	141
<i>PpCKX4</i>	EMSSMGIKVAPHGE-PGFQQPFVDAAGGELWIDLKRETLKEGLAPRSWTDYLYLSIGGTLNAGVGGQT	209
<i>PpCKX5</i>	EMSTLKGIKVAPNGE-PGFRHPFVDAAGGELWIDLKATLREGLAPRSWTDYLYLSIGGTLNAGVGGQS	177
<i>PpCKX6</i>	EMSSLKGI RVPVPHGE-PGVLQPFVDAAGGELWIDLKATLREGLAPRSWTDYLYLSIGGTLNAGVGGQT	209
	**:::.* * * * : . : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>PpCKX1</i>	FRHGPEVSNVLQLEVVTG-KGEVVQCTPTENSELFFTVLGGGLQFGIITKARILLEKAPQVRWRMRLYIT	262
<i>PpCKX2</i>	FRHGPEVSNVLQLEVVTG-KGLVVECTPTKNSLFFAVLGGGLQFGIITKARIVLEKAPQVRWRMRTLYT	254
<i>PpCKX3</i>	FRHGPEVSNVLQLEVVTG-RGELVVCSPISHSDLFFAILGGGLQFGIITKARIVLEKAPQVRWRMRAIYT	210
<i>PpCKX4</i>	FLFGPEISNVLQLDVVTG-TGHAVTCSPTKHSDLFHGVVGGGLQFGIIT SARIVLEPAHEKVRWIRAMYT	278
<i>PpCKX5</i>	FLFGPEISNVLQLDVVTGQNAALVKCSPTKSDLFHGVVGGGLQFGIIT SARIILEPAHEKVRWIRAMYT	247
<i>PpCKX6</i>	FLFGPEISNVLQLDVVS-----VKCSPQNAADLFHGVVGGGLQFGIIT SARIILEPAHEKVRWIRVMYT	272
	* . ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>PpCKX1</i>	DFATFKRDQELLIG-SAVTKSFDYVEGFVVNNENINGWGSVPFVRSSEAMIPSSAGPIMYCLEVTK	331
<i>PpCKX2</i>	DFVTFKRDQELLIS-SATSKTFDYVEGFVVNNENAINGWGSVPFVHSEISEAMIPSSASAIMYCLEVIK	323
<i>PpCKX3</i>	DFATFRRDQELLIRSSSGSPFDYVEGFVVNDANP INGWGSVPFAPGDI SEAMIP PQAGNIMYCLEVTK	280
<i>PpCKX4</i>	DFATFTRDQEMLLS-QPPQHTFDYIEGFVVLKNEDPNNGWNSVPF DAKKIDPSMIPEEGGSVLYYIELAK	347
<i>PpCKX5</i>	DFATFTRDQEMLVLT-QAPESAFDYIEGFVVLKNKDS SHGWNSVPF DAKKIDPSIPEEGGSVLYCIELVK	316
<i>PpCKX6</i>	DFAAFTRDQEMLVVS-QPPESAFDYIEGFVVLKTEDS INGWNSVPF DSKKIDPSIPEEGGSVLYYIELVK	341
	** . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>PpCKX1</i>	AYSTADLQKLDVVE SMLAPLSFHRELLFKTDTTYFKFLDRVHELETQLRSR GLWE-IPHPWLNI FVPAS	400
<i>PpCKX2</i>	AYSAADVQTLDEEIESMLAPLNFHRELLFKTDTTYFKFLDRVHELELQLRSR GLWE-IPHPWLNI FVPAS	392
<i>PpCKX3</i>	AYSAADLHNLQVVENMLSRLGFHRGLLFKTDTSYLKFLNRLHDVEMQLSAR GLWDQIPHPWLNI FVPAA	350
<i>PpCKX4</i>	KFSGDNLILGLDQIVERMMAPLSFIPTLVFTTDVVPYAKFLNRLHDVELNLASQ GLWD-VPHPWLN FVPRS	416
<i>PpCKX5</i>	KFSPNMDTLNKTVERMVAPLSF IPTLI FTIDVVPYKFLNRLHEVEISLDSQ GLWN-VPHPWLN FVPRS	385
<i>PpCKX6</i>	NFSSNDTDTVN ETVERMLAPLSFIPALVFTIDVSYEKFLNRLHDVEVNLDSH GLWD-IPHPWLNI FVPRS	410
	: * . : . : * * : * : * :	
	G1We-VPHPWLN Motif ¹	
<i>PpCKX1</i>	AIDRFDMLVFKRLVTHEFNGLILVYPVNKSQWDKRLSVAIPESPEEIFYI VAFLRNKL PDAHGGPSLSSM	470
<i>PpCKX2</i>	VIDRFDMLVFKHLVTHEFNGLILVYPVNKSQWDKRLSVAVPEGQEEIFYI VAFLRNKL PDAAGGPSLSTM	462
<i>PpCKX3</i>	SINCFDRLVKQLKTWDFSGPILVYPLNKSQWDRRLSAAVPEGPEEVFYI VAFLRNKL PDTLGGPPLSVM	420
<i>PpCKX4</i>	SIASFDDLI FKHMIKSDFSGPILYPIKGERWDSR SAVIPD--ESIFYLVAFLRISLPSS--GPLLSTL	482
<i>PpCKX5</i>	SIGLFDALIFKQMIKDDFSGPILYPLNRRNWDSR SAVIPD--ESIFYLVGFLRISLPSS--GALLGNL	451
<i>PpCKX6</i>	SIASFDALIFKHLIKSDFNGLIYPLKRDKWDSS SAVIPD--ESVYLVGFLRISLPSS--GPPSSL	476
	* * * * * : . : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>PpCKX1</i>	LEDNEKILRICEP--LQCKQYLPHYQDRSRWKR HFG IKWETFVQNKQAF DPNVILSSQNIF SRRR----	534
<i>PpCKX2</i>	LEDNEKILRICEP--LQCKQYLPHYQDRSRWKR HFG SKWETFVQNKQLE DPTAILS PGLNIF SRRRSSSS	531
<i>PpCKX3</i>	LEENENILRICEP--LHCKQYMPHNLD RQQWR HFG SKWDLFVHNKQLE DP CGILS PGQNIF SRRQ----	482
<i>PpCKX4</i>	MAENDKIME ICHDAGMGCKMYLPEHNDIQSWKT HFG KRWETFARRKMY DP HIFILA PGQNIF RNSMRALP	552
<i>PpCKX5</i>	IADNDKIMQVCHSAKLCKKYLPEYEDTESWKL HFG KKWGSFTRRKQKY DP DFILA PGQNIF SKSTESRS	521
<i>PpCKX6</i>	IAENDKIMEVCHNASLCKMYLPEYEDTESWKT HFG KRWETF SRKHKY DP EFILE PGQNIF PRIRAHDH	546
	: : : : : . : . : * * * : * : * : * :	
	HFG DP PGQxIF Motif ² Motif ² Motif ¹	
<i>PpCKX1</i>	-GSKFSIANIAHQSQDE	551
<i>PpCKX2</i>	LGSKFSLANFTPSQAHAE	549
<i>PpCKX3</i>	----ISLSNHLEFRGMQE	496
<i>PpCKX4</i>	HPDHPLMSATPIA-----	565
<i>PpCKX5</i>	L-----	522
<i>PpCKX6</i>	PDNKLATTV-----	556

Abb. 3.17 Multiples Alignment der AS-Sequenzen verschiedener *Physcomitrella* CKX-Isoformen. Die Bindungsstelle für das FAD-binding-4-Protein (Pfam Accession PF01565), Houba-Hérin *et al.* (1999) und Schmülling *et al.* (2003), ist mit einer grünen Linie markiert. Mit einer blauen Linie ist die Substrat-Bindungsstelle 1 (Pfam Accession PF09265) markiert. Fett markiert sind weiterhin das FAD GHS-Motiv und die CKX-konservierten Motive, GIWeVPHWLN (jeweils zwischen Position 326 und 395), das PGQxIF-Motiv (C-terminale) (vgl. Schmülling *et al.* 2003) sowie die C-terminalen HFG- und DP-Motive (Popelkova *et al.*, 2004). Abweichungen zu den publizierten Motiven sind in blau angegeben.

Popelkova *et al.* (2004) beschreiben zwei zusätzliche C-terminale Motive, das HFG- und das DP-Motiv. Das HFG-Motiv kommt nur bei CKX-Proteinen vor, was für eine spezifischere Rolle dieses Motivs bei CKX sprechen könnte. Das DP-Motiv dagegen kommt bei allen Flavoproteinen vor. Die Autoren vermuten daher, dass diese beiden AS wichtig für Funktion und/oder Struktur der Flavoproteine sind.

Bei *Arabidopsis* wurde nachgewiesen, dass 4 der insgesamt 7 *AtCKX*-Proteine sekretiert werden (Schmülling *et al.*, 2003). Für die *Physcomitrella* CKX-Proteine wurden Vorhersagen zur subzellulären Lokalisierung mit Hilfe dreier Web-Server überprüft (s. 2.3, Tab. 15). Drei der sechs *PpCKX*-Proteine enthalten ein N-terminales Signalpeptid. Für *PpCKX1* wird Sekretion vorhergesagt, während *PpCKX2* und *PpCKX4* wahrscheinlich im Chloroplasten lokalisiert sind. *PpCKX3* und *PpCKX5* sind nach der Vorhersage in den Peroxisomen sowie in der Plasmamembran oder dem ER lokalisiert. *PpCKX6* enthält ein Signalpeptid und ist nach Vorhersage im ER lokalisiert.

Tab. 15 Vorhersage der subzellulären Lokalisierung der *Physcomitrella* CKX Proteine mittels der Web-Server (<http://wolfsort.org/>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Horton, 2007; Target-P/ Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>; Emanuelsson *et al.*, 2007) [http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/](http://www.bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/); Höglund *et al.*, 2006)

Name	PSORT	Target P/Signal P (Cutoff)	MultiLoc
<i>PpCKX1</i>	Outside	S/3, 27-28/27-28 (CYS-DS)	Plasma Membrane 0,66
<i>PpCKX2</i>	C Stroma	C/4, 52-53/ -	Chloroplast 0,24
<i>PpCKX3</i>	Peroxisome	-/ -	Plasma Membrane 0,39
<i>PpCKX4</i>	Chloroplast	M/3, 116,/ 34-35 (RKG-QH)	Chloroplast 0,89
<i>PpCKX5</i>	Peroxisome	-/ -	ER 0,8
<i>PpCKX6</i>	Plasma Membrane	-, 34-35/34-35 (RKG-QH)-	ER 0,79

Bei Target P: Zuverlässigkeitsklasse (1=hoch bis 5=niedrig), (S) Sekretory Pathway (C) Chloroplast, (M) Mitochondrien, (-) Keine Vorhersage, (ER) Endoplasmatisches Retikulum.

3.3.1.3 Vergleich der *Physcomitrella* CKX-Sequenzen mit denen anderer Organismen

Die abgeleiteten AS-Sequenzen der sechs *Physcomitrella* CKX-Proteine wurden mit 33 weiteren CKX-Sequenzen verschiedener Organismen verglichen, wobei Samenpflanzen (27 Sequenzen), das Moosfarn *Selaginella moellendorffii*, das Cyanobakterium *Nostoc* sowie das Bacterium *Legionella pneumonica* vertreten waren (s. 2.3). Die *Physcomitrella* CKX-Gene zeigten zu den vier *Selaginella* CKX-Formen (*SmCKX*) die höchste Homologie, mit Werten zwischen 44 und 49%. Zu den Samenpflanzen konnte ebenfalls eine relativ hohe Homologie festgestellt werden. Die höchste Homologie von 45% besteht zwischen *PpCKX4* und den Mais-Proteinen *ZmCKX2* und *ZmCKX3* sowie zwischen *PpCKX2* und *PpCKX3* und den *Populus trichocarpa* Proteinen *PtCKX3* und *PtCKX1* (vgl. Tab. 24).

Die höchste Verwandtschaft aller sechs *PpCKX*-Proteine, besteht - neben den bereits oben erwähnten Spezies - zu *Arabidopsis* (*AtCKX5* und *AtCKX6*), Gerste (*HvCKX*), Pappel (*PtCKX2*, *PtCKX4*) sowie Reis (*OsCKX4*) mit einer 40%igen Identität. Bezüglich CKX aus *Nostoc* und *Legionella* zeigen die *Physcomitrella* CKX-Proteine hingegen eine geringe Homologie von lediglich 15 bis 19% (vgl. Tab. 24).

Innerhalb der Spezies zeigen einige CKX-Isoformen eine Homologie von über 90%: *Arabidopsis AtCKX5* und *AtCKX6* 99,8%, *Selaginella SmCKX1* und -4 bzw. *SmCKX2* und -3 mit 99% bzw. 97%, *Zea mays* (*ZmCKX2* und -3) mit 93%, *Populus trichocarpa PtCKX1* und -3 bzw. *PtCKX2* und -4 mit 92% bzw. 91%. Die CKX Sequenzen *DsCKX* und *DhCKX* aus der Gattung *Dendrobium* weisen eine Homologie von 90% auf (Tab. 24).

Die AS-Länge von *Physcomitrella* CKXs (498-565) sowie das abgeleitete Molekulargewicht von 56-63 kDa ist mit den entsprechenden Daten von Samenpflanzen und *Selaginella* vergleichbar (vgl. Abb. 3.18); die CKX-Gene all dieser Pflanzen teilen eine hohe Homologie (vgl. Tab. 24). CKX-Genprodukte des Cyanobakteriums *Nostoc* (*NsCKX1*) sowie des Bakteriums *Legionella pneumonica* (*LpCKX1*) weisen gegenüber *PpCKXs* um 42 bzw. 118 AS kürzere Sequenzen auf (Abb. 3.18).

Aus dem in Abb. 3.18 dargestellten Stammbaum lassen sich vier Hauptgruppen von CKX-Genen ablesen. In einer ersten Gruppe befinden sich polyphyletisch angeordnet die meisten CKX-Gene der ausgewählten Samenpflanzen *Arabidopsis*,

Populus trichocarpa, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Dendrobium*, *Hordeum* sowie *Medicago*. Am nächsten verwandt zu dieser Gruppe I ist Gruppe II mit den CKX-Genen von *Physcomitrella* und *Sellaginella*, bei denen sich monophyletische Anordnungen der jeweiligen Genfamilien zeigen. Isoliert zwischen Gruppe II und III befindet sich *OsCKX3*, was möglicherweise auf eine weitere CKX-Gruppe hinweist, für die weitere Sequenzbeispiele fehlen. In der dritten Gruppe (III) befinden sich polyphyletisch angeordnet die Gene anderer Samenpflanzen, wobei unter anderem die *AtCKX7* oder *PsCKX* eingeordnet sind.

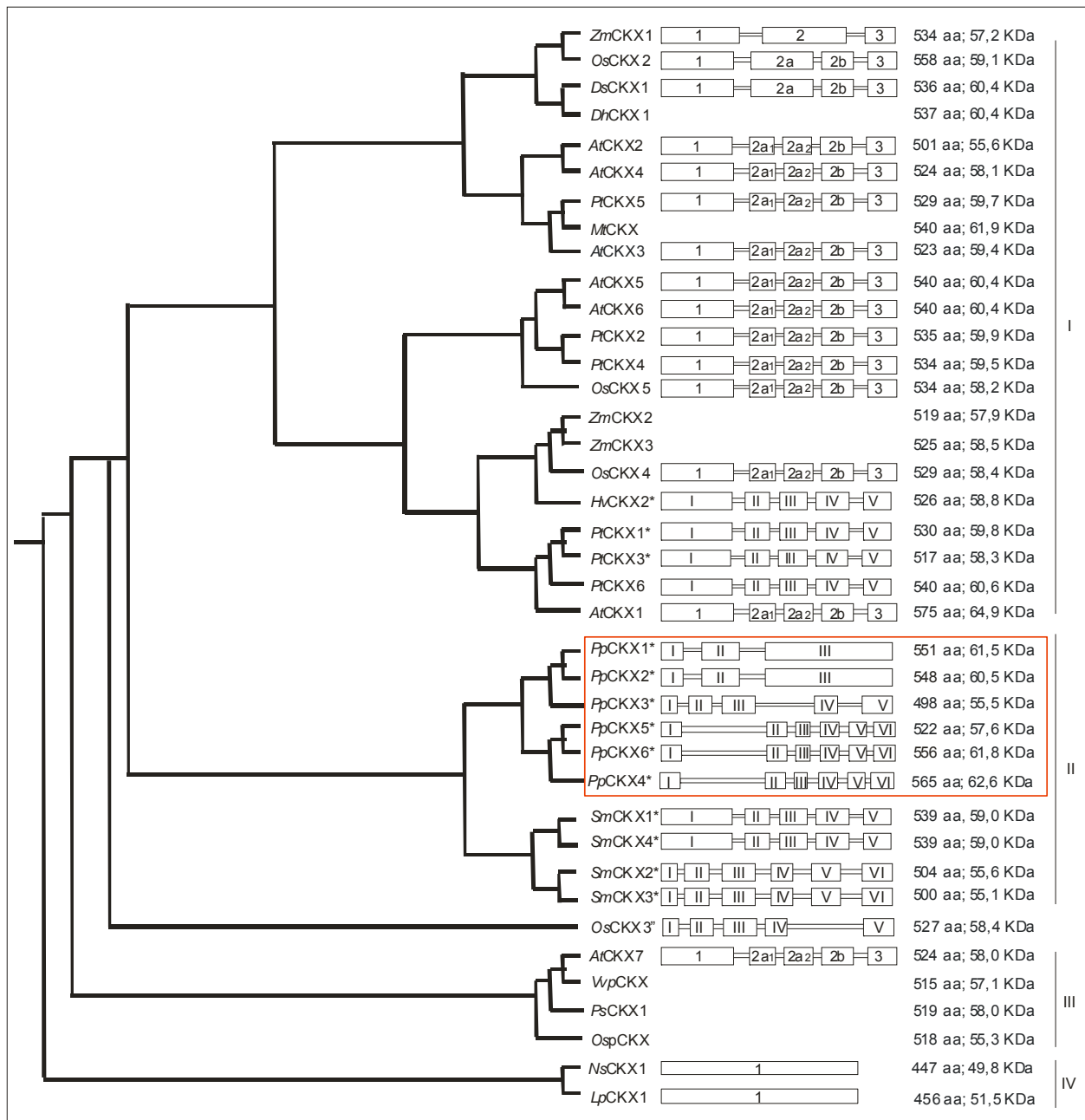


Abb. 3.18 Phylogenetische Analyse von CKX-AS-Sequenzen in Eukarionten und Prokarionten über Clustal-W (NJ Tree). Intron-Exon-Verteilung aus bekannten Sequenzen (Quelle: Schmölling *et al.*, 2003 und Bilyeu *et al.*, 2001) *Intron-Exon-Verteilung über JGI ermittelt. Länge der AS-Sequenz und die jeweilige abgeleitete molekulare Masse sind rechts wiedergegeben.

3.3.2 ÜBEREXPRESSION VON *AtCKX2* IN *Physcomitrella*

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, mögliche Auswirkungen einer Reduktion des Cytokiningehalts auf die Verteilung der Cytokinine und auf den Phänotyp zu erfassen. Hierfür wurden mittels genetischer Transformation *Physcomitrella*-Pflanzen hergestellt, die ein heterologes Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase-Gen aus *Arabidopsis* (*AtCKX2*) konstitutiv exprimieren.

3.3.2.1 Herstellung eines Vektors zur Überexpression von *AtCKX2*: pHP_Act1_*AtCKX2*

Die Klonierung des gewünschten Transformationsvektors pHP_Act1_*AtCKX2* wurde in zwei Schritten durchgeführt (Abb. 3.19 und Abb. 3.20).

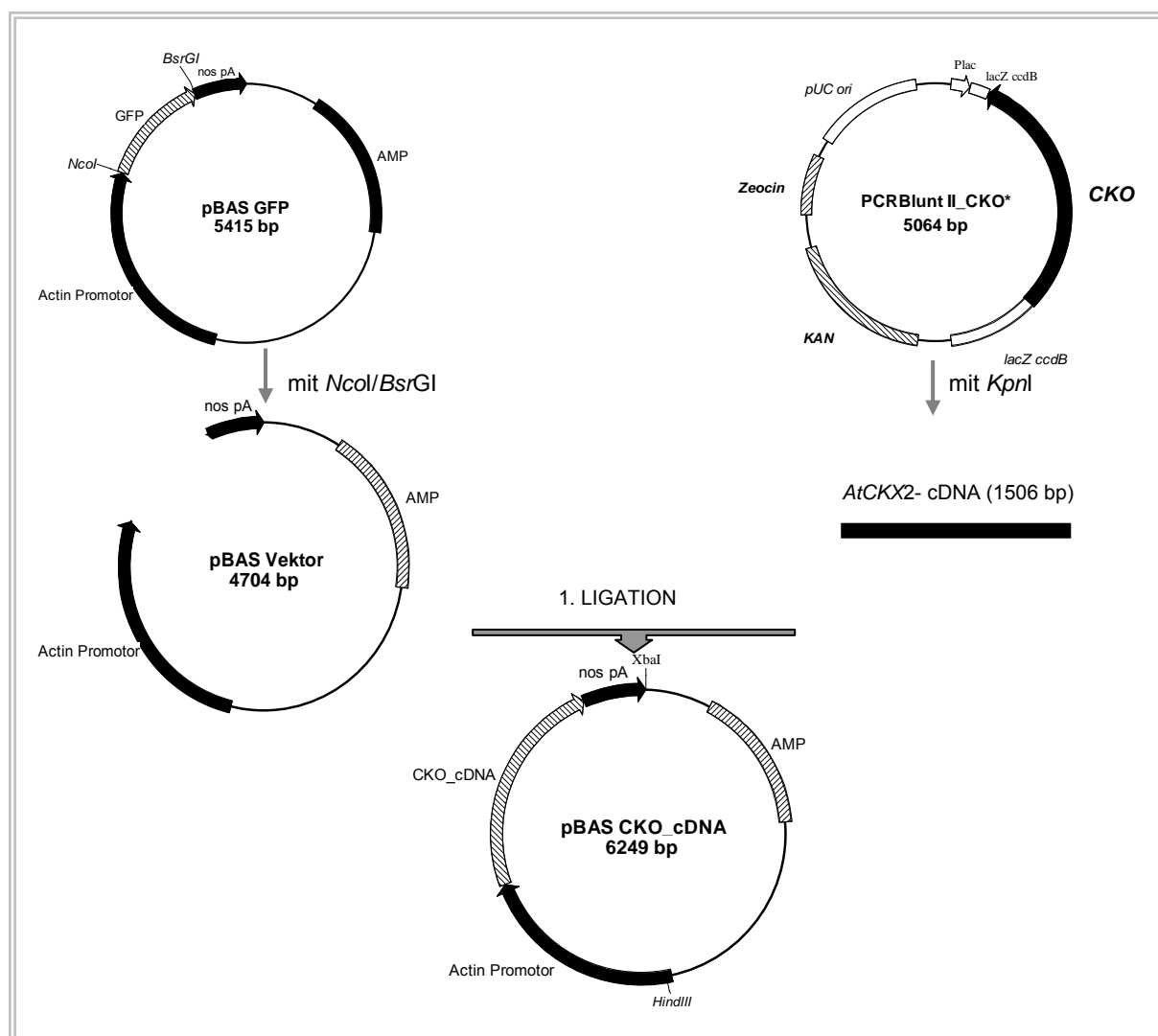


Abb. 3.19 Teil 1 der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Transformationsvektors pHP_Act1_AtCKX2. Die Fusion des Actin1-Promotors aus Reis (Acc. No. S44221) mit der AtCKX2-cDNA (Acc. No. AF303978) aus *A. thaliana* ergab das Zwischenprodukt pBAS CKO_cDNA (Fortsetzung in Abb. 3.20). * Vollständiger Name dieses Vektors ist pCR Blunt II TOPO-CKO-cDNA.

Zunächst wurde die CKX2-cDNA aus *A. thaliana* mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* aus dem Vektor pCR BluntII Topo-CKO-cDNA (Herkunft AG Schmüling, FU Berlin) gewonnen. Aus dem Plasmid pBAS GFP (Zeidler *et al.*, 1999) wurde die für das GFP (*green fluorescence protein*) kodierende Sequenz mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BsrGI* entfernt. Der erhaltene Vektor wurde gebluntet und dephosphoryliert (2.4.2.8). Anschließend wurde die AtCKX2-cDNA in den pBAS Vektor gebracht und mit dem konstitutiven Actin1-Promotors fusioniert. Das Zwischenprodukt wurde als pBAS CKO_cDNA bezeichnet (Abb. 3.19).

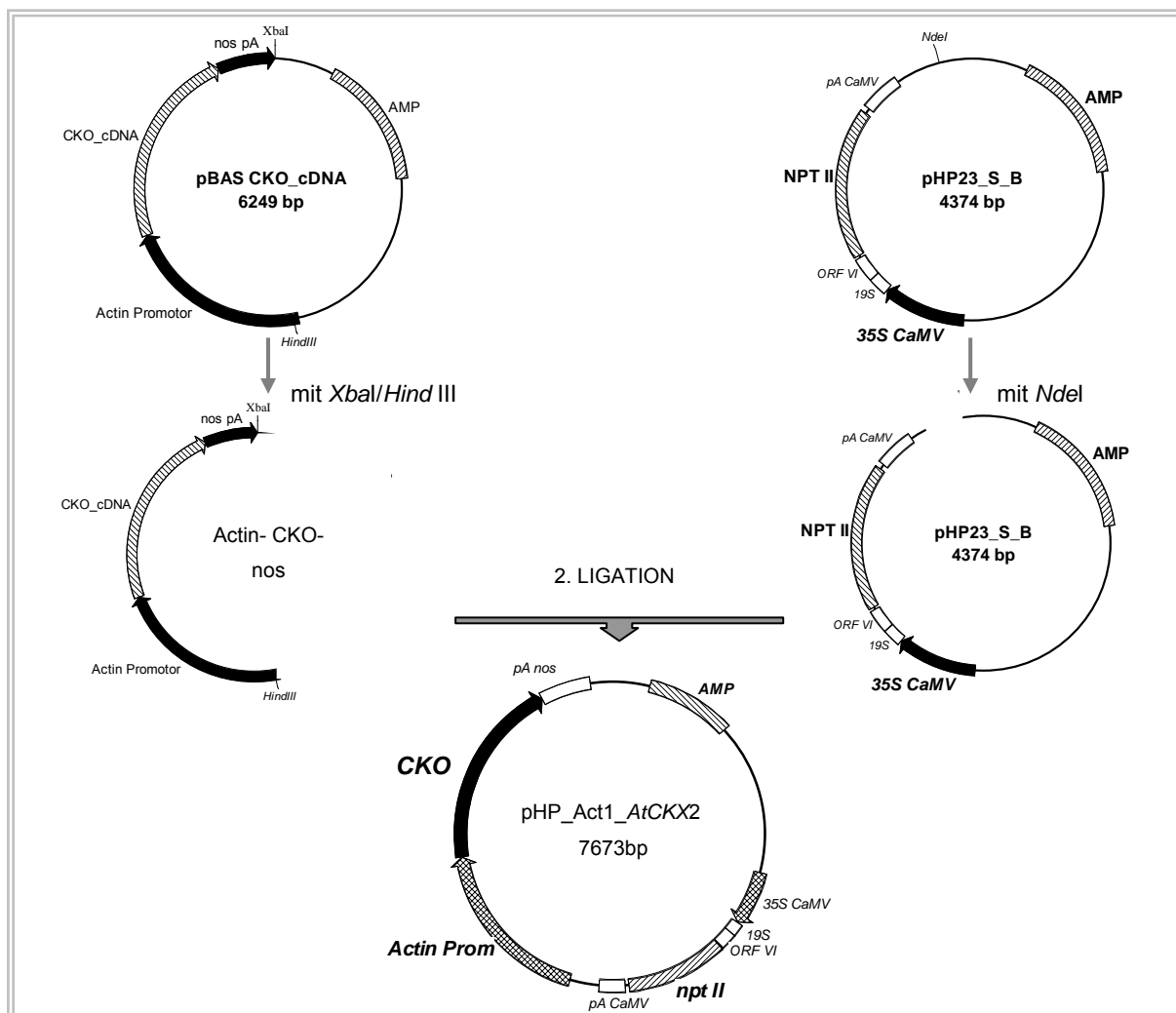


Abb. 3.20 Herstellung des Transformationsvektors pHP_Act1_AtCKX2 mit dem pflanzene geeigneten Resistenzmarker nptII.

Da das Plasmid pBAS CKO_cDNA keinen Selektionsmarker für Pflanzen enthält, wurde die gesamte Kasette (Actin1-Promotor, CKO-cDNA, nos3-Terminator) aus diesem Vektor mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* gewonnen (2.4.2.5) und in den Vektor pHP23_S_B eingefügt, welcher zuvor mit *NdeI* linearisiert worden war (Abb. 3.20). Dieser vermittelt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418.

Zur Überprüfung des Plasmids pHP_Act1_AtCKX2 (7673 bp, vgl. 6.3) wurden Restriktionsanalysen, PCR und Sequenzierungen durchgeführt.

3.3.2.2 Überprüfung des pHP_Act1_AtCKX2-Konstrukts

Zuerst wurde durch PCR mit Hilfe des Primerpaars 77/76, die Orientierung des CKX-Inserts relativ zum Actin1-Promotor überprüft (s. Tab. 1 und Abb. 3.21 A). Aus den erhaltenen Kolonien erwies sich der Klon pHP_Act1_AtCKX2 -7 als richtig, da das erwartete Amplifikat von 395 bp nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

Um die Identität des Konstruktes pHP_Act1_AtCKX2 weiter zu erhärten wurde mit den Restriktionsendonukleasen, *EcoRI*, *EcoRV* und *XhoI* restringiert. Die für diese Enzyme erwarteten Schnittstellen sind in der Plasmidkarte in Abb. 3.21 (s. Anhang 6.3) eingetragen. Für alle Restriktionen wurden die vorherberechneten Fragmentgrößen erhalten (Daten nicht gezeigt).

Durch Sequenzierung mit Hilfe von M13-*forward*- und *reverse*-Standard-Primern, welche die *AtCKX2*-cDNA flankieren, wurde während der Herstellung dieses Konstruktes festgestellt, dass nach der Transformation in *E. coli* eine Mutationen (Deletion) des Ausgangsplasmids (PCR BluntII TOPO) aufgetreten war. Das CKX-Genprodukt ist auch bei geringer Expression toxisch für *E. coli* (Schwartzberg, mdl. Mitteilung). Zur Vermeidung von Mutationen wurde in weiteren Kulturansätzen von *E. coli* 20 mM Glucose hinzugegeben, um somit den *lac*-Promotor zu reprimieren. In einer darauffolgenden Sequenzierung eines weiteren Klons wurde der äußere Bereich des CKX-Gens, in dem die Deletion und der bp-Austausch vorgekommen waren, nochmals überprüft. Der innere Bereich wurde mit Hilfe von Primern Pr351 und Pr352 sequenziert (siehe Tab. 1). Hierbei wurde die korrekte kodierende Sequenz von *AtCKX2* nachgewiesen. In weiteren Sequenzierungen

wurden die unbekanntenen Regionen des pHP_Act1_AtCKX2-Konstruktes aufgeklärt (s. Anhang 6.3).

3.3.2.3 Transformation von *Physcomitrella* mit pHP_Act1_AtCKX2

Um eine Überexpression von CKX in *Physcomitrella* zu erreichen, wurde der hergestellte pHP_Act1_AtCKX2 Vektor nach der PEG-Methode (s. 2.6.4) transformiert. Es wurden mehrere Transformationen mit jeweils ca. 3×10^5 Protoplasten und 30 µg zirkulärer DNA durchgeführt, allerdings wurden nur in einem Transformationsansatz stabile Transformanten erhalten (s. Tab. 16). Die Überlebensrate der Protoplasten betrug ca. 1,6%. Die Anzahl der resistenten Linien, nach drei Selektionszyklen, bei denen die regenerierten Protoplasten auf selektiven und nicht-selektiven Medien gewachsen waren, betrug 38. Nach weiteren Selektionszyklen konnten insgesamt zwei stabile Transformanten erhalten werden, die im Folgenden als tCKX7 und tCKX16 bezeichnet werden.

Tab. 16 Ergebnisse des Transformationsexperiments mit pHP_Act1_AtCKX2.

