

Einfluss von  
Xyloglucan Endotransglucosylasen/Hydrolasen  
auf die Wurzelentwicklung  
in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Tanja Rehders

Kiel, 2018

Erste Gutachterin:	Prof. Dr. Margret Sauter
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Dietrich Ober
Tag der mündlichen Prüfung:	14.12.2018

## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Wachstum der primären Zellwand .....	3
1.2 Die <i>XTH</i> -Genfamilie.....	5
1.3 Aufbau und Wachstum der Wurzel in <i>Arabidopsis</i> .....	7
1.4 Gen- <i>Knockout</i> und Genomeditierung.....	9
1.4.1 Posttranskriptionelle Regulation über amiRNA .....	10
1.4.2 Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 .....	11
1.5 Zielsetzung .....	12
<b>2 Material &amp; Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1 Material.....	13
2.1.1 Chemikalien & Enzyme.....	13
2.1.2 Primer .....	13
2.1.3 Medien & Lösungen .....	13
2.1.3.1 Medien zur Anzucht von Bakterien .....	13
2.1.3.2 Medien zur Anzucht von Pflanzen.....	14
2.1.4 Pflanzen.....	15
2.2 Methoden .....	16
2.2.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> & <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	16
2.2.2 Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
2.2.3 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
2.2.4 Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	17
2.2.5 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.2.7 Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.2.9 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	20
2.2.10 Herstellung chemisch kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	20

2.2.11 Transformation chemisch kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	21
2.2.12 Allgemeine Klonierungstechniken .....	21
2.2.13 Gateway <sup>TM</sup> - Rekombinationsreaktion.....	22
2.2.14 Isolierung von genomischer DNA.....	22
2.2.15 Isolierung von Gesamt-RNA .....	23
2.2.16 Reverse Transkription von RNA .....	23
2.2.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	24
2.2.18 Agarosegelelektrophorese .....	26
2.2.19 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR).....	26
2.2.20 Sequenzierung.....	27
2.2.21 Herstellung von Gewebe-Dünnschnitten.....	27
2.2.21.1 Einbettung von Pflanzenmaterial in Technovit <sup>®</sup> 7100.....	27
2.2.22 Histochemische GUS-Analyse .....	28
2.2.23 Mikroskopie und Bildaufnahmen.....	29
2.2.24 Computergestützte Analysen.....	29
2.3 Klonierungen.....	30
2.3.1 Klonierung von Promotor:GUS-Konstrukten.....	31
2.3.2 Klonierung von 35S:XTH:GFP-Konstrukten .....	31
2.3.3 Klonierung von artificial microRNA-Konstrukten.....	32
2.3.4 Klonierung von CRISPR/Cas9-Konstrukten.....	33
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Erzeugung und Identifizierung von XTH Knockout-Linien in Arabidopsis.....	36
3.1.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionslinien für XTH15, XTH16, XTH17 & XTH19 ....	36
3.1.2 Erzeugung und Auswahl der amiRNA-Linien zum XTH16-Knockdown .....	38
3.1.3 Erzeugung von XTH16- und XTH18-Knockout-Linien mit CRISPR/Cas9 .....	41
3.1.3.1 Nachweis des XTH16-Knockouts.....	42
3.1.3.2 Nachweis des XTH18-Knockouts.....	46
3.2 XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 werden in den Apoplasten sekretiert .....	49
3.3 Entwicklungs- und gewebespezifische Expression von XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19.....	50
3.3.1 Aktivität der XTH15- und XTH16-Promotoren während der Blütenentwicklung ....	51
3.3.1.1 Einfluss von XTH15 und XTH16 auf die Bildung von Samen.....	53

3.3.2 Promotoraktivität von <i>XTH15</i> , <i>XTH16</i> , <i>XTH17</i> , <i>XTH18</i> und <i>XTH19</i> in Hypokotylen etiolierter Keimlinge .....	54
3.3.2.1 Einfluss von <i>XTH15</i> , <i>XTH16</i> , <i>XTH17</i> , <i>XTH18</i> und <i>XTH19</i> auf das Streckungswachstum etiolierter Keimlinge .....	56
3.3.4 Aktivität von <i>XTH15</i> , <i>XTH16</i> , <i>XTH17</i> , <i>XTH18</i> und <i>XTH19</i> in der Wurzel.....	57
3.4 <i>XTH16</i> , <i>XTH17</i> und <i>XTH18</i> fördern das Wachstum von Lateralwurzeln.....	61
3.4.1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hat einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum der Lateralwurzeln .....	63
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>68</b>
4.1 Mit CRISPR/Cas9 können mit hoher Effizienz und Spezifität größere Deletionen induziert werden .....	68
4.2 Der <i>Knockout</i> von <i>XTH15</i> und <i>XTH16</i> führt zu in einer geringeren Anzahl von Samenanlagen .....	72
4.3 <i>XTH15</i> , <i>XTH16</i> , <i>XTH17</i> , <i>XTH18</i> und <i>XTH19</i> und ihre Rolle beim Streckungswachstum .....	74
4.4 <i>XTH15</i> , <i>XTH16</i> , <i>XTH17</i> , <i>XTH18</i> und <i>XTH19</i> sind auf unterschiedliche Weise am Wurzelwachstum beteiligt.....	75
4.5 Ausblick .....	77
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
Anhang.....	95
A1 Primer .....	95
A2 Vektoren .....	98
Eidesstattliche Erklärung .....	100
Danksagung .....	101
Lebenslauf .....	102

## Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
AA	Antimycin A	PS	<i>Protospacer</i>
ad	auffüllen bis	qRT-PCR	Quantitative <i>Realtime</i> PCR
amiR	<i>artificial microRNA</i>	R	relative Expressionsratio
bp	Basenpaar	rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
cDNA	komplementäre DNA	RT	Raumtemperatur
CDS	<i>Coding Sequence</i>	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	SD	Standardabweichung
Ct	threshold cycle	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMF	Dimethylformamid	SE	Standardfehler
DMSO	Dimethylsulfoxid	sgRNA	single-guide RNA
DPI	Diphenyliodonium Chlorid	TAE	Tris-Acetat-EDTA
E	<i>Realtime</i> PCR Effizienz	TfB	Transformation Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	UTR	untranslatierte Region
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	v/v	Volumen/Volumen
gDNA	genomische DNA	w/v	Masse/Volumen
GFP	grün fluoreszierende Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )	wt	Wildtyp
GUS	β-Glucoronidase	X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β- D-Glucuronsäure
LB	Medium nach Luria-Bertani	XEH	Xyloglucan Endohydrolase
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>	XET	Xyloglucan Endotrans- glucosylase
MOPS	(N-morpholino)- propansulfonsäure	XTH	Xyloglucan Endotrans- glucosylasen/Hydrolasen
MS	Murashige & Skoog	YEP	<i>yeast extract peptone</i>
OD	optische Dichte		
ORF	offener Leserahmen		

## Zusammenfassung

Xyloglucane sind Bestandteile der Zellwand Höherer Pflanzen und gehören zu den Hemizellulosen. Xyloglucan Endotransglucosylasen/Hydrolasen (XTHs) sind Enzyme, die in der Lage sind, spezifisch Xyloglucan zu spalten und zu ligieren. Daher wird angenommen, dass sie an der Bildung und Modifizierung primärer Zellwände beteiligt sind und dabei eine wichtige Rolle bei der kontrollierten Expansion von Zellen einnehmen. Denkbar sind auch Funktionen bei der Bildung von sekundären Zellwänden. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind 33 XTHs identifiziert worden, ihre genaue Funktion ist jedoch weitgehend ungeklärt. Um einen Einblick in die Rolle von XTHs bei der Etablierung der Wurzelarchitektur zu erlangen, wurden fünf Mitglieder der Untergruppe II, *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19*, die nach *in silico*-Analysen, in der Wurzel exprimiert werden, untersucht. Für genetische Analysen wurden Einfach- und Mehrfach-*Knockout*-Linien identifiziert oder erzeugt. Da für *XTH16* und *XTH18* keine T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung standen, wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems *Knockout*-Linien generiert. Es zeigte sich, dass der Funktionsverlust von *XTH16* oder *XTH18* dazu führt, dass Zellen der Lateralwurzeln weniger stark wachsen, wodurch die Lateralwurzeln von *xth16*- und *xth18*-Keimlingen insgesamt kürzer bleiben. Um eine Beteiligung von *XTH16* und *XTH18* an der Zellstreckung zu untermauern, wurden Hypokotyle etiolierter Keimlinge untersucht, da diese postembryonal ausschließlich durch Zellstreckung wachsen. *Promotor:GUS*-Analysen zeigten, dass alle fünf untersuchten *XTH*-Gene auch im Hypokotyl exprimiert sind. Es wurde jedoch in den *Knockout*-Linien keine Veränderung des Streckungswachstums beobachtet, sodass von einer spezifischen Funktion von *XTH16* und *XTH18* in wachsenden Lateralwurzeln ausgegangen werden kann. Des Weiteren zeigte die Analyse der gewebespezifische Expression auf, dass *XTH15* und *XTH16* während der Blütenentwicklung eine starke Expression in den reproduktiven Organen aufweisen. Beim Funktionsverlust einer oder beider Gene konnte eine verminderte Anzahl von Samenanlagen festgestellt werden. Dies könnte auf eine Funktion von *XTH15* und *XTH16* an der Entwicklung des Gynoeceums hinweisen. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit zueinander, scheinen die fünf *XTH*-Gene differenzierte Funktionen in der Entwicklung der Pflanze entwickelt zu haben.

## Abstract

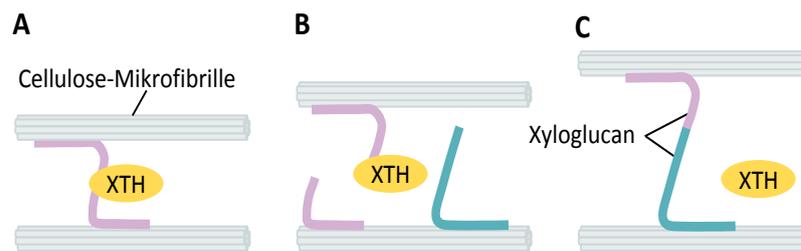
The hemicellulose xyloglucan is a major component of the primary cell wall of higher plants. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) are enzymes that are specialized in cleaving and fusing xyloglucan molecules. They are implicated in the formation and restructuring of primary cell walls, especially during the controlled expansion of cells. It is also plausible, that they take part in the formation of secondary cell walls. The Arabidopsis genome encodes 33 XTH genes, but their specific functions remain unclear. *In silico* analyses revealed expression of the subgroup II members *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18*, and *XTH19* in roots. To gain insight into the role of XTHs in root growth and structure, plants with single or multiple knockout of these genes were identified or generated. Since no T-DNA insertion lines were available for *XTH16* and *XTH18*, knockout lines were generated with the CRISPR/Cas9 system. The loss of function mutants *xth16* and *xth18* had shorter cells in the lateral roots and shorter lateral roots. In order to further test the hypothesis that XTH16 and XTH18 participate in cell elongation we studied hypocotyl elongation, because postembryonic growth of hypocotyls takes place through cell extension only. *Promoter:GUS* analyses showed that all five XTH genes were expressed in the hypocotyl. However, elongation growth was not altered in the knockout lines, suggesting a specific function of XTH16 and XTH18 in lateral root elongation. Furthermore, tissues-specific expression analyses revealed strong promoter activities of *XTH15* and *XTH16* in reproductive organs of developing flowers. Knockout of one or both genes lead to a decreased number of ovules. This may indicate a function of XTH15 and XTH16 in gynoecium development. Taken together, despite of their high sequence identity, the five XTH genes that were analyzed here were shown to possess specific functions in plant growth and development.

## 1 Einleitung

Zellwände sind ein charakteristisches Merkmal aller Pflanzen. Wachsende Zellen sind von einer primären Zellwand umgeben, die hauptsächlich aus komplexen Polysacchariden und einer kleinen Menge an Strukturproteinen besteht (McNeil *et al.*, 1984; Cosgrove, 2005). Primäre Zellwände werden während des Wachstums und der Teilung von Zellen gebildet und sind einerseits dünn und elastisch, während die Polysaccharide gleichzeitig ein starkes Netzwerk bilden, das wie ein Korsett den Protoplasten stützt und ihm seine Form verleiht (Cosgrove, 2005).

### 1.1 Wachstum der primären Zellwand

Am Aufbau der primären Zellwand sind drei Arten von Polysacchariden beteiligt: Cellulose, Hemicellulosen und Pektine (Carpita & Gibeaut, 1993; Fry, 2010). Cellulose-Mikrofibrillen bilden das starre Grundgerüst der Zellwand und verleihen ihr ihre Festigkeit. Die Mikrofibrillen haben einen Durchmesser von 3-5 nm und sind mehrere Mikrometer lang (Cosgrove, 2005). Sie entstehen durch spontane Zusammenlagerung und Kristallisation dutzender  $\beta$ -1,4-verknüpfter Glucanketten, die an der Plasmamembran synthetisiert werden (McFarlane, Döring & Persson, 2014). Die Mikrofibrillen sind in eine Matrix aus Pektinen und Hemicellulosen eingelagert. Hemicellulosen binden entweder über Wasserstoffbrücken an die Oberfläche der Cellulose oder können stellenweise in die Mikrofibrillen eingeschlossen werden, sodass ein stabiles Netzwerk entsteht (Fry, 1989; Hayashi, 1989). Schließlich bilden Pektine eine dichte, wässrige Gelmatrix, wodurch die Polymere der Zellwand miteinander verbunden werden (Mohnen, 2008). Pektine und Hemicellulosen werden im Golgi-Apparat synthetisiert und von dort in den Apoplasten transportiert. Dort werden sie spontan oder enzymatisch katalysiert in das bestehende Netzwerk der Zellwand integriert (Scheller & Ulvskov, 2010). Dies ist besonders entscheidend während sich Zellen im Wachstum befinden. Wenn Pflanzenzellen wachsen, muss die Zellwand ebenfalls wachsen. Dies geschieht durch eine kontrolliert Ausdehnung der Zellwand, was dadurch ermöglicht wird, dass parallel angeordnete Cellulose-Mikrofibrillen auseinander rücken. Hierbei spielen Expansine eine entscheidende Rolle. Bei diesen handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die durch



**Abbildung 1-1: Die Aktivität von XTHs als Endotransglucosylasen.**

Das Enzym führt zwei Reaktionen aus, zuerst eine Spaltung einer glykosidischen Bindung im Xyloglucan-Rückgrat, gefolgt von der Neubildung der Bindung mit einer zweiten Xyloglucankette. **(A)** Das XTH-Enzym bindet an eine Xyloglucanverbindung (in lila dargestellt) zwischen zwei benachbarten Cellulose-Mikrofibrillen (grau). **(B)** Nach dem Schneiden des Xyloglucan-Rückgrats bleibt einer der Stränge kovalent an die katalytische Stelle des Enzyms gebunden. **(C)** Durch die Ligation mit einer anderen Xyloglucankette (blau) wird ein hybrides Xyloglucan gebildet (lila/blau).

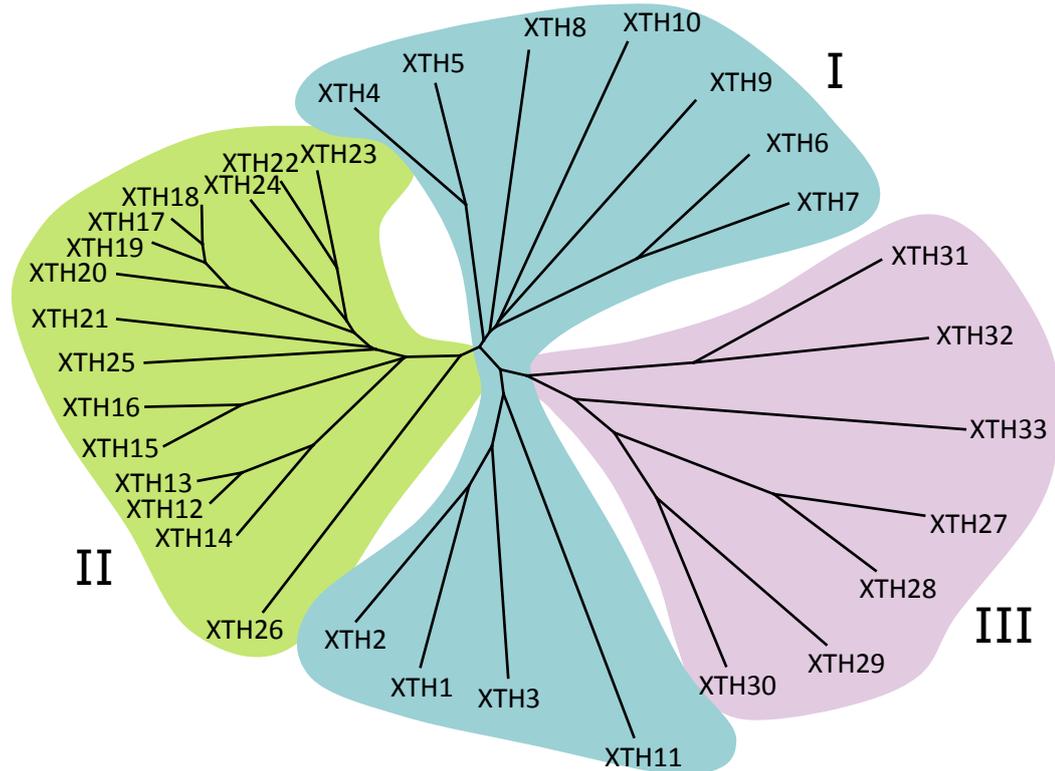
einen niedrigen pH-Wert aktiviert werden und sie daher eine wichtige Funktion beim Säurewachstum einnehmen (Rayle & Cleland 1970; McQueen-Mason & Cosgrove 1995). Expansine lösen die Wasserstoffbrücken zwischen den Polysacchariden der Zellwand, sodass diese sich gegeneinander verschieben oder auseinander driften können und die Zellwand auf diese Weise an Fläche zunimmt (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995). Würde die Zellwand jedoch ausschließlich auf diese Weise wachsen, würde sie nach und nach immer dünner werden und dabei an Stabilität verlieren, bis sie schließlich nicht mehr in der Lage wäre, dem Turgordruck des Protoplasten standzuhalten und ein Platzen der Zelle zu verhindern. Aus diesem Grund werden während des Wachstums von Zellen laufend neue Zellwandpolysaccharide sekretiert und in die bestehende Zellwandmatrix integriert (Yanagisawa *et al.*, 2015). Charakteristisch für Hemicellulosen ist ein Rückgrat aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten (Scheller & Ulvskov, 2010). Daher wird angenommen, dass Endotransglucosylasen, Enzyme die in der Lage sind, Glucane zu spalten und neu zu verknüpfen, bei der Integration neuer Polysaccharide in die Zellwandmatrix beteiligt sind (Valent & Albersheim, 1974). Da Xyloglucan die am häufigsten vorkommende Hemicellulose in der primären Zellwand von dicotylen Pflanzen ist, wird angenommen, dass im Besonderen die auf die Spaltung und Ligation von Xyloglucanen spezialisierten Xyloglucan Endotransglucosylasen/Hydrolasen (XTH) eine Funktion bei der Verstärkung der primären Zellwand einnehmen (Nishitani & Tominaga, 1992; Scheller & Ulvskov, 2010). Es wird davon ausgegangen, dass Xyloglucan-Ketten die Verbindung benachbarter Cellulose-Mikrofibrillen darstellen. Durch XTHs wird die glykosidische Bindung im Xyloglucan-Rückgrat gespalten.

Anschließend verbleibt ein Ende der Xyloglucan-Kette an die katalytische Stelle des Enzyms gebunden, sodass dieses mit dem Ende einer anderen Xyloglucan-Kette ligiert werden kann. Wird dadurch die Verbindung zwischen den benachbarten Mikrofibrillen verlängert, können diese durch den Turgordruck des Protoplastens auseinandergeschoben werden und so die Zellwand an Fläche zunehmen.

## 1.2 Die *XTH*-Genfamilie

Bei XTHs handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind, spezifisch die Transglycosylierung und/oder Hydrolyse von Xyloglucanen zu katalysieren (Rose *et al.*, 2002). Durch die Aufschlüsselung der genomischen Sequenzen mehrerer Modelorganismen ist bekannt, dass diese üblicherweise über große *XTH*-Genfamilien mit zahlreichen Mitgliedern verfügen (Nishitani & Vissenberg, 2007). Beispielsweise besteht die *XTH*-Genfamilie von Reis (*Oryza sativa*) aus 29 und die der Balsampappel (*Populus thrichocarpa*) aus 41 Mitgliedern (Yokoyama, Rose & Nishitani, 2004; Geisler-Lee *et al.*, 2006). Sogar in dem vergleichsweise kleinen Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden 33 ORFs (*open reading frames*) gefunden. Von Yokoyama & Nishitani (2001a) wurde gezeigt, dass von allen 33 ORFs Transkripte nachweisbar sind, was darauf hindeutet, dass es sich um funktionelle Gene handelt. Diese liegen auf allen fünf Chromosomen verteilt, wobei etwa ein Drittel davon in Gruppen von zwei bis vier Genen zusammen vorliegen, was vermutlich das Resultat von Genduplikationen und -translokationen ist (Blanc *et al.*, 2000; Yokoyama & Nishitani 2001a).

Basierend auf phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen der Aminosäuresequenzen, sowie der Struktur und Organisation der Gene werden die XTHs in drei Untergruppen eingeteilt (Abbildung 1-2). Die meisten Mitglieder der Gruppe I besitzen vier Exons, der Gruppe II zwei oder drei Exons, während die Gene der Gruppe III vier bis fünf Exons haben (Yokoyama & Nishitani 2001a; Rose *et al.*, 2002). Zusätzlich könnten die phylogenetischen Unterschiede eine Unterscheidung der XTHs nach ihren hauptsächlichen Enzymaktivitäten, also Xyloglucan Endotransglucosylase (XET) oder Xyloglucan Endohydrolase (XEH) reflektieren. Tatsächlich konnte für einige Mitglieder der Untergruppen I und II gezeigt werden, dass diese *in vitro* ausschließlich XET-Aktivität besitzen (Okazawa *et al.*, 1993; Maris *et al.*, 2009, 2011), während XTHs, die *in vitro* XEH-Aktivität aufwiesen, zur Untergruppe III gehörten (Zhu *et al.*, 2012; Kaewthai *et al.*, 2013). Typisch für XTHs ist ein N-



**Abbildung 1-2: Phylogenetischer Verwandtschaft der XTH-Genfamilie in Arabidopsis.**

Basierend auf den vorhergesagten Aminosäuresequenzen der 33 XTH-Gene aus Arabidopsis wurde das Dendrogramm mit Hilfe von CLUSTALW und TreeView erstellt. Zur Visualisierung der Einteilung in die drei Untergruppen I, II & III sind diese in blau, grün und lila unterlegt.

terminales Signalpeptid, das für die Sekretion der Proteine in den Apoplasten verantwortlich ist (Yokoyama & Nishitani, 2001b). Außerdem haben die XTHs das DEIDFEFLG-Motiv gemeinsam, dass die katalytische Domäne sowohl für die XET-, wie auch XEH-Aktivität darstellt (Okazawa *et al.*, 1993; Campbell & Braam, 1998).

Durch Expressionsanalysen ist bekannt, dass die einzelnen XTHs in Arabidopsis unterschiedliche Profile bezüglich ihrer entwicklungs- und organspezifischen Expression aufweisen. Die Experimente von Becnel *et al.* (2006) deuten darauf hin, dass vermutlich in jedem Gewebe und zu jedem Entwicklungszeitpunkt ein oder sogar mehrere XTHs exprimiert werden. Zusammen mit dem ubiquitären Vorkommen von Xyloglucan in den unterschiedlichen Zelltypen weist dies darauf hin, dass XTHs an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt sind (Vissenberg *et al.*, 2005). Tatsächlich konnten XTHs schon mit einer Reihe unterschiedlicher Funktionen in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören zum Beispiel die Streckung von Blattstielen (Sasidharan *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2011), Wachstum der Stamina (Kurasawa *et al.*, 2008), das Wachsen und Reifen von

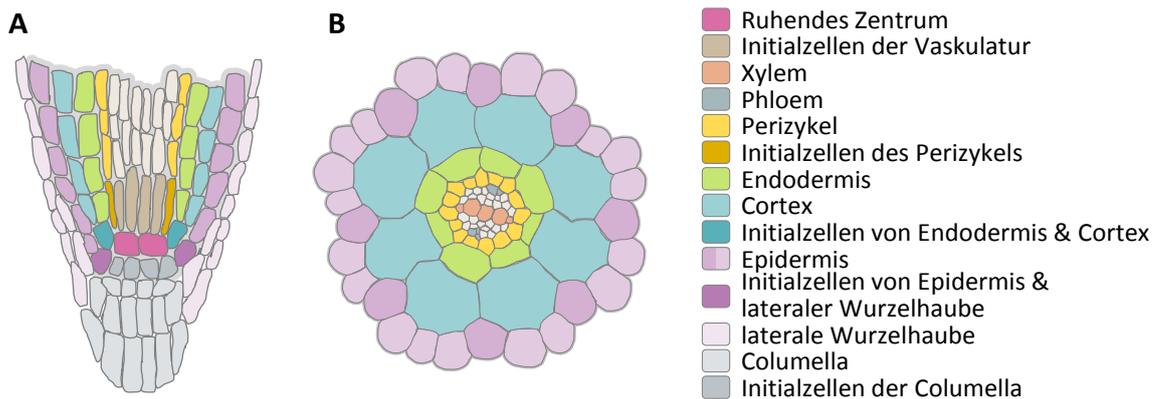
Früchten (Atkinson *et al.*, 2009; Miedes & Lorences, 2009), sowie die Vermittlung von Toleranzen gegenüber Trocken-, Aluminium- oder Salzstress durch die Anpassung der Wurzelzellwand und/oder des Wurzelwachstum (Cho *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013).

### 1.3 Aufbau und Wachstum der Wurzel in Arabidopsis

Im Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* sind *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* phylogenetisch nah miteinander verwandt und werden alle in der Wurzel exprimiert (Vissenberg *et al.*, 2005; Becnel *et al.*, 2006; diese Arbeit). Dies wirft die Frage auf, ob jedem dieser Gene eine bestimmte Rolle zukommt oder ob sie funktionell redundant sind. Um einen Einblick in die Funktionen dieser Gene zu gewinnen, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung und die Morphologie der Wurzel genauer untersucht.

Die Wurzel von Arabidopsis ist besonders einfach aufgebaut. Die einzelnen, in der Regel nur eine Zellschicht umfassenden Gewebeschichten sind als radiär symmetrische Zylinder um die Vaskulatur herum angeordnet. Die Vaskulatur wird von den Zellen des Perizykels umschlossen, darauf folgen Endodermis und Cortex. Das äußere Abschlussgewebe bildet die Epidermis, von welcher auch die Wurzelhaare gebildet werden (Dolan *et al.*, 1993). In der Spitze der Wurzel befindet sich das Apikalmeristem der Wurzel (RAM, *root apical meristem*), welches kontinuierlich neue Zellen für die stets wachsende Wurzel bildet. Den Mittelpunkt des RAM bildet das Ruhende Zentrum, eine Gruppe von Zellen, die mitotisch nicht sehr aktiv sind. Das Ruhende Zentrum wird von den Initialzellen (Stammzellen) umgeben, aus denen die verschiedenen Zelltypen der Wurzel hervorgehen (Scheres, 2007).

Anfangs besteht das Wurzelsystem nur aus der bereits während der Embryonalentwicklung angelegten Primärwurzel (Petricka, Winter & Benfey, 2012). Nachdem sich die einzelnen Zelltypen der Primärwurzel differenziert haben, entsteht das dynamisch wachsende Wurzelsystem ausschließlich durch die Verzweigung der bestehenden Wurzel. In der Differenzierungszone der Primärwurzel entstehen Lateralwurzeln, die aus über den Xylempolen gelegenen Perizykelzellen, genannt Gründerzellen, hervorgehen (Dolan *et al.*, 1993; Malamy, 2005). Die Bildung eines Lateralwurzelprimordiums beginnt mit einer ersten antiklinalen Zellteilung einer Gründerzelle, was das erste von sieben Stadien der Lateralwurzelentwicklung markiert (Malamy & Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2003). Während



**Abbildung 1-3: Aufbau der Wurzel von Arabidopsis.**

(A) Schematischer Längsschnitt durch die Wurzelspitze. Das Apikalmeristem befindet sich in der Mitte der Wurzelspitze und umfasst das Ruhende Zentrum, welches von den Initialzellen umgeben wird. (B) Der schematischer Querschnitt durch die Wurzel zeigt die symmetrische Anordnung der verschiedenen Gewebeschichten, die in konzentrischen Kreisen um das Leitgewebe herum organisiert sind. Abbildung modifiziert nach Cederholm, Iyer-Pascuzzi & Benfey, (2012).

der letzten Entwicklungsstufen wird das Primordium zunehmend der Spitze der Primärwurzel ähnlicher, bis schließlich alle Zelltypen, die in der Primärwurzel vorhanden sind, inklusive des RAM, *de novo* entstanden sind (Benfey, Bennett & Schiefelbein, 2010). Letztlich tritt das Primordium aus der Primärwurzel hervor und die neuentstandene Lateralwurzel beginnt zu wachsen. Während des Wachstums der Primär- und Lateralwurzeln werden sukzessive neue Primordien initiiert, so dass im Laufe der Zeit ein immer komplexeres Wurzelsystem entsteht.

Während des Wachstums der Wurzeln entstehen durch Teilung der Initialzellen neue Zellen, die während ihres Reifeprozesses drei verschiedene Entwicklungsphasen, die namensgebend für die entsprechenden Zonen der Wurzel sind, durchlaufen. In jedem dieser Entwicklungsstadien kommt der Zellwand, oder genauer gesagt ihrer Synthese oder Modifikation eine wichtige Rolle zu. In der meristematischen Zone teilen sich die Zellen, so dass viele kleine Zellen entstehen (Verbelen *et al.*, 2006). Die Zellteilung in Pflanzen erfolgt durch Bildung einer Zellplatte als Vorläufer der neuen Querwand. Diese dehnt sich seitlich aus und fusioniert schließlich mit der Zellwand der Mutterzelle, wodurch die Tochterzellen voneinander getrennt werden. Anschließend wird die Zellplatte zur Mittellamelle und von den beiden Tochterzellen wird eine neue Primärwand aufgebaut. (Samuels, Giddings & Staehelin, 1995). Beim Verlassen der meristematischen Zone gehen die Zellen in die Elongationszone über, wo sie die Fähigkeit, sich zu teilen, verlieren und ein

Streckungswachstum einsetzt, wodurch sich die Zellen um ein vielfaches verlängern (Verbelen *et al.*, 2006). Wenn das Streckungswachstum der Zellen beendet ist, gelangen die Zellen in die Differenzierungszone (Verbelen *et al.*, 2006). Ein wichtiges Merkmal dieser Zone ist die Ausbildung von Wurzelhaaren, die durch polares Spitzenwachstum von speziellen Epidermiszellen, den Trichoblasten, entstehen. Sowohl das Wachstum der Zellen in der Elongationszone, wie auch die Ausbildung der Wurzelhaare gehen mit einer starken Volumenzunahme der Zellen einher, wobei die Zellwand der Zellen irreversibel ausgedehnt wird. Um dabei ein Dünnerwerden der Wand, bis hin zur mechanischen Instabilität, zu verhindern, werden stetig neue Wandpolymere synthetisiert und in die bestehende Wand integriert (Yanagisawa *et al.*, 2015; Cosgrove, 2018). Dabei wird den XTHs eine bedeutende Rolle zugeschrieben, da diese durch die Spaltung und Ligation von Xyloglucan-Ketten für die Integration neuer Xyloglucan-Moleküle in die bestehende Zellwand verantwortlich sind.