Gesamtanzahl Protoplasten	Überlebende Protoplasten	Resistente Linien	stabile Transformanten
ca. 3×10^5	4.862	38	2

3.3.2.4 Nachweis der Transgenese bei den tCKX-Transformanten

3.3.2.4.1 PCR Nachweis

Um die Anwesenheit des *AtCKX2*-Transgens bei den Transformanten nachzuweisen, wurde eine PCR mit pflanzlichem Gewebe durchgeführt (s. Tab. 8). Bei dem hierbei verwendeten Primerpaar 92/93 bindet der *forward* Primer (92) am Anfang der *cCKX* (470-490 bp) und der *reverse* Primer (93) in der Mitte des Genes (870-891 bp) (s. Abb. 3.21 A). Abb. 3.21 B zeigt das Agarose-Gel, auf dem PCR Ansätze zum Nachweis der *AtCKX2*-Transformationskassette in den tCKX-Transformanten tCKX7 und tCKX16 aufgetrennt wurden. In beiden Fällen belegt das 421 bp große Amplifikat die Anwesenheit der Transformationskassette.

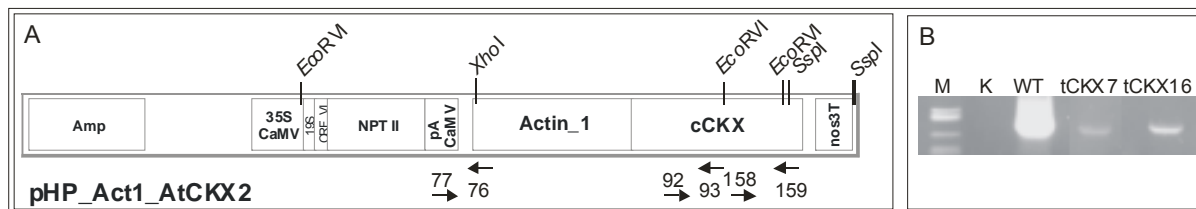


Abb. 3.21 (A) Schema des Transformationsvektors pHP_Act1_AtCKX2 und Darstellung der für den PCR-Nachweis verwendeten Primer 92/93 sowie der für die Überprüfung des pHP_Act1_AtCKX2-Konstrukts und RT-PCRs verwendete Primer 77/76 bzw. 158/159. Lokalisierung der Restriktionsschnittstellen für *XhoI*, *SspI*, und *EcoRV*. (B) Agarosegel zum PCR-basierten Nachweis der Anwesenheit des *AtCKX2*-Transgens auf genomischer Ebene bei den Transformanten tCKX7 und tCKX16. (M) Marker, (K) Wasser-Kontrolle.

3.3.2.4.2 Southern-Blot

Die erfolgreiche Integration der *AtCKX2*-Transformationskassette in das *Physcomitrella*-Genom wurde für tCKX7 ebenfalls mittels Southern-Blot-Analyse überprüft. Bedingt durch extreme Schwierigkeiten, die gDNA beider Transformanten nach der DNA-Extraktion zu restringieren, wurde diese Analyse nur bei tCKX7 durchgeführt (s. 2.7.1).

Die Restriktion der tCKX7 gDNA erfolgte durch die Enzyme *SspI* und *XhoI*. Zwei *SspI*-Schnittstellen sind im Abstand von ca. 1600 bp in der Mitte des *CKX*-Gens und am Ende des *nos3*-Terminators lokalisiert. Für *XhoI* existiert nur eine Schnittstelle am Anfang des *Actin1*-Promotors (vgl. Abb. 3.21 A). Für die Analyse wurde die tCKX7 gDNA mit den jeweiligen Enzymen durch Einzel- und Doppel-Restriktion geschnitten. Die Fragmentgrößen nach dem Verdau sind in Tab. 17 angegeben. Die Wildtyp gDNA wurde nur mit dem Enzym *SspI* restringiert.

Die Vorbereitung des Gels für die Southern-Blot-Analyse wurde wie in 2.7.3 beschrieben durchgeführt. Die Herstellung der Sonde sowie die Hybridisierung und Detektion der DNA erfolgte mittels des DIG (Digoxigenin)-Easy Kits von Roche. Das *AtCKX2*-Fragment aus pCR BluntII_TOPO_CKO_cDNA (Abb. 2.1) wurde mit Hilfe von *KpnI* Verdau gewonnen und als *template* für die Herstellung der Sonde benutzt.

Bei allen aufgetragenen gDNA-Proben von tCKX7 ist die Anwesenheit der *AtCKX2*-Kassette auf genomischer Ebene festzustellen (Abb. 3.22). In Spur 5, bei der die unverdaute gDNA aufgetragen wurde, ist zu erkennen, dass die Sonde mit hochmolekularer DNA hybridisiert hat.

Für den Verdau mit *SspI* sind Banden in der Größe von ca. 6073 und 1600 bp zu sehen, was den Erwartungen entspricht. Für dieses Enzym ist das erwartete Muster

bei einer oder mehreren vollständigen Integrationen der Actin1_AtCKX2_nos3T-Kassette unverändert.

Tab. 17 Erwartete Fragmentgrößen nach Verdau der genomischen-DNA von tCKX7 mit *SspI*, *XhoI*, *SspI-XhoI* sowie *EcoRV*

Fragmentgrößen			
<i>SspI</i>	<i>XhoI</i>	<i>SspI-XhoI</i>	<i>EcoRV</i>
6073bp	7673bp	3773bp	4024bp
1600bp		2300bp	3107bp
		1600bp	548bp

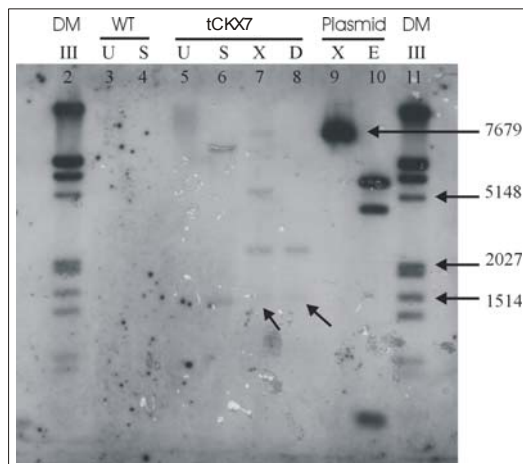


Abb. 3.22 Nachweis der genomischen Integration des CKX-Transgens bei tCKX7 durch Southern-Blot-Analyse.

WT-Spuren: (3) unverdaute DNA, (4) gDNA wurde mit *SspI* restringiert; tCKX7 Spuren: (5) unverdaute gDNA, (6) mit *SspI* verdaute gDNA, (7) verdaut mit *XhoI*, (8) Doppel-Verdau (*SspI/XhoI*). Kontroll-Plasmid-Spuren: (pHP_Act1_AtCKX2) (9) Verdau mit *XhoI* (10) Verdau mit *EcoRV*. (DM) DIG-Marker III. Pfeile zeigen auf die kleinste Bande bei *SspI*-sowie Doppel-Verdau (1600bp).

Eine komplette Integration des Plasmids wurde durch die Restriktion mit *XhoI* (Spur 6) nachgewiesen, bei der eine ca. 8000 bp große Bande zu sehen ist, welche dem linearen Plasmid entspricht (Abb. 3.22). In der *XhoI* Spur sind 3 weitere Banden zu erkennen, jeweils mit einer Größe von ca. 4000 bp, 2300 bp und von ca. 1600 bp, die möglicherweise auf unspezifische Hybridisierung außerhalb des artifiziiellen Locus (*PpCKX*-Gene) zurückzuführen sind.

Beim Verdau mit *SspI* sind nur die Banden von 6073 bp und 1600 bp zu sehen, welche der *CKX*-Kassette (Act1_AtCKX2_nos3T) entsprechen. Das Auftreten dieser erwarteten Banden lässt darauf schließen, dass die Integration des Transgens in tCKX7 vollständig ist und dass höchstwahrscheinlich nur eine einzige Integration stattgefunden hat.

3.3.2.5 Nachweis der Expression des AtCKX2-Transgens durch RT-PCR

Nach der Bestätigung der Anwesenheit von *AtCKX2* in den Transformanten tCKX7 und tCKX16 wurde die Expression des heterologen *AtCKX2*-Transgens bei beiden Transformanten überprüft. Als *template* für die RT-PCR wurde cDNA verwendet, die

durch *random-hexamer*-Primer aus Gesamt-RNA durch *reverse* Transkription hergestellt wurde (s. 2.8.3). Als Negativ-Kontrolle hierzu wurde ein Teil der Gesamt-RNA aus den jeweiligen Genotypen ohne RT-Reaktion als template eingesetzt (sog. RT-Minus). Diese Ansätze dienen dem Ausschluss von Interferenzen durch eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA. Als Kontrolle für die RT-Reaktion wurde TMV-RNA eingesetzt, die anschließend mit spezifischen Primern amplifiziert wurde (Abb. 3.21).

Der Nachweis der *AtCKX2*-Expression erfolgte mit Hilfe der Primer 158 und 159, welche ein Fragment des 3'-Endes des *AtCKX2*-Gens amplifizierten (vgl. Abb. 3.21, A). Sowohl für tCKX7 als auch für tCKX16 konnten Amplifikate mit der vorhergesagten Größe von 307 nt deutlich nachgewiesen werden. Für Wildtyp cDNA blieb die *AtCKX2* spezifische Amplifikation aus. Als Kontrolle der Amplifizierbarkeit der gDNA wurden zusätzlich die cDNAs aller drei Genotypen (WT, tCKX7 und tCKX16) mit Primerpaaren für das Actin Gen von *Physcomitrella* (*PpAct3*, AY382283, Primer 214/215) sowie für 18S-RNA kodierende Gene (Primer 86/87) amplifiziert (Tab. 1). Die vorhergesagte Größe dieser Amplifikate betrug 350 bzw. 220 nt. Auf der Grundlage der dargestellten RT-PCR Ergebnisse kann bei tCKX7 und tCKX16 von einer Expression des *AtCKX2*-Transgens ausgegangen werden.

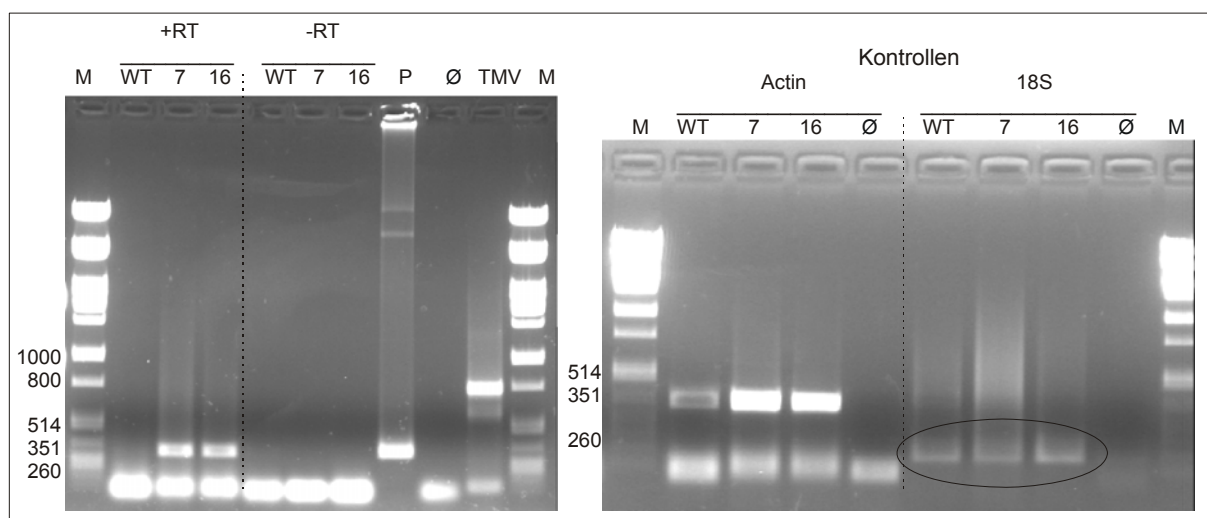


Abb. 3.23 A) RT-PCR Nachweis der Expression des *AtCKX2*-Transgens in den Transformanten tCKX7 und tCKX16. Die Banden mit dem erwarteten *AtCKX2* spezifischen Amplifikat sind bei tCKX7 (7) und tCKX16 (16) deutlich erkennbar. Als Positiv-Kontrolle wurde der Transformationsvektor pHP_Act1_*AtCKX2* (P) eingesetzt. Als Kontrolle der RT wurde TMV-RNA verwendet.

B) Bei den konstitutiven Kontrollen sind die erwarteten Amplifikate für *PpAct3*-Transkripte (ca. 350 nt) sowie für 18S RNA-Transkripte zu erkennen (220 nt).

Abkürzungen: M: Marker Lambda Pst, Ø Wasserkontrolle. (1,0%iges TAE-Gel)

3.3.2.6 Vergleich der *in vitro* CKX-Aktivität beim Wildtyp und den tCKX-Transformanten (tCKX7/tCKX16)

Die Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX) ist zuständig für die irreversible Abspaltung der Isoprenoid-Seitenkette von Cytokinin-Ribosiden und -Basen (s.1.3). In Kapitel 3.3.2.5 konnte die Expression der heterologen *AtCKX* bei beiden Transformanten nachgewiesen werden; dies deutet zusammen mit den hier dargestellten Daten (Tab. 18) darauf hin, dass die angestrebte Erhöhung der endogenen CKX-Aktivität realisiert wurde.

Genotyp	Replikat	Spezifische Aktivität nmol Ade/mg Protein h	
		Gewebe	Medium
Wildtyp	A	0,716	0,054
	B	0,539	0,058
tCKX7	A	30,462	9,997
	B	11,085	5,019
tCKX16	A	24,776	11,761
	B	14,523	9,421

Tab. 18 *In vitro* Enzym-Aktivität der Cytokinin-Oxidase/ Dehydrogenase in Rohextrakten und Medium von *Physcomitrella* Flüssigkulturen. (Experiment wurde in Kooperation mit Dr. V. Motyka, Inst. for Experimental Botany, Prag, CZ, durchgeführt; Methode siehe Schwartzberg *et al.*, 2007)

Zur Überprüfung auf erhöhte CKX Enzymaktivität bei den Transformanten tCKX7 und tCKX16 wurden Gewebe und Medium aus jeweils zwei 12 Tage alten Flüssigkulturen gewonnen. Hieraus wurden Proteinextrakte hergestellt und die CKX-Aktivität wurde gemessen. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. V. Motyka (Inst. of Experimental Botany, Prag) durchgeführt (s. 2.11).

Die spezifische CKX-Aktivität war bei beiden Transformanten deutlich erhöht. In den Gewebeextrakten wurde gegenüber dem Wildtyp eine 20- bis 42-fach höhere Aktivität gemessen. In den aus Medium hergestellten Proteinpräparationen war die Aktivität sogar 86- und 217-fach höher. Dieses Ergebnis belegt neben der erwarteten CKX-Überexpression, dass ein Großteil des rekombinanten *AtCKX2*-Proteins ins Medium ausgeschieden wurde.

3.3.2.7 Studien zur Ploidie der tCKX-Transformanten

Studien zur Korrelation zwischen Ploidie und Phänotyp (Schween *et al.*, 2005) nach der genetischen Transformation haben erwiesen, dass Unterschiede in der Ploidie (n , $2n$ oder $4n$) zu phänotypischen Unterschieden führen können. Um dies bei den tCKX-Transformanten zu überprüfen, wurde Gewebe von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16 wie in 2.12.3. beschrieben vorbereitet und gemessen.

Die Messung des Ploidiegrades der tCKX-Transformanten tCKX7 und -16 erfolgte durch automatische Flowzytometrie im Vergleich zum Wildtyp (2.12.3). Die resultierenden Histogramme entsprachen im Fall von tCKX7 dem Wildtyp mit einem Peak in den Kanälen 75-100, was auf einen haploiden Zustand hindeutet. Bei dem Transformanten tCKX16 hingegen sprachen die Histogramme für eine Verdopplung der DNA-Menge im Zellkern mit einem Peak in den Kanälen 190-200, was für einen diploiden Zustand spricht (Daten nicht gezeigt).

Um keine falschen Aussagen zu *AtCKX2*-bedingten phänotypischen Veränderungen zu treffen, werden nur solche Veränderungen in Betracht gezogen, welche bei beiden Transformanten auftreten (s. 3.3.2.8) und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die erhöhten CKX-Aktivität zurückzuführen sind.

3.3.2.8 Beschreibung von Wachstum und Phänotyp der tCKX-Transformanten

Da aufgrund der in 3.3.2.4 bis 3.3.2.5 dargestellten Daten davon ausgegangen werden muss, dass bei tCKX7 und tCKX16 die gewünschte CKX-Überexpression vorliegt, wurden phänotypische Untersuchungen auf mehreren Ebenen durchgeführt.

3.3.2.8.1 Biomasseproduktion unter Flüssigkulturbedingungen

Die Genotypen tCKX7 und tCKX16 sowie der Wildtyp wurden im A'BCDTV-Medium in Triplikaten unter Flüssigkulturbedingungen kultiviert. Zu Versuchsbeginn sowie an den Tagen 10 und 20 wurde das Trockengewicht des jeweils in 200 ml Medium gewachsenen Gewebes bestimmt (2.11.2). Alle drei Genotypen zeigen im zeitlichen Verlauf eine vergleichbare Biomasseproduktion (s. Abb. 3.24).

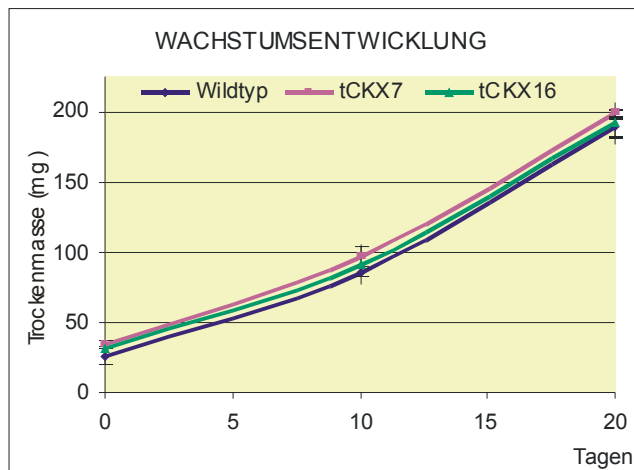


Abb. 3.24 Biomasseproduktion von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16 unter Flüssigkulturbedingungen im zeitlichen Verlauf. Die Daten entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen von drei Kulturen je Genotyp.

Wie in Abb. 3.25 wiedergegeben, lag bei allen drei Genotypen zum Zeitpunkt T0 ausschließlich Protonema vor, welches wie bei T10 und T20 zu Gametophoren weiterdifferenzierte. Allerdings waren Unterschiede in der Ausprägung der verschiedenen Gewebe (Form, Größe, Anzahl) zu erkennen, die in den Kapiteln 3.3.2.8.2 und 3.3.2.8.3 dargestellt und bewertet werden.

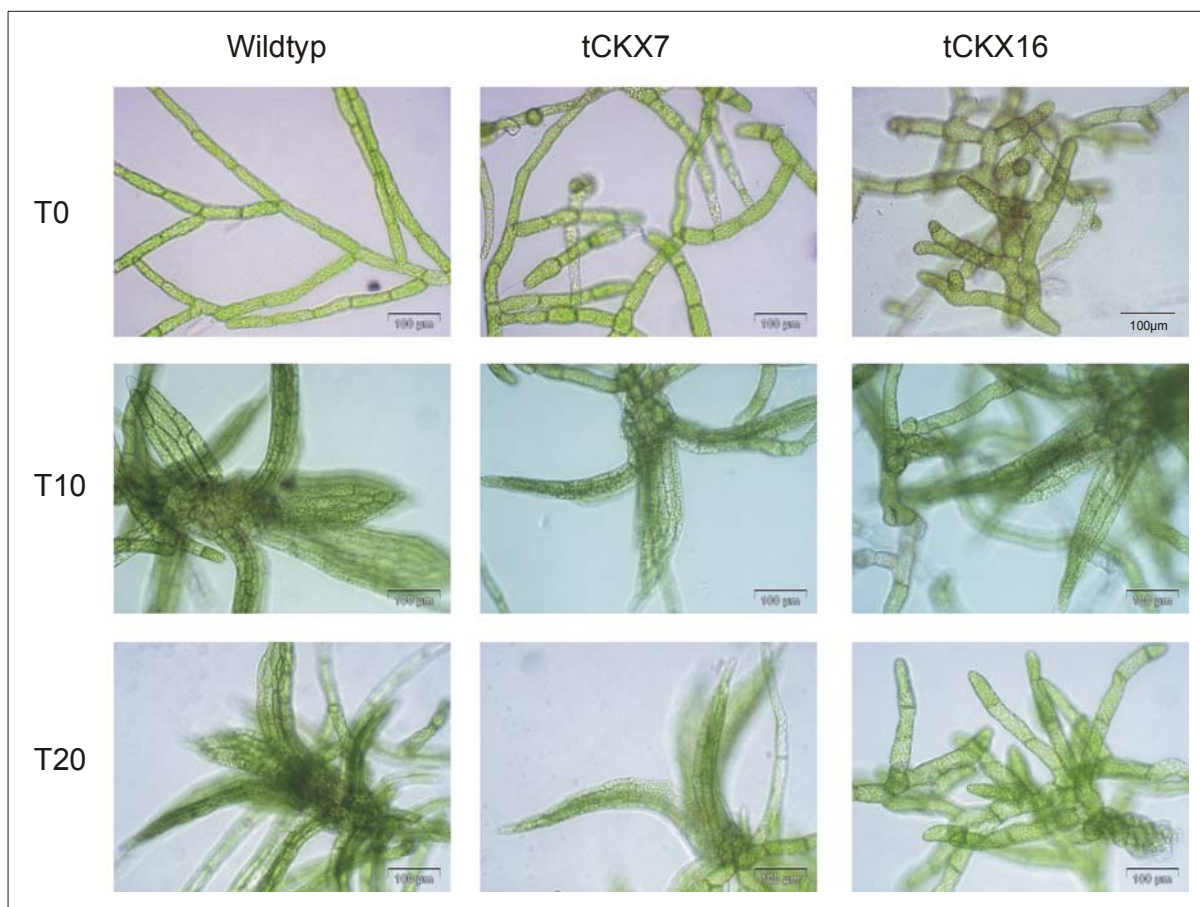


Abb. 3.25 Mikroskopische Aufnahmen von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16 aus Flüssigkulturen. Probenahmen an Tagen T0, T10 und T20. Die Größenbalken entsprechen 100 µm.

Die Integration und Überexpression von *AtCKX2* bei den tCKX-Transformantanten zeigten eine erhöhte CKX-Aktivität, insbesondere im Kulturmedium. Die Auswirkungen der erhöhten CKX-Aktivität auf den Phänotyp wurden auf verschiedenen Ebenen untersucht: Protonema, Gametophoren, Rhizoide, Phylloide. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Fähigkeit zur generativen Vermehrung beeinträchtigt war.

3.3.2.8.2 Protonema

Für die Erfassung von Größenunterschieden bei Protonemazellen wurden Flüssigkulturen verwendet, die bei 25°C in 1-Liter Schottflaschen gehalten worden waren (s. 2.11.2). Insgesamt wurden 100 Protonemazellen pro Genotyp vermessen. Die Messung von Zelllänge und -breite erfolgte immer an der Mitte der Querwände bzw. an den Längsseiten der Zellen, unabhängig von der Zellform. Wachsende Apikalzellen waren von dieser Untersuchung ausgenommen.

Zuerst wurden die mittlere Zelllänge und -breite für den Wildtyp ermittelt. Als Standard wurden Werte betrachtet, die mindestens bei 10% der vermessenen Zellen vorkamen. Hierbei wurde eine Zelllänge zwischen 60 und 99 µm und eine Zellbreite zwischen 18 und 29 µm bestimmt. Vereinzelt konnten Zell-Abmessungen außerhalb dieser Bereiche gemessen werden (s. Abb. 3.26 links).

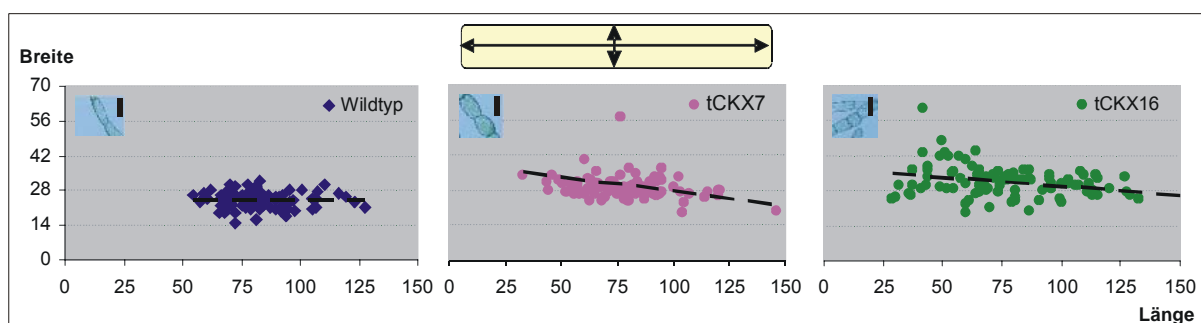


Abb. 3.26 Darstellung der Länge und Breite von 100 vermessenen Protonema Zellen von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16. Als Inserts sind, oben links, typische Protonema-Zellen der jeweiligen Genotypen abgebildet (Größenbalken entsprechen 75 µm).

Die Zellen der Transformanten zeigen eine Länge von 20 bis 160 µm; für die Breite wurden Werte von 14 bis 60 µm gemessen. Wenn man einer Reihe von Zellen eines Protonema-Fadens folgte, konnte man gelegentlich eine Inversion von Länge und

Breite beobachten, so dass vereinzelt Zellen einen runden anstatt länglichen Habitus zeigten (vgl. ebenfalls Abb. 3.25, T0).

Tab. 19 Prozentuale Verteilung der Zelllänge und -breite bei Protonema von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16.

LÄNGE (%)			GENOTYP	BREITE (%)		
< 60 µm	60-99 µm	> 99 µm		< 18 µm	18-29 µm	> 29 µm
4,0	85,0	11,0	Wildtyp	3	93,0	4,0
16,0	71,9	12,5	tCKX7	0	65,5	34,4
28,0	46,0	25,0	tCKX16	0	43,8	56,3

Die statistische Verteilung der Zellabmessungen der Transformanten unterschied sich von der des Wildtyps. Bei beiden Transformanten konnte man im Vergleich zum Wildtyp eine Tendenz zur Bildung von breiteren Zellen beobachten (Abb. 3.26). Während beim Wildtyp das Auftreten von breiteren Zellen (breiter als 29 µm) nur bei 4% lag, kamen solche Zellen bei den Transformanten (tCKX7 und tCKX16) mit einer Häufigkeit von 34,4% bzw. 56,3% vor (s. Tab. 19).

Die Länge der Zellen bei den Transformanten unterschied sich im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls, allerdings zeigte sich die Veränderung bei tCKX16 stärker als bei tCKX7. Bei tCKX7 konnte man eine verstärkte Bildung von kürzeren Zellen (unter 60 µm) beobachten, mit einem Vorkommen von 16% im Vergleich zu 4% beim Wildtyp. Bei tCKX16 sah man im Vergleich zum Wildtyp sowohl verkürzte als auch verlängerte Zellen, wobei die kürzeren Zellen mit einer Häufigkeit von 28% vorkamen. Die längeren Zellen (> 99 µm) kamen bei tCKX7 mit einer Häufigkeit von 25% vor, beim Wildtyp jedoch nur mit einer Häufigkeit von 11%. (vgl. Tab. 19).

3.3.2.8.3 Gametophoren und Rhizoide

Um Veränderungen bei den Gametophoren und Rhizoiden feststellen zu können, wurden Pflanzen verwendet, die auf Agarmedium bei 15°C und 25°C gewachsen waren (s. 2.5.1). Nach zweimonatigem Wachstum in Glasgefäßen wurden 13 Pflanzen auf eine mit Millimeter-Papier skalierte Folie gelegt und vermessen. Sowohl bei Gametophoren als auch bei Rhizoiden wurden die jeweiligen maximalen Längen gemessen.

Die Größe der Gametophoren beim Wildtyp unterschied sich bei beiden Wachstumstemperaturen nicht. Die Rhizoide hingegen zeigten bei 15°C ein stärkeres Wachstum und waren doppelt so lang wie bei Pflanzen, die bei 25°C gewachsen waren. Die Anzuchttemperatur wirkt sich also deutlich auf die Länge der Rhizoide aus.

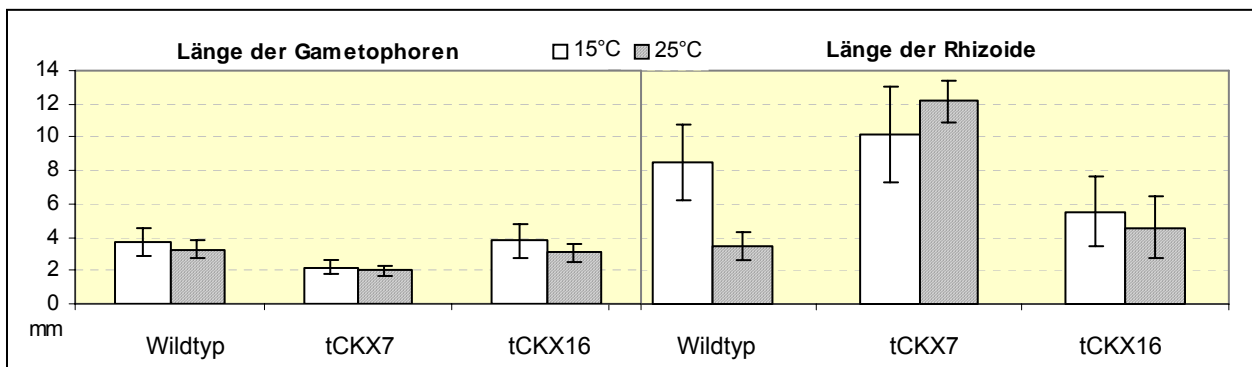


Abb. 3.27 Links: Darstellung der Länge der Gametophoren von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16 bei jeweils 15°C und 25°C. Rechts: Länge der Rhizoide von WT, tCKX7 und tCKX16 bei jeweils 15°C und 25°C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für mindestens 13 vermessene Pflanzen je Genotyp.

Bei den Transformanten traten genauso wie beim Wildtyp bei der Länge der Gametophoren keine signifikanten Abweichungen zwischen beiden Temperaturen auf (s. Abb. 3.27 links). Wenn man die Gametophorengröße der beiden Transformanten mit der des Wildtyps vergleicht, ist keine deutliche Tendenz zu beobachten: Während bei tCKX7 für beide Temperaturen die Gametophoren einer Größe von 45% bzw. 63% des Wildtyps zeigten (15° bzw. 25°C), waren tCKX16 Gametophoren ähnlich groß wie der Wildtyp.

Im Unterschied zum Wildtyp zeigten beide Transformanten bei der Länge der Rhizoide keine Temperaturabhängigkeit (s. Abb. 3.27 rechts). Bei 15°C war die mittlere Länge der Rhizoide bei tCKX7 länger als beim Wildtyp, die für tCKX16 dagegen kürzer.

Auffallend war bei 25°C, dass die Rhizoide der Transformanten tCKX7 und tCKX16 3,5- bzw. 1,4-fach länger als beim Wildtyp waren.

3.3.2.8.4 Vergilbung der Phylloide

Die tCKX-Transformanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine verfrühte Vergilbung der Phylloide. Bereits nach 5 Wochen wurden Vergilbungen beobachtet, die in der Regel an der Basis des Cauloids begannen. In Abb. 3.28 sind 12 Wochen alte Pflanzen dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte der Wildtyp (links) sowohl im unteren als auch im oberen Teil des Gametophors die charakteristische grüne Farbe. tCKX7 hingegen zeigte durchgehend bei allen Gametophoren Vergilbungen. tCKX16 war weniger vergilbt, obwohl in der Mitte der Gametophoren bereits dunkle Punkte zu erkennen waren. Wenn man die einzelnen Gametophoren betrachtet (untere Bilder), wird die bei den Transformanten auftretende starke Vergilbung der Phylloide im Vergleich zum Wildtyp deutlich.