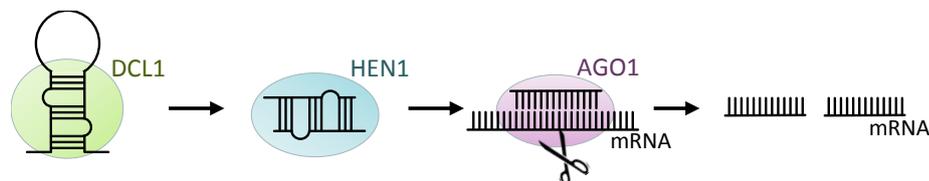
### 1.4 Gen-*Knockout* und Genomeditierung

Für die Aufschlüsselung von Genfunktionen in revers-genetischen Ansätzen sind Organismen mit genetischen Veränderungen, die zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust eines Gens führen, besonders hilfreich. Für den Modellorganismus *Arabidopsis* wurden bereits mehrere Sammlungen von Linien erstellt, wie beispielsweise *Syngenta Arabidopsis Insertion Library* (McElver *et al.*, 2001; Sessions *et al.*, 2002) oder *Salk Institute Genome Analysis Laboratory* (Alonso *et al.*, 2003), die durch Agrobakterien transferierte DNA-Fragmente (T-DNA) im Genom tragen. Die Integration dieser T-DNAs führt zu stabilen, vererbaren Mutationen, die, je nach Integrationsort, die Transkription eines Gens verändern oder ausschalten. Zwar konnte durch diese Projekte bereits eine hohe Abdeckung des *Arabidopsis*genoms erreicht werden, jedoch stehen für manche Gene, wie beispielsweise *XTH16* und *XTH18*, bisher keine T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Um auch in einem solchen Fall eine revers-genetische Analyse durchführen zu können, kann eine posttranskriptionelle Regulation des zu untersuchenden Gens durch RNA-Interferenz (RNAi) induziert werden (Bartel, 2004; Schwab *et al.*, 2006). Bei RNAi binden kleine, nicht-kodierende RNAs an komplementäre *messenger RNAs* (mRNAs), wodurch diese entweder direkt zum Abbau markiert werden oder die Translation der entsprechenden mRNA unterdrückt wird. Da es dabei in der Regel nur zu einem teilweisen Funktionsverlust des Gens kommt, spricht

man hier von einem *Knockdown*. Durch die Etablierung der CRISPR/Cas9-Technologie (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) als molekulargenetisches Werkzeug ist es möglich, Veränderungen im Genom von Pflanzen gezielt zu induzieren und dadurch einen spezifischen *Knockout* eines Gens herbeizuführen (Jinek *et al.*, 2012; Schiml & Puchta, 2016).

### 1.4.1 Posttranskriptionelle Regulation über amiRNA

Bei natürlich vorkommenden *microRNAs* (miRNA) handelt es sich um kleine nicht-kodierende RNAs, welche im Genom kodiert liegen (Bartel, 2004). miRNAs werden als lange einzelsträngige Transkripte abgelesen, welche sich dann zu einer fehlerhaften Haarnadelstruktur zusammenfalten. Diese Vorläufer-miRNAs werden im Nukleus von der RNase DICER-LIKE 1 (DCL1), welche im Komplex mit weiteren Proteinen aktiv ist, in zwei Stufen prozessiert (D'Ario, Griffiths-Jones & Kim, 2017), sodass schließlich etwa 20 Nukleotid große RNA-Duplexe, bestehend aus miRNA und miRNA\*, entstehen (Kurihara & Watanabe, 2004). Nachdem diese dann von HUA ENHANCER 1 (HEN1) an den 3'-Enden methyliert wurden (Yu *et al.*, 2005), wird angenommen, dass eine bislang unbekannte Helikase an der Spaltung der miRNA/miRNA\*-Duplexe beteiligt ist (Kim, Han & Siomi, 2009). Während die miRNA\* degradiert wird, bildet die miRNA zusammen mit der Nuklease ARGONAUTE1 (AGO1) den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Hammond *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009). Von der miRNA gelenkt, bindet AGO1 an die entsprechende, komplementäre mRNA, welche dann von AGO1 degradiert wird (Baumberger & Baulcombe, 2005; Ossowski *et al.*, 2008). Bei der Anwendung von amiRNAs wird das System der natürlichen miRNAs genutzt, um einen *Knockdown* des entsprechenden Gens auszulösen.



**Abbildung 1-4: Biogenese von miRNAs in Pflanzen.**

Das zur Haarnadelstruktur gefaltete miRNA-Transkript wird von DCL1 prozessiert, anschließend werden die entstandenen RNA-Fragmente von HEN1 methyliert. Durch die gebundene, einzelsträngige miRNA wird AGO1 zur Ziel-mRNA gelenkt, welche dann durch AGO1 degradiert wird.

### 1.4.2 Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9

In der Natur dienen CRISPR/Cas9-Systeme als adaptives Immunsystem vieler Prokaryoten, um sich vor Fremd-DNA von Viren oder Bakteriophagen zu schützen (Jansen *et al.*, 2002; Horvath & Barrangou, 2010). Dafür werden Teile der Fremd-DNA zwischen den CRISPR-Sequenzen, als sogenannten *Protospacer*, in das Genom integriert (Barrangou *et al.*, 2007). Diese werden dann als *CRISPR-RNA* (crRNA), die durch den *Protospacer* einen zur Fremd-DNA komplementären Bereich aufweist, transkribiert. Die crRNA hybridisiert mit einer zweiten RNA, der *transactivating CRISPR RNA* (tracrRNA) (Deltcheva *et al.*, 2011). Der Hybrid aus crRNA und tracrRNA bildet die sogenannte *guide-RNA* (gRNA), welche mit dem Cas9-Protein assoziiert (Jinek *et al.*, 2012). Dadurch kann Fremd-DNA, welche die *Protospacer*-Sequenz trägt, wiedererkannt und gezielt degradiert werden (Barrangou *et al.*, 2007; Garneau *et al.*, 2010).

Mit der Etablierung des CRISPR/Cas9-System als molekularbiologischem Werkzeug wurde es möglich, das Genom von Pflanzen mit hoher Effizienz gezielt zu verändern (Schiml & Puchta, 2016). Die Methode beruht darauf, dass durch die Auswahl spezifisch gewählter *Protospacer*-Sequenzen, die als Fusionskonstrukt mit der tracrRNA als sogenannte *single-guide RNA* (sgRNA) transkribiert werden, die Cas9-Nuklease zu dem gewünschten Genlokus gelenkt wird, sodass dort gezielt ein Doppelstrangbruch in der DNA induziert wird. Wird dieser anschließend von der Pflanze mit dem fehleranfälligen *non-homologous end joining* (NHEJ) repariert, werden mit großer Wahrscheinlichkeit Punktmutationen eingefügt (Salomon & Puchta, 1998; Weterings & Chen, 2008). Durch einen Basenaustausch im kodierenden Bereich von Genen können *Missense*- oder *Nonsense*-Mutationen entstehen, kommt es zur Insertion oder Deletion einzelner Nukleotide, kann dadurch eine Verschiebung des Leserahmens verursacht werden, was dann den *Knockout* des jeweiligen Gens zur Folge haben kann. Ein großer Unterschied zur der Generierung von *Knockout*-Linien durch die Integration von T-DNAs besteht darin, dass bei der Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems der Genlokus nicht durch die Integration T-DNA selbst mutagenisiert wird, sondern dies erst nachträglich, durch die darauf kodiert liegende Kombination von sgRNA und Cas9-Nuklease, geschieht. Daher muss sichergestellt werden, dass Mutationen tatsächlich in die Keimbahn eingetreten sind und an die folgende Generation vererbt werden. Dies ist am wahrscheinlichsten, wenn die Mutation bereits früh in der Entwicklung aufgetreten ist und

dabei bereits in Zellen des Apikalmeristems auftrat, bevor sich aus diesen die reproduktiven Blütenorgane entwickeln (Fauser, Schiml & Puchta, 2014). Aber auch Mutationen die zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung auftreten, können in die nächste Generation vererbt werden, sofern diese in Zellen auftreten, die in die Keimbahn eintreten. Daher ist es möglich, in der T2 verschiedene Genotypen zu erhalten. Zum einen ist es möglich, dass Pflanzen der T2-Generation die Mutation nicht geerbt haben und nur das Wildtyp-Allel tragen. Auch ist es möglich, dass die Mutation weitergegeben wurde und die Nachkommen für diese homo- oder heterozygot sind. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, dass man transheterozygote Nachkommen erhält. Das bedeutet, dass die beiden Allele des Gens verschiedene Mutationen, die unabhängig voneinander entstanden sind, tragen. Darüber hinaus können, solange sich die Cas9-Nuklease im Genom befindet und noch intakte Erkennungssequenzen vorhanden sind, stets auch neue Mutationen erzeugt werden.

## 1.5 Zielsetzung

Die Hemicellulose Xyloglucan ist eine der Hauptbestandteile der primären Zellwand von Gefäßpflanzen. XTHs sind Enzyme, die an der Modifizierung von Xyloglucan beteiligt sind. Sie werden durch eine große Genfamilie mit 33 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana* kodiert. In der vorliegenden Arbeit sollten die Genfunktionen von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* analysiert werden. Um Rückschlüsse auf die Funktion der Gene ziehen zu können, sollte die gewebespezifische Expression sowohl *in silico*, als auch mit Hilfe von *Promotor:GUS* Reporterlinien untersucht werden. Ein weiteres Ziel bestand in der Funktionsanalyse über revers-genetische Ansätze. Dabei sollte zum einen eine mögliche Beteiligung von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* oder *XTH19* am Streckungswachstum von Zellen analysiert werden. Dazu sollte die Expression der Gene in Hypokotylen von im Licht oder im Dunkeln angezogen Keimlingen über Reporterlinien und Realtime PCR verglichen werden. Zum anderen sollte die Rolle der Gene bei der Etablierung der Wurzelmorphologie untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, sollten T-DNA-Insertionslinien identifiziert werden. Da jedoch für *XTH16* und *XTH18* keine *Knockout*-Linien zur Verfügung standen, sollten *Knockdown-/Knockout*-Linien mit Hilfe von zunächst amiRNAs und dann CRISPR/Cas9 erzeugt werden. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der Gene zueinander, sollten außerdem Mehrfachmutanten erzeugt werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien & Enzyme

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse (p. a.)* von den Firmen *Duchefa Biochemie* (Haarlem, Niederlande), *Merck* (Darmstadt, Deutschland), *QIAGEN* (Hilden, Deutschland), *Roth* (Karlsruhe, Deutschland) und *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland) bezogen. Die eingesetzten Enzyme wurden von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) erworben.

#### 2.1.2 Primer

Die verwendeten PCR-Primer wurden von *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und in entsalzter Qualität bezogen. Nach Herstellerangaben wurden 100 µM Stamm- bzw. 10 µM Arbeitslösungen hergestellt und bei -20°C gelagert. Eine Liste der verwendeten Primer kann im Anhang A1 eingesehen werden.

#### 2.1.3 Medien & Lösungen

Für die Herstellung von Lösungen und Medien wurde stets Wasser der Qualität *Aqua bidest* aus einer Reinstwasser System Anlage (*SG-Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH*, Hamburg, Deutschland) verwendet. Zur Sterilisation wurden die Lösungen und Medien entweder für 20 Minuten auf 125°C und  $2 \cdot 10^5$  Pa erhitzt oder durch einen Sterilfilter mit einer von Porengrößen 0,2 µm oder 0,45 µm filtriert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist im entsprechenden Methodenteil beschrieben.

##### 2.1.3.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium	10 g/l Trypton
(Luria-Bertani, autoklaviert)	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	pH 7,0

YEP-Medium	10 g/l Pepton
( <i>yeast extract peptone</i> , autoklaviert)	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	pH 7,0

In Festmedien waren zusätzlich 15 g/l Agar enthalten. Die Lagerung beider Medien erfolgte bei RT. Die Selektion transformierter Bakterien wurde durch den Zusatz von einen oder mehreren Antibiotika ins Anzuchtmedium erreicht. Eine Übersicht über die eingesetzten Antibiotika, sowie die jeweils verwendete Endkonzentration ist in Tabelle 2-1 aufgeführt.

**Tabelle 2-1: Auflistung der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.**

Antibiotikum		Endkonzentration
Ampicillin	( <i>amp</i> <sup>100</sup> )	100 µg/ml
Gentamicin	( <i>gent</i> <sup>30</sup> )	30 µg/ml
Kanamycin	( <i>kan</i> <sup>50</sup> )	50 µg/ml
Rifampicin	( <i>rif</i> <sup>50</sup> )	50 µg/ml
Spectinomycin	( <i>spec</i> <sup>100</sup> )	100 µg/ml

### 2.1.3.2 Medien zur Anzucht von Pflanzen

1x MS-Medium (sterilfiltriert)	4,3 g Murashige & Skoog Medium, Basal Salt Mixture (Duchefa)
	30 g Saccharose
	ad 1 l H <sub>2</sub> O
	pH 5,5 - 5,8

0,8% (w/v) Gelrite (autoklaviert)	3,2 g Gelrite (Duchefa)
	ad 400 ml H <sub>2</sub> O

Die Lagerung des 1x MS-Mediums erfolgte bei 4°C, das Gelrite wurde bei RT aufbewahrt. Zur Herstellung des Standardmediums (0,5x MS-Medium; 0,4% Gelrite; 1,5% Saccharose) wurden MS-Medium und Gelrite auf etwa 60°C erwärmt und zu gleichen Teilen miteinander gemischt. Anschließend wurden 50 ml des Standardmediums in eine 12 x 12 cm Petrischale (*Greiner Bio-One*, Kremsmünster, Österreich) gegeben.

## 2.1.4 Pflanzen

Bei dem hier verwendeten Wildtyp (wt) handelt es sich um den Ökotyp *Columbia-0*. Die T-DNA-Insertionslinien wurden vom *NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Loughborough, UK)* erworben. Die transgenen Pflanzen wurden zunächst auf genomischer Ebene auf die jeweilige Mutation untersucht, anschließend wurde mittels RT-PCR (2.2.16) die An- bzw. Abwesenheit des entsprechenden Transkripts nachgewiesen.

**Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Arabidopsislinien.**

Name	Herkunft	Anmerkung
SALK_099891 ( <i>xth15-2</i> )	Alonso <i>et al.</i> , 2003	Insertion im 1. Exon von At4g14130
SAIL_693_B08 ( <i>xth16a</i> )	McElver <i>et al.</i> , 2001	Insertion im 5'UTR von At3g23730
SAIL_1216_B09 ( <i>xth16b</i> )	Sessions <i>et al.</i> , 2002	Keine Insertion nachweisbar
SAIL_595F06 ( <i>xth17-2</i> )	McElver <i>et al.</i> , 2001	Insertion im 1. Intron von At1g65310
GK_369E06 ( <i>xth19-1</i> )	Kleinboelting <i>et al.</i> , 2012	Insertion im 1. Exon von At4g30290
<i>xth16-5</i>	diese Arbeit (CRISPR/Cas9 für <i>XTH16</i> in wt)	
<i>xth15-2 xth16-9</i>	diese Arbeit (CRISPR/Cas9 für <i>XTH16</i> in <i>xth15-2</i> )	
<i>xth18-22</i>	diese Arbeit (CRISPR/Cas9 für <i>XTH18</i> in wt)	
<i>xth17-2 xth18-23</i>	diese Arbeit ( <i>xth17-2</i> x <i>xth18-23</i> <i>xth19-1</i> )	
<i>xth18-23 xth19-1</i>	diese Arbeit (CRISPR/Cas9 für <i>XTH18</i> in <i>xth19-1</i> )	
<i>xth17-2 xth18-23 xth19-1</i>	diese Arbeit ( <i>xth17-2</i> x <i>xth18-23</i> <i>xth19-1</i> )	
<i>miR xth16-A</i>	diese Arbeit ( <i>miR xth16-A</i> in wt)	
<i>miR xth16-B</i>	diese Arbeit ( <i>miR xth16-B</i> in wt)	
<i>miR xth16-C</i>	diese Arbeit ( <i>miR xth16-C</i> in wt)	
<i>xth15-2 miR xth16-A</i>	diese Arbeit ( <i>miR xth16-A</i> in <i>xth15-2</i> )	
<i>xth15-2 miR xth16-B</i>	diese Arbeit ( <i>miR xth16-B</i> in <i>xth15-2</i> )	
<i>XTH15:GUS</i>	diese Arbeit ( <i>pXTH15:GUS</i> in wt)	
<i>XTH16:GUS</i>	diese Arbeit ( <i>pXTH16:GUS</i> in wt)	
<i>XTH17:GUS</i>	diese Arbeit ( <i>pXTH17:GUS</i> in wt)	
<i>XTH18:GUS</i>	diese Arbeit ( <i>pXTH18:GUS</i> in wt)	
<i>XTH19:GUS</i>	diese Arbeit ( <i>pXTH19:GUS</i> in wt)	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* & *Nicotiana benthamiana*

#### Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht von *Arabidopsis* erfolgte abhängig vom Verwendungszweck entweder auf einem Gemisch zu gleichen Teilen aus Einheitserde und Sand oder steril auf Standardmedium (2.1.3.2). Nach der Aussaat wurden die Samen zunächst für 2 bis 4 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend in der Klimakammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel) bei einer Temperatur von 21°C und 60% Luftfeuchte kultiviert.

Die sterile Anzucht erfolgte mit oberflächensterilisierten Samen. Dazu wurde diese zunächst für 20 min in 2% (v/v) Natriumhypochlorid und 1.400 rpm (*Thermomixer comfort*, *Eppendorf*) inkubiert und dann fünfmalig mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Samen einzeln mit der Pipette auf Standardmedium ausgelegt. Die Anzucht der Keimlinge auf Standardmedium erfolgte in einem Winkel von 60°. Sollten Keimlinge mit 3-AT, AA, DPI oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt werden, wurden diese zunächst auf Standardmedium angezogen und nach 5 Tagen auf Medium mit entsprechendem Zusatz umgesetzt.

#### Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

*Nicotiana benthamiana* Samen wurden auf einem Gemisch aus zwei Teilen Vermehrungserde und einem Teil Lava ausgesät. Die Anzucht erfolgte in der Klimakammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel) bei einer Temperatur von 27°C und 70% Luftfeuchte.

### 2.2.2 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*

Da es sich bei *Arabidopsis* um einen Selbstbestäuber handelt, wurde der weibliche Kreuzungspartner vor dem Kreuzen emaskuliert. Dazu wurden unter dem Binokular noch geschlossene Blüten (Stadium 12 und 13, Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) geöffnet und die Antheren entfernt. Anschließend wurden vom männlichem Kreuzungspartner bereits geöffneten Blüten (Stadium 14 und 15, Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) mit einer Federstahlpinzette am Blütenboden erfasst und die Antheren auf das Stigma des weiblichen Kreuzungspartners getupft. Der erfolgreiche Transfer des Pollens konnte unter dem

Binokular überprüft werden. Alle nicht handbestäubten Blüten wurden anschließend entfernt.

### 2.2.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde in Anlehnung an die *floral dip* Methode (Clough & Bent, 1998) mittels Agrobakterien vom Stamm *GV3101* durchgeführt. Die zur Transformation bestimmten Pflanzen wurden auf Erde unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel, 21°C, 60% Luftfeuchte) angezogen. Es wurden bevorzugt Pflanzen verwendet, die Triebe mit einer Länge von 2 bis 10 cm aufwiesen. Am Vortag der Transformation wurden die Pflanzen gut gewässert. Außerdem wurde, um die Transformationsrate zu erhöhen, vor der ersten Transformation alle Blüten im Stadium 13 und älter (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) entfernt.

Am Vortag der Transformation wurden 2 ml YEP-Medium mit entsprechender Antibiotikazugabe mit einer Einzelkolonie transformierter *GV3101*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 28°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 µl der Vorkultur genutzt, um eine 4-ml-YEP-Kultur mit entsprechendem Antibiotikazusatz zu inokulieren. Diese wurde für 5 bis 6 h bei 28°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 4°C, 2000 x g) und in 4 ml YEP-Medium ohne Antibiotikazusatz aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,12 g Saccharose und 2 µl Silwett L-77 wurde die Bakteriensuspension tröpfchenweise auf den Blütenständen verteilt. Die Pflanzen wurden anschließend für 24 h im Dunkeln bei hoher Luftfeuchte gehalten, bevor sie wieder den Standardbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel, 21°C, 60% Luftfeuchte) ausgesetzt wurden. Im Abstand von 5 bis 7 Tagen wurde die Transformation noch einmal wiederholt.

### 2.2.4 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Für die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde eine Einzelkolonie transformierter *GV3101*-Zellen genutzt, um 5 ml YEP-Vorkultur mit entsprechendem Antibiotikazusatz (Tabelle 2-1) anzuimpfen. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 28°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Am Folgendem Tag wurde zunächst die OD<sub>600</sub> bestimmt, bevor die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 4°C,

2000 x g) pelletiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in Infiltrationsmedium resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt. Diese Infiltrationslösung wurde mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Infiltrationslösung in eine 5-ml-Spritze (ohne Kanüle) aufgezogen und in die Blattunterseite von 4 bis 6 Wochen alte Tabakpflanzen inokuliert. Die Auswertung wurde nach 3 bis 4 Tagen durchgeführt.

Infiltrationsmedium      10 mM MgCl<sub>2</sub>  
   150 µM Acetosyringon

### 2.2.5 Anzucht von *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurden *E. coli*-Zellen der Stämme *DH5α* und *DB3.1* verwendet. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium bei 37°C. Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden 4 ml flüssiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Die Lagerung der Bakterien erfolgte auf LB-Festmedium bei 4°C. Zur Selektion transformierter Zellen wurde dem Medium entsprechende Antibiotika (Tabelle 2-1) zugesetzt.

### 2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese zunächst auf LB-Festmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde eine Einzelkolonie verwendet, um 5 ml LB-Flüssigkultur zu inokulieren. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 300 µl der Vorkultur genutzt, um 100 ml LB-Kultur anzupflanzen. Diese Kultur wurde dann bei 37°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3 inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt und die Bakterienzellen möglichst auf Eis gehalten. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 1.000 x g) pelletiert und die Zellen in 80 ml Transformationspuffer 1 aufgenommen. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen wiederum pelletiert (5 min, 4°C, 1.000 x g) und anschließend in 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert. Die Zellen wurden dann in 100-µl-Aliquots in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Transformationspuffer 1 (sterilfiltriert)	30 mM Kaliumacetat
	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	100 mM KCl
	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	15% (v/v) Glycerin

Transformationspuffer 2 (autoklaviert)	10 mM MOPS, pH 7,0
	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM KCl
	15% (v/v) Glycerin

### 2.2.7 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut, bevor der zu transformierende Ligationsansatz hinzugegeben wurde. Darauf folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Danach wurde ein Hitzeschock für 35 s bei 42°C (*Thermomixer comfort, Eppendorf*) durchgeführt und die Zellen dann wieder für 2 bis 3 min auf Eis gehalten. Zur Regeneration der Zellen wurde 250 µl LB-Medium hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf LB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden zunächst 3 ml LB-Flüssigkultur mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 2 ml in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen pelletiert (5 min, RT, 18.320 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl Resuspensionslösung gelöst. Nach Zugabe von 200 µl Lysislösung wurde die Probe durch dreimaliges Invertieren gemischt und dann 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl der Neutralisierungslösung hinzugefügt, die Probe wiederum drei Mal invertiert und 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, RT, 18.320 x g) wurde

der Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, RT, 18.320 x *g*) pelletiert. Zum Waschen des Pellets wurden 500 µl 70% (v/v) Ethanol zugegeben und 10 min bei RT und 18.320 x *g* zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet bei RT getrocknet und abschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

Resuspensionslösung	50 mM Glucose 25 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 300 µg/ml RNase A ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> )
Lysislösung	400 mM NaOH 2% (w/v) SDS
Neutralisierungslösung	3 M Natriumacetat, pH 4,8

Wurde besonders reine Plasmid-DNA, beispielsweise zur Sequenzierung benötigt, wurde zur Aufreinigung der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.9 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agrobakterien vom Stamm *GV3101* verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in YEP-Medium bei 28°C. Die Lagerung der Zellen erfolgte auf YEP-Festmedium bei 4°C. Zur Selektion transformierter Zellen wurde dem Medium entsprechende Antibiotika (Tabelle 2-1) zugesetzt.

### 2.2.10 Herstellung chemisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Um chemisch kompetente *A. tumefaciens*-Zellen herzustellen, wurden die Bakterien zunächst auf YEP-Festmedium bei 28°C inkubiert, um anschließend 2 ml YEP-Vorkultur mit einer Einzelkolonie zu inokulieren. Die Inkubation der Vorkultur erfolgte über Nacht bei 28°C

und 250 rpm. Die Vorkultur wurde verwendet, um eine 50-ml-YEP-Kultur (*rif<sup>50</sup>/gent<sup>30</sup>*) anzupfen, welche dann bei 28°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,5 inkubiert wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 2.000 x g) pelletiert und in 10 ml 0,15 M NaCl resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (5 min, 4°C, 1.000 x g) und in 1 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Es wurde dann 15% (v/v) Glycerin zugesetzt, die Zellen in 200- $\mu$ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.11 Transformation chemisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Nachdem die chemisch kompetenten *A. tumefaciens* auf Eis aufgetaut wurden, wurde 1  $\mu$ g Plasmid-DNA hinzugefügt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf wurden die Zellen 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 2 bis 3 min bei 37°C (*Thermomixer comfort, Eppendorf*) aufgetaut. Zur Regeneration der Zellen wurde 1 ml YEP-Medium zugegeben und die Zellen 2 bis 4 h bei 28°C und 250 rpm (*Incubator shaker G25, New Brunswick Scientific*) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (2 min, RT, 500 x g) und in 100  $\mu$ l YEP-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf YEP-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen und für 2 bis 3 Tage bei 28°C inkubiert.

### 2.2.12 Allgemeine Klonierungstechniken

Zur Klonierung vorgesehene DNA-Fragmente wurden entweder über PCR synthetisiert oder durch Restriktion aus Plasmid-DNA gewonnen. In beiden Fällen wurde zunächst die gewünschte Größe der Fragmente mit Hilfe der horizontalen Agarosegelelektrophorese (2.2.18) überprüft und die entsprechenden Fragmente mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Sollten nur geringe Mengen von DNA eluiert werden, wurde das Volumen des Elutionspuffers entsprechend verringert.

Die Restriktion wurde mit konventionellen Restriktionsendonukleasen (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Sollte eine Rezirkulation von restringierten Vektoren während der Ligation verhindert werden, wurden diese mit der *FastAP Thermosensitive Alkaline*

*Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific) behandelt. Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben angewendet.

### 2.2.13 Gateway<sup>TM</sup>- Rekombinationsreaktion

Wenn möglich, wurde für Klonierungen die Gateway<sup>TM</sup>-Technologie (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Abweichend zu den Herstellerangaben setzte sich der Ansatz der Rekombinationsreaktion dabei wie folgt zusammen:

- 75 ng Zielvektor
- 75 ng Eingangsvektor
- ad 4 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl Gateway<sup>TM</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme Mix  
(Thermo Fisher Scientific)
- 2 h Inkubation bei RT
- 0,5 µl Proteinase K Lösung  
(Thermo Fisher Scientific)
- 10 min Inkubation bei 37°C

Anschließend wurde der Ansatz direkt zur Transformation in *E. coli* (2.2.7) eingesetzt.

War es nicht möglich das Gateway<sup>TM</sup>-System zu nutzen, wurden auf klassische Klonierungstechniken zurückgegriffen. Die Klonierungsstrategien sind detailliert im Abschnitt Klonierungen (2.3) dargestellt. Sämtliche Klonierungen wurden durch Sequenzierung auf die Korrektheit der gewünschten Sequenz überprüft.

### 2.2.14 Isolierung von genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA aus Arabidopsis wurden ein bis zwei junge Rosettenblätter mit 400 µl Extraktionspuffer in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Mikropistill sorgfältig zerkleinert. Durch Zentrifugation (5 min, RT, 18.320 x g) wurden die Gewebereste pelletiert und 300 µl des Überstands in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 300 µl Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wurde die

DNA gefällt und anschließen durch Zentrifugation (10 min, RT, 18.320 x *g*) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen (5 min, RT, 18320 x *g*). Nach dem Trocknen wurde das Pellets in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

DNA-Extraktionspuffer	200 mM Tris, pH 7,5
	250 mM NaCl
	25 mM EDTA, pH 8,0
	0,5% (w/v) SDS

### 2.2.15 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 500 µl TRI Reagent® (*Sigma-Aldrich*) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und das entsprechende Pflanzenmaterial darin mit Hilfe eines Mikropistills homogenisiert. Bei der gleichzeitigen Bearbeitung mehrerer Proben wurden diese auf Eis gehalten, bis das Homogenisieren aller Proben abgeschlossen war. Anschließend folgte eine fünfminütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 100 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben für 15 s kräftig geschüttelt, gefolgt von 2 bis 3 min Inkubation bei RT. Nach 15 min Zentrifugation (4°C, 12.500 x *g*) wurden bis zu 300 µl der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktiongefäß überführt und die RNA nach Zugabe von 125 µl Isopropanol und 125 µl *High Salt Solution* für 10 min bei RT gefällt. Durch eine weitere Zentrifugation (10 min, 4°C, 12.500 x *g*) wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 4°C, 12.500 x *g*), anschließend für 5 bis 10 min bei RT getrocknet und dann durch 10 min Inkubation bei 60°C und 1.400 rpm (*Thermomixer comfort, Eppendorf*) in 30 bis 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop™2000 (*Thermo Fisher Scientific*) bestimmt und die Qualität der RNA im Agarosegel (2.2.18) überprüft. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

<i>High Salt Solution</i>	0,8 M Natriumcitrat
	1,2 M NaCl

### 2.2.16 Reverse Transkription von RNA

Um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die Gesamt-RNA

vor der Erststrangsynthese zunächst mit RNase-freier DNase I (*Thermo Fisher Scientific*) behandelt. Die Ansätze dafür setzten sich wie folgt zusammen:

1 µg Gesamt-RNA  
1 U DNase I, RNase-frei  
2 µl 10x Reaktionspuffer (mit MgCl<sub>2</sub>)  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte durch 15 min Inkubation bei 75°C. Die anschließende Erststrangsynthese von cDNA wurde in folgenden Ansatz durchgeführt.