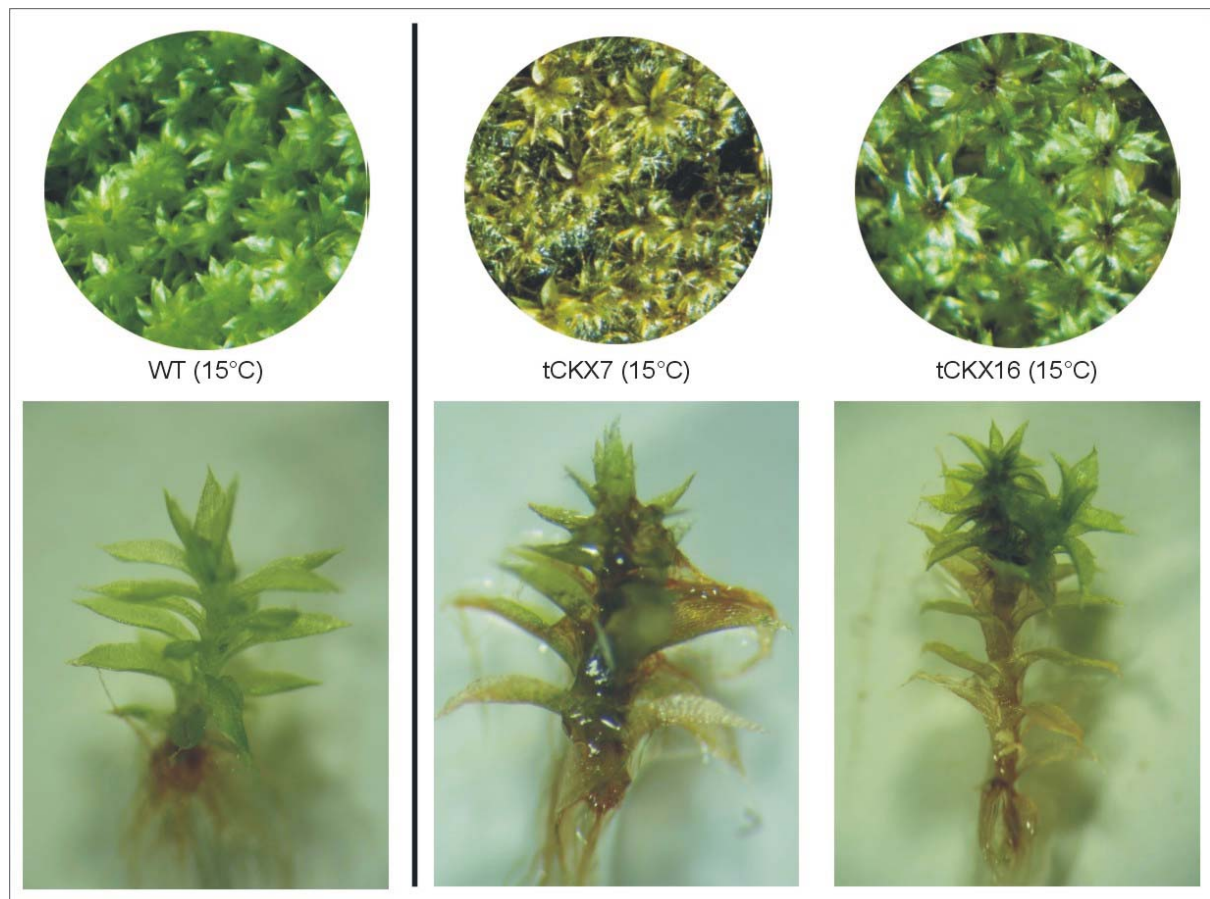


Abb. 3.28 Darstellung von Gametophoren von Wildtyp, tCKX7 und tCKX16 nach 12 wöchigem Wachstum auf ABCTV-Medium bei 15°C (s. 2.5.1). Oben: Aufsicht auf *Physcomitrella* Kulturen. Unten: Exemplarisch isolierte Gametophoren; der Wildtyp zeigt die typisch grüne Farbe der Phylloide. Die Transformanten zeigen dagegen Vergilbungen an Phylloiden sowie die Bildung mittelständiger Rhizoide am Cauloid.

Gelegentlich konnte man am Cauloid der tCKX-Transformanten, ähnlich wie bei *PpADK1*-Transformanten (s. 3.2.2.5.3), mittelständige Rhizoide erkennen.

3.3.2.8.5 Generative Fortpflanzung

Mehrere Kreuzungsversuche sowie Versuche zur Induktion von Sporophyten wurden durchgeführt, um die Fertilität beider Transformanten zu überprüfen (s. 2.12.1). Hierbei konnte in keinem Fall die Bildung von Sporophyten beobachtet werden. Weder nach der Kreuzung mit dem Wildtyp, noch mit der *nicBS*-Mutante, welche männlich steril sind (Schaefer *et al.*, 1991), konnten Antheridien, Archegonien oder Sporophyten beobachtet werden, sodass folglich der Lebenszyklus der Transformanten auf die vegetative Vermehrung beschränkt ist.

3.3.2.9 Verteilung der endogenen Cytokinine bei den tCKX-Transformanten

Bei beiden tCKX-Transformanten wurde eine sehr viel stärkere Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase-Aktivität als beim Wildtyp gemessen (vgl. 3.3.2.6). Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen der veränderten *CKX*-Aktivität auf Status und Verteilung der endogenen Cytokinine bei *Physcomitrella* untersucht.

Ein wichtiges Versuchsziel war hierbei ebenfalls die Gesamterfassung der bei *Physcomitrella* intra- und extrazellulär vorkommenden Cytokinine.

Bei Faiss *et al.* (1997) sind die methodischen Details dieser an der Universität Olomouc (Tschechien, vgl. Abb. 2.2, B) durchgeführten LC-MS-Analysen zusammengefasst. Aus einer Gesamtanzahl von 44 untersuchten Cytokinin-Formen wurden bei *Physcomitrella* 20 Formen nachgewiesen. Bei diesen Versuchen wurde festgestellt, dass die *tZ*-, *cZ*-, *iP*- und *BA*-Formen immer präsent waren (s. Anhang 6.8); gelegentlich wurde auch die Anwesenheit von *dHZ*- und *T*-Formen gemessen. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten von Messungen aus drei unabhängigen Kulturen.

3.3.2.9.1 Isoprenoid-Cytokinine im Gewebe

Der Status der intrazellulär vorkommenden Cytokinine für Wildtyp und tCKX-Transformanten ist in Abb. 3.29 dargestellt. Im Gewebe waren bei beiden Transformanten übereinstimmend mit dem Wildtyp cZROG, iPRMP, tZROG, cZRMP sowie tZRMP die dominierenden Cytokinin-Formen.

iP-Formen

Hinsichtlich der iP-Formen sieht man übereinstimmend für alle drei Genotypen eine Tendenz zur fallenden Konzentrationen während des gesamten Messzeitraumes. Bei iP sind die Niveaus bei den tCKX-Transformanten tCKX7 und tCKX16 niedriger als beim Wildtyp, mit einer maximalen Reduktion bei T10 auf 44% bzw. 52% der Wildtyp Konzentration.

tZ-Formen

Alle 5 Metabolite, tZRMP, tZR, tZROG, tZ und tZOG, zeigen generell eine Tendenz zur Reduktion im zeitlichen Verlauf (vgl. Anhang 6.8). Wiederum waren die Niveaus dieser Metabolite bei beiden Transformanten niedriger als beim Wildtyp. Die stärkste Reduktion war bei tZ zum Zeitpunkt T10 zu sehen. Die tZ Niveaus waren auf 16% (0,7 pmol/g tCKX16) des Wildtyp Gehalts reduziert, der 4,4 pmol/g aufwies. Auffallend beim Vergleich der Transformanten war, dass bei tCKX16 alle tZ-Formen stärker reduziert sind als bei tCKX7.

cZ-Formen

Im Gewebe wurde bei beiden Transformanten nur eine übereinstimmende Veränderung beobachtet, die aus einer leichten (bis 1,7-fachen) Erhöhung von cZR bestand. Alle anderen cZ-Formen zeigten keine deutlichen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp.

dHZ-Formen

In geringen Mengen waren auch dHZ-Formen im Gewebe vorhanden, vertreten durch das Ribosid dHZR, sein O-Glucosid dHZROG sowie die Base dHZ. Die Gehalte aller anderen dHZ-Formen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Ausschließlich die Base zeigte bei den Transformanten eine leichte Senkung gegenüber dem Wildtyp.

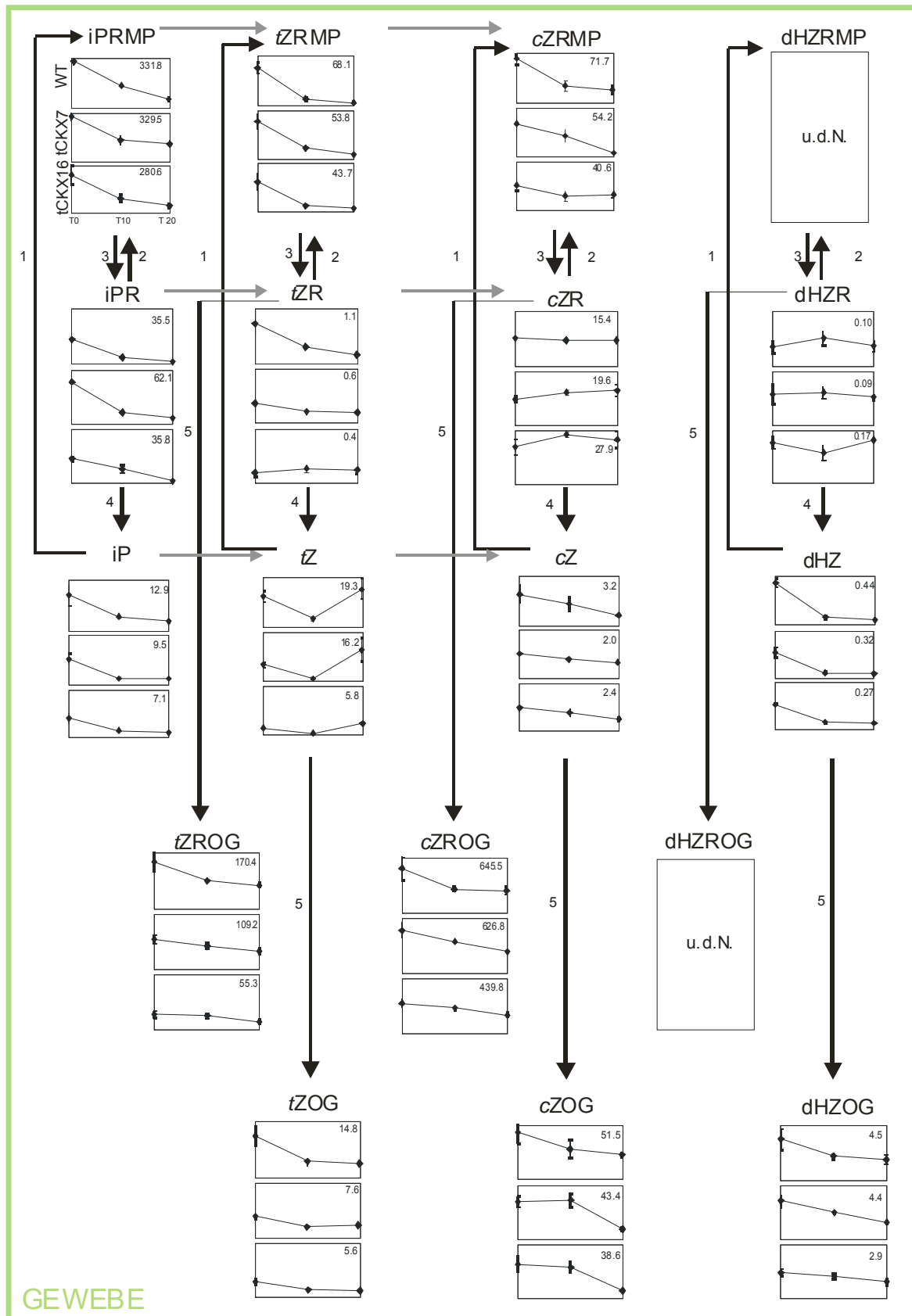


Abb. 3.29 Konzentrationen der intrazellulären Isoprenoid-Cytokinine von Wildtyp (jeweils oben) und tCKX-Transformanten tCKX7 (mitte) und tCKX16 (unten). Die Daten sind in pmol/g angegeben (TG). u.d.N.- unter der Nachweisgrenze; (1) APT (Adenin-Phosphoribosyltransferase); (2) ADK (Adenosin-Kinase), (3) 5'-N (5-Nukleotidase); (4) ADN: Adenosin-Nukleosidase; (5) O-GT (O-Glucosyltransferase). Die Skalierung ist bei den jeweiligen Metaboliten für alle drei Genotypen identisch. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Messungen aus drei unabhängigen Kulturen. Probenahmen bei T0, T10 und T20. Die angegebenen Werte stellen die Maxima bei den jeweiligen Genotypen dar.

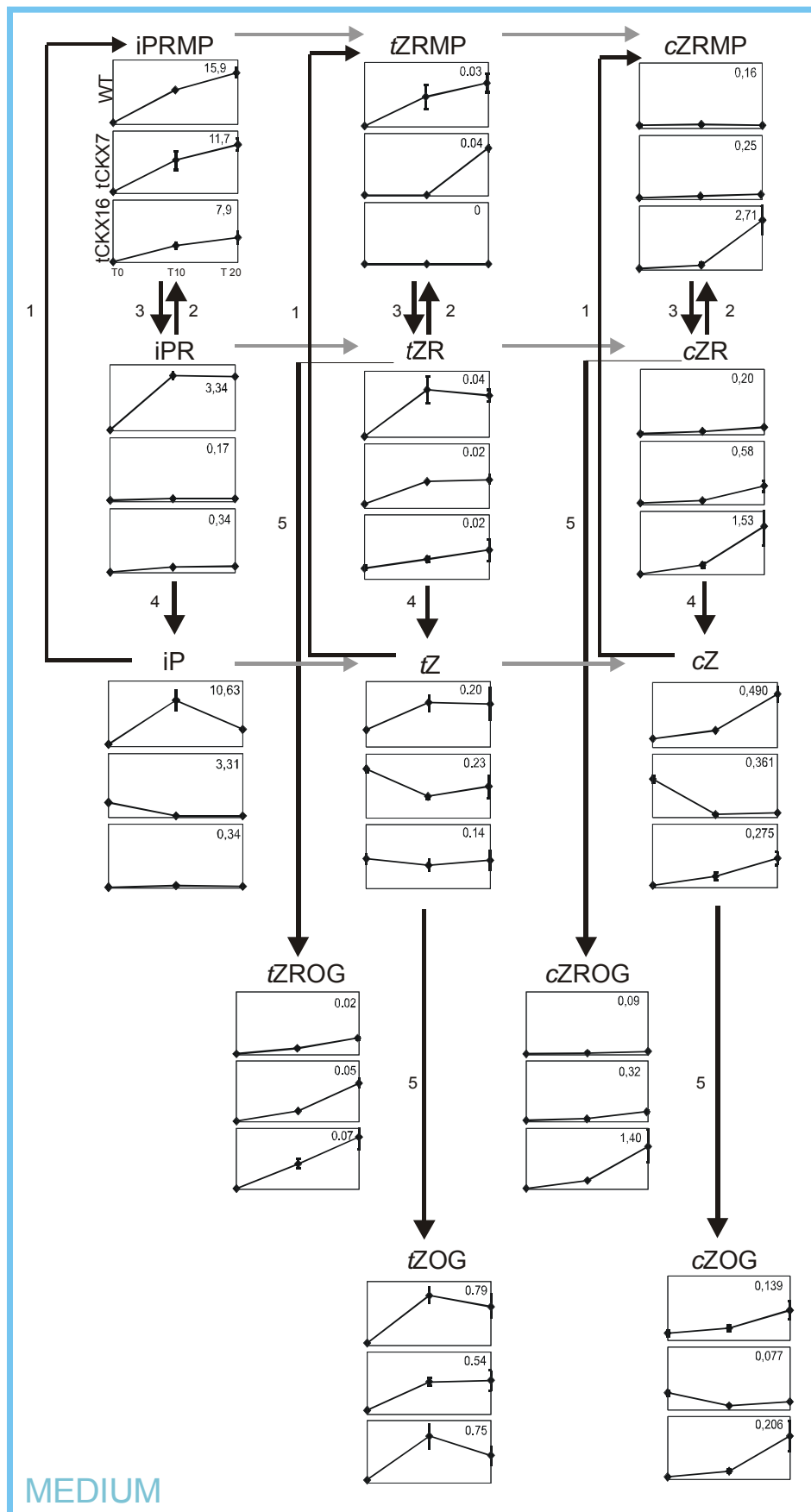


Abb. 3.30 Konzentrationen der extrazellulären Isoprenoid-Cytokinine von Wildtyp (jeweils oben) und den tCKX-Transformanten tCKX7 (mitte) und tCKX16 (unten). (Weitere Angaben siehe Legende Abb. 3.29)

3.3.2.9.2 Isoprenoid-Cytokinine im Medium

Der Status der extrazellulären Cytokinine bei Wildtyp und tCKX-Transformanten ist in Abb. 3.30 zusammengefasst:

iP-Formen

Im Medium war eine klare Reduktion aller drei iP-Formen nachzuweisen, wobei iP die stärkste Abnahme zeigte. Zum Zeitpunkt T10 wurde eine Senkung von iP gemessen (0,2 bzw. 0,3 pmol/100 ml bei tCKX7 bzw. tCKX16) gegenüber dem Wildtyp mit 10,6 pmol/100 ml, eine Menge die nur 1,8% bzw. 2,8% des extrazellulären iP beim Wildtyp entspricht. Zum Probennahme-Zeitpunkt T10 waren die iPR-Gehalte bei beiden Transformanten mit 0,17- bzw. 0,34 pmol/100 ml niedriger als beim Wildtyp (3,34 pmol/100 ml), solche Werte entsprechen 5% bzw. 10% des Gehalts beim Wildtyp. Die Reduktion von iPRMP gegenüber den anderen iP-Metaboliten war mit 50% eher gering. An allen drei Messtagen war die iPRMP-Reduktion bei tCKX7 am stärksten (vgl. Anhang 6.8).

tZ-Formen

Während im Gewebe sowohl beim Wildtyp als auch bei den tCKX-Transformanten *tZRMP* und *tZROG* die am höchsten konzentrierten Metabolite waren, dominierten im Medium *tZ* und *tZOG*. Extrazelluläre *tZ* Nukleotide lagen oftmals unterhalb der Nachweisgrenze. Die *tZ*-Gehalte sanken bei beiden Transformanten im Kulturverlauf bis auf Werte, die 48,5% bzw. 53,5% des Wildtyp *tZ* Gehalts repräsentieren. Beim O-Glucosid *tZROG* hingegen wurde eine bis zu 4,1-fache Steigerung (T10, tCKX16) festgestellt.

cZ-Formen

Die extrazellulären Konzentrationen von *cZRMP*, *cZROG* sowie *cZR* stiegen über den gesamten Kulturverlauf bei allen drei Genotypen an (Abb. 3.30, vgl. Anhang 6.8). Der *cZRMP*-Gehalt tendierte bei den Transformanten mit zunehmender Kulturdauer zu höheren Werten, während er beim Wildtyp eher konstant blieb. Bei T0 repräsentiert das Niveau von *cZRMP* nur 31% bzw. 39% des Wildtyp Gehalts, zum Ende des Experiments hingegen bis zu 18-fach höher.

Die Werte für *cZR* stiegen ebenfalls und erreichten ein Maximum, das bei *tCKX7* und *tCKX16* 3,2 bzw. 7,8-fach über den Wildtyp-Werten lag. Am Ende des Experiments wurde bei *tCKX7* eine 3,5-fache Steigerung von *cZROG* festgestellt, bei *tCKX16* war sogar eine 15-fache Zunahme nachzuweisen.

Während im Gewebe *cZROG*, *iPRMP* und *tZROG* mit Werten zwischen ca. 650-55 pmol/g die dominierende Substanzen darstellten, war im Medium *iPRMP* das Cytokinin mit der höchsten Konzentration mit Werten zwischen ca. 7,9-16 pmol/100 ml.

3.3.2.9.3 Vorkommen und Verteilung aromatischer-Cytokinine

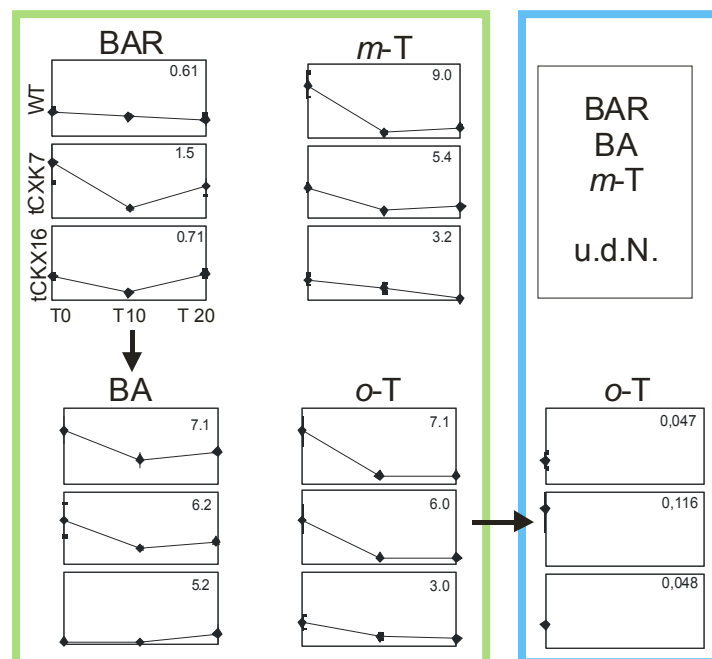
Die massenspektrometrische Analyse erlaubte ebenfalls die Erfassung von aromatischen-Cytokininen. Im Gewebe konnte das Vorkommen von *BAR* und *BA* sowie *m*- und *o*-Topolin eindeutig nachgewiesen werden. Bei *BA* wurde bei beiden Transformanten eine leichte Reduktion nachgewiesen, wobei 70% der Wildtyp Gehalte gemessen wurden. Bei allen anderen Formen war keine klare Tendenz erkennbar.

Im Medium wurde als einzige aromatische-Cytokininform *o*-T zum Zeitpunkt *T0* nachgewiesen. Der Status der nachgewiesenen aromatischen-Cytokinine beim Wildtyp und *tCKX*-Transformanten ist in Abb. 3.31 dargestellt.

Abb. 3.31 Konzentration und Verteilung der nachgewiesenen aromatischen Cytokinie in Gewebe (grün) und Medium (blau) beim Wildtyp (jeweils oben) und den *tCKX*-Transformanten, *tCKX7* (mitte) und *tCKX16* (unten). Die Daten sind in pmol/g (TG) bzw. pmol/ 100ml wiedergegeben.

u.d.N.- unter der Nachweisgrenze.

(Weitere Angaben siehe Legende zu Abb. 3.29).



Gesamt-Cytokinine und Verteilung der Cytokinin-Familien

Bei den tCKX-Transformanten waren intrazellulär im Vergleich zum Wildtyp keine großen Veränderung bei den Konzentrationen der verschiedenen Cytokinin-Familien zu verzeichnen (Tab. 20). Nur bei tCKX16 war eine Halbierung der Gesamt-Konzentration für die *tZ*-Familie (*tZ*, *tZOG*, *tZR*, *tZROG*, *tZRMP*) im Vergleich zum Wildtyp nachzuweisen.

Im Medium hingegen trat übereinstimmend bei beiden Transformanten eine Reduktion der iP- sowie *tZ*-Metabolite auf, die gegenüber dem Wildtyp zu einer Absenkung des Gesamt-Cytokininingehaltes, bezogen auf die gesamte Kultur, führt. Die Absenkung war bei tCKX16 höher als bei tCKX7.

Tab. 20 Zusammenfassende intra- und extrazelluläre Verteilung der Gesamtmengen für verschiedene Cytokinin-Familien (iP-, *tZ*-, *cZ*-, dHZ-, BA- und T-Familie) in *Physcomitrella* Wildtyp und tCKX-Transformanten. Die Daten sind in pmol/Kultur (200 ml) angegeben. Die Daten für einzelne Cytokininsubstanzen wurden in Abb. 3.29 und Abb. 3.30 graphisch präsentiert. Rot markiert: Abnahme gegenüber dem Wildtyp. Fam: Familie

Name	Gewebe						Tag	Medium						Gesamt
	iP-Fam	<i>tZ</i> -Fam	<i>cZ</i> -Fam	dHZ-Fam	BA-Fam	T-Fam		iP-Fam	<i>tZ</i> -Fam	<i>cZ</i> -Fam	dHZ-Fam	BA-Fam	T-Fam	
Wildtyp	9,4	6,7	19,8	0,12	0,2	0,4	0	1,3	0,20	0,52	0	0	0	38,5
	15,0	10,5	35,8	0,24	0,3	0,1	10	48,7	2,11	0,96	0	0	0	113,5
	7,1	11,5	39,1	0,24	0,5	0,3	20	46,3	1,78	2,12	0	0	0	108,6
tCKX7	14,0	6,3	25,7	0,17	0,3	0,4	0	7,0	0,58	1,09	0	0	0	55,3
	16,6	10,0	53,2	0,32	0,2	0,2	10	16,3	1,28	0,76	0	0	0	98,6
	13,9	8,9	35,2	0,01	0,4	0,3	20	24,0	1,58	2,43	0	0	0	86,7
tCKX16	10,2	3,4	17,1	0,10	0,2	0,2	0	0,3	0,37	0,17	0	0	0	32,0
	11,9	5,6	40,9	0,24	0,2	0,3	10	11,7	1,80	1,84	0	0	0	74,3
	5,6	4,2	32,6	0,20	0,5	0,1	20	17,1	1,30	12,3	0	0	0	73,7

Zusammenfassend für alle dargestellten Messungen der endogenen Cytokinine lässt sich festhalten, dass *cZ*-O-Glucoside sowie Monophosphate (iP-, *tZ*-, *cZ*-) die am stärksten vertretenen Cytokinine in *Physcomitrella* sind. dHZ-Formen und aromatische-Cytokinine kommen nur in Spuren vor.

Die heterologe CKX-Überexpression zeigte den deutlichsten Effekt bei den extrazellulären iP und iPR-Konzentrationen mit einer maximalen Reduktion auf Werte, die nur 1,8% bzw. 5% der Wildtyp Gehalte entsprechen. Die daraus ableitbaren Rückschlüsse auf die hormonellen Wirkungen von Cytokinin bei Laubmoosen werden im Folgenden diskutiert.

4 DISKUSSION

4.1 Cytokinine bei *Physcomitrella*

Cytokininspektrum

Bei *Physcomitrella* wurden bereits diverse Studien durchgeführt um festzustellen, welche Cytokininformen und Konjugate in dieser Spezies vorkommen und wie der Haushalt dieser Formen gesteuert wird (Wang *et al.*, 1980, 1981, Letham und Palni, 1983, Schulz *et al.*, 2000, 2001; Schwartzberg *et al.*, 1998, 2003).

In den oben genannten Arbeiten wurde lediglich das Vorkommen von iP- und Z-Formen nachgewiesen. Nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten LC-MS basierten Cytokininbestimmungen muss diese Annahme korrigiert werden. In dieser Arbeit wird neben iP- und Z-Formen auch das Vorkommen weiterer Cytokinine beschrieben: *cis*-Zeatin-, dHZeatin-Formen sowie die aromatischen-Cytokinine BA und deren Hydroxy-Verbindungen *ortho*- und *meta*-Topolin.

Bei den pro Kultur gemessenen intrazellulären iP- und cZ-Cytokinen (vgl. Abb. 3.1 A und B), liegt der Anteil an iP-Formen (iPRMP, iPR, iP an den drei wiedergegebenen Tagen) gegenüber der Gesamt-Cytokininmenge lediglich zwischen 1,9 und 20% (jeweils Experiment A und B), während 60-88% aus *cis*-Zeatin Verbindungen (cZRMP, cZR, cZROG, cZ, cZOG) bestehen (vgl. Anhang Tab. 25/Tab. 26 bzw. Tab. 28/Tab. 29). Anhand dieser Ergebnisse muss gefolgert werden, dass bei *Physcomitrella* die *cis*-Zeatin-Formen die Hauptcytokinine im Gewebe darstellen.

In den bislang publizierten Arbeiten wurden im Kulturmedium von *Physcomitrella* (Wang *et al.*, 1981, Schulz *et al.*, 2001; Schwartzberg *et al.*, 2003) und in Weizen (Laloue und Fox 1989) lediglich Cytokinin-Riboside und -Basen nachgewiesen. Nach den für diese Arbeit durchgeführten Messungen für endogen produzierte Cytokinine kann nicht nur von einer Freisetzung von Cytokinin-Basen und Cytokinin-Ribosiden, sondern auch von Cytokinin-Nukleotiden ausgegangen werden. Dieser Befund stimmt mit dem von Motyka *et al.* (2003) überein, welche an Suspensionskulturen von Tabak das extrazelluläre Vorkommen der Monophosphate iPRMP, tZRMP und dHZRMP nachweisen.

Für die intrazellulären iP-Formen beim Wildtyp stellt iPRMP, wie bereits von Schulz *et al.* (2001) beschrieben, den Haupt-Metabolit dar. Bei den cZ-Formen dominiert hingegen cZROG (s. Abb. 3.1 A und B).

In einer breiten Studie zu den endogenen Cytokinin bei Algen wurde bei 18 von 30 untersuchten Spezies ebenfalls festgestellt, dass cZ-Formen die Hauptcytokinine sind, wobei cZ der überwiegende Metabolit war und nicht wie bei *Physcomitrella* cZROG (Stirk *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnten die Befunde von Wang *et al.* (1981) bestätigt werden, nachdem bei *Physcomitrella* auch Z und deren Riboside und Ribotide vorkommen. Zeatin-zusammen mit iP-Verbindungen wurden von Auer (1997) als typische Cytokinine für Grünalgen, Moose und Farne eingeordnet. In der vorliegenden Arbeit wurden in *Physcomitrella* tZ-Formen sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen. Hierbei waren je nach angewendetem Messverfahren nicht immer alle tZ-Metabolite nachweisbar (vgl Abb. 3.1 A und B).

Als weitere Gruppe von Isoprenoid-Cytokinin wurde - erstmals für Bryophyten - die Anwesenheit von dHZ-Formen (außer dHZRMP) nachgewiesen.

Ebenfalls erstmals für diese Pflanzengruppe wurde das geringfügige Vorkommen von aromatischen-Cytokinin (BA-, o-T und m-T-Formen) nachgewiesen.

Die Zusammenfassung der intra- und extrazellulär vorkommenden Cytokinine berechnet als pmol/Kultur (Tab. 21, Tab. 22) zeigt auf, dass Cytokinin-Metabolite hauptsächlich in der Zelle akkumuliert werden.

Hinweise auf die Cytokininbiosynthese bei Physcomitrella

Auf der Grundlage der vorliegenden Literatur zu Samenpflanzen geht man davon aus, dass die Biosynthese von Cytokinin überwiegend über Adenylat-Isopentenyltransferasen (IPT) erfolgt und nicht alleine über den *turnover* von tRNA geschieht (Barnes *et al.*, 1980; Miyawaki *et al.*, 2006). Yekdakova *et al.* (2008) haben anhand bioinformatischer Untersuchungen sowie Expressionsdaten zum tRNA-IPT-Gen *PpIPT1* bei *Physcomitrella* Wildtyp und *ove*-Mutanten die Hypothese aufgestellt, dass bei *Physcomitrella* die Isoprenoid-Cytokinine überwiegend über den tRNA-Weg

synthetisiert werden. In *Arabidopsis* wurde festgestellt, dass die Biosynthese von *cZ*-Cytokinen vorwiegend über den tRNA-Weg erfolgt (Miyawaki *et al.*, 2006). Übereinstimmend mit dieser Vorstellung wurde bei tCKX7 im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Aktivität des *PpIPT1*-Gens nachgewiesen (Yevdakova *et al.*, 2008). Die erhöhte *PpIPT1*-Expression in tCKX7 wird als Gegenreaktion des Cytokininbiosyntheseapparates auf die CKX-bedingte Absenkung des Cytokiningehaltes interpretiert.