1 µg Gesamt-RNA (DNase I behandelt)  
0,2 mM dNTPMix  
0,2 µM Oligo-dT-Primer  
100 U *RevertAid Reverse Transcriptase* (*Thermo Fisher Scientific*)  
20 µl 5x Reaktionspuffer  
ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Die cDNA-Synthese wurde für 75 min bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde eine Inaktivierung des Enzyms durch 10 min Inkubation bei 70°C erreicht.

### 2.2.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erreicht. Wurde die PCR zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen durchgeführt, wurde die DreamTaq™ DNA Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet, sollten die erzeugten DNA-Amplifikate zur Klonierung verwendet werden, wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*) eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurden mit dem *Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler* (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Die standardmäßig verwendeten Ansätze werden im Folgenden beschrieben. Bei der Durchführung einer Kolonie-PCR, wurden Bakterien einer Einzelkolonie als Template zu dem Ansatz gegeben.

DreamTaq™ DNA Polymerase

1 ng - 1 µg Template-DNA  
 0,5 mM dNTP-Mix  
 0,5 µM 5'-Primer  
 0,5 µM 3'-Primer  
 0,25 U DreamTaq™ Polymerase  
 2 µl 10x DreamTaq™ Green Puffer  
 ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

50 ng - 250 ng Template-DNA  
 0,5 mM dNTP-Mix  
 0,5 µM 5'-Primer  
 0,5 µM 3'-Primer  
 1 U Phusion™ High-Fidelity Polymerase  
 10 µl 5X Phusion™ HF Puffer  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Das jeweilig verwendete PCR-Programm leitete sich von folgenden Schemata ab:

DreamTaq™ DNA Polymerase

Denaturierung	5 min	94°C	
Denaturierung	45 s	94°C	← 35x
Primer-Anlagerung	45 s	50 - 60°C	
Elongation	1 min/kb	72°C	
finale Elongation	7 min	72°C	

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

Denaturierung	1 min	98°C	
Denaturierung	10 s	98°C	← 35x
Primer-Anlagerung	20 s	50 - 65°C	
Elongation	30 s/kb	72°C	
finale Elongation	7 min	72°C	

Die Anlagerungstemperatur wurde abhängig von den verwendeten Primern gewählt. Eine Auflistung dieser, sowie deren Verwendungszweck können dem Anhang A1 entnommen werden. Standardmäßig wurden 35 Zyklen gewählt, sollte verhindert werden, dass die Plateau-Phase der exponentiellen Amplifikation erreicht wird, wurde die Zyklenzahl entsprechend verringert.

### 2.2.18 Agarosegelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten wurde durch horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001) erreicht. Standardmäßig wurden 1%ige (w/v) Agarose-TAE-Gele verwendet. Zur Detektion der Nukleinsäuren unter UV-Licht wurde den Gelen 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandards wurden entweder der *SmartLadder (Eurogentec)* oder der *O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)* verwendet. Diese decken jeweils ein Größenspektrum von 200 bp bis 10.000 bp bzw. 10 bp bis 300 bp ab.

TAE-Puffer

40 mM Tris

1 mM EDTA, pH 8,0

0,11% (v/v) Eisessig

### 2.2.19 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Für quantitative Expressionsanalysen mittels Realtime PCR (qRT-PCR) wurde das *Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN)* verwendet. Die Reaktionsansätze wurden stets mit einem technischen Replikat wie folgt angesetzt.

10 ng revers transkribierte RNA (2.2.16)

7,5 µl *Rotor-Gene SYBR® Green PCR Master Mix* (Quiagen)

0,5 µM 5'-Primer

0,5 µM 3'-Primer

ad 15 µl H<sub>2</sub>O

Für die PCR-Reaktion wurde der *Rotor-Gene® Q Realtime PCR cycler (QIAGEN)* mit folgendem Programm genutzt.

Denaturierung	5 min	95°C	
Denaturierung	5 s	95°C	← 45x
Elongation	10 s	60°C	

Die für die Auswertung benötigten Werte  $E$  (*Realtime PCR Effizienz*) und  $Ct$  (*threshold cycle*) wurden der *Rotor-Gene*<sup>®</sup> Q-Software entnommen. Die Berechnung der relativen Expressionsratio  $R$  wurde in Anlehnung an die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode unter Verwendung des geometrischen Mittels der beiden konstitutiv exprimierten Gene *ACTIN 2* (*ACT2*, At3g18780) und *GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT* (*GAPC*, At3g04120) durchgeführt (Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002). Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$R = E_{target}^{\Delta Ct} / \sqrt{E_{GAPC}^{\Delta Ct} * E_{ACT2}^{\Delta Ct}}$$

( $R$ : relative Expressionsratio,  $E$ : *Realtime PCR* Effizienz,  $Ct$ : *threshold cycle*)

## 2.2.20 Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass DNA-Fragmente die gewünschte Sequenz aufwiesen, wurden diese mittels Sequenzierung überprüft. Dazu wurden die Dienste der *GATC Biotech AG* (Konstanz, Deutschland) in Anspruch genommen.

## 2.2.21 Herstellung von Gewebe-Dünnschnitten

Um Dünnschnitte für die Mikroskopie zu erhalten, wurde das jeweilige Geweben zunächst in *Technovit*<sup>®</sup> 7100 (*Kulzer*) eingebettet (2.2.21.1). Das Schneiden der Präparate wurde am halb-motorischen Rotationsmikrotom RM2245 (*Leica Biosystems*) durchgeführt.

### 2.2.21.1 Einbettung von Pflanzenmaterial in *Technovit*<sup>®</sup> 7100

Zunächst wurde das einzubettende Gewebe 1 bis 2 h in 96% (v/v) Ethanol fixiert bevor es in einem 1:2-Gemisch aus 96% (v/v) Ethanol und *Basislösung Technovit*<sup>®</sup> 7100 (*Kulzer*) für 1 bis 2 h präinfiltriert wurde. Für die folgende Infiltration wurde 1 g *Härter I* in 100 ml *Basislösung Technovit*<sup>®</sup> 7100 gelöst und das Gewebe mit dieser *Vorbereitungslösung* überschichtet. Um

das Infiltrationsergebnis zu verbessern wurden die Proben in der *Vorbereitungslösung* zunächst 20 min vakuuminfiltriert und dann mindestens 12 h bei RT inkubiert. Für die Polymerisation wurden 600 µl *Vorbereitungslösung* mit 40 µl *Härter II* gründlich gemischt. Von dieser *Infiltrationslösung* wurden 600 µl in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, die präinfiltrierte Probe hineingegeben und in die gewünschte Orientierung gebracht.

### 2.2.22 Histochemische GUS-Analyse

Für die Detektion von transgener  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität in stabil transformierten Arabidopsispflanzen wurde das zu untersuchende Gewebe mit X-Gluc-Lösung überschichtet und für 1 bis 24 h bei 37°C inkubiert. Durch die  $\beta$ -Glucuronidase wird das X-Gluc einem blauen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) umgesetzt. Zum Stoppen der Reaktion und gegebenenfalls Entfernung des Chlorophylls, wurde das Gewebe anschließend in 70% (v/v) Ethanol überführt. In der Regel wurde das Gewebe anschließend zur besseren Dokumentation mit Klärlösung überschichtet und anschließend die Blaufärbung des Gewebes am Binokular oder Mikroskop festgehalten.

X-Gluc-Lösung	50 mM Natriumphosphat, pH 7,2 0,2% (v/v) Triton X-100 2 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) 2 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) 2 mM 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure (gelöst in DMF)
Klärlösung	67% (w/v) Chloralhydrat 11% (v/v) Glyzerin

### 2.2.23 Mikroskopie und Bildaufnahmen

**Tabelle 2- 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Mikroskope und Binokulare.**

Gerät	Kamera	Software	Hersteller
Lichtmikroskop BX41	U-CMAD3	CellA Version 2.6	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Infinity 3S	INFINITY ANALYZE Version 6.5.4	Lumenera Corporation, Ottawa, ON Kanada
Binokular SZ61	SC100	analySIS getIT Version 5.1	Olympus, Hamburg, Deutschland
Binokular Nikon SMZ18	DIGITAL SIGHT- Ri1	NIS-Elements Imaging Software , Version 4.40	Laboratory Imaging s.r.o., Prag, Tschechische Republik
CLSM Leica SP5		Leica LAS AF	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

### 2.2.24 Computergestützte Analysen

**Tabelle 2-4: Verwendete Programme und frei zugängliche Internet-Ressourcen.**

Name	Verwendung	Quelle
<i>Clustal Omega</i>	Erstellung von Sequenzalignments	McWilliam <i>et al.</i> , 2013
<i>DESKGEN<sup>TM</sup></i>	Design der CRISPR/Cas9-Experimente	deskgen.com
<i>eFP-Browser</i>	Datenbank für Arabidopsis- Expressionsanalysen	Winter <i>et al.</i> , 2007
<i>ExpASy Translate tool</i>	Translation von DNA- in Aminosäuresequenzen	Gasteiger <i>et al.</i> , 2003
<i>Fiji</i>	Bildauswertungen	Schindelin <i>et al.</i> , 2012
<i>GeneDoc</i>	Manuelle Erstellung und Bearbeitung von Sequenzalignments	Nicholas & Nicholas, 1997
<i>Genevestigator</i>	Datenbank für Arabidopsis- Expressionsanalysen	Hruz <i>et al.</i> , 2008
<i>Minitab<sup>®</sup>16</i>	Statistische Analyse von Daten	ADDITIVE GmbH
<i>NCBI Blast</i>	Sequenzsuche und -vergleiche	Boratyn <i>et al.</i> , 2013
<i>NCBI Primer Blast</i>	Primerdesign	Ye <i>et al.</i> , 2012
<i>NEBcutter V2.0</i>	Untersuchung von DNA-Sequenzen bezüglich Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme	Vincze <i>et al.</i> , 2003
<i>Reverse Complement</i>	Übersetzung von DNA-Sequenzen in den (revers-) komplementären Strang	Stothard, 2000

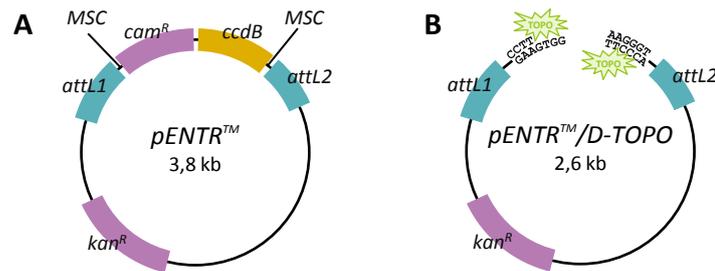
Fortsetzung Tabelle 2-4.

Name	Verwendung	Quelle
<i>R</i>	Statistische Analyse von Daten	R Core Team, 2018
<i>R package: agricolae V1.2-8</i>	Statistische Analyse von Daten	Mendiburu, 2017
<i>RStudio</i>	grafische Benutzeroberfläche für R	RStudio Team, 2016
<i>SnapGene Viewer</i>	Auswertungen von Chromatogrammen, Überprüfung von Plasmid-DNA-Sequenzen	SnapGene® software, GSL Biotech, <a href="http://snapgene.com">snapgene.com</a>
<i>TAIR</i>	Kuratierte Arabidopsis Datenbank	Berardini <i>et al.</i> , 2015
<i>T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool</i>	Arabidopsis-Datenbank und Genkartierung	Alonso <i>et al.</i> , 2003
<i>TreeView</i>	Darstellung von phylogenetischen Bäumen	Page, 1996
<i>WMD3</i>	Design der amiRNA-Experimente	S. Ossowski, J. Fitz, R. Schwab, M. Riester & D. Weigel

## 2.3 Klonierungen

Wenn möglich, wurden die Klonierungen mit Hilfe der *Gateway*<sup>TM</sup>-Technologie (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Mit Ausnahme der Klonierungen der CRISPR/Cas9-Vektoren wurden die von *Thermo Fisher Scientific* vertriebenen Eingangsvektoren *pENTR1A*<sup>TM</sup>, *pENTR3C*<sup>TM</sup> oder *pENTR*<sup>TM</sup>/*D-TOPO*<sup>®</sup> genutzt (Abbildung 2-1). Als Zielvektoren wurden die binären Vektoren *pB7WG2* oder *pBGWFS7* verwendet (Karimi, Inze & Depicker, 2002). Der Vektor *pB7WG2* enthält eine Expressionskassette, die für den 35S Promotor des Blumenkohlmosaikvirus kodiert, der Vektor *pBGWFS7* enthält die kodierende Sequenz für das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen aus *E. coli*.

Das Plasmid *pRS300 miR319a pBSK*, welches als Template für die Erzeugung der *artificial microRNAs* genutzt wurde, wurde freundlicherweise von Detlef Weigel (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sämtliche Vektoren, die für die Erstellung der *CRISPR/Cas9*-Konstrukte verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Holger Puchta (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland) zur Verfügung gestellt. War die Nutzung der *Gateway*<sup>TM</sup>-Systems nicht möglich,



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Eingangsvektoren für das Gateway™-System.**

(A) *pENTR1A™* bzw. *pENTR3C™* (B) *pENTR™/D-TOPO®*. *attL1/2*: Gateway™ Rekombinationssequenz, *cam<sup>R</sup>*: Chloramphenicol-Resistenz, *ccdB*: zytotoxisches CcdB-Gen aus *E. coli*, *kan<sup>R</sup>*: Kanamycin-Resistenz, *MSC*: Multiple Cloning Site. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

wurde auf herkömmliche Klonierungstechniken (Sambrook & Russell, 2001) zurückgegriffen. Sollten PCR-Produkte zur *in vivo*-Amplifikation subkloniert werden, wurde das *CloneJET PCR Cloning Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet.

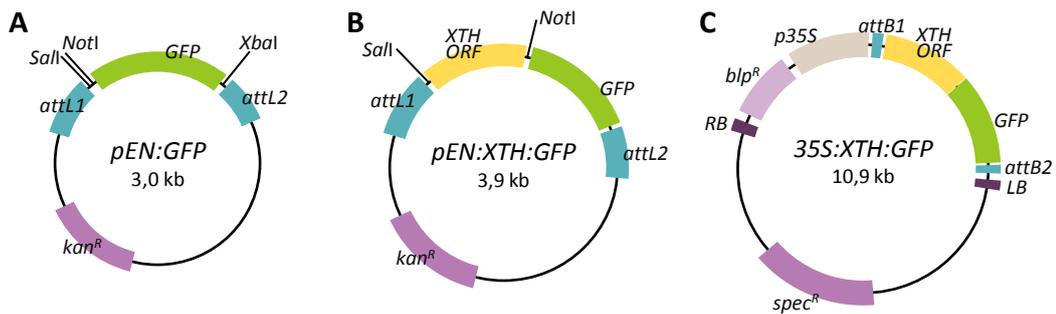
Eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer kann im Anhang A1, eine Liste der hergestellten Vektoren im Anhang A2 eingesehen werden. Die *in vivo* Amplifikation von Plasmiden erfolgte mittels *E. coli*-Zellen vom Stamm *DH5α* oder *DB3.1* (2.2.7).

### 2.3.1 Klonierung von *Promotor:GUS* Konstrukten

Für Expressionsanalysen wurden zunächst mit Hilfe der Datenbank *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*, Berardini *et al.*, 2015) etwa 1.000 bis 1.500 bp große Promotorsequenzen stromaufwärts des Startcodons identifiziert und via PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann direktional in einen *pENTR™/D-TOPO®* eingebracht. Alternativ wurde das PCR-Produkt restringiert und gerichtet in den linearisierten Eingangsvektor *pENTR1A™* oder *pENTR3C™* ligiert. Anschließend wurde eine Rekombinationsreaktion (2.2.13) zwischen dem entsprechenden Eingangsvektor und dem Zielvektor *pBGWFS7* durchgeführt.

### 2.3.2 Klonierung von *35S:XTH:GFP* Konstrukten

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden *GFP*-Reportergenkonstrukte hergestellt. Dazu wurde zunächst die für das *green fluorescent protein* kodierende Sequenz *mNeonGreen* über PCR von dem Plasmid *pICSL50015* (*Addgene*, MA, USA) amplifiziert (Shaner *et al.*, 2013). Das Fragment wurde restringiert und in den auf gleiche Weise linearisierten *pENTR1A™* ligiert. Das dadurch erhaltene Plasmid wurde *pEN:GFP* genannt.



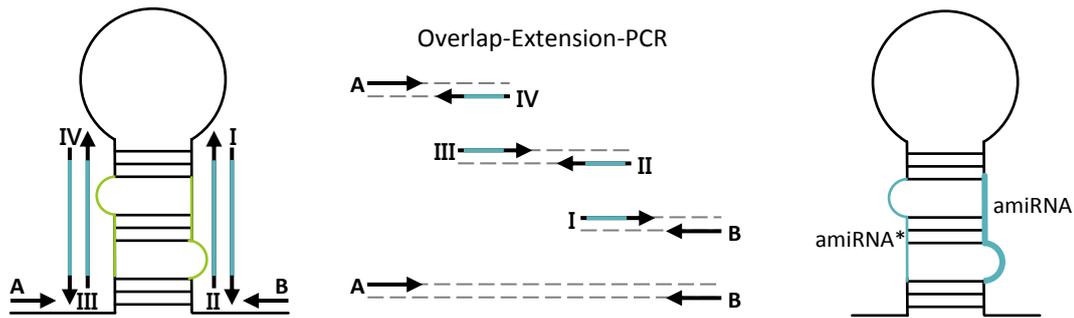
**Abbildung 2-2: Schematische Illustration der Vektoren der 35S:XTH:GFP-Klonierung.**

**(A)** Modifizierter Eingangsvektor *pENTR1A<sup>TM</sup>* für die Erstellung C-terminaler *GFP*-Fusionstkonstrukte. **(B)** Eingangsvektor mit Fusionsprodukt aus *ORF*- und *GFP*-Sequenz. **(C)** Binärer Expressionsvektor mit 35S-Promotor-Expressionskassette. *attL1/2*, *attB1/2*: Gateway<sup>TM</sup> Rekombinationssequenz, *blp<sup>R</sup>*: Phosphinothricin-Resistenz, *kan<sup>R</sup>*: Kanamycin-Resistenz, *spec<sup>R</sup>*: Spectinomycin-Resistenz. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Anschließend wurden die ORFs der zu klonierenden Gene ohne Stoppcodon über PCR amplifiziert, als Template wurde cDNA verwendet. Die PCR-Produkte wurden wiederum restringiert und mit dem zuvor linearisierten *pEN:GFP* ligiert. Mittels einer Rekombinationsreaktion (2.2.13) wurde das entstandene Fusionsprodukt in den Zielvektor *pB7WG2* eingebracht und auf diesem Wege die Expression des Fusionsproteins unter die Kontrolle des ubiquitären 35S-Promotor gestellt (Karimi, Inze & Depicker, 2002). Die dabei entstandenen Vektoren wurden *35S:XTH:GFP* genannt.

### 2.3.3 Klonierung von *artificial microRNA* Konstrukten

Für die Erzeugung von *Knockdown*-Linien wurden *artificial microRNA* (*amiRNA*) Konstrukte hergestellt und diese stabil in *Arabidopsis* transformiert. Für das Design der *amiRNAs* wurde der *WMD3 – Web MicroRNA Designer* verwendet (Schwab *et al.*, 2006; Ossowski, Schwab & Weigel, 2008). Anschließend wurde mittels *Overlap-Extension-PCR* die *amiRNA* synthetisiert (Abbildung 2-3). Durch drei PCR-Reaktionen (Primer A + IV, II + III und B + I) wurden Teilfragmente der *amiRNA* hergestellt. Als Template für diese drei PCRs diente das Plasmid *pRS300 miR319a pBSK* (zur Verfügung gestellt von Detlef Weigel, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Deutschland), auf welchen die Vorläufer-miRNA kodiert liegt. Durch die Primer I, II, III und IV wurde die Sequenz der Vorläufer-miRNA gegen die gewünschte, künstliche Sequenz ausgetauscht. Für die finale PCR-Reaktion wurden die Primer A und B eingesetzt, während die Amplifikate der vorhergehenden PCRs als Template dienten (Abbildung 2-3). Das PCR-Produkt wurde dann mit *Sall* und *NotI*



**Abbildung 2-3: Konstruktion der artificial microRNAs.**

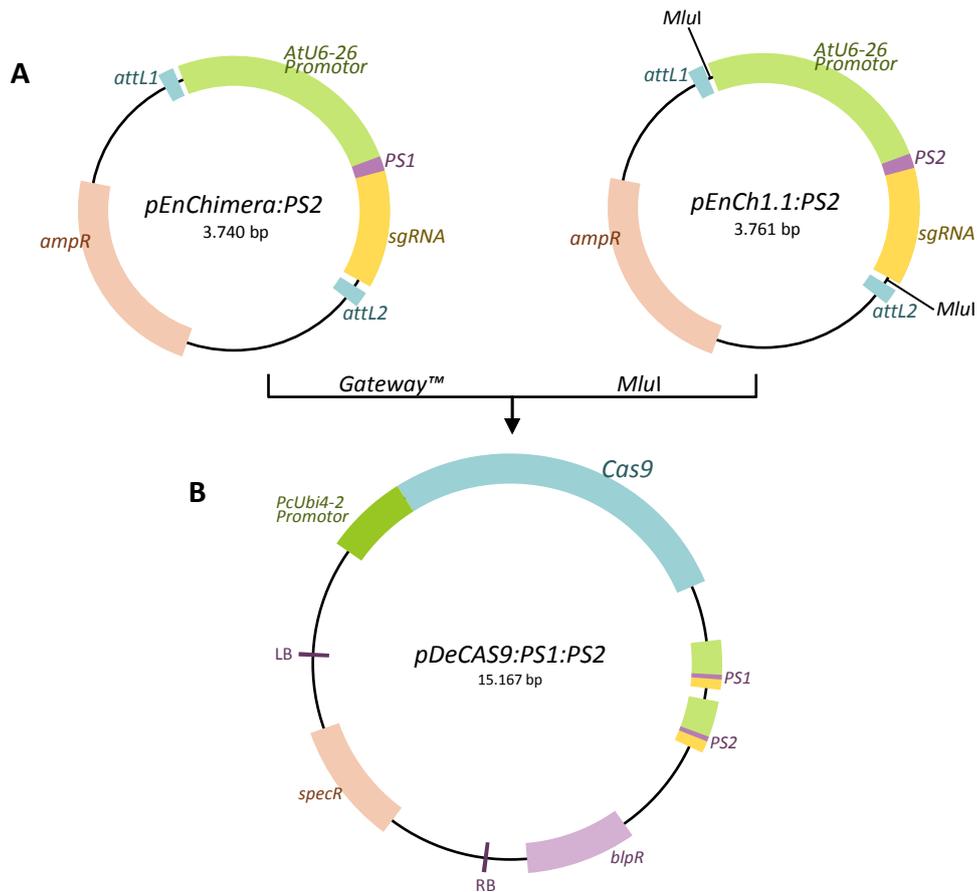
Mittels Overlap-Extension-PCR werden mit den Oligonukleotiden I - IV die miRNA und miRNA\* Sequenzen (grün) zu den gewünschten amiRNA und amiRNA\* (blau) umgeschrieben. Abbildung verändert nach (Schwab *et al.*, 2006), Darstellung nicht maßstabsgetreu.

restringiert und in den auf gleiche Weise linearisierten *pENTR1A*<sup>TM</sup> ligiert. Anschließend wurde mittels Rekombinationsreaktion (2.2.13) die amiRNAs in den binären Vektor *pB7WG2* überführt (Karimi, Inze & Depicker, 2002), sodass die Expression der amiRNAs unter die Kontrolle des 35S-Promotors gestellt wurde. Die binären Vektoren wurden *35S:XTH16amiR-A*, *-B* und *-C* genannt.

### 2.3.4 Klonierung von *CRISPR/Cas9* Konstrukten

Das CRISPR/Cas9 System wurde genutzt, um *knockout* Linien für die Gene *XTH16* und *XTH18* zu erzeugen. Die dafür verwendeten Eingangs- und Zielvektoren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Puchta (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Fauser *et al.*, 2014, Schiml *et al.*, 2014, Steinert *et al.*, 2015). Für das Entwerfen der *Protospacer* wurde die von *DESKGEN*<sup>TM</sup> (deskgen.com) kostenlos nutzbare Software verwendet. Für beide Gensequenzen, wurden jeweils zwei *Protospacer* entworfen, die etwa 400 bzw. 200 bp (*XTH16* bzw. *XTH18*) voneinander entfernt an die genomische DNA binden. Auf diesem Wege sollte gleichzeitig an zwei Stellen der DNA ein Doppelstrangbruch induziert werden und so eine Deletion der dazwischen liegenden Sequenz herbeigeführt werden. Bei der späteren Analyse der Tochtergenerationen der transformierten Pflanzen war es so möglich auf die gewünschte Mutation via PCR zu selektieren.

Je *Protospacer* wurden zwei Oligonukleotide von *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) in entsalzter Qualität geordert. Ein Oligonukleotid enthielt die *Protospacer*-Sequenz und einen 5'-ATTG-Überhang, das andere die revers-komplementäre *Protospacer*-Sequenz und einen 5'-AAAC-Überhang. Es wurden je 2 µM der beiden Oligonukleotide in



**Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Klonierung der CRISPR/Cas9-Zielvektoren.**

**(A)** Die Eingangsvektoren *pEnChimera* und *pEnC1.1* wurden mit *BbsI* linearisiert und die *Protospacer*-Oligonukleotide eingebracht. **(B)** Anschließend wurden die Expressionskassetten mittels Rekombinationsreaktion und *MluI*-Klonierung in den Zielvektor *pDeCas9* transferiert. *amp<sup>R</sup>*: Ampicillin-Resistenz, *attL1/2*: *Gateway<sup>TM</sup>* Rekombinationssequenz, *blp<sup>R</sup>*: Phosphinothricin-Resistenz, LB/RB: *left/right border*, *spec<sup>R</sup>*: Spectinomycin-Resistenz. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

einem 50- $\mu$ l-Ansatz zusammen gegeben. Durch 5 min Inkubation bei 95°C (*Thermomixer comfort*, *Eppendorf*) und anschließender langsamer Abkühlung bei RT wurde ein Aneinanderlagern der Oligonukleotide erreicht. Durch die 5'-Überhänge war es möglich, die aneinandergelagerten Oligonukleotide, gerichtet in die mit *BbsI* linearisierten Eingangsvektoren *pEn-Chimera* oder *pEn-C1.1*, zu ligieren. Diese Eingangsvektoren sind beide so entworfen, dass auf diese Weise eine Expressionskassette entsteht, die sich aus dem konstitutiven *U6-26*-Promotor aus *Arabidopsis* und einem Fusionskonstrukt aus der gewünschten *Protospacer*-Sequenz mit der *single-guide RNA*-Sequenz zusammensetzt. Die Verwendung der beiden Eingangsvektoren ermöglicht es, zwei dieser Expressionskassetten gleichzeitig auf einer Transfer-DNA des binären Zielvektors *pDeCAS9* in das *Arabidopsis*-

genom zu integrieren. Dazu wurde zunächst die erste Expressionskassette aus dem *pEn-Chimera* mittels Rekombinationsreaktion (2.2.13) in den *pDeCAS9* eingebracht. Anschließend wurde die zweite Expressionskassette mit *MluI* aus dem *pEn-C1.1* herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *MluI* linearisierten Zielvektor, welcher bereits die erste Expressionskassette trug, ligiert. Da die Ligation der zweiten Expressionskassette ungerichtet erfolgte, wurde anschließend mittels Sequenzierung die Orientierung überprüft.

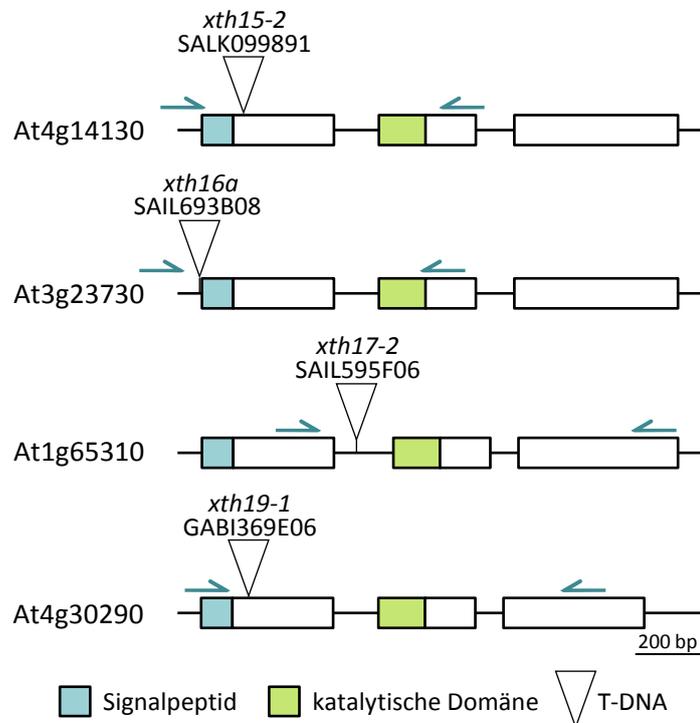
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Erzeugung und Identifizierung von *XTH Knockout*- Linien in Arabidopsis

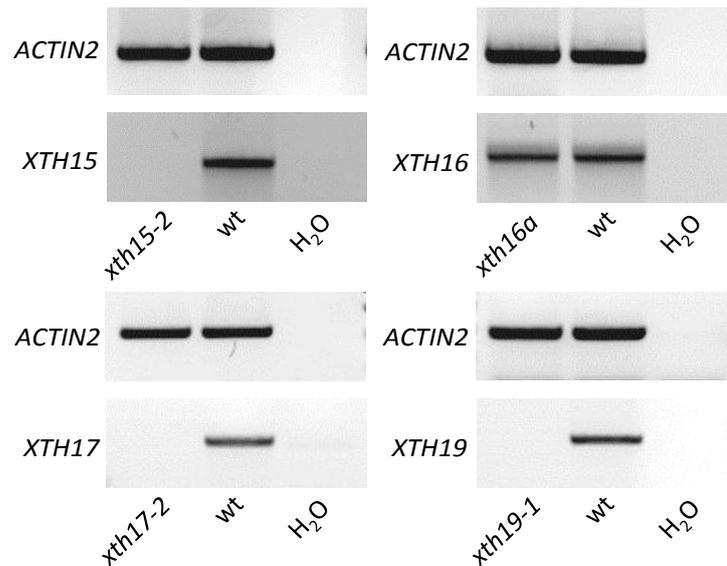
Um Hinweise auf die Funktionen von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* zu erhalten wurden T-DNA-Insertionslinien für *XTH15*, *XTH17* und *XTH19* identifiziert (3.1.1). Da für *XTH16* oder *XTH18* keine *Knockout*-Linien zur Verfügung standen, wurde ein *Knockdown* von *XTH16* über amiRNAs induziert (3.1.2). Außerdem wurde das CRISPR/Cas9-System genutzt um *Knockout*-Linien für *XTH16* und *XTH18* zu erzeugen (3.1.3).