Angesichts der extrem hohen intrazellulären Konzentrationen von *cZROG* mit 55-115 bzw. 16,3-32,7 pmol/Kultur (je nach angewendetem Messverfahren) bei Gesamt-Cytokininmengen von 81-149,8 bzw. 38-108,6 pmol/ Kultur (vg. Tab. 25/Tab. 28) stellt sich die Frage nach der Funktion dieses Cytokininkonjugates. Z-O-Glucoside gelten allgemein als inaktive Speicherformen, die vor Abbau mittels CKX geschützt sind (Galuszka *et al.*, 2007). Durch Aktivität von Glucosidasen können Z-O-Glucoside wieder in physiologisch aktive Z-Formen überführt werden (McGaw und Horgan 1983; Kaminek *et al.*, 1997; McGaw und Burch 1995).

Es besteht somit die Möglichkeit, dass *Physcomitrella* neben der *de novo* Biosynthese Pools an Z-O-Glucosiden nutzt, um entsprechende Z-Basen und -Riboside als Aglykone freizusetzen. Allerdings besteht bei der Frage nach der hormonellen Funktion von *cZ* und *cZR* generell Unklarheit, da bei einem *Physcomitrella* Knospeninduktionstest für diese Cytokine keinerlei Aktivität nachgewiesen werden konnte (Schwartzberg *et al.*, 2007). Eine Hypothese zur Funktion dieser Metabolite wird anhand der Ergebnisse zur Modulation von ADK in 4.2.5 diskutiert.

4.2 Adenosin-Kinase (ADK)

Die Cytokininhomöostase in den unterschiedlichen Wachstumsphasen wird durch die Aktivität verschiedener Enzyme des Cytokininstoffwechsels wie z.B. Adenosin-Kinase oder Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase reguliert. Im zweiten Teil dieser Arbeit ging es um Versuche zur Veränderung der ADK-Aktivität in *Physcomitrella*, die durch Überexpression von *PpADK1* erfolgen sollte.

Verschiedene Strategien sind entwickelt worden, um die Rolle der ADK in diversen Organismen zu klären.

In *Sacharomyces cerevisiae* ist eine ADK-Defizienz von einer veränderten Nutzung von S-Adenosylmethionin sowie von einer Adenosin-Exkretion begleitet (Lecoq *et al.*, 2001). Die Abschaltung von ADK in *Arabidopsis* durch *gene silencing* zeigt eine negative Wirkung auf die S-Adenosylhomocystein-Synthese (Moffatt *et al.*, 2002). Versuche zum *gene knock out* von *PpADK1* in *Physcomitrella* blieben ergebnislos, so dass von einer wichtigen Rolle dieses Gen für den Stoffwechsel ausgegangen werden kann (Schulz 2001). Bislang wurden für keinen multizellulären Organismus überlebensfähige ADK-*Knock out*-Mutanten beschrieben. ADK-Überexpressionsversuche bei *Physcomitrella*, bei denen *PpADK1* unter der Kontrolle des 35S-Promotors stand, ergaben keine oder lediglich geringe Veränderungen der ADK-Aktivität (Schulz, 2001). Bei isolierten menschlichen Lymphoblasten wiesen ADK-defiziente Zelllinien keine erkennbaren phänotypischen Unterschiede auf (Kredich und Hershfield, 1979).

Neben der bis jetzt aus *Physcomitrella* bekannten *PpADK1* (Schwartzberg *et al.*, 1998) wurden in dieser Arbeit mittels Datenbankrecherchen zwei weitere ADK-Gene identifiziert und mit zahlreichen anderen ADKs verglichen.

4.2.1 Verwandtschaft von *Physcomitrella* ADKs mit ADKs anderer Organismen

Dank der Arbeit des International Moss Genome Konsortiums konnte das gesamte nukleäre Genom von *Physcomitrella* sequenziert werden (<http://genome.jgi-psf.org/>). Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Datenbanken wurden zwei neuen ADK-Gene identifiziert und charakterisiert (3.2.1.3). Da für alle drei Gene EST-Einträge gefunden worden sind, ist von einer Expression der drei *PpADKs* auszugehen. Die Gene *PpADK1* und *PpADK2* sind mit einer 87%igen Identität sehr nah verwandt (vgl. 3.2.1.4). Zu *PpADK3* zeigen beide Gene lediglich eine Identität von ca. 60%. Paarweise Analysen mit anderen pflanzlichen ADK-Sequenzen ergaben hohe Homologien.

Das hohe Maß an Homologie zwischen phylogenetisch sehr weit entfernten Organismen, z.B. 46% zwischen Hefe und Hamster (Tab. 23), deutet an, dass die ADK grundlegende zelluläre Funktionen übernimmt und sich daher im Verlauf der Evolution nur relativ wenig verändert hat.

PpADK-Gene besitzen zahlreiche Introns

Auffallend bei allen für Abb. 3.5 verwendeten *ADK*-Genen, für die genomische Sequenzen vorliegen, ist die hohe Anzahl an Introns. Hierbei besitzen die *ADK*-Gene aus Algen (uni- und plurizellulär) 1-8 Exons (Gruppe III). Bei den Säugetieren kommen übereinstimmend 10 Exons vor. Die *ADK* des Krallenfrosches *Xenopus tropicalis* besitzt 7 Exons (nicht dargestellt). Bei den Landpflanzen (einschließlich Bryophyten, Moosfarnen und Samenpflanzen) ist die größte Fragmentierung der *ADK*-Gene mit 12-13 Exons zu sehen.

Nach Rensing *et al.* (2008, supplementary material) beträgt die mittlere Anzahl der Exons in den im *Physcomitrella*-Genom kodierten Genen 4,87 bei einer durchschnittlichen Transkript-Länge von 1195 bp und einer gesamten Gen-Länge von 2389 bp. Stenoien (2007) berichtet von einer durchschnittlichen Anzahl von 5,7 Introns pro Gen mit einer durchschnittlichen Länge von 262 bp. Im Durchschnitt beträgt die Intron-Länge innerhalb eines Genes 1330 bp gegenüber einer Exon-Länge von 1448 bp. Die *PpADKs* (jeweils mit ca. 1000 bp Transkript und ca. 2486 bp Intron Länge) liegen mit 12-13 Exons deutlich über der durchschnittlichen Exon-Anzahl, wobei die Exons folglich mit 47 bis 200 bp vergleichsweise kurz sind. Die Länge der gesamten Introns innerhalb der *PpADKs* erwies sich im Vergleich zum Durchschnitt als doppelt so lang.

Verschiedene Studien sind durchgeführt worden, um eine Korrelation zwischen der Stärke der Gen-Expression und der Intron-Anzahl herzustellen. Hierbei wurde festgestellt, dass hoch exprimierte Gene bei Tieren eine kompakte Struktur besitzen, welche durch kurze und wenige Introns gekennzeichnet sind. Dagegen enthalten solche Gene bei Hefe und einigen einzelligen Organismen längere Introns (Stenoien 2007). In *Arabidopsis* und Reis wurde festgestellt, dass hoch exprimierte Gene mehr und längere Introns enthalten (Ren *et al.*, 2006). Die Gene in Pflanzen können je nach CG-Anteil auch in zwei Gruppen klassifiziert werden (Carels und Bernardi, 2000). Bei *Physcomitrella* wurde festgestellt, dass hoch exprimierte Gene folgende Charakteristika aufweisen: (1) kurze Introns, (2) niedrige Intron Anzahl und (3) einen hohen GC-Anteil (Stenoien, 2007). Obwohl *PpADK1* 12 Introns enthält, ist die Länge der jeweiligen Introns eher kurz (3.2.1.3). Schulz (2001) hat bei *PpADK1* ein hohen GC-Anteil, 52% Exons/40% Introns, festgestellt. Anhand dieser Daten und der Tatsache, dass die *ADK* ein *house-keeping*-Enzym ist (Moffatt *et al.*, 2000), welches in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird (und neben der Interkonversion der Cytokinine u.a. auch die

Phosphorylierung und das Recycling von Adenosin reguliert), wäre es denkbar, dass diese Enzyme trotz hoher Fragmentierung der Gene hoch exprimiert werden, um solche wichtigen zellulären Prozesse aufrechtzuerhalten.

4.2.2 Untersuchungen zur Überexpression der Adenosin-Kinase *PpADK1*

Es wurden bereits Anstrengungen unternommen in *Physcomitrella* durch Überexpression des *PpADK1*-Gens und durch *gene knock out* Informationen zur Funktion der *PpADK1* und der Rolle in der Cytokinin Homöostase zu erhalten (Schulz, 2001). Versuche zum *gene knock out* ergaben keine überlebensfähigen rekombinanten Linien, woraus gefolgert wurde, dass *PpADK1* höchstwahrscheinlich ein essentielles Gen darstellt (Schulz, 2001). Überexpressionsversuche unter Verwendung des 35S-Promotors resultierten in einer nur geringfügigen Steigerung der ADK-Aktivität, wobei keine erkennbaren phänotypischen Veränderungen auftraten (Schulz, 2001).

In dieser Arbeit wurde ein Expressionsvektor konzipiert und hergestellt, bei dem die *PpADK1* cDNA (Acc. No. YT15430, Schwartzberg *et al.*, 1998) unter Kontrolle des Actin1-Promotors steht (vgl. Abb. 3.6). Der Actin1-Promotor gilt als deutlich stärker als der 35S-Promotor (Wang *et al.*, 1992). Das erstellte Konstrukt (pHP_Act1_*PpADK1*) hat eine Größe von 7278 bp; seine Richtigkeit wurde durch PCR und Sequenzierung überprüft.

Nach zwei Transformationen mit insgesamt ca. 6×10^5 Protoplasten wurden acht stabile Transformanten selektiert. Die ermittelte Transformationseffizienz bezüglich der stabilen Transformanten im Vergleich zu den angesetzten Protoplasten beträgt $1,3 \times 10^{-5}$ und ist mit der aus der Literatur bekannten Transformationseffizienz von 1×10^{-5} bzw. 5×10^{-5} Protoplasten vergleichbar (Schaefer *et al.*, 1991).

Um die eingebrachte cDNA von *PpADK1* (1178 bp) per PCR vom endogenen *PpADK1*-Lokus (3565 bp, 12 Introns) zu unterscheiden, wurden die Fragmentgrößen für dieselben Primerpaare bezüglich cDNA und gDNA verglichen. Um sicherzustellen, dass die gesamte Kassetten *Act1_PpADK1_nos3T* integriert war, wurden Versuche mit Primern außerhalb des ADK-Bereiches durchgeführt (Abb. 3.8). Alle untersuchten Transformanten (tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26, tADK1-31 und tADK1-33) weisen

eine Integration der gesamten *PpADK1*-Kassette auf. Hierbei wird von einer zufälligen Insertion ins *Physcomitrella* Genom ausgegangen, da eine homologe Rekombination (HR) zwischen der verwendeten *PpADK1*-cDNA mit dem genomischen *PpADK1*-Lokus aufgrund der hohen Fragmentierung durch Introns eher unwahrscheinlich ist. Auf Grund der relativ niedrigen Identität von 38-47% zwischen den *PpADK*-Genen auf Nukleotid-Ebene sind Rekombinationsereignisse an den *PpADK2* und *PpADK3* Loci ebenfalls nicht zu erwarten. Schaefer (2001) beschreibt, dass Konstrukte, die cDNA enthalten, weniger effizient für die homologe Rekombination sind als Konstrukte, die gDNA enthalten. Zusätzlich beschreiben sie bei Genen, die auf Nukleotid-Ebene eine Homologie von 88-93% teilen, eine HR Wahrscheinlichkeit von 30%. Die optimale Fragment-größe wird mit 500-700 bp angegeben, was mit den Angaben von Kamisugi *et al.* (2005) vergleichbar ist.

Schaeffer *et al.* (1994) beschreiben stabile und instabile Transformanten. Zu den stabilen Transformanten werden solche gezählt, die nach mehreren Wechseln zwischen Minimalmedien mit und ohne Antibiotikum ihre Resistenz beibehalten. Genetische und molekulare Analysen dieser Transformanten zeigten, dass die Transgene durch Meiose weitergegeben wird und dass im Genom mehrere Kopien von Plasmid enthalten sein können.

Anhand des Resistenzverhaltens der erhaltenen *PpADK1*-Transformanten und ihrer generativen Nachkommen sowie der umfangreichen PCR-Analysen wird von einer erfolgreichen genomischen Integration des *pHP_Act1_PpADK1*-Konstruktes ausgegangen. Dies wird ebenfalls für *tADK1-1*, *tADK1-30*, *tADK1-32* angenommen, da auch diese stabil transformiert wurden, obwohl hier keine detaillierten PCR-Analysen durchgeführt wurden.

Verlust der Transgene über die generative Reproduktion

Obwohl alle *PpADK1*-Transformanten über die Zeit resistent gegenüber G418 waren, zeigen nur fünf von insgesamt acht generativen Tochterlinien Resistenz. Dies würde für einen Verlust der integrierten *PpADK1*-Kassette sprechen.

4.2.3 Metabolismus von ^3H -[9R]iP

Die Auswirkungen der Integration der *Act1_PpADK1_nos3T*-Kassette auf den Cytokininstoffwechsel wurden mittels Fütterungsexperimenten untersucht, wobei Tritium-markiertes iPR an *Protonema* appliziert wurde.

Durch HPLC-*online*-LSC-Analysen wurde anschließend die intrazelluläre Verteilung der Radioaktivität auf die iPRMP- und iPR-Fractionen gemessen, um auf eine mögliche Veränderung der ADK-Aktivität bei den Transformanten rückzuschließen.

Unerwarteterweise verhielten sich die Transformanten hierbei im Vergleich zum Wildtyp nicht einheitlich.

Im ersten Experiment (Abb. 4.1, links) zeigte tADK1-21 mit 24% der gesamten extrahierten Radioaktivität gegenüber dem Wildtyp (5%) deutlich mehr markiertes iPR.

In einem zweiten Experiment (Abb. 4.1, rechts) ergaben die HPLC-Analysen, dass die Transformanten tADK1-24 und tADK1-33 ebenfalls eine erhöhte Menge an Radioaktivität in der iPR-Fraktion aufweisen (22% bzw. 9%, im Vergleich zu 7% beim Wildtyp). Da iPR ein Substrat der ADK darstellt, deuten die gegenüber dem Wildtyp erhöhten relativen Gehalte an markiertem iPR auf eine Reduktion der ADK-Aktivität hin. Somit stellt sich die Frage, ob das Einbringen der *PpADK1* im Fall von tADK1-21, tADK1-24 und tADK1-33 zu *gene silencing* geführt hat.

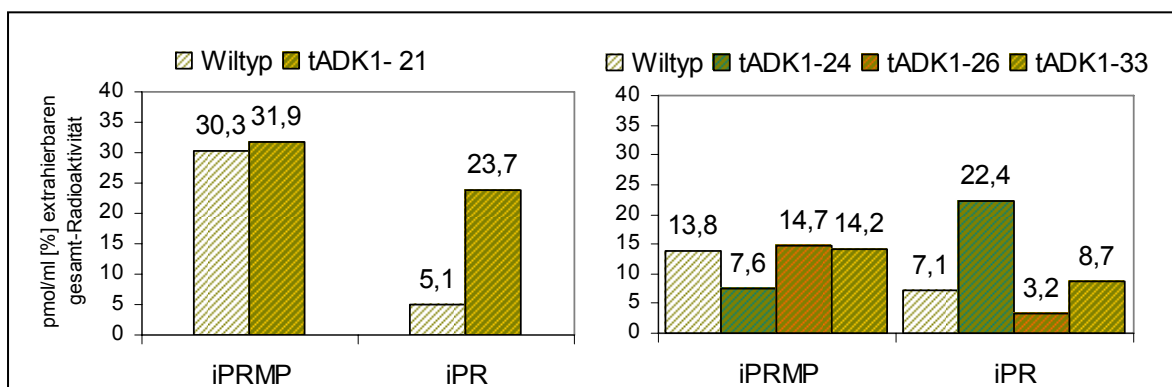


Abb. 4.1 Zusammenfassung der Daten aus Tab. 13. Darstellung der Verteilung von iPRMP und iPR nach der Fütterung mit radioaktivem ^3H -iPR. Links erste Analyse, Wildtyp und tADK1-21. Rechts zweite Analyse, Wildtyp, tADK1-24, tADK1-26 und tADK1-33.

Im Gegensatz zu den oben dargestellten Befunden zeigt tADK1-26 eine Reduktion von markiertem iPR bei gleichzeitig nur leicht erhöhtem iPRMP. Bei erhöhter ADK-Aktivität, wären deutlich erhöhte relative Gehalte an markiertem iPRMP erwartet worden.

Obschon bei den Transformanten Veränderungen bei der Verteilung der Radioaktivität gemessen wurden, kann auf der Grundlage der *in vivo* Markierungen nicht gefolgert

werden, dass die erwartete ADK-Überexpression eingetreten ist. Vielmehr kann bei tADK1-21, tADK1-24 und tADK1-33 sogar eine Aktivitätsminderung in Betracht gezogen werden.

Ebenfalls konnte bei Messungen der *in vitro* ADK-Aktivität mit ^3H -[9R]iP kein signifikanter Unterschied zwischen *PpADK1*-Transformanten und Wildtyp gemessen werden (nicht gezeigt), was mit den Ergebnissen der *in vivo*-Metabolismus-Studien für iP-Metaboliten übereinstimmt.

Es besteht Unklarheit darüber, warum im Falle von ADK - im Gegensatz zu CKX – trotz Verwendung desselben Promotors bislang keine eindeutige Überexpression erzielt werden konnte. Möglicherweise ist eine äußerst feine Regulierung der ADK-Aktivität entscheidend für die Regeneration von Protoplasten bzw. das Überleben von *Physcomitrella*, so dass nur solche Pflanzen selektiert wurden, die nur geringfügige Expressionsänderungen gegenüber dem Wildtyp aufweisen.

Da bei *Physcomitrella* größere Mengen an cZ-Verbindungen vorkommen (Tab. 14, Tab. 20), wäre es künftig sinnvoll, *in vivo*- und *in vitro*-Metabolismusstudien zu *PpADK1*-Transformanten mit markiertem cZR als Substrat vorzunehmen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringfügige Veränderungen bei der ADK-Aktivität sich stärker auf cZ- als auf iPR-Metabolite auswirken. Diese Vermutung wird durch die LC-MS basierten Messungen der endogenen Cytokinine gestützt (s. Abb. 4.2).

Die Frage, warum bei den *PpADK1*-Transformanten gegenüber dem Wildtyp stärkere Veränderungen bei den cZ-Formen als bei iP-Formen vorkommen, ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu klären. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei *Physcomitrella* wie bei Tabak Bright Yellow 2 (TBY-2, Laukens *et al.*, 2003) eine der drei *PpADK*-Isoformen Cytokinin-spezifisch sein kann und eine höhere Affinität zu cZR als zu anderen Cytokinin-Ribosiden zeigt.

4.2.4 Veränderungen des Profils endogener Cytokinine bei *PpADK1*-Transformanten

Ein Vergleich der Gehalte der verschiedenen Cytokinin-Familien (iP-, tZ-, cZ-, dHZ-Familie) und -Formen (Base, Riboside, Nukleotide, O-Glucoside) in Gewebe und

Medium (Tab. 14, Tab. 21), zeigt, dass bei den *PpADK1*-Transformanten genauso wie beim Wildtyp die *O*-Glucoside die am meisten akkumulierten Substanzen darstellen, wobei die Verteilung in Gewebe und Medium zwischen beiden Transformanten variiert. Während bei *tADK1-26* die *O*-Glucosid Akkumulation im Gewebe vorkommt, werden diese Metabolite bei *tADK1-21* im Medium akkumuliert. *tADK1-26* zeigt im Vergleich zum Wildtyp im gesamten Kulturverlauf (pmol/50 ml) eine bis 5,4%ige Erhöhung der *O*-Glucosidmenge (Tag 4), *tADK1-21* zeigt eine bis 3,9%ige Erhöhung (Tag 0).

Im Gewebe zeigen beide Transformanten im Gegensatz zum Wildtyp eine Reduktion der Gesamt-Gehalte an Cytokinin-Nukleotiden und -Ribosiden. Bei den Basen hingegen liegen erhöhte Mengen vor (vgl. Tab. 21).

Tab. 21 Zusammenfassender Vergleich der Gesamt-Menge von Cytokinin-Basen, Ribosiden, Nukleotiden sowie *O*-Glucosiden (*O*-Gluc) beim Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten an drei Tagen (T0, T4 und T8). Daten in pmol/Kultur (50 ml). Die Ausgangsdaten sind in Abb.3.13 und Abb.3.14 graphisch präsentiert. Fett: Zunahme der Cytokinine bei den *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Rot: Abnahme der Cytokinine bei den *PpADK1*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. n.B. nicht bestimmt.

Name	Gewebe				Tag	Medium			
	Basen	Ribosiden	Nukleotiden	<i>O</i> -Gluc		Basen	Ribosiden	Nukleotiden	<i>O</i> -Gluc
Wildtyp	2,2	1,3	9,7	60	0	1,6	2,8	n.B.	3,2
	0,3	2,2	25,5	67	4	1,6	2,1	n.B.	5,8
	0,8	2,3	14,4	121	8	2,3	2,2	n.B.	6,0
<i>tADK1-21</i>	4,7	0,7	3,1	30	0	1,9	1,1	n.B.	12,5
	2,0	0,5	3,4	87	4	2,5	3,1	n.B.	12,2
	6,6	0,4	2,6	117	8	4,0	3,2	n.B.	18,0
<i>tADK1-26</i>	7,2	1,0	7,4	195	0	0,8	0,2	n.B.	3,1
	6,2	0,5	3,0	386	4	1,6	0,3	n.B.	7,0
	1,6	0,7	2,8	310	8	1,0	0,3	n.B.	8,3

Dynamik der Cytokinine bei den PpADK1-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp

Trotz der Uneinheitlichkeit der *in vivo* ADK-Messungen (s. Abb. 4.1) können aus den LC-MS Messungen Beteiligungen von *PpADK1* am Cytokinin-Metabolismus abgeleitet werden (Abb. 4.2). Bei den *PpADK1*-Transformanten konnte eine deutliche Reduktion von *cZRMP* und *cZR* sowie eine Akkumulation von *tZROG* sowie *cZROG* (Gewebe und Medium), nachgewiesen werden. Auch der Gehalt an *iP* ist bei beiden Transformanten sowohl intra- als auch extrazellulär angestiegen.

Obwohl sich aus den Ergebnissen der Verteilung der endogenen Cytokinine ein ähnliches Modell erstellen lässt und bei beiden Transformanten eine Akkumulation der *cZ-O*-Glucoside nachzuweisen ist, ist es interessant, dass der Gesamt Cytokinin-Gehalt

beider Transformanten stark abweicht (Tab. 14). Bei tADK1-26 wurden mit 325 pmol/Kultur eine doppelt so große Cytokinin-Menge im Vergleich zum Wildtyp gemessen (149 pmol/Kultur, T8). Bei tADK1-21 hingegen ist die Gesamtmenge an Cytokinin am selben Tag (152 pmol/Kultur) der des Wildtyps ähnlich.

Dieser Unterschied könnte einen Hinweis auf die Beteiligung zweier unterschiedlicher Cytokinin-Inaktivierungsmechanismen bei den jeweiligen Transformanten sein. Während im Fall von tADK1-26 die Inaktivierung der cZ-Formen durch die Bildung von O-Glykosilierung bevorzugt wird, könnte es sein, dass im Fall von tADK1-21 eher die Inaktivierung durch CKX bevorzugt wird.

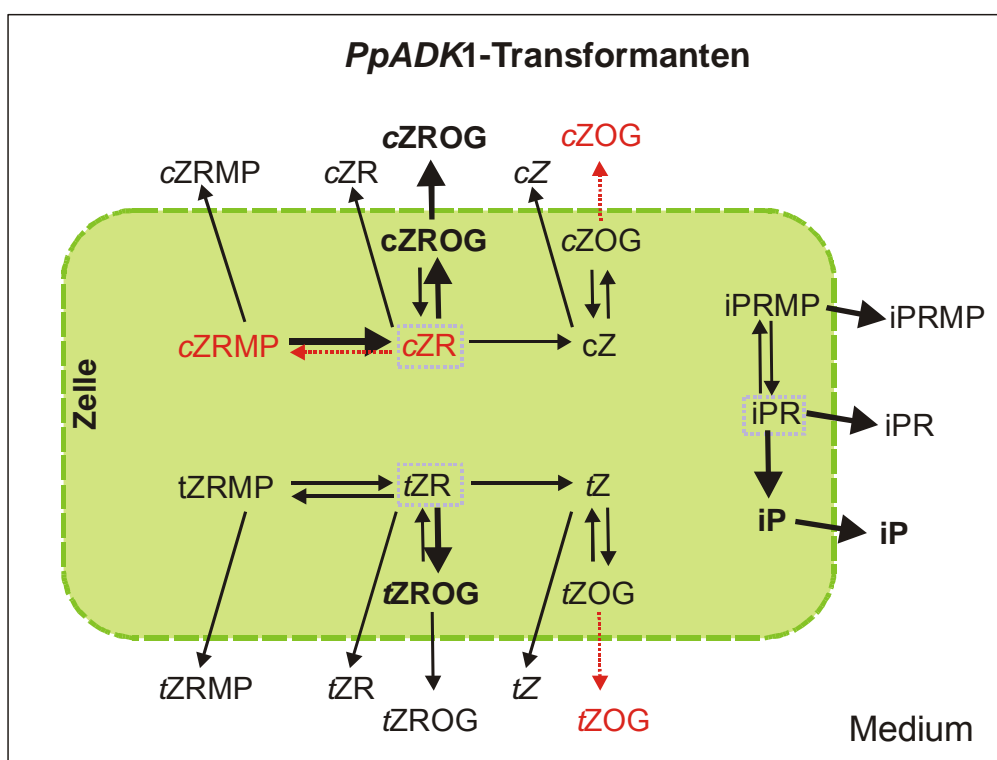


Abb. 4.2 Zusammenfassende Darstellung der Hauptmetabolite und Konversionswege bei den *PpADK1*-Transformanten, tADK1-21 und tADK1-26 im Vergleich zum Wildtyp. In Rot sind die Metaboliten und Wege markiert, die weniger präsent sind als beim Wildtyp. Fett markierte Metabolite deuten auf eine Akkumulation dieser Metabolite hin. Fett markierte Pfeile deuten auf möglicherweise erhöhte Konversionswege bei den Transformanten hin. Metabolite und Pfeile in normaler Schrift bedeuten entweder, dass bei den Transformanten dasselbe Verhältnis wie beim Wildtyp besteht oder dass die Transformanten keine einstimmige Tendenz zeigen. Blaue Rahmen: Durch ADK-degradierbare Substrate. Die Daten sind aus Abb. 3.13 und Abb. 3.14 entnommen.

Die Expression von Genen, die für Cytokinin-Biosynthese und -Homöostase von Bedeutung sind, wie *iPT*, *CKX* oder *CYP735A*, wird unter anderem durch die gegenseitige hormonelle Interaktion von Cytokinin, IAA und ABA beeinflusst (Sakakibara 2006). Brugière *et al.* (2003) haben bei *Zea mays* für das *CKX1*-Gen gezeigt, dass dieses Enzym durch ABA induziert wird. Dies ist insoweit interessant, da

tADK1-21, eine dem Wildtyp ähnliche Gesamt-Cytokininmenge hat, eine sehr viel höhere Konzentration an ABA besitzt mit einem Maximum von 371 pmol/100 ml gegenüber 1,6 pmol/100 ml beim Wildtyp. tADK1-26 zeigt dagegen mit 14,9 pmol/100 ml (maximaler Wert) eine viel geringere Steigerung dieses Hormons.

Wenn bei *Physcomitrella* - wie bei Mais - ABA einen direkten Einfluss auf die CKX haben sollte, könnte dies den Unterschied an O-Glucosiden erklären. Daher wäre es interessant, einen Enzym-Assay durchzuführen, bei dem die CKX-Aktivität bei beiden Transformanten verglichen wird.

4.2.5 Phänotypische Beobachtungen bei den *PpADK1*-Transformanten

Bei den *PpADK1*-Transformanten, tADK1-1, tADK1-21, tADK1-24, tADK1-26, tADK1-30, tADK1-31, tADK1-32, tADK1-33 konnte mittels Flowzytometrie festgestellt werden, dass nach der Transformation mit der PEG-Methode keine Veränderung in der Ploidie der Transformanten aufgetreten ist (s. Abb. 3.7). Diese Untersuchung ist bedeutsam, da transformationsbedingte Erhöhungen des Ploidie-Grads (Schween *et al.*, 2005) Auswirkungen auf den Phänotyp haben können.

Es kann angenommen werden, dass die beobachteten phänotypischen Effekte, wie verlängerte Rhizoide, verfrühte Vergilbung der Phylloide, mittelständige Rhizoide am Cauloid, sowie partielle oder totale Reduktion der Bildung von Sporophyten eine Folge der Integration der homologen *PpADK1* darstellen. Dennoch ist es schwierig, eine Korrelation zwischen phänotypischen Veränderungen und den gemessenen Verschiebungen der hormonellen Profile herzustellen.

Bei der Alge *Macrocystis pyrifera* (Nys *et al.*, 1990) und bei *Phaseolus vulgaris* (Palmer *et al.*, 1981 und Kaminek *et al.*, 1997) wurden Seneszenz-Prozesse als Folge einer Akkumulation von O-Glucosiden festgestellt. Bei *Physcomitrella*, wie bei der Alge *Cerradoeriella virgata* (Stirk *et al.*, 2003), sind die O-Glucoside, cZROG bzw. c- und tZOG, die meistakkumulierten Z-Formen. Ob die angestiegene Akkumulation von cZROG sowie die einhergehende Absenkung von cZR und cZRMP (vgl. Abb. 3.13, Abb. 4.14) bei den *Physcomitrella PpADK1*-Transformanten kausal mit der beobachteten früheren Vergilbung (vgl. Abb. 3.10) zusammenhängt, ist ungewiss. Es kann in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden, dass die phänotypischen Veränderungen durch einen veränderten Adenosinstoffwechsel ohne Beteiligung von Cytokinin entstehen.

Lexa *et al.*, (2003) haben die Dynamik der endogenen Cytokinin Konzentrationen nach Wachstum von Tabak-Sämlingen auf Medium mit jeweils iP, Z bzw. dHZ gemessen. Sie beschrieben eine Veränderung der Länge der Wurzel, die durch die Reduktion der Zeatin-Formen im Vergleich zu den iP-Formen zustande kommt. Dies wurde dadurch erklärt, dass die Z-Formen das Wachstum der Wurzel stärker als iP-Cytokinine inhibieren. Da bei den *PpADK1*-Transformanten eine drastische Senkung des Verhältnisses von iP- zu cZ-Formen vorliegt (s. Abb. 4.2), wäre es künftig interessant zu prüfen, ob bei *Physcomitrella* cZ das Wachstum von Rhizoiden inhibiert. Hierbei wird vermutet, dass das Wachstum von Rhizoiden und Wurzeln durch vergleichbare Mechanismen gesteuert werden könnte (Sakakibara *et al.*, 2003; Menand *et al.*, 2007). Menand und Kollegen (2007) haben bei *Physcomitrella* das Vorkommen von zwei Genen charakterisiert, *PpRSL1* und *PpRSL2*, die das Wachstum von Caulonema und Rhizoiden positiv steuern.

Ashton *et al.* (1979) sowie Sakakibara *et al.* (2003) beschreiben, dass die Bildung von basalen Rhizoiden an *Physcomitrella* Gametophoren durch die externe Zugabe von Auxin (IAA) induziert wird. Dieser Effekt wurde auch bei anderen Moos-Arten wie *Funaria hygrometrica* (Bopp 1953) und *Tortella caespitosa* (Gorton und Eakin, 1957) beobachtet. Dagegen wird für die Bildung von mittelständigen Rhizoiden entlang des ganzen Cauloids nicht nur externes IAA benötigt, sondern ebenfalls ein noch unbekannter Faktor (Sakakibara *et al.*, 2003).