##### 3.1.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionslinien für *XTH15*, *XTH16*, *XTH17* und *XTH19*

Zunächst wurden mit Hilfe des *T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool* (Alonso *et al.*, 2003) T-DNA-Insertionslinien identifiziert, bei denen es sich um potentielle *Knockout*-Linien der Gene *XTH15* (*xth15-2*, SALK\_099891, Alonso *et al.*, 2003), *XTH16* (*xth16a*, SAIL\_693\_B08,



**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Genstrukturen von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17* und *XTH19*.** Exons sind als Kästchen, Introns als Linien dargestellt. Die Positionen der zur Genotypisierung verwendeten genspezifischen Primer sind als halbe Pfeile eingezeichnet.



**Abbildung 3-2: RT-PCR zum Nachweis des Knockouts von XTH15, XTH16, XTH17 und XTH19.**

Der Verlust der Transkripte in den entsprechenden T-DNA-Insertionslinien wurde mittels genspezifischer RT-PCR überprüft. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *ACTIN 2* verwendet.

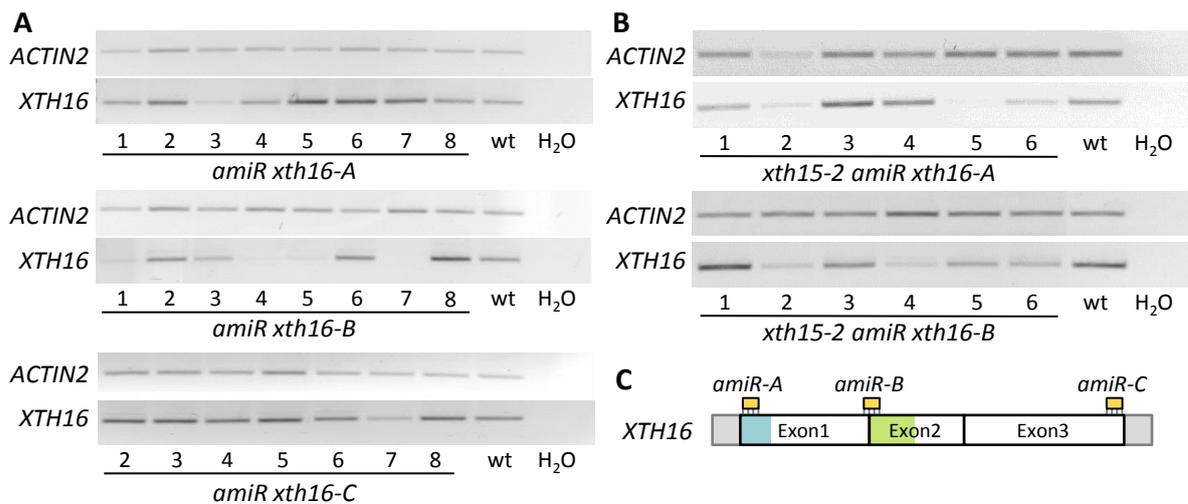
McElver *et al.*, 2001 und *xth16b*, SAIL\_1216\_B09, Sessions *et al.*, 2002), *XTH17* (*xth17-2*, SAIL\_595F06, McElver *et al.*, 2001) und *XTH19* (*xth19-1*, GK\_369E06, Kleinboelting *et al.*, 2012) handelte (Abbildung 3-1). Für *XTH18* konnte keine T-DNA-Insertionslinie gefunden werden. Da weiterführende Analysen ausschließlich mit homozygoten Pflanzen durchgeführt werden sollten, wurden die vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) erworbenen Samen auf Erde ausgelegt und später die Pflanzen über PCR genotypisch charakterisiert. Dabei konnten für die Linien *xth15-2*, *xth16a*, *xth17-2* und *xth19-1* homozygote Individuen identifiziert werden. Allerdings deutete sich bei der Auswertung der Genotypisierung der *xth16a*-Pflanzen an, dass sich der Integrationsort der T-DNA möglicherweise nicht im kodierenden Bereich der Sequenz befinden könnte. Durch die Größe der PCR-Fragmente zum Nachweis der T-DNA lag die Vermutung nahe, dass sich der Integrationsort im 5'UTR des Gens befinden könnte. Bei den Untersuchungen der *xth16b*-Pflanzen war es nicht möglich, in oder in der Nähe des *XTH16*-Genlokus eine T-DNA-Insertion nachzuweisen. Bei allen untersuchten Pflanzen dieser Linie konnte lediglich das Wildtyp-Allel von *XTH16* nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Verwendung dieser Linie abgesehen.

Die Linien *xth15-2*, *xth16a*, *xth17-2* und *xth19-1* wurden anschließend weitergehend analysiert. Zunächst wurde überprüft, ob durch die Insertion der T-DNA ein vollständiger *Knockout* des jeweiligen Gens induziert wurde. Zu diesem Zweck wurde aus 5 Tage alten

Keimlingen Gesamt-RNA isoliert und über RT-PCR auf den Verlust der jeweiligen Transkripte untersucht (Abbildung 3-2). In den Linien *xth15-2*, *xth17-2* und *xth19-1* konnte der Verlust der jeweiligen Transkripte nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Linie *xth16a* zeigte, dass sich die T-DNA-Insertion nicht auf die Expression von *XTH16* auswirkte. Da dadurch eindeutig gezeigt wurde, dass es sich bei *xth16a* nicht um eine *Knockout*-Linie handelt, wurde auch diese von weiteren Analysen ausgeschlossen. Da jedoch einer der Interessenschwerpunkte dieser Arbeit in der Untersuchung der Funktion von *XTH16* lag, sollte im weiteren Verlauf versucht werden, einen *Knockdown* von *XTH16* durch den Einsatz von *artificial microRNA* (amiRNA) herbeizuführen. Als im Verlauf dieser Arbeit das CRISPR/Cas9-System verfügbar wurde, wurde diese Technologie genutzt, um *XTH16-Knockout*-Linien zu erzeugen. Beide methodischen Ansätze sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

### 3.1.2 Erzeugung und Auswahl der amiRNA-Linien zum *XTH16-Knockdown*

Nachdem gezeigt wurde, dass es sich bei den Linien *xth16a* und *xth16b* nicht um *Knockout*-Linien handelte, wurde zunächst versucht, ein *Knockdown* von *XTH16* über *artificial microRNA* (amiRNA) herbeizuführen. Für die Konzeption der hier verwendeten amiRNA-Konstrukte zum *Knockdown* von *XTH16* wurde der *WMD3 – Web MicroRNA Designer* (Schwab *et al.*, 2006; Ossowski, Schwab & Weigel, 2008) verwendet. Anhand der vom *WMD3* verwendeten Kriterien, wie zum Beispiel die Position der Fehlpaarungen mit der Ziel-mRNA oder der benötigten Hybridisierungsenergie mit der Ziel-mRNA im Vergleich zu der benötigten Hybridisierungsenergie zu eventuellen ungewünschten Nebenzielen (Schwab *et al.*, 2006), wird eine Rangfolge von möglichen amiRNA-Sequenzen vorgeschlagen. Um die Wahrscheinlichkeit auf einen effektiven *Knockdown* zu erhöhen, wurden drei der vorgeschlagenen Sequenzen ausgewählt, die auf verschiedenen Positionen der mRNA innerhalb der kodierenden Sequenz binden. Diese wurden amiR-A, -B und -C genannt. amiR-A bindet 13 bis 33 Nukleotide hinter dem Start-ATG, amiR-B 263 bis 283 Nukleotide hinter dem Start-Codon und amiR-C 21-1 Nukleotide vor dem Stopp-Codon (Abbildung 3-3 C). Die anschließende Synthese der amiRNA-Sequenzen wurde mittels *Overlap-Extension-PCR* in Anlehnung an das *Cloning of artificial microRNAs*-Protokoll, welches ebenfalls auf der Internetseite des *WMD3* (Schwab *et al.*, 2006; Ossowski *et al.*, 2008) zur

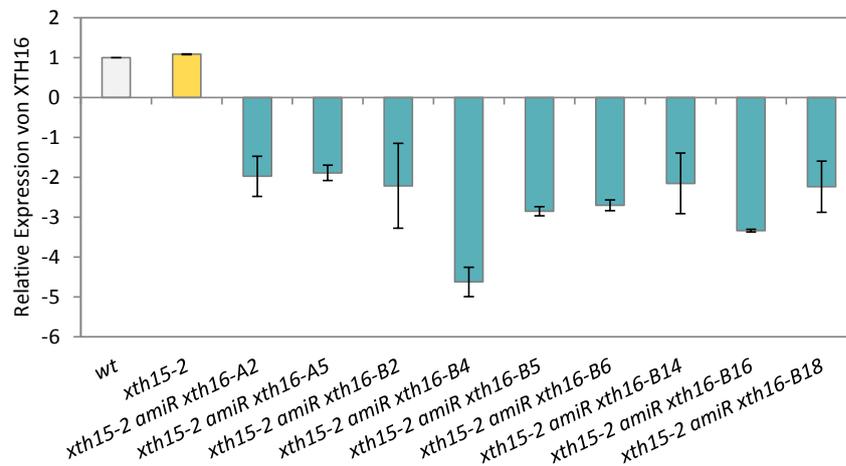


**Abbildung 3-3: RT-PCR zum Nachweis der Expression von XTH16.**

Die Expression von *XTH16* in den transgenen amiRNA-Linien *mir xth16-A*, *-B* und *-C* (**A**) im Wildtyp-Hintergrund und (**B**) im *xth15-2*-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp. Als Referenz wurde das Haushaltsgen *ACTIN 2* (At3g18780) verwendet. (**C**) Schematische Darstellung der *XTH16*-mRNA. Die amiR-A, -B und -C sind gelb eingezeichnet. 5'UTR und 3'UTR sind in grau, die Signalpeptidsequenz ist in blau und die katalytische Domäne in grün dargestellt.

Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Letztendlich wurden die drei amiR-Fragmente in den binären Vektor *pB7WG2* überführt (Karimi, Inze & Depicker, 2002). Dadurch wurde die Expression der amiRNAs *in planta* unter die Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors gestellt. Die Herstellung der Vektoren ist detailliert im Kapitel 2.3.3 beschrieben. Die drei Konstrukte wurden dann mit Hilfe von Agrobakterien stabil in den Wildtyp sowie in den *xth15-2* Hintergrund transformiert, um auf diesem Wege Doppelmutanten zu erzeugen. Die Transformanden wurden *amiR xth16-A*, *-B*, *-C* und *xth15-2 amiR xth16-A*, *-B*, *-C* genannt.

Um geeignete unabhängige amiR-Linien zu finden, wurde aus Rosettenblättern der Primärtransformanden Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert, um die Expression von *XTH16* über PCR nachzuweisen. Als Referenzgen wurde das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen *ACTIN 2* (At3g18780) verwendet. Resultate der RT-PCR sind in Abbildung 3-3 A und B gezeigt. Bei der Analyse der unabhängigen Linien der *amiR xth16-C* Pflanzen zeigte sich, dass sich die Transkriptmenge von *XTH16* nicht von der des Wildtyps unterschied. Bei den Pflanzen der Linie *amiR xth16-A* konnte lediglich eine potentielle *Knockdown*-Linie (*amiR xth16-A-3*) gefunden werden. Die stärksten Veränderungen der Transkriptmenge konnten bei den Transformanden mit dem Konstrukt amiR-B beobachtet werden. Unter den unabhängigen *amiR xth16-B* Linien wurden mehrere unabhängige Linien (*amiR xth16-B-1*, *-4*, *-5* und *-7*) mit einem potentiell reduzierten Transskriptspiegel identifiziert (Abbildung 3-3 A).



**Abbildung 3-4: Ergebnisse der quantitative Realtime-PCR zur Bestimmung der XTH16-Expression.**

Die Expression von *XTH16* wurde im wt, der *xth15-2* Einfachmutante sowie in neun unabhängigen *xth15-2 amiR xth16*-Doppelmutanten über qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgene für die qRT-PCR wurden *ACTIN 2* (At3g18780) und *GAPC* (At3g04120) verwendet. Die relative Expression von *XTH16* wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt.

Bei der Untersuchung der Expression von *XTH16* in den unabhängigen *xth15-2 amiR xth16-A*- und *-B*-Linien wurden in der T1-Generation ebenfalls mehrere Pflanzen identifiziert (*xth15-2 amiR xth16-A2*, *-A5*, *-B2*, *-B4*, *-B5*, *-B6*, *-B14*, *-B16* und *-B18*), bei denen eine verminderte Menge von *XTH16* Transkripten vorlag (Abbildung 3-3 B). Wie auch bei den amiR-C-Pflanzen mit wt-Hintergrund, zeigten auch die amiR-C-Pflanzen im *xth15-2*-Hintergrund keine veränderte Expression von *XTH16*.

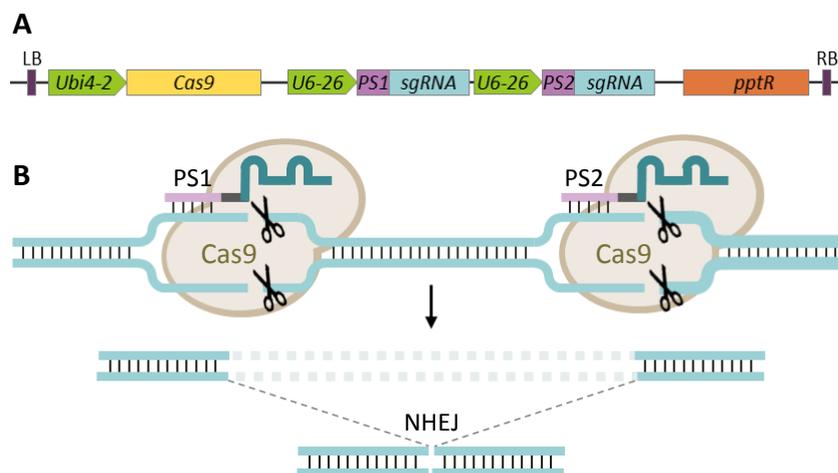
Um die Veränderung der *XTH16*-Expression in den neun unabhängigen vermeintlichen Doppelmutanten-Linien zu quantifizieren wurde eine *Realtime*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Als Referenzgene für die qRT-PCR wurden *ACTIN 2* und *GAPC* (At3g04120) gewählt. Die relative Expression von *XTH16* wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002) bestimmt. In Abbildung 3-4 ist die relative Expression von *XTH16* sowohl in der *xth15-2*-Einfachmutante, als auch in den neun unabhängigen *xth15-2 amiR xth16*-Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. In den Doppelmutanten konnte in allen untersuchten Linien eine reduzierte Menge an *XTH16*-mRNA nachgewiesen werden. Die kleinste Veränderung wurde dabei bei der Linie *xth15-2 amiR xth16-A5* detektiert, die eine 1,89-fache ( $\pm 0,19$ ) Verminderung der *XTH16*-Transkriptmenge zeigte. Die mit 4,62-fache ( $\pm 0,37$ ) stärkste Verringerung wurde in der Linie *xth15-2 amiR xth16-B4* nachgewiesen. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die beobachtete Abnahme des *XTH16*-Transkriptlevels eindeutig auf die Anwesenheit der

amiRNAs zurückzuführen ist, da die relative Expression von *XTH16* in der *Knockout*-Linie *xth15-2* der des Wildtyps ( $1,08 \pm 0,01$ ) entsprach. Der *Knockout* von *XTH15* alleine hatte folglich keinen Einfluss auf die Expression von *XTH16*.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit den beiden Konstrukten amiR-A und amiR-B, die Menge der mRNA von *XTH16* verringert werden konnte. Anhand der qRT-PCR Ergebnisse wurde entschieden, dass im Folgenden die Linien *xth15-2 amiR xth16-A2*, *-B4* und *-B5* tiefergehend analysiert werden sollten. Als im Verlauf dieser Arbeit ein gezielter *Knockout* von *XTH16* mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems durchgeführt werden konnte, wurde anschließend jedoch ausschließlich mit den *Knockout*-Linien gearbeitet.