Die *PpADK1*-Transformanten tADK1-21 und tADK1-26 zeigen eine sehr ausgeprägte Bildung von mittelständigen Rhizoiden und weisen im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügige Veränderungen beim Cytokininstatus auf. Da bei beiden Transformanten die Niveaus von IAA sowohl im Gewebe mit 9,1 bzw. 12,3 pmol/Kultur als auch im Medium mit 1 bzw. 0,4 pmol/Kultur niedriger als beim Wildtyp (51,9 bzw. 7,4 pmol/Kultur) liegen, können die vermehrten mittelständigen Rhizoide nicht durch IAA-Wirkung erklärt werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das Einbringen des homologen *PpADK1*-Gens keine große Veränderung auf die Verteilung der iP-Metabolite bewirkt, wohl aber auf diejenige der cZ. Hierbei konnte eine Reduktion von cZRMP und cZR, sowie eine Akkumulierung von cZROG festgestellt werden. Es bleibt zu prüfen, ob die in den *PpADK1*-Transformanten beobachtete verstärkte Bildung mittelständiger Rhizoide sowie verlängerte Rhizoide kausal mit diesen Verschiebungen der cZ-Cytokinine

verknüpft sind. Die Charakterisierung der zwei weiteren Gene, *PpADK2* und *PpADK3*, sollte bei zukünftigen Untersuchungen weitere Informationen zur ADK-vermittelten Regulation des Cytokininhaushaltes liefern.

4.3 Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX)

In diesem dritten Teil der Arbeit werden die Ergebnisse bioinformatischer Untersuchungen zum Vorkommen von *PpCKX*-Genen diskutiert. Weiterhin wird über eine Reduktion des Cytokinin-Gehalts mittels Überexpression von CKX-Aktivität berichtet. In anderen Pflanzen wie *Arabidopsis*, Tabak, oder Gerste wurde das sogenannte *cytokinin-deficiency-syndrom* beschrieben (Werner *et al.*, 2001, 2003), wobei durch den Mangel an aktiven Cytokinin u.a. eine negative Regulation von Cytokinin auf Wurzel-Wachstum sowie eine positive Wachstumsregulation im Sprossbereich deutlich wurde. Bei Bryophyten liegen bislang keine Informationen über die Auswirkung von Cytokinin-Defizienz vor.

4.3.1 Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase Gene in *Physcomitrella*

Bei *Physcomitrella* waren bis jetzt keine *CKX*-Gene bekannt. Nach einer BLAST Untersuchung wurden über den JGI-Server sechs mögliche *PpCKX*-Gene gefunden, wobei durch manuelle Edition fehlende Sequenzen mit Hilfe des Cosmoss Programms ergänzt wurden. Für alle sechs *PpCKX*-Gene konnten in den *Physcomitrella* Datenbanken EST-Einträge gefunden werden, sodass davon auszugehen ist, dass alle sechs Gene exprimiert werden.

Durch Alignments mit Sequenzen anderer Organismen konnten bei allen *Physcomitrella* *CKXs* die fünf, für *CKX*-Proteine typischen Motive, gefunden werden (Schmülling *et al.*, 2003; Popelkova *et al.*, 2004). Anhand des GHS-Motivs, das für die kovalente Bindung des FAD-Kofaktors an Histidin über eine 8-alpha-(N^3 -histidyl)-Riboflavin-Bindung wichtig ist, können die *Physcomitrella* *CKXs* in zwei Gruppen eingeordnet werden. Während in *PpCKX3*, *PpCKX4*, *PpCKX5* und *PpCKX6* das GHS-Motiv unverändert vorhanden ist, zeigen *PpCKX1* und *PpCKX2* mit GSS ein verändertes Motiv (vgl. Abb. 3.17). Schmülling *et al.* (2003) berichten, dass in den von ihnen untersuchten *CKX*-Sequenzen

das GHS-Motiv sehr konserviert ist. Abwandlungen dieses Motivs kommen z.B. bei der CKX des Cyanobacteriums *Nostoc* vor, welches ein GYT-Motiv hat. Auch andere Organismen wie *Stigmatella* (SHS-Motiv, Acc. No. ZP_01464779), *Legionella* (GLS-Motiv, Acc. No. YP_094928), *Nocardioides* (GHN-Motiv, Acc. No. YP_919354), *Hordeum* (GSV-Motiv, Acc. No. AAN16383) und *Medicago* (AHS-Motiv, Acc. No. ABN_05767) zeigen an dieser betreffenden Position ein abweichendes Motiv (Vergleich nicht gezeigt). Über das Pfam-Programm (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) wurden sowohl bei *Nostoc*, bei beiden *Physcomitrella* CKXs (*PpCKX1* und *PpCKX2*) als auch bei den *AtCKXs* dieselbe FAD-Bindung_4 (PF01565) identifiziert. In der Arbeit von Fraaije *et al.* (2000) wird beschrieben, dass die Flavinylierung der Oxidorreduktase Vanillyl-Alcohol-Oxidase nach einer Mutation von His-61 zu Threonin (Thr) die Affinität des Enzyms zu FAD ändert und zu einer nicht-kovalenten Bindung zwischen Protein und Kofaktor führt. Innerhalb der FAD-Oxidorreduktase-Familie gibt es auch Proteine, die den Kofaktor durch eine nicht-kovalente Bindung binden. Da FAD-Moleküle nur durch Histidin (His), Cystein (Cys) oder Tyrosin (Tyr) an das Apoprotein kovalent binden können (Decker, 1993), ist daher nicht auszuschließen, dass den Austausch von Histidin gegen Serin (S) zu einer veränderten Kofaktor-Bindung bei *PpCKX1* und *PpCKX2* führt.

Putative Lokalisierung der PpCKXs sowie Beeinflussung der CKX-Aktivität durch andere Enzyme

Die Lokalisierung der CKX-Proteine übt einen Einfluss auf die Wirkungsweise gegenüber Substrat und Elektronenakzeptor aus (Frébortová *et al.*, 2004). Eine Vorhersage der Lokalisierung der *PpCKXs* wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Programmen durchgeführt (vgl. Tab. 15). Nach allen drei Methoden konnte übereinstimmend für *PpCKX2* eine Lokalisierung im Chloroplast vorhergesagt werden. Dies stellt einen interessanten Befund dar, da das Genprodukt des Cytokinin-Biosynthesegens *PpITP1* möglicherweise ebenfalls im Chloroplast lokalisiert ist (Yevdakova und Schwarzenberg, 2007). Beide Enzyme spielen eventuell bei der Homöostase von Cytokininen in den Chloroplasten eine Rolle, was wichtig für die Kontrolle von bestimmten Chloroplasten-Funktionen sein könnte. In Chloroplasten haben bereits Benkova *et al.* (1999) bei Tabak und Weizen ein breites Spektrum von Cytokininen (Z-, iP-, dHZ-Nukleotide, -Riboside, -Base sowie N- und O-Glucoside) sowie CKX-Aktivität festgestellt.

Frébortová *et al.* (2004) haben für *ZmCKX1* vorgeschlagen, dass die Elektronenakzeptoren der CKX-Reaktion Komponenten wie *p*-Chinone sein können, welche wie später Galuszka *et al.* (2005) vermuteten, nach der Modifizierung durch verschiedene Oxidasen, wie u.a. Polyphenol-Oxidase, aus Phenolen generiert werden könnten. In *Physcomitrella* wurde intra- und extrazelluläre PPO-Aktivität gemessen (Richter, 2009). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der PPO- und CKX-Aktivität wurde auch von Richter (2009) vermutet, da eine *PpPPO1*-vermittelte Senkung der extrazellulären PPO-Aktivität mit einer Reduktion des iP-Abbaus korrelierte.

Weitere Experimente sollten den möglichen Zusammenhang zwischen CKX-Aktivität und deren Beeinflussung durch andere Enzyme aufklären.

4.3.2 Phylogenetische Analyse der *PpCKXs*

Neben der Identifizierung und Charakterisierung der *PpCKX*-Multigenfamilie wurden sowohl die Aminosäuresequenzen als auch die Intron-Exon-Verteilungen (Organisation) phylogenetischen Vergleichen mit 39 *CKX*-Genen (s. Tab. 24) unterzogen. Hierbei wurde festgestellt, dass die *CKX*-Gene aus *Physcomitrella* die höchste Homologie zu Sequenzen aus *Selaginella* und Samenpflanzen besitzen.

Die *Physcomitrella* *CKX*-Proteine weisen, im Vergleich zur *Arabidopsis* *CKX*-Multigenfamilie (34-99% Identität), mit einer 45-80%igen Identität zueinander eine kleinere Divergenz auf (vgl. Tab. 24). Während alle *PpCKXs* in zwei nah verwandten Clustern im Stammbaum gruppiert sind, sind die *AtCKXs* auf vier Clustern verteilt, wobei die *AtCKX*-Gene mehr Identität zu anderen pflanzlichen *CKX* zeigen (vgl. Abb. 3.18).

Intron-Exon-Verteilung innerhalb der verschiedenen CKX-Gene

Bilyeu *et al.* (2001) haben genomische Vergleiche zwischen *ZmCKX1* und allen *Arabidopsis* *CKX*-Genen (*AtCKX1* - 7) durchgeführt. Schmülling *et al.* (2003) beschreiben phylogenetische Vergleiche mit zusätzlichen eukaryotischen- und prokaryotischen-Sequenzen. Die von beiden Arbeitsgruppen verglichenen genomischen Loci umfassen Gene, die zwei bis vier Introns besitzen (Abb. 4.3, innere Kasten). Phylogenetisch sind die *PpCKX* auf AS-Ebene in zwei Gruppen unterteilt. Diese Gruppierung entspricht in etwa der Verteilung der Intron-Exon-Muster. In der ersten Gruppe enthalten die genomischen Sequenzen 2 (*PpCKX1* - 2) bis 4 (*PpCKX3*) Introns. Diese Intron-Exon-Verteilung kommt bereits bei Samenpflanzen vor. In der zweiten

Gruppe besitzen alle Gene 5 Introns (*PpCKX4*, -5 und -6). Dies repräsentiert, zusammen mit *SmCKX2* - 3, die größte Intron-Anzahl der bis jetzt bekannten CKX-Sequenzen (Abb. 4.3).

Die Länge der Exons 2, 5 und 6 bei *PpCKX4*, *PpCKX5* und *PpCKX6* entsprechen der Länge der Exons 2, 4 und 5 bei *PpCKX3*. Die Summe (bp) der Exons 3 und 4 bei *PpCKX4*, *PpCKX5* und *PpCKX6* entspricht der Größe von Exon 3 bei *PpCKX3*. Somit könnte bei *PpCKX4*, *PpCKX5* und *PpCKX6* das zusätzliche Intron durch Teilung von Exon 3 (bei *PpCKX3*) entstanden sein.

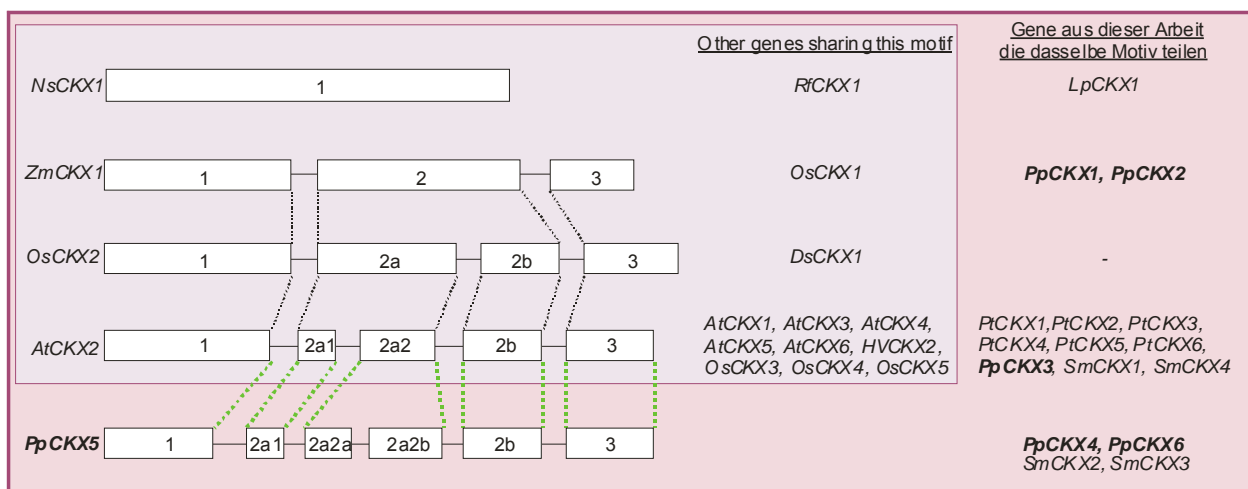


Abb. 4.3 Intron-Exon-Verteilung von CKX-Genen, die eine bekannte genomische Sequenz besitzen, nach Schmölling *et al.* (2003, innerer Kasten). Angaben, die in dieser Arbeit verglichenen Sequenzen sind im äußeren Kasten aufgelistet. Eine neue Intron-Exon-Verteilung mit fünf Introns wurde bei *Physcomitrella* (*PpCKX4* - 6) und *Selaginella* (*SmCKX2* und 3) festgestellt. Die Größe der Introns und Exons ist nicht maßstabsgetreu.

Interessanterweise, ist die genomische Organisation innerhalb der verschiedenen Multigen-Familien bei den hier dargestellten Samenpflanzen sehr konserviert (*AtCKX*- und *PtCKX*-Gene enthalten 4 Introns). Dagegen weisen die CKX-Gene der ursprünglicheren Landpflanze *Physcomitrella* mit 2 bzw. 4 bis 5 Introns eine sehr große Vielfalt auf. Diese Heterogenität steht möglicherweise in Zusammenhang mit der ursprünglichen Kolonisierung und Adaptation dieser Pflanzen an Land-Habitate.

Vorkommen der CKX erfolgte nach der Eroberung des Landes

Die Suche nach CKX-Genen in genomischen Datenbanken der Algen-Arten *Volvox carteri*, *Ostreococcus lucimarinus* und *Chlamydomonas reinhardtii* brachte kein Ergebnis. Rensing *et al.* (2008) haben in Vergleichen von *Physcomitrella* mit anderen Pflanzenarten (u.a. Algen) festgestellt, dass *Physcomitrella* nicht nur eine höhere Komplexität von Gen-Familien als Adaptation an das neue Habitat besitzt, sondern auch

eine höhere Komplexität von Genen mit möglicher Beteiligung an hormoneller Regulation - einschließlich Cytokinin. Heyl und Schmülling (2003) beschreiben in ihrem Review Rezeptorgene (CRE1/AHK4, AHK2 und AHK3) sowie andere Proteine (AHPs, B-/A-type ARR) die beim Cytokinin-Signals-Transduktionsweg beteiligt sind. Viele dieser Gene, die bei Samenpflanzen vorkommen, wurden ebenfalls bei *Physcomitrella* gefunden, jedoch nicht bei Algen. Die Tatsache, dass weder bei *Volvox*, *Ostreococcus* noch bei *Chlamydomonas* CKX-Gene gefunden werden konnten, kennzeichnet *Physcomitrella* als Beispiel für eine frühe Landpflanze, die bereits eine große Divergenz und Komplexität an CKX-Genen besitzt.

4.3.3 CKX Überexpression: Veränderung der CKX-Aktivität

Um eine Reduktion der aktiven Cytokinine bei *Physcomitrella* zu erreichen, wurde ein Überexpressionsvektor erstellt, bei dem das *AtCKX2*-Gen (Acc. No. AC005917, Werner *et al.*, 2001) unter der Kontrolle des Actin1-Promotors stand (vgl. Abb. 3.19, Abb. 3.20).

Die Transformation von *Physcomitrella*-Protoplasten mit dem Überexpressionsvektor pHP_Act1_AtCKX2 erwies sich als schwierig. Nach mehreren Transformationen wurden nur zwei stabile Transformanten (tCKX7 und tCKX16) isoliert. Die Transformationsrate, bezogen auf die DNA-Menge, betrug 0,06% pro µg; ein Wert, der an der unteren Grenze der von Schaefer *et al.* (1994) beschriebenen Rate liegt. Da beide tCKX-Transformanten im Vergleich zu Cytokinin-defizienten-Mutanten von Samenpflanzen (Werner *et al.*, 2001, 2003, 2008; Yang *et al.* 2003; Kopečný *et al.* 2006) eine geringe Reduktion des Gesamt-Cytokinin-Gehaltes aufwiesen, könnte es sein, dass sich eine starke Reduktion der endogenen Cytokinine bei *Physcomitrella* letal auswirkt und daher nur eine geringe Anzahl an Transformanten zu erreichen ist.

Das in dieser Arbeit verwendete *AtCKX2*-Gen gehört zu den 5 *Arabidopsis* CKX-Proteinen, die sekretiert werden (vgl. Werner *et al.*, 2001). Bereits durch die Integration vermutlich einer einzigen Kopie (tCKX7, vgl. 3.3.2.4.2) kann eine deutliche Steigerung der CKX-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp erzielt werden. Die Stärke der veränderten CKX-Aktivität variiert leicht zwischen beiden Transformanten. Bei beiden Transformanten wurde im Vergleich zum Wildtyp der größte Anstieg der CKX-Aktivität im Medium festgestellt mit Steigerungsraten bis ca. 220-fach (tCKX16) (vgl. Tab. 18,

Schwartzenberg *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass man eine so hohe CKX-Aktivität im Medium findet, ist ein Beweis dafür, dass bei *Physcomitrella* der Mechanismus für die Signalpeptid-vermittelte Sekretion auch beim heterologen AtCKX2 Protein funktioniert.

4.3.4 Verteilung der endogenen Cytokinine bei den tCKX-Transformanten

Die Veränderung der CKX-Aktivität bei den tCKX-Transformanten führte zu einer Abweichung in der Verteilung von Cytokinin im Vergleich zum Wildtyp. Quantitativ konnten solche Unterschiede mittels LC-MS erfasst werden. Zusammenfassend werden die Gehalte an Cytokinin-Formen (Base, Riboside, Nukleotide, O-Glucoside) sowie Cytokinin-Familien (iP-, tZ-, cZ-, dHZ-, BA-, o-Topolin-Familie), berechnet als pmol/Kultur in Tab. 22 bzw. Tab. 20 wiedergegeben:

Die Verteilung der verschiedenen Cytokinin-Familien bei den tCKX-Transformanten variiert in Gewebe und Medium im Vergleich zum Wildtyp. Während iP-, tZ- und cZ-Familien im Gewebe und Medium nachzuweisen waren, konnten die dHZ-, BA- sowie die T-Familie nur im Gewebe gefunden werden. Bei diesen drei Familien ist keine deutliche quantitative Abweichung im Vergleich zum Wildtyp festzustellen. Anhand des in Tab. 20 dargestellten Anteils der verschiedenen Cytokinin-Familien sind im Gewebe genauso wie beim Wildtyp die cZ-Formen, gefolgt von iP-Formen, die am häufigsten vorkommenden Cytokinine. Mit einem Anteil von 85% bzw. 62% (tCKX7 bzw. tCKX16) der gesamten Cytokinine im Medium sind die iP-Formen die dominierende Familie (vgl. Tab. 20).

Tab. 22 Zusammenfassende Darstellung der intra- und extrazellulären Verteilung der Gesamtmengen an Cytokinin-Basen, -Ribosiden, -Nukleotiden und O-Glucosiden (O-Gluc) im *Physcomitrella* Wildtyp und den tCKX-Transformanten an T0, T10 und T20. Die Daten sind in pmol/Kultur (200 ml) angegeben. Die Ausgangsdaten sind in Abb.3.29 und Abb.3.30 graphisch präsentiert. Fett: Zunahme der Cytokinine bei den tCKX-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Rot: Abnahme der Cytokinine bei den tCKX-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp.

Name	Gewebe				Tag	Medium			
	Basen	Ribosiden	Nukleotiden	O-Gluc		Basen	Ribosiden	Nukleotiden	O-Gluc
Wildtyp	1,2	1,2	11,9	22,2	0	1,26	0,05	0,5	0,12
	1,4	2,1	17,1	41,1	10	22,0	6,90	21,2	1,76
	3,1	1,8	9,0	44,5	20	9,07	7,06	32,3	1,71
tCKX7	1,3	2,7	15,2	27,3	0	7,80	0,17	0,4	0,30
	0,9	3,4	19,3	56,7	10	0,63	0,59	15,9	1,23
	2,9	2,5	13,6	39,5	20	0,66	1,53	24,0	1,88
tCKX16	0,8	1,8	11,5	17,0	0	0,42	0,06	0,2	0,11
	1,0	4,4	12,7	40,8	10	1,12	1,29	10,8	2,13
	1,3	2,9	8,2	30,6	20	1,36	3,86	21,2	4,20

Bezüglich der Cytokinin-Formen sind die O-Glucoside im Gewebe bei den tCKX-Transformanten - ebenso wie beim Wildtyp - die am meisten akkumulierten Metabolite, während im Medium die Nukleotide vorherrschen. Im Gewebe ist eine Steigerung der Gesamt-Riboside von einer Absenkung der Basen begleitet. Im Medium allerdings treten sowohl die Basen, Riboside als auch die Nukleotide in niedrigeren Mengen auf (wobei die Nukleotide nur geringfügig abnehmen). In *Arabidopsis* wurde ein Abbau des Nukleotids iPRMP durch die *AtCKX2* festgestellt, wobei dieses Enzym iPRMP mit einer niedrigeren Rate als iP umsetzte (Galuszka *et al.*, 2007). Daraus lässt sich folgern, dass die bei den *Physcomitrella* Transformanten sekretierte *AtCKX2* nicht nur für den Abbau der iP und iPR Metabolite verantwortlich ist, sondern möglicherweise auch zum Abbau der iP-Nukleotide beiträgt.

Cytokinin-Defizienz bei Physcomitrella und anderen Pflanzen

Als Folge der Überexpression des *AtCKX2*-Genes in *Physcomitrella* ist eine Senkung der Gesamt-Cytokinine im Vergleich zum Wildtyp nachzuweisen. Allerdings variierte die Stärke der Defizienz zwischen beiden Transformanten. tCKX16 zeigt mit 74 pmol/Kultur (68%) gegenüber 108 pmol/Kultur (100%) beim Wildtyp eine stärkere Cytokinin-Defizienz als tCKX7, wobei 86 pmol/Kultur 80% der Gesamt-Cytokinine beim Wildtyp entsprechen. Diese Veränderung ist eine Folge der leichten Senkung der *tZ*-Familie im Gewebe, sowie der Halbierung der gesamten iP- und *tZ*-Formen im Medium (vgl. Tab. 20), was auch mit der maximalen CKX-Aktivität bei den *AtCKX*-Transformanten im Medium korreliert.

Cytokinin-defiziente Pflanzen von *Arabidopsis* enthalten zwischen 31-63% bzw. 10-70% der Wildtyp Gesamt-Cytokinin-Menge (Werner *et al.*, 2001 bzw. Kopečný *et al.*, 2006) und bei Orchidee wurde zwischen 30-55% der Gesamtmenge an Cytokinen beim Wildtyp bei Cytokinin-Mangel-Pflanzen gemessen (Yang *et al.*, 2003). Die Reduktion der Gesamt-Cytokinine in *Physcomitrella* ist im Vergleich zu den anderen CKX-überexprimierenden Pflanzen somit deutlich geringer.

Dynamik der Cytokinin-Konzentrationen bei den Physcomitrella tCKX-Transformanten

Die Überexpression von *AtCKX2* zeigt bei den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp eine Verschiebung beim Vorkommen der Isoprenoid-Cytokinin Familien *cZ*, *tZ* und iP (Abb. 4.4). Durch die Überexpression des *AtCKX2*-Gens ist ein stärkerer Abbau der Basen und Riboside sowie iPRMP (Galuszka *et al.*, 2005) zu erwarten. Diese

Reduktion zeigt sich im Medium stärker als im Gewebe. Dieser Befund ist mit der vielfach angestiegenen CKX-Aktivität im Medium vereinbar (vgl. Tab. 18).

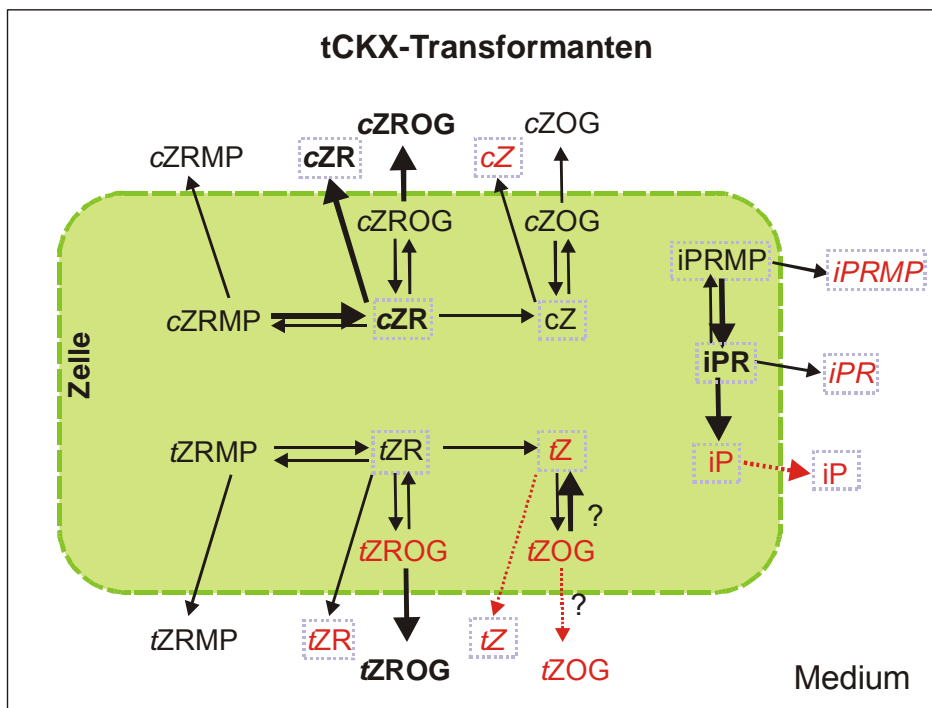


Abb. 4.4 Vereinfachtes Schema zu den Veränderungen der Cytokinin-Gehalte bei den tCKX-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Fett markiert: Metabolite, die bei den tCKX-Transformanten in höherer Konzentration als beim Wildtyp vorkommen, sowie Wege, die möglicherweise aktiviert sind. Rot markiert: Metabolite, die bei den tCKX-Transformanten in geringerer Menge als beim Wildtyp vorkommen, sowie Wege, die möglicherweise reduziert sind. Blaue Rahmen: Durch CKX-degradierbare Substrate. Die Daten sind aus Abb. 3.29 und Abb. 3.30 entnommen.

Im Gewebe sind nur die Basen *tZ* und *iP* reduziert. Im Medium unterliegen alle Basen (*iP*, *cZ*, *tZ*) sowie die Riboside *iPR* und *cZR* einer Reduktion. Obwohl bei Tabakpflanzen, die das *AtCKX2* überexprimieren, das Enzym eine ähnliche Affinität für *iP*- und *Z*-Formen zeigte (Galuszka *et al.*, 2007), war bei *Physcomitrella* die Senkung der *iP*-Formen stärker ausgeprägt als die der *Z*-Formen. Jedoch ist bei den *AtCKX2*-überexprimierenden Pflanzen sowohl von *Physcomitrella* als auch von Tabak eine höhere Affinität zur Base im Vergleich zum entsprechenden Ribosid nachzuweisen, was sich hier mit einem stärkeren Abbau von *iP* im Vergleich zu *iPR* widerspiegelt (vgl. Abb. 3.30).

Obwohl das Ribosid *cZR* und die Base *cZ* Substrate der CKX sind, wurde unerwartet eine Steigerung von *cZR* sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen. Im Medium waren jeweils auch die *cZROG* und *tZROG*-Gehalte angestiegen. Ein Grund für das unterschiedliche Verhalten der *cZ*-Formen im Vergleich zu den *tZ*- und *iP*-Formen

könnte in der Steigerung der Expression des *PpIPT1*-Gens liegen, die für tCKX7 nachgewiesen wurde (Yevdakova *et al.*, 2008). Die *PpIPT1* Expressionssteigerung kann als biosynthetische Gegenreaktion auf die Cytokinin-Defizienz interpretiert werden, woraus überwiegend cZ-Verbindungen resultieren. Sollte die Akkumulation von cZR und cZROG die Folge einer aktivierten Biosynthese sein, stellt sich die Frage, ob die Akkumulierung von tZOG auf *cis-trans* Isomerisierungen (cZ- zu tZ-Formen) zurückzuführen ist.

Anders als bei Tabak, wo heterolog exprimierte *AtCKX2* im Gegensatz zu *ZmCKX1* und *HvCKX1* (Bilyeu *et al.*, 2001; Galuszka *et al.*, 2004) nicht in der Lage ist, cZ zu degradieren (Galuszka *et al.*, 2007), scheint *AtCKX2*-Expression bei *Physcomitrella* zu einem Abbau von cZ zu führen, was sich aus der extrazellulären Reduktion dieses Metaboliten ableiten lässt.

Man kann schlussfolgern, dass überexprimierte *AtCKX2* eine Reduktion des Gesamt-Cytokinin-Gehaltes bewirkt. Die Erhöhung der Transkription der *PpIPT1* in *AtCKX2*-überexprimierenden *Physcomitrella*-Pflanzen (Yevdakova *et al.*, 2008) und die damit verbundene wahrscheinliche Erhöhung der tRNA-gebundenen Cytokininbiosynthese scheint nicht ausreichend, um den Cytokiningehalt auf Wildtyp-Niveau zu erhalten.

4.3.5 Effekte von Cytokinin-Mangel auf den Phänotyp

Ziel dieses Teiles der Arbeit war festzustellen, welche sichtbaren Folgen der zuvor erzeugte und nachgewiesene Cytokinin-Mangel auf Wachstum und Entwicklung der *AtCKX2*-transgenen Pflanzen ausübt. Obwohl tCKX16 eine höhere Reduktion der Gesamt-Cytokinin-Menge als tCKX7 erfuhr, zeigte tCKX7 stärkere phänotypische Veränderungen. Da unterschiedliche Ploidie-Grade einen Effekt auf den Phänotyp zeigen können (Schwen *et al.*, 2005), werden hier nur solche phänotypischen Veränderungen als Effekt der Überexpression betrachtet, die sowohl bei tCKX7 als auch bei tCKX16 vorkamen.

Da der Cytokinin-Mangel bei den tCKX-Transformanten Formabweichungen bei Protonemazellen auslöste, welche zu kürzeren und runden Formen tendieren, kann eine Beteiligung der Cytokinine bei der Wachstumssteuerung von Protonemazellen gefolgert werden.

Bei der Bildung von Knospen und Gametophoren kam es bei tCKX7 und tCKX16 zu Verzögerungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.28).

Im Gegensatz zu Cytokinin-defizienten Pflanzen von *Arabidopsis* und Orchideen, die eine entgegengesetzte Rolle der Cytokinine bei Regulation von Wurzel- und Spross-Meristem erkennen ließen (Werner *et al.*, 2003; Kopecny *et al.* 2006; Yang *et al.*, 2003), zeigten die *Physcomitrella* AtCKX2-transgenen Pflanzen keine offensichtliche, den Samenpflanzen analoge Rolle der Cytokinine bei der Regulation der Rhizoid- und Gametophor-Bildung auf.

Die Senkung der Cytokinin-Niveaus bei den AtCKX2-transgenen Pflanzen bewirkte eine vollkommene Abwesenheit von Antheridien und Archegonien. Dies deutet darauf hin, dass sowohl männliche als auch weibliche Gametangien für ihre Entwicklung ein entsprechendes Cytokinin-Signal benötigen.

Chloroplasten stellen targets für die Cytokininwirkung dar und Cytokinine beeinflussen Proliferation, Erhaltung sowie Abbau von Chloroplasten (Reski *et al.*, 1994). Der Effekt von Cytokinin auf Seneszens-Prozesse bei höheren Pflanzen ist unterschiedlich: Während bei Tabakpflanzen die Reduktion von Cytokinin Seneszens-Prozesse hervorruft, zeigte ein Cytokinin-Defizit bei *Arabidopsis* keine eindeutige Auswirkung auf die Seneszens (Ori *et al.*, 1999, Werner *et al.*, 2001). Obwohl der Alterungsprozess von höheren Pflanzen und Moosen nicht direkt verglichen werden kann, sind Ähnlichkeiten bei den Effekten zu sehen. Die Cytokinin-defizienten Pflanzen von *Physcomitrella* zeigen wie die entsprechenden Tabakpflanzen eine Vergilbung der Phylloide in Aufwärtsrichtung. Bei älteren Kulturen konnte eine totale Chlorose der Phylloide beobachtet werden. Aufgrund der einfachen Anatomie der Phylloide (nur eine Zellschicht), sahen die Phylloide nach mehrwöchigem Wachstum glasig und nahezu durchsichtig aus.

Nys *et al.* (1990) haben bei alten, zerfallenen Phylloiden von Algen eine Akkumulation von O-Glucosiden sowie eine Reduktion von aktiven Cytokinin nachgewiesen. Die *PpADK1*-Transformanten sowie die tCKX-Transformanten zeigten Vergilbung der Phylloide. In beiden Fällen sind auf verschiedene Weise aktive Cytokinine reduziert sowie O-Glucoside akkumuliert worden. Obwohl beim Wildtyp die O-Glucoside die Hauptmetabolite repräsentieren, könnte darüber spekuliert werden, ob die Homöostase zwischen aktiven Cytokinin und O-Glucosiden eine Rolle bei der Ausbildung der beobachteten Chlorose spielt.

4.4 UNGEKLÄRTE FRAGEN UND PERSPEKTIVEN

1. Da bei *Physcomitrella* im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 21 verschiedene Cytokininspezies nachgewiesen wurden (vgl. Tab. 25 und Tab. 28), stellt sich die Frage nach der biologischen Aktivität dieser verschiedenen Cytokinine. *cZ* zeigt bei *Physcomitrella* keinerlei Effekt auf die Knospenbildung. Da aber eine Hemmung des Rhizoidwachstums durch die *cZ*-Formen vermutet wird, könnte die Etablierung eines Bioassays zur Erfassung des Cytokinin-gesteuerten Rhizoidwachstums Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.
2. Freisetzung von aktiven Cytokinin aus *O*-Glucosiden (vg. 4.2.4): In *Physcomitrella* sind die *O*-Glucoside die am meisten akkumulierten Metabolite und der tRNA-abhängige Biosyntheseweg stellt bei dieser Pflanze wahrscheinlich den Hauptcytokinin-Biosyntheseweg für Cytokinine dar; ob die Freisetzung aus *O*-Glucosid-Speicherformen die schnelle Bildung von freien Cytokinin ermöglicht und damit den eher langsamen, vom „turnover“ der tRNA-abhängigen-Weg ergänzt, wäre ein wichtiger Untersuchungspunkt.
3. Die Aufklärung der subzellulären Lokalisierung der charakterisierten *ADK*- und *CKX*-Genprodukte könnte durch Transformationsexperimente unter Nutzung von GUS-Fusionskonstrukten erzielt werden.
4. Das Plastid als wichtiger Ort der Cytokininbiosynthese sollte hinsichtlich der möglichen Lokalisierung von *PpIPT1* und *PpCKX2* sowie *PpPPO* im Chloroplasten überprüft werden (4.3.1), um weitere Erklärungen über die Regulation der Cytokinin-Homöostase und seine physiologische Rolle zu erhalten.
5. Enzymkinetische Arbeiten zur Affinität der verschiedenen *ADK*- und *CKX*-Isoformen hinsichtlich der Affinität zu verschiedenen Cytokinin-Metaboliten wären wichtig zur Vervollständigung des Bildes von der Steuerung der Pflanzenentwicklung über hormonmetabolisierende Enzyme.
6. Analysen zur Rolle des Anstiegs von *O*-Glucosiden im Zusammenhang mit Alterungsprozessen bei *Physcomitrella* sowie zur genauen Regulation der Bildung von mittelständigen-Rhizoiden am Cauloid stehen noch aus (4.2.5).
7. Die geschaffenen *ADK*- und *CKX*-transgenen Pflanzen (3.2.2.2 bzw. 3.3.2.3) könnten als Arbeitsmittel für weitere Forschungsprojekte zur Evolution von Cytokinin-Signalling dienen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson J.D.** (1977) Adenylate Metabolism of Embryonic Axes from Deteriorated Soybean Seeds. *Plant Physiology* 59, 610-614
- Armstrong D.** (1994) Cytokinin Oxidase and the Regulation of Cytokinin Degradation. In: D W S Mok, M C Mok (eds): *Cytokinins: chemistry, activity and function*, CRC Press, Boca Raton 139-154
- Ashton N.W., Grimsley N.H., Cove D.J.** (1979) Analysis of Gametophytic Development in the Moss, *Physcomitrella patens*, Using Auxin and Cytokinin Resistant Mutants. *Planta* 144, 427-435
- Astot C., Dolezal K., Nordstrom A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N.H., Sandberg G.** (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 97, 14778-14783
- Auer C.A.** (1997) Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. *Plant Growth Regulation* 23, 17-32
- Barnes M.F., Tien C.L., Gray J.S.** (1980) Biosynthesis of cytokinins by potato cell cultures. *Phytochemistry* 19, 409-412
- Benkova E., Witters E., Dongen W.v., Kolar J., Motyka V., Brzobahaty B., Van Onckelen H.A., Machackova I.** (1999) Cytokinins in Tobacco and Wheat Chloroplasts. Occurrence and Changes due to Light/Dark Treatment. *Plant Physiology*, 121, 245-251
- Benzanilla M., Pan A., Quatrano R.S.** (2003) RNA Interference in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology*, 133, 470-474
- Bielecki R. L.** (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissue. *Analytical Biochemistry* 9, 431-442
- Bilyeu K.D., Cole J.L., Larskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O.** (2001) Molecular and Biochemical Characterization of a Cytokinin Oxidase from Maize. *Plant Physiology*, 125, 378-386
- Bopp M., R. Atzorn** (1992) The morphogenetic system of the moss protonema. *Cryptogamic Botany* 3, 3-10
- Bopp, M.** (1953) Die Wirkung von Heteroauxin auf Protonemawachstum und Knospenbildung von *Funaria hygrometrica*. *Z. Botanik* 41, 1-16
- Brugière N., Jiao S., Hantke S., Zinselmeier C., Roessler J.A., Niu X., Jones R. J., 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
- Caputto R.** (1951) The enzymatic synthesis of adenylic acid; adenosinekinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 189, 801-814
- Carels N., Bernardi G.** (2000) Two Clases of Genes in Plants. *Genetics* 154, 1819-1825
- Chatfield J.M., Armstrong D. J.** (1986) Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv great northern. *Plant Physiology* 80, 493-499
- Chen C.M.** (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum* 101, 665-673
- Chen C.M., Petschow B.** (1978) Metabolism of cytokinin-ribosylation of cytokinin bases by adenosine phosphorylase from wheat germ. *Plant Physiology* 62, 871-874

- Chen C.M., Eckert R.L.** (1977) Phosphorylation of Cytokinin by Adenosine Kinase from Wheat Germ. *Plant Physiology* 59, 443-447
- Cordes, J.F.** (1972) Das internationale Einheitensystem. *Naturwissenschaften* 59, 177-182
- Cove D.** (2005) The Moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* 39, 339-358
- Cove D.L., Knight C.D., Lamparter T.** (1997) Mosses as model systems. *Trends in Plant Science* 2, 99-105
- Cove D.J., Knight C.D.** (1993) The Moss *Physcomitrella patens*, a Model System with Potential for the Study of Plant Reproduction. *The Plant Cell* 5, 1483-1488
- Chuang S., Chen A., Chao C.** (1995) Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Research* 23, 1641
- Decker K.F.** (1993) Biosynthesis and Function of Enzymes with Covalently Bound Flavin. *Annual Review of Nutrition* 13, 17-41
- Dietrich J.T., Kaminek M., Blevins D.G., Reinbott T.M., 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(3), 327-336
- Dobrev P.I., Kamínek M.** (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 950, 21-29
- Emanuelsson O., Brunak S., Heijne S. von, Nielsen H.** (2007) Locating proteins in the cell using targetP, signalP, and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971
- Engel P.P.** (1968) The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *American Journal of Botany* 55, 438-446
- Faiss M., Zalubilová J., Strnad M., Schmölling T.** (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signalling in whole tobacco plants. *The Plant Journal* 12, 401-415
- Faiss M., Strnad M., Redig P., Dolezal K., Hanus J., Onckelen H. van, Schmölling T.** (1996) Chemically induced expression of the *rolC*-encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides *in planta*. *The Plant Journal* 10(1), 33-46
- Faye F. und Le Floc'h F.** (1997) Adenosine kinase of peach tree flower buds: Purification and properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 35, 15-22
- Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coghill P.C., Sammut J.S., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A.** (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research Database Issue* 36, D281-D288
- Fraaije M. W., van den Heuvel R. H. H., van Berkel W.J. H., Mattevi A.** (2000) Structural Analysis of Flavinylation in Vanillyl-Alcohol Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 49, 38654–38658
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Sebela M., Pec P., Hrbác J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I.** (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemistry. Journal* 380, 121-130
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmölling T., Frébort I.** (2007) Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 255-267

- Galuszka P., Frébortová J., Luhová L., Bilyeu K. D., English J.T., 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 (5) 716-728
- Galuszka P.1 , Frébortová J. , Werner T. , Yamada M. , Strnad M. , Schmölling T. and Frébort I.** (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat. *European Journal of Biochemistry* 271(20) 3990-4002
- Galuszka P., Frébort I., Sebela M., Sauer P., Jacobsen S., Pec P.** (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* 268, 450-461
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.** (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. John M Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607
- Gerhäuser D., Bopp M.** (1990) Cytokinin Oxidases in Mosses. 1. Metabolism of Kinetin and Benzyladenine *in vivo*. *Journal of Plant Physiology* 135, 680-685
- Gorton B.S., Eaki R.E.** (1957) Development of the gametophyte in the moss *Tortella caespitosa*. *Botanical Gazette* 119, 31-38
- Guranowski A.** (1979) Plant Adenosine Kinase: Purification and Some Properties of the Enzyme from *Lupinus luteus* Seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 196 (1), 220-226
- Hare P.D., van Staden J.** (1994) Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum* 91, 128-136
- Heyl A., Schmölling T.** (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 480-488
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H.** (2007) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 1-9
- Höglund A., Dönnies P., Blum T., Adolph H.W., Kohlbacher O.** (2006) MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics* 22, 1158-1165
- Horton P., Park K.J., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C.J., Nakai K.** (2007) WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research (Web Server Issue)* (1-3), W585-W587
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J.** (2004) N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 47822-47832
- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplast. *The Plant Journal* 17(6), 615-626
- Kakimoto T.** (2003) Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* 116, 233-239
- Kaminek M., Motyka V., Vankova R.** (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101, 689-700
- Kaminek M., Armstrong D.J.** (1990) Genotypic Variation in Cytokinin Oxidase from *Phaseolus Callus* Cultures. *Plant Physiology* 93, 1530-1538

- Kamisugi Y., Cuming A.C., Cove D.J. (2005)** Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research* 33, e173
- Khraiwesh B., Ossowski S., Weigel D., Reski R., Frank W. (2008)** Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: An alternative to targeted gene knockouts. *Plant Physiology* 148, 684-693
- Knight C.D., Cove D.J., Boyd P.J., Ashton N.W. (1988)** The Isolation of Biochemical and developmental mutants in *Physcomitrella patens*. in: Glime, J.M. (ed.): *Methods in Bryology. Proc.*, 47-58
- Kopecný D., Trakowski P., Majira A., Bouchez-Mahiout I., Nogué F., Laurière M., Sandberg G., Laloue M., 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
- Köppel E., Stadler M., Lüthy J., Hübner P. (1997)** Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne "roundup ready". *Mitt. Gebiete Lebens. Hyg.* 88, 164-175
- Kornberg A., Pricer W.E. (1951)** Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 481-496
- Kredich N.M., Hershfield M.S. (1979)** S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 76 (5), 2450-4 221926
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007)** Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445, 652-655.
- Laloue M., Fox J.E. (1989)** Cytokinin Oxidase from Wheat: Partial Purification and General Properties. *Plant Physiology* 90, 899-906
- Laukens K., Lenobel R., Strnad M., Onckelen H. v., Witters E. (2003)** Cytokinin affinity purification and identification of a tobacco BY-2 adenosine kinase. *FEBS Letters* 533, 63-66
- Lecoq K., Belloc I., Desgranges C., Daignan-Fornier B. (2001)** Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the *ADO 1* gene and study of the mutant phenotype. *Yeast* 18, 335-342
- Letham D.S., Palni L.M.S. (1983)** The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* 34, 163-97
- Letham D.S., Summons R.E., Parker C.W., MacLeod J.K. (1979)** Regulators of cell division in plant tissues-XXVII. Identification of an amino-acid conjugate of 6-benzylaminopurine formed in *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Planta* 146, 71-74
- Letschert B., Adam G., Lesemann D.E., Willingmann P., Heinze C. (2002)** Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods* 106, 1-10
- Lexa M., Genkov T., Malbeck J., Machácková I., Brzobohatý B. (2003)** Dynamics of Endogenous Cytokinin Pools in Tobacco Seedlings: a Modelling Approach. *Annals of Botany* 91, 585-597
- Long M.C., Escuyer V., Parker W.B. (2003)** Identification and characterization of a unique adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 185, 6548-6555

- Malito E., Coda A., Bilyeu K.D., Fraaije M.W., Mattevi A.** (2004) Structures of Michaelis and Product Complexes of Plant Cytokinin Dehydrogenase: Implications for Flavoenzyme Catalysis. *Journal of Molecular Biology* 341, 1237-1249
- McGaw B.A., Burch L.R.** (1995) Cytokinin biosynthesis and metabolism. *Plant Hormones* 98-117
- McGaw B. A., Horgan R.** (1983) Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown-gall tissue. *Planta* 159, 30-37
- Menand B., Yi K., Jouannic S., Hoffmann L., Ryan E., Linstead P., Schaefer D.G., Dolan L.** (2007) An Ancient Mechanism Controls the Development of Cells with a Rooting Function in Land Plants. *Science* 316, 1477-1480
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M.** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemistry Society* 77, 1392
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T.** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 103, 16598-16603
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T.** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. *The Plant Journal* 37, 128-138
- Moffatt B. A.; Stevens Y.Y., Allen M. S., Snider J.D., Pereira L.A., Todorova M.I., Summers P.S., Weretilnyk E.A.; Martin-McCaffrey L., Wagner C.** (2002) Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiology* 128, 812-821
- Moffatt B.A., Wang L., Allen M.S., Stevens Y.Y., Qin W., Snider J., Schwartzberg K. v.** (2000) Adenosine Kinase of *Arabidopsis*. Kinetic Properties and Gene Expression. *Plant Physiology* 124, 1775-1785
- Mok D. W.S., Mok M.C.** (2001) Cytokinin Metabolism and Action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 52, 89-118
- Mok D.W.S., Martin R.C.** (1994) Cytokinin Metabolic Enzymes. In: DWS Mok and MC Mok (eds.) *Cytokinins* 129-137
- Mok M.C.** (1994) Cytokinins and plant development- an overview. In: DWS Mok and MC Mok (eds.) *Cytokinins: Chemistry, activity, and function*, CRC Press, Boca Raton 155
- Motyka V., Vanková R., Capková V., Petrásek J., Kamínek M., Schmölling T.** (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum* 117, 11-21
- Motyka V., Faiss M., Strnad M., Kamínek M., 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., Kamínek M.** (1990) Characterization of cytokinin oxidase from tobacco and poplar callus cultures. In: Kamínek M., Mok D.W.S., Zazimalova E., eds. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. SPB Academic Publishing bv, The Hague 33

- Nakamura T, Sugiura C, Kobayashi Y, Sugita M** (2005) Transcript profiling in plastid arginine tRNA-CCG gene knockout. Construction of *Physcomitrella patens* plastid DNA microarray. *Plant Biology* 7, 258-265.
- Nys R.d., Jameson P.E., Chin N., Brown M.T., Sanderson K.J.** (1990) The Cytokinins as Endogenous Growth Regulators in *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. (Phaeophyceae). *Botanica Marina* 33, 467-475
- Oka A.** (2003) New insights into cytokinins. *Journal of Plant Research* 116, 217-220
- Ori, N., Juarez, M.T., Jackson, D., Yamaguchi, J., Banowitz, G.M., Hake, S.** (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* 11, 1073–1080.
- Palmer M.V., Horgan R., Wareing P.F.** (1981) Cytokinin metabolism in *Phaseolus vulgaris* L.- Identification of endogenous cytokinins and metabolism of [8-14C]dihydrozeatin in stems of decapitated plants. *Planta* 153, 297-302
- Popelková H., Galuszka P., Frébortová J., Bilyeu K.D., Frébort, I.** (2004) Cytokinin dehydrogenase: Characterization and structure homology modelling of the flavoprotein catabolizing plant hormones cytokinins. *Recent Research Developments in Proteins* 2, 1-19
- Ren X.Y., Vorst O., Fiers M.W.E.J., Stiekma W.J., Nap J.P.** (2006) In plants, highly expressed genes are the least compact. *Trends in Genetic* 22, 528-532
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T., Oishi K., Shin-I T., Kuroki Y., Toyoda A., Suzuki Y., Hashimoto S., Yamaguchi K., Sugano S., Kohara Y., Fujiyama A., Anterola A., Aoki S., Ashton N., Barbazuk W.B., Barker E., Bennetzen J.L., Blankenship R., Cho S.H., Dutcher S.K., Estelle M., Fawcett J.A., Gundlach H., Hanada K., Heyl A., Hicks K.A., Hughes J., Lohr M., Mayer K., Melkozernov A., Murata T., Nelson D.R., Pils B., Prigge M., Reiss B., Renner T., Rombauts S., Rushton P.J., Sanderfoot A., Schween G., Shiu S.H., Stueber K., Theodoulou F.L., Tu H., Van de Peer Y., Verrier P.J., Waters E., Wood A., Yang L., Cove D., Cuming A.C., Hasebe M., Lucas S., Mishler B.D., Reski R., Grigoriev I.V., Quatrano R.S., Boore J.L.** (2008) The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* 319 (5859), 64-69
- Rensing S.A., Fritzowsky D., Lang D., Reski R.** (2005) Protein encoding genes in an ancient plant: Analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens*. *BMC Genomics* 6:43
- Reski, R.** (1999) Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* 208, 301-309
- Reski, R.** (1998) Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Botanica Acta* 111, 1-15
- Reski, R.** (1994) Plastid Genes and Chloroplast Biogenesis. In: Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. D.W.S. Mok, M.C. Mok (eds.), 179-195. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Reski R., Abel W.O.** (1985) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens* using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354-358
- Richter H.** (2009) Organisation and transcriptional regulation of the polyphenol oxidase (PPO) multigene family of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. and functional gene knockout of *PpPPO1*. Dissertation, Universität Hamburg, Department Biologie
- Rogers S.O., Bendich A.J.** (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology, Manual* eds. Gelvin SB A 6, 1-10

- Sakakibara H.** (2006) Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. Annual Review of Plant Biology 57,431-49
- Sakakibara H.** (2003) Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signalling pathways in plants. Journal of Plant Research 116, 253-257
- Sakakibara K., Nishiyama T., Sumikawa N., Kofuji R., Murata T., Hasebe M.** (2003) Involvement of auxin and a homeodomain-leucine zipper I gene in rhizoid development of the moss *Physcomitrella patens*. Development 130, 4835-4846
- Sambrook J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Schaefer D.G.** (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. Current Opinion in Plant Biology 4: 143-150
- Schaefer D.G., Zrýd J.-P.** (2001) The Moss *Physcomitrella patens* Now and Then. Plant Physiology 127: 1430-1438
- Schaefer D.G., Zrýd J.P.** (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. The Plant Journal 11(6), 1195-1206.
- Schaefer D.G., Bisztray G., Zrýd J.P.** (1994) Genetic Transformation of the Moss *Physcomitrella patens*. Biotechnology in Agriculture and Forestry 29 - Plant Protoplasts and Genetic Engineering V (ed. by Y.P.S. Bajaj), Srpinger-Verlag Berlin Heidelberg
- Schaefer D.G., Zrýd J.P., Knight C.D., Cove D.J.** (1991) Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. Mol. Gen. Genet. 226, 418-424
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. Journal of Plant Research 116, 241-252
- Schoor S., Moffatt B. A.** (2004) Applying high throughput techniques in the study of adenosine kinase in plant metabolism and development. Frontiers in Bioscience 9, 1771-1781
- Schulz P.** (2001) Biochemische und molekulare Untersuchungen zum Cytokininstoffwechsel bei *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Dissertation, Universität Hamburg, FB Biologie
- Schulz P.A., Hofmann A.H., Russo V., Hartmann E., Laloue M., Schwartzberg K.v.** (2001) Cytokinin Overproducing *ove* Mutants of *Physcomitrella* Species Show Increased Riboside to Base Conversion. Plant Physiology 126, 1224-1231
- Schulz P., Reski R., Maldiney R., Laloue M., Schwartzberg K. v.** (2000) Kinetics of Cytokinin Production and Bud Formation in *Physcomitrella*: Analysis of Wild Type, a Developmental Mutant and Two of Its *ipt* Transgenics. Journal of Plant Physiology 156, 768-774
- Schwartzberg K.v., Fernández Núñez M., Blaschke H., Dobrev P. I., Novák O., Motyka V., Strnad M.** (2007) Cytokinins in the Bryophyte *Physcomitrella patens*: Analysis of Activity, Distribution and Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Overexpression Reveal Role of Extracellular Cytokinins. Plant Physiology 145, 786-800
- Schwartzberg K.v., Pethe C., Laloue M.** (2003) Cytokinin metabolism in *Physcomitrella patens* - differences and similarities to higher plants. Plant Growth Regulation 39, 99-106

- Schwartzberg K.v., Kruse S., Reski R., Moffatt B., Laloue M.** (1998) Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *The Plant Journal* 13 (2), 249-257
- Schween G., Schulte J., Reski R.** (2005) Effect of Ploidy Level on Growth, Differentiation, and Morphology in *Physcomitrella patens*. *The Bryologist* 108 (1), 27-35
- Spychala J., Datta N.S., Takabayashi K., Datta M., Fox I. H., Gribbin T., Mitchell B.S.** (1996) Cloning of human adenosine kinase cDNA: Sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 93, 1232-1237
- Stenoien H.K.** (2007) Compact genes are highly expressed in the moss *Physcomitrella patens*. *The Author* 20, 1223-1229
- Stirk W.A., Novák O., Strnad M., van Staden J.** (2003) Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation* 41, 13-24
- Strnad M.** (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* 101
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H.** (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 41866-41872
- Tarkowski P., Dolezal K., Strnad M.** (2004) Analytical methods in cytokinin research. *Chemicke Listy* 98, 834-841
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J** (1994) Custal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties. *Nucleic Acid Research* 22, 4673-4680
- Wang H., Hao L., Shung C.Y., Sunter G., Bisaro D.M.** (2003) Adenosine Kinase Is Inactivated by Geminivirus AL2 and L2 Proteins. *The Plant Cell* 15, 3020-3032
- Wang T.L., Horgan R., Cove D.** (1981) Cytokinins from the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 68, 735-738
- Wang T., Cove D.J., Beutelmann P., Hartmann E.** (1980) Isopentenyladenine from mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 19, 1103-1105
- Wang Y., Zhang W., Cao J., McElroy D., Wu R.** (1992) Characterisation of *cis*-Acting Elements Regulating Transcription from the Promoter of a Constitutively Active Rice Actin Gene. *Molecular and Cellular Biology* 12 (8) 3399-3406
- Weretilnyk E.A., Alexander K.J., Drebenstedt M., Snider J.D., Summers P.S., Moffatt B.A.** (2001) Maintaining Methylation Activities during Salt Stress. The Involvement of Adenosine Kinase. *Plant Physiology* 125, 856-865
- Werner T., Holst K., Pörs Y., Guivarc'h A., Mustroph A., Chriqui D., Grimm B. Schmülling T.** (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* 59(10), 2659-2672
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Onckelen H.V., 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. *The Plant Cell* 1-19
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 1-6

- Whitty C.D., Hall R.H.** (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry* 52, 789-799
- Wood A., Oliver M.J., Cove D.** (2000) Bryophytes as model systems. *The Bryologist* 103, 128-133
- Yang S.H., Yu H., Goh C.J.** (2003) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Molecular Biology* 51, 237-248
- Yevdakova N., Motyka V., Malbeck J., Travnickova A., Novak O., Strnad M., Schwartzberg K. v.** (2008) Evidence for Importance of tRNA-Dependent Cytokinin Biosynthetic Pathway in the Moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulation* 27, 271-281
- Yevdakova N.A.; Schwartzberg K.v.** (2007) Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss, *Physcomitrella patens*. *Planta* 226, 683-695
- Zeidler M., Hartmann E., Hughes J.** (1999) Transgene Expression in the Moss *Ceratodon purpureus*. *Journal of Plant Physiology* 154, 641-650

6 ANHANG

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen nach dem SI-System (Cordes, 1972) sind nicht aufgeführt.

^3H -iP	Tritium markierte Isopentenyladenin
^3H -iPR	Tritium markierte Isopentenyladenosin
aa/AS	Aminosäure
Acc. No.	Accession Number
Act1	Actin 1 Promotor
ADK	Adenosin-Kinase
Alignment	Anordnung von Protein- oder Nukleotidsequenzen nach der Ähnlichkeit ihrer einzelnen Positionen in einem Textdokument
AMP	Ampicilin
BA	Benzyladenin
BA9G	Benzyladenin-9-Glucosid
BAR	Benzyladenosin
BARMP	Benzyladenosin-5'-Monophosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tools
bp	Basenpaare
CaMV	Blumenkohlmosaik-Virus
cDNA	copy DNA
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
cZ7G	<i>cis</i> -Zeatin-7-Glucosid
cZ9G	<i>cis</i> -Zeatin-9-Glucosid
cZOG	<i>cis</i> -Zeatin- <i>O</i> -Glucosid
cZR	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid
cZRMP	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat
cZROG	<i>cis</i> -Zeatin-Ribosid- <i>O</i> -Glucosid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dHZ	dihydro-Zeatin
dHZ7G	dihydro-Zeatin-7-Glucosid
dHZ9G	dihydro-Zeatin-9-Glucosid
dHZOG	dihydro-Zeatin- <i>O</i> -Glucosid
dHZR	dihydro-Zeatin-Ribosid
dHZRMP	dihydro-Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat
dHZROG	dihydro-Zeatin-Ribosid- <i>O</i> -Glucosid
dNTP	Deoxinukleosidtriphosphate (A/T/C/G)
dmp	<i>disintegrations per minute</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GT	<i>gene targeting</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescence protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
H	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
HR	Homologe Rekombination
iP	Isopentenyladenin
iP9G	Isopentenyladenin-9-Glucosid
iPR	Isopentenyladenosin
iPRMP	Isopentenyladenosin-5'-Monophosphat
K	Kinetin
KR	Kinetin-Ribosid
KRMP	Kinetin-Ribosid-5'-Monophosphat
Knock out	Zerstörung eines Gens

kDa	Kilodalton
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LSC	Flüssigszintillationszählung
MMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
<i>m</i> -T	<i>meta</i> -Topolin
<i>m</i> -T9G	<i>meta</i> -Topolin-9-Glucosid
<i>m</i> -TOG	<i>meta</i> -Topolin-O-Glucosid
<i>m</i> -TR	<i>meta</i> -Topolin-Ribosid
<i>m</i> -TRMP	<i>meta</i> -Topolin-Ribosid-5'-Monophosphat
<i>m</i> -TROG	<i>meta</i> -Topolin-Ribosid-O-Glucosid
min	Minuten
mJ	milijoules
Mr	relative Molekülmasse
NCBI	National Centre of Biotechnology Information
NJ	Neighbour-Joining
nptII	Neomycin-Phosphotransferase II
nos3T	nos3-Terminator
nt	Nukleotid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
<i>o</i> -T	<i>ortho</i> -Topolin
<i>o</i> -T9G	<i>ortho</i> -Topolin-9-Glucosid
<i>o</i> -TOG	<i>ortho</i> -Topolin-O-Glucosid
<i>o</i> -TR	<i>ortho</i> -Topolin-Ribosid
<i>o</i> -TRMP	<i>ortho</i> -Topolin-Ribosid-5'-Monophosphat
<i>o</i> -TROG	<i>ortho</i> -Topolin-Ribosid-O-Glucosid
<i>p</i> -T	<i>para</i> -Topolin
<i>p</i> -T9G	<i>para</i> -Topolin-9-Glucosid
<i>p</i> -TOG	<i>para</i> -Topolin-O-Glucosid
<i>p</i> -TR	<i>para</i> -Topolin-Ribosid
<i>p</i> -TRMP	<i>para</i> -Topolin-Ribosid-5'-Monophosphat
<i>p</i> -TROG	<i>para</i> -Topolin-Ribosid-O-Glucosid
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	(<i>polymerase chain reaction</i>) Polymerase-Ketten-Reaktion PCR
Rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
S	Sekunde
SD	Standardabweichung
TG	Trockengewicht
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -Zeatin
<i>tZ</i> 7G	<i>trans</i> -Zeatin-7-Glucosid
<i>tZ</i> 9G	<i>trans</i> -Zeatin-9-Glucosid
<i>tZ</i> OG	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glucosid
<i>tZ</i> R	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid
<i>tZ</i> RMP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-5'-Monophosphat
<i>tZ</i> ROG	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-O-Glucosid
u.d.N.	unterhalb der Nachweisgrenze
ün	Übernacht
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen

6.2 Restriktionskarte und vollständige Sequenz von pHP_Act1_PpADK1

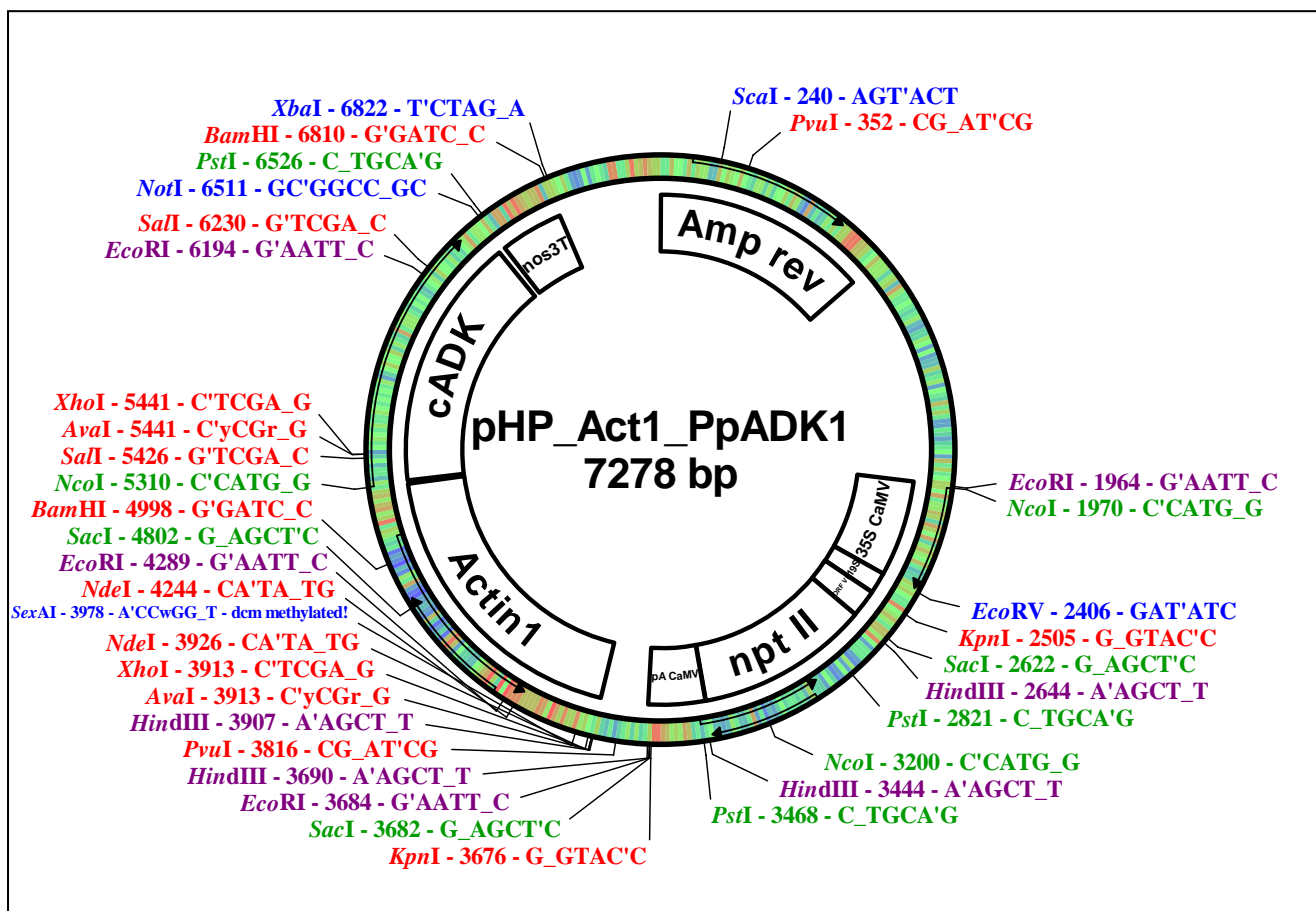


Abb. 6.1 Darstellung von pHP_Act1_PpADK1 mit Schnittstellen von ausgewählten Restriktionsendonukleasen und deren Position.

1	CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT	Ampicilin	1351	GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GCGGACAGG
51	GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA AGATCCTTGA	Resistenz	1401	TATCCGGTAA CGCGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC
101	GAGTTTTTCG CCGGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC		1451	AGGGGGAAAC CGCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCCGGTTC CGCCACCTTC
151	TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC		1501	GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
201	GGTCGCCGCA TACACTATTG TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT		1551	AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC
251	CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAAGT		1601	TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC COCTGATTCT GTGGATAACC
301	CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT TCTGACAACG		1651	GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCGACG CCGAACGACC
351	ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA TGGGGGATCA		1701	GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA
401	TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGA GCTGAATGAA GCCATACCAA		1751	ACCGCCTCTC CCCCGCGGTT GGCCGATTCA TTAATGACG TGGCACGACA
451	ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCTGATG CAATGGCAAC AACGTTGCGC		1801	GGTTTCCCGA CTGGAAGCG GGCAGTGAGC CGAACGCAAT TAATGTGAGT
501	AAACTATTAA CTGCGCAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAATTAAT		1851	TAGCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA CACTTTATGC TTCGGCTCG
551	AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCC		1901	TATGTTGTGT GGAATTGTA GCGGATAACA NTTTCNCACA GGAACAGCT
601	TTCCGGCTGG CTGCTTATG GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG		1951	NTGACATGAT NACGAATTCC CATGGAGTCA AAGATTCAAA TAGAGACCT
651	TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT		2001	AACAGAACTC GCCGTAAGA CTGGCGAACA GTTCATACAG AGTCTCTTAC
701	CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGCC AACTATGGAT GAACGAAATA		2051	GACTCAATGA CAAGAAGAAA ATCTTCGTCA ACATGGTGGA GCACGACAG
751	GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAACGTGCA		2101	CTTGTCTACT CCAAAAATAT CAAAGATACA GTCTCAGAAG ACCAAAGGCC
801	GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTGATG GATTTAAAC TTCATTTTTA		2151	AATTGAGACT TTTCACAAA GGGTAATATC CGGAACCTC CTCGGATTCC
851	ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA		2201	ATTGCCAGC TATCTGTAC TTTATTGTGA AGATAGTGA AAAGGAAGGT
901	TCCCTTAACG TGAGTTTTCC TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG		2251	GGCTCTACA AATGCCATCA TTGCGATAAA GGAAGGCCA TCGTTGAAGA
951	ATCAAAGGAT CTCTTGAGA TCCTTTTTTT CTGGCGGTA TCTGCTGCTT		2301	TGCCTCTGCC GACAGTGGTC CCAAAGATGG ACCCCACACC ACAGGAGACA
1001	GCAACAAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTTTGTTTG CCGGATCAAG		2351	TCGTGGAAAA AGAAGACGTT CCAACCACGT CTTCAAAGCA AGTGGATTGA
1051	AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAACCT GCTTCAGCAG AGCCGACAGTA		2401	TGTGATATCT CCACTGACGT AAGGGATGAC GCACAAATCC ACTATCCTTC
1101	CCAAATACTG TTCTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA		2451	GCAAGACCTT TCCTCTATAT AAGGAAGTTC ATTTCAATTTG GAGAGGACAG
1151	CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG		2501	GGTACCCATC AAAAGGCTAC TGCCTATTTA AACACATCTC TGGAGACTGA
1201	CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA		2551	GAAAATCAGA CCTCCAAGCA TGGAGAACAT AGAAAACTC CTCATGCAAG
1251	TAGTTACCGG ATAAGCGACA GCGGTGGGG TGAACGGGG GTTCGTGCAC		2601	AGAAAATACT AATGCTAGAG CTCGATCTAG TAAGAGCAAA AATAAGCTTG
1301	ACAGCCACG TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC		2651	GATTGGATTG CACGACGTT CTCCGGCCCG TTGGTGGAG AGGCTATTCC

2701 GCTATGACTG GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CGCCGTGTTT
2751 CGGCTGTGAG CGCAGGGGCG CCCGGTTCTT TTTGTCAAGA CCGACCTGTG
2801 CGGTGCCCTG AATGAAGTGC AGGACGAGGC AGCCGGGCTA TCGTGGCTGG
2851 CCACGACGGG CGTTCCTTGC GCAGCTGTGC TCGACGTTGT CACTGAAGCG
2901 GGAAGGGACT GCCTGCTATT GGGCGAAGTG CCGGGGCAGG ATCTCTGTGC
2951 ATCTCACCTT GCTCCTGCCG AGAAAGTATC CATCATGGCT GATGCAATGC
3001 GCGGCTGCA TACGCTTGAT CCGGCTACCT GCCCATTGCA CCACCAAGCG
3051 AAACATCGCA TCGAGCGAGC ACGTACTCGG ATGGAAGCCG GTCTTGTGCA
3101 TCAGGATGAT CTGGACGAAG AGCATCAGGG GCTCGGCCA GCCGAAGTGT
3151 TCGCCAGGCT CAAGGCGCGC ATGCCCGAGC GCGAGGATCT CFCGTGAGC
3201 CATGGCGATG CCTGCTTGCC GAATATCATG GTGAAAAATG GCCGCTTTTC
3251 TGGATTATC GACTGTGGCC GGCTGGGTGT GCGGACCCG TATCAGGACA
3301 TAGCGTTGGC TACCCTGAT ATTGCTAAG AGCTTGGCGG CGAATGGCT
3351 GACCGTGGC TCGTGTCTTA CGTAGCGCC GCCCCCGATT CCGAGCGCAT
3401 GCGCTTCTAT CGCTTCTTG ACGAGTCTT CTGAGCGGGA CCCAAGCTTC
3451 GACGATCTCT GACCTCGAGG GATCCCGCT GAAATCACCA GTCTCTCTCT
3501 ACAAACTCTA CTCTCTCTAT AATAATGTGT GAGTAGTTC CAGATAAGGG
3551 AATTAGGGTT CTTATAGGTT TTCGCTCATG TGTGAGCAT ATAAGAAACC
3601 CTTAGTATGT ATTTGTATTT GTAATAACT TCTATCAATA AAATTTCTAA
3651 TTCCTAAAAA CAAAATCCAG GGTACCAGG CTCGAAATCA AGCTTGGCAC
3701 TGGCCGCTG TTTACAACGT CGTACTGGG AAAACCCCTG CGTTACCCAA
3751 CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCCTTTC GCCAGCTGG GTAATAGCGA
3801 AGAGGCCCGC ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCAGCAG CTGAATGGCG
3851 AATGGCCGCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTC
3901 CACCGCAAGC TTTCTGAGGT CATTATATG CTTGAGAAGA GAGTCGGAT
3951 AGTCCAAAAT AAAACAAGG TAAGATTACC TGGTCAAAG TGAAAACATC
4001 AGTTAAAAGG TGGTATAAGT AAAATATCGG TAATAAAAAG TGGCCCAAAG
4051 TGAATTTTAC TCTTTTCTAC TATTATAAAA ATTGAGGATG TTTTGTGCGT
4101 ACTTTGATAC GTCATTTTTG TATGAATTGG TTTTAAAGTT TATTCGCGAT
4151 TTGAAAATGC ATATCTGTAT TTGAGTGGT TTTAAAGTTC GTTGTTTTG
4201 TAAATACAGA GGGATTGTGA TAAGAAATAT CTTTAAAAAA CCCATATGCT
4251 AATTTGACAT AATTTTGTAG AAAAATATAT ATTCAGCGGA ATTCACAAT
4301 GAAACAATAA AAGATAAAAA TAGCTTGCC CCGTTGCAGC GATGGGTATT
4351 TTTTCTAGTA AAATAAAGA TAAACTTAGA CTCAAAACAT TTACAAAAAC
4401 AACCCCTAAA GTCCTAAAAG CCAAAGTGT ATGCACGATC CATAGCAAGC
4451 CCAGCCCAAC CCAACCCAAC CCAACCCACC CCAGTGCAGC CAACTGGCAA
4501 ATAGTCTCCA CCCCAGGAC TATCACCCTG AGTTGTCCG ACCACCGCAC
4551 GTCTCGCAG CAAAAAAGG AAAAAGAAAG AAAAAGAAAG AAAGAAAAAC
4601 AGCAGGTGGG TCCGGGTCTG GGGGCCGGA AAAGCGAGGA GGATCGCGAG
4651 CAGCGACGAG GCCCGGCCCT CCTCCGCTT CCAAGAAAC GCCCCCATC
4701 GCCACTATAT ACATACCCCC CCTCTCTCTC CCATCCCCCC AACCCCTCCAC
4751 CACCACCACC ACCACCTCCA CCTCTCCCC CCTCGCTGCC GGACGACGAG
4801 CTCTCCCCC CTCCCCCTCC GCCCGCGCG GCGCGTAA CACCCGCCC
4851 CTCTCTCTT TCTTTCTCG TTTTTTTTTT CCGTCTGGT CTCGATCTTT
4901 GGCCTTGTA GTTTGGGTGG GCGAGAGCG GCTTCGTGCG CCACCAGATC
4951 GGTGCGGGG AGGGGCGGA TCTCGCGCT GGGCTCTCG CCGCGTGG

5001 TCCGGCCCG ATCTCGCGG GAATGGGGCT CTCGGATGTA GATCTGCGAT
5051 CCGCCGTTGT TGGGGGAGAT GATGGGGGCT TTAATAATTTC CGCCATGCTA
5101 AACAGATCA GGAAGAGGGG AAAAGGGCAC FATGGTTTAT ATTTTATAT
5151 ATTTCTGCTG CTTCTGTCAG CTTAGATGTG CTAGATCTTT CTTTCTCTCT
5201 TTTGTGGGTA GAATTTGAAT CCCTCAGCAT TGTTCATCGG TAGTTTTTCT
5251 TTTTATGAT TGTGACAATG CAGCCTCGTG CCGAGCTTTT TTGTAAGTAG
5301 AAGAGGCTCC CATGGCCCGC GCTAGATCCC TCGCTCTTAT TCGACCACGC
5351 ATTCTCTCTC TCGCAATGGC GTCCGAGGGT GTGCTTTTGG GCATGGGAAA
5401 CCCCTGCTC GACATCTCCT CGTGGTCTGA CGACGCATTC CTCGAGAAGT
5451 ACGGGCTGAC GCTAAACAAAC GCTATTCTTG CTGAGGACAA GCACCTTCCC
5501 ATGTACAAGG AACTGGCTGC CAATCCCGAT GTAGAGTACA TTGACGAGG
5551 TGCTACTCAG AACACCATCA GGATTGCCCA GTGGATGCTA GGTGAATCGA
5601 ACGCAACTAG CTACTTTGGC TGTGTTGGCA AGGATGAGTA TGGCAGCCGT
5651 ATGTTCAAGC TCGCCTCTGA GGGAGGTGTC AATATCCGAT ACAGTGTGGA
5701 CGAGGATCTT CCCACTGGAA CATGCGGCGT GCTCGTGGT AAGGGAGAGA
5751 GCTCCTTGGT AGCAATCTT TCAGCCGCCA ACAATAACAA ATCGACCCAC
5801 TTGAAGAAGC CAGAAACTG GCTTTCTGAG GAGAGGACAA AGTACATCTA
5851 CAGCGCCGCT TTCTCTCTGA CTGTTTCACC GGAATCTATG ATGACCGTGG
5901 CCAACATGCT TGCCGAGACC GGAATAACT ACATGATCAA CTTAGCCGCT
5951 CCGTTCATCT GCCAGTCTT TAAGGACCCCT CTTATGAGGC TTTTCCCTTA
6001 CGTGGATTTT ATTTTCGGCA ACGAGAGCGA GGCCAGAGCA TTTGCGCAAG
6051 TTCAAGGCTG GGAGACAGAG GACACCAAGG TGATAGCCGT AAAGTTGGCT
6101 GCGTTACCGA AAGTGGCGG CACCACAAG CGTGTGCTG TCATCACCCA
6151 GGAACACTGAC CCCACAATTG TTGCTGAAGA TGGAAAGGTG ACTGAATTCC
6201 CCGTCAACCC TATTCTTAAG GAGAAGTTGG TCGACACTAA TGCAGCTGGT
6251 GACTCTTTTG TCGAGGGTGT CTTGTCTCAG CTGGTGTGG GTAAGACAT
6301 CGCACAGTGC GTCAGAGCAG GAAACTACGC AGCCAGCGCT ATCATCAGC
6351 GCTCTGGATG CACTTTCCCT TCCAAACCAT CCTTCGAAAG TCAGTAGAAA
6401 ATTGTTAGG TAGGGGTGAG GAAATTTGCC GCCCTTTTTT TTTGTCACAG
6451 CATCTATCAT GCAATACAAC TGGGTTGCCA TATCAAAAAA AAGCGGCCGT
6501 ACAAGTAAAG CGCCGCCCG GCTGCAGATC GTTCAAACAT TTGGCAATAA
6551 AGTTTCTTAA GATTGAATCC TGTGCCGGT CTTGCGATGA TTATCATATA
6601 ATTTCTGTTG AATTACGTTA AGCATGTAAT AATTAACATG TAATGATGTA
6651 CGTTATTTAT GAGATGGGTT TTTATGATTA GAGTCCCGCA ATTATACATT
6701 TAATACGCGA TAGAAAAA AATATAGCCG GCAAACTAGG ATAAATTATC
6751 GCGCGCGGTG TCATCTATGT TACTAGATCC GATGATAAGC TGTCAAACAT
6801 GAGAATTTGG GATCCACTAG TTCTAGATGG TGCACCTCTA GTACAATCTG
6851 CTCTGATGCC GCATAGTTAA GCCAGCCCG ACACCCGCCA ACACCCGCTG
6901 ACGGCCCTG ACGGGCTTGT CTGCTCCCG CATCCGTTA CAGACAAGCT
6951 GTGACCGCT CCGGAGCTG CATGTGTCAG AGGTTTTCAC CGTATCACC
7001 GAAACGCGC AGACGAAAGG GCCTCGTAT ACGCCTATTT TTATAGGTAA
7051 ATGTCATGAT AATAATGGTT TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA
7101 AATGTGCGC GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTTCAAATAT
7151 GTATCCGCT ATGAGACAAT AACCCGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA
7201 AAAGGAAGG TATGAGTATT CAACATTTCC GTGTGCGCCT TATTCCTTTT
7251 TTTGCGCAT TTTGCCTTCC TGTTTTTT

PpADK1

Actin1 Promoter
(aus Reis)

NOS 3T

6.3 Restriktionskarte und vollständige Sequenz von pHP_Act1_AtCKX2

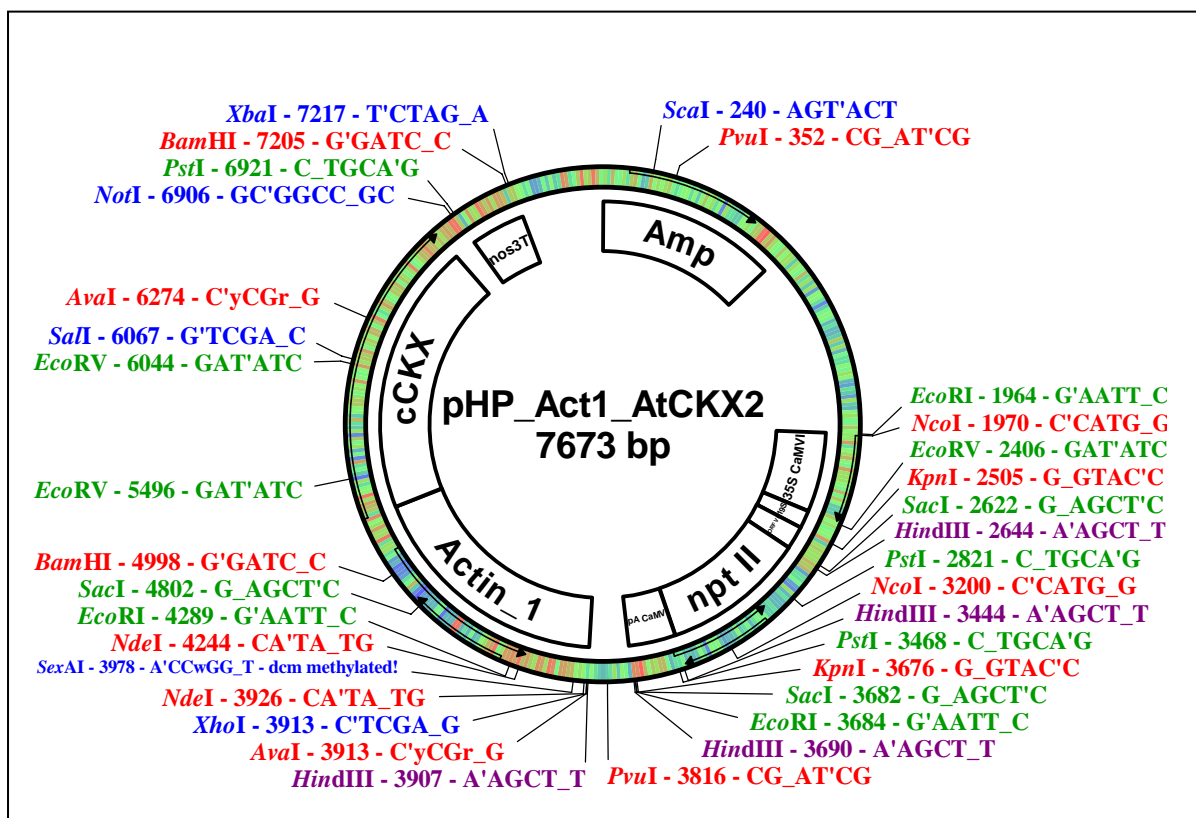


Abb. 6.2 Darstellung von pHP_Act1_AtCKX2 mit Schnittstellen von ausgewählten Restriktionsendonukleasen und deren Position.

1	CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAGATAAAA ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT	Ampicilin	1451	AGGGGGAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT
51	GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA AGATCCTTGA	Resistenz	1501	GACTTGAGCG TCGATTTTGT TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
101	GAGTTTTCGC CCGAAGAAG GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC		1551	AAAAACGCCA GCAACGGCGC CTTTTCACGG TTCTGGGCTT TTTGCTGGCC
151	TGCTATGTGG CCGGATATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC		1601	TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT GTGATAAAC
201	GGTCGCGGCA TACACTATTC TCAGAAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT		1651	GTATTACCAG CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCGCGC CCGAACGACC
251	CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTAATGCAGT		1701	GAGCGCAGCG AGTCAGTGA CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA
301	CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCG CCAACTTACT TCTGACAACG		1751	ACCGCCTCTC CCCGCGGTT GCGCGATTCA TTAATGCAGC TGGCACGACA
351	ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA TGGGGATCA		1801	GGTTTCCCGA CTGAAAAGCG GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT
401	TGTAACCTGC CTTGATCGTT GGAACCCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA		1851	TAGCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA CACTTTATGC TTCCGGCTCG
451	ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCTGTGAC CAATGGCAAC AACGTTGCGC		1901	TATGTTGTGT GGAATTGTA CCGGATAACA NTTTNCNACA GGAAACAGCT
501	AAACTATTTA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAAATTAAT		1951	NTGACATGAT NACGAATTCC CATGGAGTCA AAGATTCAAA TAGAGGACCT
551	AGACTGGATG GAGSCGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGGCC		2001	AACAGAACTC GCCGTAAGA CTGGCGAACA GTTCATACAG AGTCTCTTAC
601	TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG		2051	GACTCAATGA CAAGAAGAAA ATCTCTGTCA ACATGGTGGG GCACGACACG
651	TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGCGCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT		2101	CTTGCTACT CCAAAAATAT CAAAGATACA GTCTCAGAAG ACCAAAGGGC
701	CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT GAACGAAATA		2151	AATGAGACT TTTCAACAAA GGGTAATATC CCGAAACCTC CTCGGATTCC
751	GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAACGTGCA		2201	ATTGCCAGC TATCTGTAC TTTATTGTGA AGATAGTGGG AAAGGAAGGT
801	GACCAAGTTT ATCATATAT ACTTATGAT GATTTAAAAC TTCATTTTTA		2251	GGCTCTACA AATGCCATCA TTGCGATAAA GGAAAGGCCA TCGTTGAAGA
851	ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA		2301	TGCTCTGCC GACAGTGGT CCAAGATGAG ACCCCCACCC ACGAGGAGCA
901	TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC CTGAGAAAAG		2351	TGCTGGAAAA AGAAGACGTT CCAACACGCT CCAATGAGCA AGTGGATTGA
951	ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTFTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT		2401	TGTGATATCT CCACTGACGT AAGGATGAC GCACAACTCC ACTATCTCTC
1001	GCAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTTTGTTTG CCGATCAAG		2451	GCAAGACCC TCTCTATAT AAGGAAGTTC ATTTCAATTTG GAGAGGACAG
1051	AGTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAACCT GCTTCAGCAG ACGCGAGATA		2501	GGTACCCTAC AAAAGGCTAC TGCTATTTTA AACACATCTC TGGAGACTGA
1101	CCAAACTACTG TTCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTCAAGAA		2551	GAAATCAGA CCTCCAAGCA TGGAGAACAT AGAAAACTC CTCATGCAAG
1151	CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG		2601	AGAAAAACT AATGCTAGAG CTCGATCTAG TAAGAGCAAA AATAAGCTTG
1201	CTGCTGCCAG TGGGATAAG TCGTGTCTTA CCGGTTGGA CTCAGAGACA		2651	GATGGATTG CACGCAGGTT CTCGCCGCGC TTGGTGGAG AGCCTATTCG
1251	TAGTTACCGG ATAAGCGCA CCGGTCCGGG TGAACGGGGG GTTCGTGCAC		2701	GCTATGACTG GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CCGCGTGTTC
1301	ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC		2751	CGGCTGTGAG CCGAGGGGCG CCCGGTCTCT TTTGTCAAGA CCGACCTGTC
1351	GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GCGGACAGG		2801	CGTGTCCCTG AATGAACTGC AGGACGAGCG AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG
1401	TATCCGGTAA CCGGACGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC		2851	CCACGACGGG CGTTCCTTGC GCAGCTGTGC TCGAGCTGTG CACTGAAGCG

2901	GGAAAGGACT	GGCTGCTATT	GGGCGAAGTG	CCGGGGCAGG	ATCTCCTCTC	
2951	ATCTCACCTT	GCTCCTGCCG	AGAAAGTATC	CATCATGGCT	GATGCAATGC	
3001	GGCGGCTGCA	TACGCTTGAT	CCGGCTACTC	GCCCATTCGA	CCACCAAGCG	
3051	AAACATCGCA	TCGAGCGAGC	ACGTACTCCG	ATGGAGCCCG	GTCTTGTCGA	
3101	TCAGGATGAT	CTGGACGAAG	AGCATCAGGG	GCTCGCGCCA	GCCGAACTGT	
3151	TCGCCAGGCT	CAAGCGCGCG	ATGCCCGACG	GCGAGGATCT	CGTCGTGACC	
3201	CATGGCGATG	CCTGCTTGCC	GAATATCATG	GTGGAAAATG	GCCGCTTTTC	
3251	TGGATTTCAT	GACTGTGGCC	GGCTGGGTGT	GGCGGACCCG	TATCAGGACA	
3301	TAGCGTTGGC	TACCCGTGAT	ATTGCTGAAG	AGCTTGGCGG	CGAATGGGCT	
3351	GACCGCTGCG	TCGTGCTTTA	CGGTAGCGCC	GCCCCCGATT	CGCAGCGCAT	
3401	CGCCTTCTAT	CGCCTTCTTG	ACGAGTTCTT	CTGAGCGGGA	CCCAAGCTTC	
3451	GACGGATCTC	GACCTGCAGG	CATGCCCCGT	GAATCACCAC	GTCTCTCTCT	
3501	ACAAATCTAT	CTCTCTCTAT	AATAATGTGT	GAGTAGTTCC	CAGATAAGGG	
3551	AATTAGGGTT	CTTATAGGGT	TTGCTCATG	TGTTGAGCAT	ATAAGAAACC	
3601	CTTAGTATGT	ATTTGTATTT	GTAANAATCT	TCTATCAATA	AAATTTCTAA	
3651	TTCTCTAAAC	CAAAATCCAG	GGGTACCAGG	CTCGAATTCA	AGCTTGGCAG	
3701	TGGCCGTCGT	TTTACAACGT	CGTGACTGGG	AAAACCCCTG	CGTTACCCAA	
3751	CTTAATCGCC	TTGCAGCACA	TCCCCTTTTC	GCCAGCTGGC	GTAATAGCGA	
3801	AGAGGCCCGC	ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTGCGCAGC	CTGAATGGCG	
3851	AATGGCGCCT	GATGCGGTAT	TTTCTCCTFA	CGCATCTGTG	CGGTATTTC	
3901	CACCGCAAGC	TTCTCGAGGT	CATTTCATATG	CTTGAGAAGA	GAGTCGGGAT	Actin1 Promotor
3951	AGTCCAAAAT	AAAACAAAGG	TAAGATTACC	TGTCAAAAGG	TGAAAACATC	(aus Reis)
4001	AGTTTAAAAGG	TGTTATAAGT	AAAATATCCG	TAATAAAAAG	TGGCCCAAAG	
4051	TGAAAATTAC	TCTTTTCTAC	TATTATAAAA	ATTGAGGATG	TTTTTGCGGT	
4101	ACTTTGATAC	GTCAATTTTG	TATGAATTTG	TTTTTAAGTT	TATTCGCGAT	
4151	TTGGAAATGC	ATATCTGFAT	TTGAGTCGGT	TTTTAAGTTC	GTTGCTTTTG	
4201	TAAATACAGA	GGGATTGTGA	TAAGAAATAT	CTTTAAAAAA	CCCATATGCT	
4251	AATTTGACAT	AATTTTGTAG	AAAAATATAT	ATTCAGGCGA	ATTCCACAAT	
4301	GAACAATAAT	AAGATTAATA	TAGCTTGCCC	CCGTTGCAGC	GATGGTATT	
4351	TTTTCTAGTA	AAATAAAAAG	TAAACTTAGA	CTCAAAAACAT	TTACAAAAAC	
4401	AACCCCTAAA	GTCTTAAAGC	CCAAAGTGCT	ATGCACGATC	CATAGCAAGC	
4451	CCAGCCCAAC	CCAACCCAAC	CCAACCCACC	CCAGTGCAGC	CAACTGGCAA	
4501	ATAGTCTCCA	CCCCCGGCAC	TATCACCCGT	AGTTGTCCGC	ACCACCCGAC	
4551	GTCTCGCAGC	CAAAAAAATA	AAAAAAGAGA	AAAAAAGAAA	AAAGAAAAAC	
4601	AGCAGGTGGG	TCCGGTCCGT	GGGGCCCGGA	AAAGCGAGGA	GGATCCGGAC	
4651	CAGCGACGAG	GCCCGGCCCT	CCCTCCGCTT	CCAAAAGAAC	GCCCCCATCC	
4701	GCCACTATAT	ACATACCCCC	CCCTCTCCTC	CCATCCCCCC	AACCCCTCCAC	
4751	CACCACCACC	ACCACCTCCA	CCTCCTCCCC	CCTCGTGC	GGACGACGAG	
4801	CTCCTCCCCC	CTCCCTCC	GCCGCGCCG	CGCCGTAAC	CACCCCGCCC	
4851	CTCTCCTCTT	TCTTTCTCCG	TTTTTTTTTT	CCGTCTCGGT	CTCGATCTTT	
4901	GGCCTTGGTA	GTTTGGGTGG	GCGAGAGGCG	GCTTCGTGCG	CGCCAGATC	
4951	GGTGCGCCGG	AGGGCCGGGA	TCTCGCGGCT	GGGGCTCTCG	CCGGCGTGG	
5001	TCCGGCCCGG	ATCTCGCGGG	GAATGGGGCT	CTCGGATGTA	GATCTGCGAT	
5051	CCGCCGTTGT	TGGGGGAGAT	GATGGGGGGT	TAAAAATTTT	CGCCATGCTA	
5101	AACAAGATCA	GGAAGAGGGG	AAAAGGGCAC	TATGGTTTAT	ATTTTATAT	
5151	ATTTCTGCTG	CTTCGTCAAG	CTTAGATGTG	CTAGATCTTT	CTTTCTCTT	
5201	TTTGTGGGTA	GAATTTGAAT	CCCTCAGCAT	TGTTTCATCG	TAGTTTTTCT	
5251	TTTCATGATT	TGTGACAATG	CAGCCTCGTG	CGGAGCTTTT	TTATGGCTAA	
5301	TCTTCGTTTA	ATGATCACTT	TAATCACGGT	TTTAATGATC	ACCAATCAT	AtCKX2
5351	CAAACGGTAT	TAAAATTGAT	TTACCTAAAT	CCCTTAACCT	CACCCTCTCT	
5401	ACCGATCCTT	CCATCATCTC	CGCAGCCTCT	CATGACTTCG	GAACATAAC	
5451	CACCGTGACC	CCCGCGGGCG	TAATCTGCC	CTCCTCCACC	GCTGATATCT	
5501	CTCGTCTCCT	CCAAATACGCC	GCAAACGGAA	AAAGTACATT	CCAAGTAGCG	
5551	GCTCGTGGCC	AAGGCCACTC	CTTAAACGGC	CAAGCCTCGG	TCTCCGGCGG	
5601	AGTAATCGTC	AACATGACGT	GTATCACTGA	CGTGGTGGTT	TCAAAGACA	
5651	AGAAGTACGC	TGACGTGGCG	GCCGGGACGT	TATGGGTGGA	TGTGCTTAAG	
5701	AAGACGGCGG	AGAAAGGGGT	GTCCCGGTTT	TCTTGGACGG	ATTATTTGCA	
5751	TATAACCGTC	GGAGAACGT	TGTCGAATGG	TGGAATGGT	GGTCAAGTGT	
5801	TTCGAAACGG	TCCTCTTGGT	AGTAACGTC	TGGAATGGGA	CGTTATTACT	
5851	GGGAAAGGTG	AAATGTTGAC	ATGCTCGCGA	CAGCTAAACC	CAGAATGTTT	
5901	CTATGGAGTG	TTAGGAGGTT	TGGGTCAATT	TGGAATTATA	ACGAGAGCCA	
5951	GAATTTGTTT	GGACCATGCA	CCTAAAACGG	CCAAATGGTT	TGGATGCTC	
6001	TACAGTGATT	TCACAACCTT	TACAAAGGAC	CAAGAACGTT	TGATATCAAT	
6051	GGCAAACGAT	ATTGGAGTCG	ACTATTTAGA	AGGTCAAATA	TTTCTATCAA	
6101	ACGGTGTGCT	TGACACCTCT	TTTTTCCACC	CTTCAGATCA	ATCTAAAGTC	
6151	GCTGATCTAG	TCAAGCAACA	CGGTATCATC	TATGTTCTTG	AAGTAGCCAA	
6201	GTATTATGAT	GATCCCAATC	TCCCATCAT	CAGCAAGGTT	ATTGACACAT	
6251	TAACGAAAAC	ATTAAGTTAC	TTGCCCGGGT	TCATATCAAT	GCACGACGTC	
6301	GCCTACTTCG	ATTTCTTGAA	CCGTGTACAT	GTGCAAGAAA	ATAAATCAG	
6351	ATCTTTGGGA	TTATGGGAAC	TTCCATCATC	TTGGCTTAAAC	CTCTACGTTT	
6401	CTAAATCTCG	GATTCTCGAT	TTTCATAACG	GTGTTGTCAA	AGACATTCTT	
6451	CTTAAGCAAA	AATCAGCTTC	GGGACTCGCT	CTTCTCTATC	CAACAAACCG	
6501	GAATAAATGG	GACAAATCGTA	TGTCGGCGAT	GATACCAGAG	ATCGATGAAG	
6551	ATGTTATATA	TATTATCGGA	CTACTACAAT	CCGCTACCCC	AAAGGATCTT	
6601	CCAGAAGTGG	AGAGCGTTAA	CGAGAAGATA	ATTAGGTTTT	GCAAGGATTC	
6651	AGGTATTAAAG	ATTAAGCAAT	ATCTAATGCA	TTACTACTAGT	AAAGAAGATT	
6701	GGATTGAGCA	TTTTGGATCA	AAATGGGATG	ATTTTTCGAA	GAGGAAAGAT	
6751	CTATTTGATC	CCAAGAAACT	GTTATCTCCA	GGGCAAGACA	TCTTTTGATT	
6801	AACTTAATGT	GATATGTCAT	TTGTGAGGTC	TAATATCTAA	AACTATAATA	
6851	TAGTTACTAT	ATAATAATAG	CATTTTGGTG	GAAGTAAAT	TGGGTACAAG	
6901	TAAAGCGGCC	GCCCGGCTGC	AGATCGTTCA	AAACATTTGGC	AATAAAGTTT	NOS 3T
6951	CTTAAGATTG	AATCCTGTTG	CCGGTCTTGC	GATGATTATC	ATATAATTTT	
7001	TGTTGAATTA	CGTTAAGCAT	GTATAAATTA	ACATGTAATG	CATGACGTTA	
7051	TTTATGAGAT	GGGTTTTTAT	GATTAGAGTC	CCGCAATTAT	ACATTTAATA	
7101	CGCGATAGAA	AACAAAATAT	AGCGCGCAAA	CTAGGATAAA	TTATCGCGCG	
7151	CTGAGTTCAT	TATGTTACTA	GATCCGATGA	TAAGCTGTCA	AACATGAGAA	
7201	TTGGGGATCC	ACTAGTTCTA	GATGGTGAC	TCTCAGTACA	ATCTGCTCTG	
7251	ATGCCGCATA	GTTAAGCCAG	CCCCGACACC	CGCCAACACC	CGCTGACGCG	
7301	CCCTGACGGG	CTTGTCTGCT	CCCGGCATCC	GCTTACAGAC	AAGCTGTGAC	
7351	CGTCTCCGGG	AGTGCATGTT	GTACAGAGTT	TTCAACCCTCA	TCACCGAAAC	
7401	GCGCGAGACG	AAAGGGCCTC	GTGATACGCC	TATTTTTTATA	GGTTAATGTC	
7451	ATGATAATAA	TGGTTTCTTA	GACGTCAGGT	GGCCTTTTTC	GGGAAATGT	
7501	CGCGCGAACC	CCTATTTGTT	TATTTTTTCTA	AATACATTCA	AATATGTATC	
7551	CGCTCATGAG	ACAATAACCC	TGATAAATGC	TTCAATAATA	TTGAAAAAGG	
7601	AAGAGTATGA	GTATTCAACA	TTTCCGTGTC	GCCCTTATTC	CCTTTTTTGC	
7651	GGCATTTTGC	CTTCTGTTTT	TTG			

6.4 Phylogenetische Analyse von *Physcomitrella* ADKs

Tab. 23 Vergleich der Homologie (% Identität) verschiedener ADKs aus Moos, Samenpflanzen, Säugetieren, Algen, Moosfarnen und Hefe auf Grundlage der abgeleiteten AS- Sequenzen. Die Werte wurden nach paarweisem Alignment mittels Clustal-W gewonnen. In blau sind die Werte größer als 85% markiert. Fett markiert sind Werte die innerhalb der verschiedenen Gruppen (Samenpflanzen, Algen, u.s.w.) die höchste Homologie mit den jeweiligen *PpADK*-Sequenzen aufzeigen. Die Accession Nummern für die verwendeten Sequenzen sind in 2.3 angegeben.

ORGANISMEN	Moos			Samenpflanzen									Grünalgen			Moosfarn		Säugetiere				Hefe	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
(1) <i>PpADK1</i>	X																						
(2) <i>PpADK2</i>	87	X																					
(3) <i>PpADK3</i>	64	59	X																				
(4) <i>MtADK</i>	67	63	62	X																			
(5) <i>AtADK1</i>	65	62	61	84	X																		
(6) <i>AtADK2</i>	66	62	61	83	92	X																	
(7) <i>NtADKiso2S</i>	66	61	60	85	85	85	X																
(8) <i>OsjADK1</i>	66	64	62	83	79	80	81	X															
(9) <i>PtADK1</i>	67	62	63	88	83	85	86	84	X														
(10) <i>StADKiso1T</i>	68	63	61	85	84	85	90	83	87	X													
(11) <i>VvADK</i>	67	63	62	89	84	86	86	84	91	88	X												
(12) <i>ZmADK</i>	68	63	62	83	83	83	82	89	87	84	86	X											
(13) <i>CrADK</i>	57	55	52	56	57	56	55	56	55	56	55	56	X										
(14) <i>VcADK</i>	59	58	54	58	58	58	56	59	58	58	57	59	90	X									
(15) <i>OiADK</i>	57	55	51	56	56	56	56	56	58	57	56	59	53	53	X								
(16) <i>SmADK1</i>	71	67	64	75	71	72	73	72	75	74	75	73	58	59	57	X							
(17) <i>SmADK2</i>	70	66	64	74	70	71	72	71	74	73	74	73	57	58	57	98	X						
(18) <i>RnADK</i>	52	50	50	57	57	57	56	58	58	57	57	58	48	50	49	54	54	X					
(19) <i>CgADK</i>	52	50	50	56	57	56	56	57	57	56	56	58	48	51	49	54	53	91	X				
(20) <i>EcADK</i>	53	51	50	57	56	56	56	57	58	57	57	58	48	49	47	53	51	91	90	X			
(21) <i>HsADK</i>	51	50	49	56	55	54	54	56	57	55	56	57	48	48	46	51	50	90	92	94	X		
(22) <i>PsADK</i>	43	39	41	42	44	43	42	41	42	43	42	43	39	40	40	42	42	44	46	41	41	X	

6.5 Phylogenetische Analyse von *Physcomitrella* CKXs

Tab. 24 Identität (%) der *Physcomitrella* CKX-Sequenzen mit denen von weiteren Organismen. Die AS-Sequenzen wurden mittels Clustal-W verglichen. In blau sind die höchsten Homologie-Werte innerhalb der Gen-Familie einer Spezies markiert. Fett markiert sind die Werte der Organismen, die eine Homologie über 45% mit den jeweiligen *PpCKX*-Genen teilen. In orange markiert sind die Werte, die innerhalb der restlichen Spezies eine Homologie von über 50% zeigen. Die Accession-Nummern der verwendeten Sequenzen sind in 2.3 angegeben. Uzl.: Unizelluläre Organismen

6.6 Verteilung der endogenen Cytokinine beim Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten tADK1-21 und tADK1-26

Tab. 25 Konzentrationen der Isoprenoid-Cytokinine bei Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten, tpCA1-21 bzw. tpCA1-26 im Gewebe (pmol/g). Diese Untersuchung erfolgte im Labor von Dr. Vaclav Motyka, Institute of Experimental Botany, Prag, Tschechische Republik. u.d.N. unterhalb der Nachweisgrenze.

Genotyp	Tag	iPRMP	iPR	iP	tZRMP	tZR	tZROG	tZ	tZOG	cZRMP	cZR	cZROG	cZ	cZOG	dHZRMP	dHZR	dHZROG	dHZ	dHZOG
Wildtyp	T0	4,1	1,0	2,3	u.d.l.	u.d.l.	2,9	0,4	2,9	43	4,2	263	4,7	11,4	u.d.l.	1,3	3,9	3,1	2,7
	T1	5,2	1,5	1,7	u.d.l.	u.d.l.	1,4	0,0	0,0	76	4,2	207	0,5	3,9	u.d.l.	1,3	2,6	1,5	1,2
	T2	6,0	1,4	1,2	u.d.l.	u.d.l.	2,3	0,0	0,0	69	5,5	265	2,2	2,7	u.d.l.	0,2	2,1	0	1,0
	T3	4,4	1,4	0,8	u.d.l.	u.d.l.	1,1	0,0	3,6	51	4,7	208	0,8	3,0	u.d.l.	1,1	0	0	0
	T4	5,2	1,2	0,9	u.d.l.	u.d.l.	0,5	0,0	0,6	94	7,3	257	0,4	1,6	u.d.l.	0,0	1,8	0	0
	T5	10,4	3,2	1,1	u.d.l.	u.d.l.	3,5	0,0	0,0	141	15,7	579	1,9	9,7	u.d.l.	0,0	2,5	0,9	2,3
	T6	5,4	2,5	7,2	u.d.l.	u.d.l.	1,5	1,3	2,1	67	19,3	277	2,3	4,4	u.d.l.	1,4	1,5	0,7	1,3
	T7	2,9	1,1	5,2	u.d.l.	u.d.l.	3,4	3,1	0,9	25	9,5	427	8,4	13,1	u.d.l.	0,9	1,7	0,6	1,6
	T8	3,5	1,5	1,1	u.d.l.	u.d.l.	1,1	0,0	0,0	34	4,0	303	1,1	13,3	u.d.l.	0,5	0,8	0	0,8
T9	4,7	1,2	1,6	u.d.l.	u.d.l.	2,2	0,0	0,0	96	45,9	364	2,9	17,8	u.d.l.	0	2,6	0	0,0	
tADK1-21	T0	0,5	3,2	16,7	u.d.l.	u.d.l.	4,1	u.d.l.	3,2	20,7	1,6	190,5	1,7	4,4	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	13,6	2,8
	T2	13,5	8,4	5,5	u.d.l.	u.d.l.	4,8	u.d.l.	0,0	9,3	0	286,5	0,6	15,7	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	11,2	0,9
	T4	10,0	1,5	4,9	u.d.l.	u.d.l.	4,7	u.d.l.	0,0	3,9	0,5	333,3	1,4	15,4	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	1,8	0,4
	T6	6,5	1,4	3,0	u.d.l.	u.d.l.	3,4	u.d.l.	0,9	4,7	0	578,9	1,7	4,6	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	7,5	0,7
	T8	3,7	0,9	2,3	u.d.l.	u.d.l.	2,4	u.d.l.	0,3	2,7	0	286,1	0,4	2,7	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	13,8	0,8
	T10	5,2	1,9	3,4	u.d.l.	u.d.l.	2,4	u.d.l.	0,3	7,2	0	492,8	0,7	5,6	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	24,6	0,4
tADK1-26	T0	1,2	2,4	9,5	u.d.l.	u.d.l.	17,1	u.d.l.	0,8	17,1	u.d.l.	445,5	3,3	20,0	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	5,1	0,3
	T2	2,0	0,9	5,4	u.d.l.	u.d.l.	15,0	u.d.l.	0,5	2,7	u.d.l.	506,5	2,6	12,7	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	16,5	0,2
	T4	3,0	1,1	4,0	u.d.l.	u.d.l.	23,1	u.d.l.	0,6	3,5	u.d.l.	793,5	3,1	21,9	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	6,3	0,2
	T6	3,9	1,7	3,0	u.d.l.	u.d.l.	23,9	u.d.l.	1,1	3,1	u.d.l.	677,9	0,2	11,0	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	3,1	0,3
	T8	1,9	1,2	2,3	u.d.l.	u.d.l.	15,5	u.d.l.	1,1	2,9	u.d.l.	511,3	0,2	9,8	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	0,3	0,4
	T10	3,3	1,8	3,9	u.d.l.	u.d.l.	22,3	u.d.l.	0,8	2,8	u.d.l.	1029,0	0,8	13,9	u.d.l.	u.d.l.	u.d.l.	4,0	0,6

Tab. 26 Konzentration der Isoprenoid-Cytokinine bei Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten, tADK1-21 bzw. tADK1-26 im Medium (pmol/100 ml). (Weitere Angaben s. Tab. 25) n.B. nicht bestimmt.

Genotyp	Tag	iPRMP	iPR	iP	tZRMP	tZR	tZROG	tZ	tZOG	cZRMP	cZR	cZROG	cZ	cZOG	dHZRMP	dHZR	dHZROG	dHZ	dHZOG
Wildtyp	T0	n.B.	0,39	0,42	n.B.	0,73	0,67	1,70	0	n.B.	3,80	2,85	0,73	1,38	n.B.	0,62	0,31	0,43	1,10
	T1	n.B.	0,54	0,93	n.B.	0,81	0,90	0,00	1,77	n.B.	1,98	4,35	1,05	1,42	n.B.	0,76	0,39	0	0,98
	T2	n.B.	0,45	1,07	n.B.	0,72	0,92	1,42	1,34	n.B.	1,96	5,10	0,36	1,19	n.B.	0,76	0	0	1,05
	T3	n.B.	0,72	2,76	n.B.	1,05	0,79	1,20	1,60	n.B.	1,88	5,65	0,90	2,28	n.B.	0,98	0,40	0,77	1,06
	T4	n.B.	0,45	0,54	n.B.	0,83	0,86	0,86	1,43	n.B.	2,05	6,00	1,04	2,20	n.B.	0,82	0,34	0,82	0,80
	T5	n.B.	0,49	0,70	n.B.	0,71	0,72	u.d.N.	1,54	n.B.	1,93	6,90	0,99	2,87	n.B.	0,69	0,31	1,05	1,06
	T6	n.B.	0,52	0,76	n.B.	0,84	0,79	u.d.N.	1,30	n.B.	2,03	9,95	0,95	1,06	n.B.	0,70	0,00	0,00	1,00
	T7	n.B.	0,47	0,49	n.B.	1,04	0	u.d.N.	1,28	n.B.	1,85	8,20	1,61	1,76	n.B.	0,60	0,36	0,48	0,80
	T8	n.B.	0,60	1,92	n.B.	0,70	0,71	u.d.N.	1,50	n.B.	2,29	7,75	1,73	1,13	n.B.	0,79	0,13	0,99	0,74
	T9	n.B.	0,58	1,31	n.B.	0,87	0,99	u.d.N.	1,58	n.B.	1,98	9,94	2,74	2,33	n.B.	0,71	0,44	1,18	0,87
tADK1-21	T0	n.B.	1,33	2,42	n.B.	u.d.N.	0,54	u.d.N.	0,46	n.B.	0,79	23,00	0,52	0,34	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	0,88	0,60
	T2	n.B.	1,69	2,90	n.B.	u.d.N.	0,30	u.d.N.	0,10	n.B.	3,50	17,80	0,64	0,59	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	0,50	0,24
	T4	n.B.	2,60	3,50	n.B.	u.d.N.	0,28	u.d.N.	0,17	n.B.	3,60	23,00	0,95	0,62	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	0,54	0,36
	T6	n.B.	2,90	3,30	n.B.	u.d.N.	0,16	u.d.N.	0,22	n.B.	3,30	27,00	1,00	0,88	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	0,00	0,26
	T8	n.B.	3,20	4,80	n.B.	u.d.N.	0,76	u.d.N.	0,19	n.B.	3,10	33,00	2,49	1,42	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	0,64	0,68
	T10	n.B.	4,10	3,90	n.B.	u.d.N.	0,43	u.d.N.	0	n.B.	4,00	43,00	4,90	1,72	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	0,44	0,72
tADK1-26	T0	n.B.	0,44	1,59	n.B.	u.d.N.	0,19	u.d.N.	0,05	n.B.	u.d.N.	5,50	0	0,15	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,24
	T2	n.B.	0,56	2,60	n.B.	u.d.N.	0,37	u.d.N.	0	n.B.	u.d.N.	10,40	0,48	0,38	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,04
	T4	n.B.	0,69	2,70	n.B.	u.d.N.	0,72	u.d.N.	0,04	n.B.	u.d.N.	12,40	0,50	0,52	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,40
	T6	n.B.	0,61	1,57	n.B.	u.d.N.	0,41	u.d.N.	0	n.B.	u.d.N.	13,30	0,73	0,34	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,23
	T8	n.B.	0,56	1,49	n.B.	u.d.N.	0,49	u.d.N.	0,05	n.B.	u.d.N.	15,40	0,41	0,29	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,36
	T10	n.B.	0,92	2,23	n.B.	u.d.N.	1,20	u.d.N.	0	n.B.	0,02	36,92	1,35	0,51	n.B.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,43

6.7 Konzentrationen von ABA und IAA beim Wildtyp und den *PpADK1*-Transformanten tADK1-21 und tADK1-26

Tab. 27 Konzentrationen von ABA und IAA bei Wildtyp und *PpADK1*-Transformanten in Gewebe (pmol/g) und Medium (pmol/100 ml), sowie Angaben von Gewicht und Volumina, die für die Bestimmung der verschiedenen Hormone verwendet wurden (Cytokinine, ABA und IAA).

Genotyp	Tag	Gewebe		Medium	
		ABA	IAA	ABA	IAA
Wildtyp	T0	12,9	39,5	0,7	14,8
	T1	29,1	166,8	0,6	11,8
	T2	11,8	62,6	0,6	13,2
	T3	10,3	60,9	0,8	6,1
	T4	9,6	68,8	1,1	12,3
	T5	16,9	65,9	1,4	8,5
	T6	13	49,2	1,2	10,1
	T7	4,4	127,8	1,2	17,2
	T8	6,9	109,7	1,6	23,2
	T9	11,2	211,3	1,6	17,6
tADK1-21	T0	95,7	153,4	39	2,1
	T2	5,6	31	371	1,5
	T4	9,8	29	172	2,2
	T6	10,6	29,7	257	0,1
	T8	6,5	22,5	231	1,9
	T10	4,4	23,5	269	13,8
tADK1-26	T0	9,7	19,2	2,7	0,8
	T2	5,3	19,3	9	2
	T4	8,3	26,4	9,3	1,9
	T6	14,5	37,3	11,9	1,6
	T8	4,6	21,2	0	0
	T10	12,1	25,5	14,9	8,6

Genotyp	Tag	Gewebe	Medium
		Gewicht (mg)	Volumina (ml)
Wildtyp	T0	230	50
	T1	225	50
	T2	262	50
	T3	338	50
	T4	288	50
	T5	213	50
	T6	398	50
	T7	288	50
	T8	473	50
	T9	305	50
tADK1-21	T0	147	50
	T2	178	50
	T4	246	50
	T6	285	50
	T8	402	50
	T10	345	50
tADK1-26	T0	404	50
	T2	612	50
	T4	460	50
	T6	461	50
	T8	577	50
	T10	379	32,5

6.8 Darstellung der endogene Cytokinine beim WT und die tCKX-Transformanten tCKX7 und tCKX16

Tab. 28 Cytokininkonzentrationen bei Wildtyp und tCKX-Transformanten im Gewebe, angegeben in pmol/g, Werte entsprechen Mittelwerten aus drei verschiedenen Kulturen mit Angaben der jeweiligen Standardabweichungen. Messungen durchgeführt von Dr. O. Novak und Prof. Dr. M. Strnad, Palacky Universität, Olomouc, Tschechische Republik. u.d.N. unterhalb der Nachweisgrenze.

Genotyp	Tag	iPRMP	iPR	iP	dHZRMP	dHZR	dHZROG	dHZ	dHZOG	BARMP	BAR	BA	m-T	o-T
Wildtyp	T0	331,8±36	30,8±2,9	10,9±2,4	u.d.N	0,07±0,04	4,5±1,5	0,38±0,04	u.d.N	u.d.N	0,53±0,10	6,1±0,80	7,9±2,6	6,2±2,5
	T10	159,9±6	8,9±0,8	5,0±0,6	u.d.N	0,10±0,03	2,6±0,4	0,08±0,03	u.d.N	u.d.N	0,48±0,14	3,1±1,5	0,9±0,2	0,9±0,2
	T20	63,0±22	2,7±0,9	3,2±0,5	u.d.N	0,07±0,02	2,2±0,6	0,05±0,02	u.d.N	u.d.N	0,41±0,18	4,2±0,3	1,8±0,4	0,9±0,2
tCKX7	T0	329,5±41	62,1±3,5	9,5±2,4	u.d.N	0,09±0,04	4,4±0,9	0,32±0,08	u.d.N	u.d.N	1,47±0,62	6,2±2,8	5,4±0,9	6,0±2,5
	T10	154,4±39	16,1±4,7	2,2±0,3	u.d.N	0,09±0,02	3,1±0,3	0,06±0,02	u.d.N	u.d.N	0,25±0,04	2,2±0,4	1,2±0,1	0,7±0,1
	T20	127,1±40	8,3±2,8	2,3±0,3	u.d.N	0,05±0,01	0,1±0,0	0±0	2,1	u.d.N	0,85±0,34	3,1±0,3	2,0±0,3	0,8±0,1
tCKX16	T0	280,6±82	35,8±4,1	7,1±2,9	u.d.N	0,16±0,03	2,9±0,5	0,26±0,01	u.d.N	u.d.N	0,63±0,14	5,2±1,5	3,2±0,2	3,0±0,2
	T10	107,9±30	19,7±7,5	2,6±0,9	u.d.N	0,12±0,03	2,5±0,4	0,08±0,02	u.d.N	u.d.N	0,18±0,04	2,2±0,3	1,8±0,8	1,1±0,4
	T20	52,3±17	2,1±0,7	1,6±0,4	u.d.N	0,16±0,01	1,8±0,5	0,07±0,01	u.d.N	u.d.N	0,71±0,09	3,8±1,8	0±0	0,8±0,1

Genotyp	Tag	tZRMP	tZR	tZROG	tZ	tZOG	cZRMP	cZR	cZROG	cZ	cZOG
Wildtyp	T0	68,1±12,5	0,91±0,2	170,4±51,3	13,5±1,3	14,8±4,8	71,7±12,7	13,5±2,3	645,5±207,3	2,7±0,3	51,5±15,4
	T10	11,1±3,0	0,44±0,1	100,8±14,9	4,4±1,2	5,5±1,7	27,5±10,9	14,2±1,2	338,4±36,1	2,1±1,0	33,0±12,1
	T20	4,6±1,3	0,23±0,0	83,7±15,4	19,3±6,4	4,9±0,8	20,2±7,8	14,1±0,9	319,2±65,8	1,0±0,2	26,9±2,7
tCKX7	T0	53,8±15,0	0,55±0,2	109,2±20,7	8,5±1,9	7,6±1,2	54,2±16,8	14,5±2,0	626,8±137,3	2,0±0,1	41,2±7,4
	T10	13,3±5,4	0,31±0,1	85,0±11,0	1,2±0,5	3,6±1,0	33,0±12,6	18,3±1,9	457,0±30,9	1,3±0,3	43,4±9,2
	T20	3,3±0,2	0,29±0,1	64,5±13,8	16,2±7,5	4,4±1,0	5,2±1,3	19,6±4,1	312,6±40,1	1,0±0,3	11,2±2,0
tCKX16	T0	43,7±16,9	0,28±0,0	55,3±16,0	3,8±1,2	5,6±1,8	40,6±11,5	20,9±5,5	439,8±88,1	2,4±0,3	38,6±11,1
	T10	7,9±3,5	0,40±0,1	49,6±11,5	0,7±0,2	2,7±0,9	22,6±9,8	27,9±2,0	359,1±46,3	1,9±0,5	34,5±9,3
	T20	4,5±1,5	0,35±0,1	29,3±7,8	5,8±0,7	2,3±0,3	24,8±6,4	25,3±5,9	264,0±53,9	1,2±0,3	8,5±2,4

Tab. 29 Vorkommen endogener Cytokinine bei WT und tCKX-Transformanten im Medium, Werte in pmol/100 ml (Gesamtvol. 200 ml). Die angegebenen Werte sind der Mittelwert aus drei verschiedenen Kulturen mit Angaben der jeweiligen Standardabweichungen. (Weitere Angaben s.Tab. 28)

Genotyp	Tag	iPRMP	iPR	iP	dHZRMP	dHZR	dHZROG	dHZ	dHZOG	BARMP	BAR	BA	m-T	o-T
Wildtyp	T0	0,1 ±0,01	0,01±0,00	0,5 ±0,08	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
	T10	10,4 ±1,00	3,34±0,34	10,6 ±3,08	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
	T20	16,0 ±2,14	3,30±0,03	3,8 ±0,67	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
tCKX7	T0	0,1 ±0,05	0,04±0,01	3,3 ±0,62	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
	T10	7,8 ±2,86	0,17±0,08	0,2 ±0,06	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
	T20	11,7 ±1,65	0,17±0,08	0,1 ±0,03	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
tCKX16	T0	0,06±0,02	0,01±0,00	0,06±0,02	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
	T10	5,2 ±1,84	0,34±0,16	0,3 ±0,15	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.
	T20	7,9 ±2,84	0,38±0,17	0,3 ±0,12	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.

Genotyp	Tag	tZRMP	tZR	tZROG	tZ	tZOG	cZRMP	cZR	cZROG	cZ	cZOG
Wildtyp	T0	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,077±0,011	0,024±0,005	0,135±0,040	0,012±0,003	0,006±0,001	0,075±0,024	0,032±0,015
	T10	0,023±0,011	0,036±0,012	0,008±0,001	0,202±0,051	0,786±0,169	0,164±0,046	0,080±0,014	0,035±0,005	0,150±0,036	0,052±0,018
	T20	0,034±0,009	0,031±0,005	0,020±0,002	0,197±0,097	0,608±0,247	0,146±0,020	0,196±0,028	0,089±0,033	0,490±0,095	0,139±0,053
tCKX7	T0	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.	0,231±0,017	0,057±0,005	0,053±0,021	0,039±0,019	0,017±0,002	0,361±0,039	0,077±0,016
	T10	u.d.N.	0,019±0,002	0,013±0,000	0,098±0,012	0,512±0,086	0,150±0,069	0,112±0,022	0,074±0,022	0,025±0,006	0,018±0,008
	T20	0,038±0,004	0,020±0,005	0,051±0,009	0,145±0,068	0,535±0,206	0,250±0,100	0,576±0,212	0,315±0,075	0,036±0,006	0,037±0,004
tCKX16	T0	u.d.N.	0,008±0,002	u.d.N.	0,138±0,034	0,039±0,008	0,042±0,004	0,008±0,003	0,008±0,000	0,016±0,007	0,009±0,002
	T10	u.d.N.	0,015±0,002	0,033±0,008	0,108±0,040	0,745±0,267	0,237±0,079	0,291±0,102	0,251±0,017	0,107±0,040	0,034±0,009
	T20	u.d.N.	0,022±0,010	0,069±0,020	0,130±0,062	0,429±0,199	2,712±1,006	1,532±0,755	1,397±0,661	0,275±0,074	0,206±0,091

Tab. 30 Gewicht in mg des untersuchten Gewebes, aus 200 ml Kultur.

Tag	Wildtyp	tCKX7	tCKX16
T0	25,2 ± 4,4	34,8 ± 1,7	31,6 ± 0,7
T10	86,1 ± 3,8	96,2 ± 7,2	91,6 ± 14,4
T20	102,5 ± 3,8	100,6 ± 0,5	100,6 ± 0,9

Fett: Mittelwert aus drei verschiedenen Kulturen (mit Standardabweichung)

6.9 Vorträge, Kongresse und Publikationen:

Publikationen:

Schwartzenberg K. v., Fernández Núñez M., Blaschke H., Dobrev P.I., Novák O., Motyka V., Strnad M., (2007) Cytokinins in the Bryophyte *Physcomitrella patens*: Analyses of Activity, Distribution, and Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Overexpression Reveal the Role of Extracellular Cytokinins, *Plant Physiology* 145:786-800

Zunke U., Fernandez-Nunez M., Ilmberger N., Hofmeier M., Konitz K., Doobe G. (2003) *Cameraria ohridella*, das HAM-CAM-Projekt 2002/03 in Hamburg. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 55, 10, 227-234.

Zunke U., Doobe G., Fernandez-Nunez M., Ilmberger N., Hofmeier M., Konitz K. (2003) Zur Biologie der Rosskastanien-Miniermotte *Cameraria ohridella*. Tagungsband der 21. Osnabrücker Baumpflegetage, Kapitel IV.

Vorträge:

Fernández Núñez M., Schwartzenberg K. v. (2005):

Cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression in the moss *Physcomitrella patens*. In: Auxins and Cytokinins in plant development International Symposium, Prag, Tschechische Republik, 7-12 July

Fernández Núñez M., Yevdakova N., Schulz P., Motyka V., Novák O., Schwartzenberg K.v. (2003): *Physcomitrella patens* „Low Cytokinin Transformants“ – down regulation of endogenous cytokinin content via cytokinin oxidase overexpression. In: Forschungstage der Universität Hamburg, 30-31 Oktober

Posters und Kongresse:

Fernández Núñez M., Blaschke H., Novák O., Strnad M., Motyka V., Schwartzenberg K. v. (2007) Distribution and activity of cytokinins in *Physcomitrella*. 125 Jahre Deutsche Botanische Gesellschaft Botanikertagung Universität Hamburg September 3-7

Blaschke H., Fernández Núñez M., Motyka V., Novák O., Schwartzenberg K.v. (2004) Cytokinin metabolic changes after CKX-Overexpression in *Physcomitrella*. Botanikertagung Braunschweig 5-10 Sept

Fernández Núñez M., Yevdakova N., Schulz P., Motyka V., Novák O., Schwartzenberg K. v. (2003) *Physcomitrella patens* „Low Cytokinin Transformants“ – down regulation of endogenous cytokinin content via cytokinin oxidase overexpression, Forschungstage der Universität Hamburg, 30-31 Oktober

Fernández Núñez M., Yevdakova N., Schulz P., Motyka V., Novák O., Schwartzenberg K. v. (2003) *Physcomitrella patens* „Low Cytokinin Transformants“ – down regulation of endogenous cytokinin content via cytokinin oxidase overexpression, Moos Annual International Conference for Moos Experimental Research in St. Louis, Missouri, USA 7-10 Sept 2003; **1. Preis bei Posterprämierung**

Fernández Núñez M., Schulz P., Schwartzenberg K.v. (2002) Modifikation of cytokinin metabolism in *Physcomitrella*. Botanikertagung Freiburg 22-27 September 2002

Fernández Núñez M., Schulz P., Schmölling T., Schwartzenberg K.v. (2002) Phenotypic changes after cytokinin oxidase overexpression in *Physcomitrella*. DFG Schwerpunktprogramm „Molekular Analysis of Phytohormone Action“ 2nd International Conference 21-23 März 2002

Besuch des 17th IPGSA 1-6 July 2001 in Brno, Tschechische Republik

Danksagung

Bei meinen Betreuern, Herrn Prof. Dr. Heinz Hahn, Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei und Herrn PD Dr. Klaus von Schwartzberg möchte ich mich herzlich für die hervorragende wissenschaftliche Anleitung, für Diskussionen und Anregungen sowie für konstruktive Kritik bedanken. Herrn PD Dr. Klaus von Schwartzberg danke ich darüber hinaus für seine hilfreichen Ratschläge nicht nur fachlicher, sondern auch organisatorischer Natur, für seinen Optimismus, seine Aufmunterungen und sein unerschütterliches Vertrauen in mich.

Ich danke Herrn Dr. Vaclav Motyka, Herrn Dr. Petre Dobrev, Herrn Jiri Malbek und Frau Alena Travnickova vom Institute of Experimental Botany (Prag, Tschechische Republik) für die Durchführung von HPLC-MS-Messungen und CKX-Enzymassays. Herrn Prof. Dr. Miroslav Strnad und Herrn Dr. Ondrej Novak vom Plant Growth Regulator Laboratory (Palacký University, Olomouc, Tschechische Republik) danke ich für die Durchführung der UPLC-MS/MS Cytokinin – Analyse.

Meinen Kolleginnen Frau Hanna Turčinov und Frau Dr. Hanna Richter danke ich für wichtige fachliche und unschätzbare freundschaftliche Ratschläge und die tolle Zeit im Labor und außerhalb. Sie haben mich, gerade auf den schweren letzten Metern, unermüdlich animiert.

Allen Mitarbeitern der Nutzpflanzenbiologie danke ich für wertvolle Unterstützung und jederzeitige Hilfsbereitschaft und ganz allgemein für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Für die Erhaltung des Laborbetriebes und für die Unterstützung bei der Literatursuche danke ich besonders Frau Susanne Bringe und Frau Vera Schwekendiek.

Der Universität Hamburg danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form der Graduiertenförderung.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, bei meinen Freunden und bei meinem Mann Felix bedanken – sie waren immer für mich da, haben sich mit um meine Tochter gekümmert und mir mit mehr oder minder sanftem Druck geholfen, den Blick auf das Ziel nicht zu verlieren.