### 3.1.3 Erzeugung von *XTH16*- und *XTH18*-*Knockout*-Linien mit CRISPR/Cas9

Da für *XTH16* oder *XTH18* keine *Knockout*-Linien zur Verfügung standen, wurde das CRISPR/Cas9-System genutzt um solche Linien zu erzeugen. Dafür wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei welchem eine größere Deletion von mehreren Hundert Basenpaaren induziert werden sollte. Erreicht wurde dies durch die Verwendung zweier *Protospacer*, die im selben Genlokus binden. Auf diesem Wege werden zwei Doppelstrangbrüche der genomischen DNA induziert, wodurch es zu einer Deletion der dazwischenliegenden



**Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der CRISPR/Cas9-Methode mit zwei *Protospacern*.**

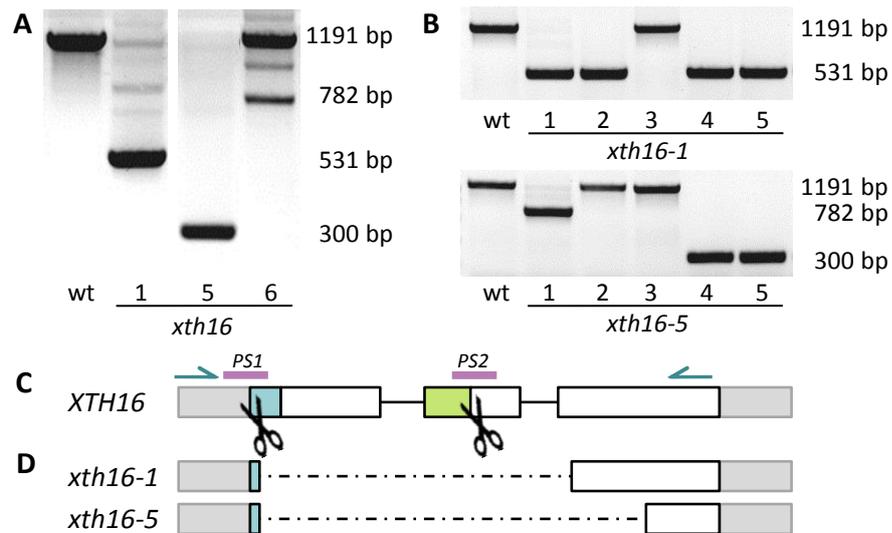
**(A)** T-DNA zur CRISPR/Cas9-Expression *in planta*. Die Expression der Cas9-Nuklease wird durch den konstitutiven Ubiquitin 4-2 Promotor (*Ubi4-2*) aus *Petroselinum crispum* kontrolliert. Die *Protospacer* PS1 und PS2 werden jeweils als Fusionskonstrukt mit der *tracrRNA* als *sgRNA* unter Kontrolle des konstitutiven U6-26 Promotors aus *Arabidopsis* transkribiert. Für die Selektion transgener Pflanzen dient eine Phosphinothricin-Resistenz-Kassette (*pptR*). **(B)** Der Komplex aus Cas9 und *sgRNA* bindet an die zum *Protospacer* komplementäre Sequenz im Genom, sodass dort von der Nuklease der DNA-Doppelstrang gespalten wird. Wird die Bruchstelle mittels NHEJ repariert, kann es zur Deletion des dazwischen gelegenen Sequenzabschnitts kommen. Darstellung nicht maßstabsgetreu.

Sequenz kommen kann (Belhaj *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013). Ein Vorteil dieses Versuchsaufbaus lag darin, dass komplette Genabschnitte aus dem Genom „gelöscht“ werden können (Abbildung 3-5 B). Zusätzlich wurde die Suche nach einzelnen Individuen, die die gewünschte Mutation tragen, durch einfache Genotypisierung über PCR möglich. Durch die Deletion des DNA-Abschnitts kann bei einer PCR des entsprechenden Genabschnitts eine Veränderung der Größe des Amplifikats detektiert werden (Abbildung 3-6).

Die *Protospacer* wurden mit Hilfe der kostenlosen Software von *DESKGEN*<sup>TM</sup> so entworfen, dass sie im Abstand von etwa 400 oder 200 Basenpaaren (*XTH16* oder *XTH18*) voneinander entfernt an die genomische DNA binden. Die beiden für jeweils einen Genlokus bestimmten *Protospacer* wurden in die Eingangsvektoren *pEn-Chimera* bzw. *pEn-C1.1* ligiert. Beide Plasmide sind so entworfen, dass auf diese Weise eine Expressionskassette entsteht, die ein Fusionskonstrukt aus der gewünschten *Protospacer*-Sequenz mit der sgRNA-Sequenz enthält. Gleichzeitig wird die Expression des Fusionskonstrukts unter die Kontrolle des U6-26-Promotors aus *Arabidopsis* gestellt. Der U6-Promotor steuert die Transkription durch die RNA-Polymerase III, welche auf die Transkription von kurzen, nicht-kodierenden RNAs spezialisiert ist (Schiml & Puchta, 2016; Turowski & Tollervey, 2016). Durch die Verwendung der beiden Eingangsvektoren ist es möglich, zwei dieser Expressionskassetten auf einer Transfer-DNA gleichzeitig, zusammen mit der kodierenden Sequenz für die Cas9-Nuklease, mittels Agrobakterien stabil in *Arabidopsis* zu transformieren (Abbildung 3-5 A). Die Herstellung der binären Vektoren ist detailliert in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

### 3.1.3.1 Nachweis des *XTH16-Knockouts*

Um einen *Knockout* von *XTH16* zu induzieren wurden zunächst zwei *Protospacer* mit Hilfe der *DESKGEN*<sup>TM</sup> Software entworfen, die im Genlokus von At3g2373 binden. Die Position des ersten *Protospacer* befindet sich direkt am Anfang der kodierenden Sequenz, der zweite *Protospacer* bindet im zweiten Exon von *XTH16* (Abbildung 3-6 C). Durch die Verwendung dieser zwei *Protospacer* sollte eine Deletion von etwa 400 bp der Gensequenz herbeigeführt werden. Der Abschnitt, der dabei aus dem Genom entfernt werden sollte, beinhaltet zum einen die für das potenzielle Signalpeptid kodierende Sequenz, welches für die Sekretion des Proteins aus der Zelle hinaus in den Apoplasten verantwortlich ist (Yokoyama & Nishitani, 2001b), als auch einen Teil der Sequenz, die für das für XTHs typische DEIDFEFLG-Motiv



**Abbildung 3-6: Genotypische Charakterisierung nach der Induktion des *XTH16*-Knockouts.**

(A) Nach der Transformation zur Induktion des *XTH16*-Knockouts wurden in der T1 verschiedene Genotypen identifiziert. (B) In der T2 wurde eine Aufspaltung der Genotypen beobachtet. (C) Schema der *XTH16*-Genstruktur. Exons sind als Kästchen, Introns als durchgezogene Linie dargestellt. UTRs sind in grau, das Signalpeptid ist in blau und die katalytische Domäne in grün gezeichnet. Die Positionen der *Protospacer* (PS) sind in rosa markiert. Die PCR-Primer für die Genotypisierung sind als halbe Pfeile dargestellt. (D) In den Linien *xth16-1* und *xth16-5* wurden Abschnitte der genomischen Sequenz entfernt. Die Deletionen sind als unterbrochene Linien abgebildet.

kodiert. Von diesem wird angenommen, dass es die katalytische Domäne darstellt, die sowohl für die Hydrolase- wie auch die Transferaseaktivität der XTHs benötigt wird (Okazawa *et al.*, 1993; Campbell & Braam, 1998).

Nach der stabilen Transformation mittels Agrobakterien wurden die Primärtransformanten (T1) *xth16-1* bis *xth16-13* durch die von der T-DNA vermittelte Phosphinothricin-Resistenz selektiert. Anschließend wurde aus den resistenten T1-Pflanzen genomische DNA aus einem Rosettenblatt extrahiert und über PCR genotypisiert. Mit der dafür verwendenden Primerkombination wird aus dem Wildtyp-Allel von *XTH16* ein 1191 bp großes Fragment amplifiziert. Bei erfolgreicher Induktion beider Doppelstrangbrüche, sowie der anschließenden Deletion des dazwischenliegenden Sequenzabschnitts, wurde ein Amplifikat von ungefähr 780 bp erwartet (Abbildung 3-6 C). Von den analysierten T1-Pflanzen konnte in neun ausschließlich ein Amplifikat in der Größe des Wildtyp-Allels nachgewiesen werden. In zwei Fällen (*xth16-6* und *xth16-8*) konnte sowohl das PCR-Fragment für das Wildtyp-Allel, als auch ein PCR-Fragment mit einer Größe von 780 bp beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass in einem Teil der Zellen, aus denen die gDNA extrahiert wurde, die gewünschte Mutation erfolgreich induziert wurde, während ein

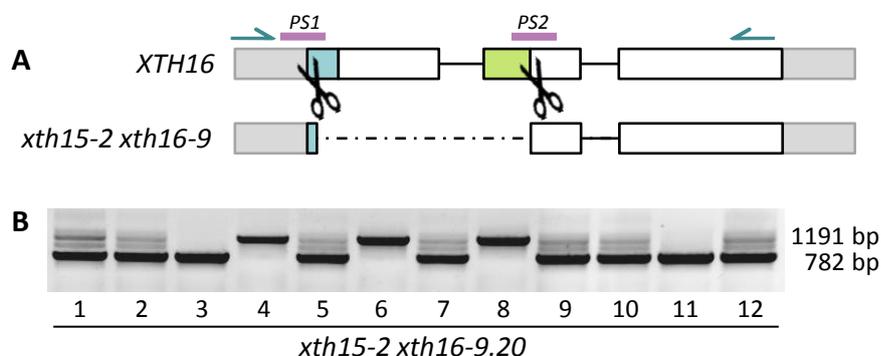
anderer Teil der Zellen nach wie vor das Wildtyp-Allel besitzt. Die PCR-Analyse der Pflanzen *xth16-1* und *xth16-5* zeigten zwar nicht das erwartete 780 bp Fragment, stattdessen wurden jedoch PCR-Amplifikate mit einer Größe von etwa 500 oder 300 bp vervielfältigt (Abbildung 3-6 A). Die Sequenzierung dieser PCR-Amplifikate zeigte, dass es in beiden Fällen durch die Induktion der Doppelstrangbrüche zu einer größeren Deletion in der kodierenden Sequenz von *XTH16* gekommen war, als erwartet. Anstelle von 400 bp, wurden hier 660 oder 891 bp aus der genomischen Sequenz entfernt (Abbildung 3-6 C).

Daraus wurde geschlossen, dass der gewählte Ansatz prinzipiell funktioniert, um den Genlocus von *XTH16* zu verändern. Aufgrund der konstitutiven Expression der Cas9-Nuklease können die Mutationen jedoch jederzeit während der Entwicklung der T1-Pflanzen aufgetreten sein. Da zur Genotypisierung gDNA aus Blattmaterial verwendet wurde, konnte zu diesem Zeitpunkt keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachteten Mutationen ebenfalls in Zellen der Keimbahn vorhanden waren und in die nächste Generation vererbt werden würden.

Um sicher zu stellen, dass die beobachteten Mutationen im Genlocus von *XTH16* tatsächlich in die T2 weitergegeben wurden, wurden jeweils 25 Pflanzen zur Genotypisierung ausgesät und über PCR analysiert. Bei den Nachkommen der Pflanzen *xth16-6* und *xth16-8*, die sich in der T1 heterozygot gezeigt hatten, konnte in der folgenden Generation lediglich das Wildtyp-Allel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Mutation wurde also nicht in die folgende Generation weitergegeben. In der T2-Generation der Linien *xth16-1* und *xth16-5* konnte eine Aufspaltung des Genotyps beobachtet werden. Die Genotypisierung der T2-Generation ist exemplarisch in Abbildung 3-6 B gezeigt. In beiden Fällen wurden Individuen gefunden, die bei der Genotypisierung homozygot für die bereits in der T1 beobachteten Mutationen waren, die nicht das erwartete PCR-Fragment von 780 bp, sondern PCR-Amplifikate mit einer Größe von etwa 500 bp (*xth16-1*) und 300 bp (*xth16-5*) aufwiesen. Die Genotypisierung von Pflanzen der T3-Generation bestätigte, dass es sich hierbei um vererbte Mutationen handelte. Für beide Mutationen war es möglich, homozygote Individuen zu identifizieren. Jedoch konnte nur für einen Nachkommen der Linie *xth16-5* nachgewiesen werden, dass die anfangs eingebrachte T-DNA bereits aus dem Genom herausgekreuzt wurde. Da diese Pflanzen, abgesehen von der induzierten Mutation von *XTH16*, wieder dem Wildtyp entsprechen, kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede im Phänotyp ausschließlich auf den *Knockout* von *XTH16* zurückzuführen sind.

Herstellung der Doppel-Knockout Linie *xth15-2 xth16-9*

Das Gen mit der höchsten Sequenzähnlichkeit zu *XTH16* ist *XTH15*. Die Aminosäuresequenzen zeigen 86% Übereinstimmung und es wird angenommen, dass beide Genen aus einem gemeinsamen Vorläufergen hervorgegangen sind (Rose *et al.*, 2002). Um zu analysieren, wie sich der gleichzeitige *Knockout* von *XTH15* und *XTH16* auswirkt, wurde das Konstrukt zur Induktion des *XTH16-Knockouts* ebenfalls stabil in die T-DNA-Insertionslinie *xth15-2* eingebracht. Die Primärtransformanden *xth15-2 xth16-1* bis *-17* wurden anhand ihrer Phosphinothricin-Resistenz selektiert und anschließend wie zuvor beschrieben genotypisch über PCR charakterisiert. Mit der dafür verwendeten Primerkombination wird aus dem Wildtyp-Allel von *XTH16* ein 1191 bp großes Fragment amplifiziert. Bei erfolgreicher Induktion der beiden Doppelstrangbrüche und anschließender Deletion des dazwischenliegenden Sequenzabschnitts, sollte ein Fragment von ungefähr 780 amplifiziert werden. In allen T1-Pflanzen war das Wildtyp-Allel noch nachweisbar. In den vier Pflanzen *xth15-2 xth16-1*, *-9*, *-12* und *-17* wurde aber zusätzlich ein PCR-Fragment mit einer Größe von 780 bp amplifiziert, was einen heterozygoten Zustand der Zellen, aus denen die gDNA extrahiert wurde, anzeigt. Wiederum wurden zur Untersuchung der T2-Generation jeweils 25 Pflanzen zur Genotypisierung ausgesät und über PCR analysiert. Dabei konnte in allen Nachkommen der Linien *xth15-2 xth16-1*, *-12* und *-17* ausschließlich das Wildtyp-Allel nachgewiesen werden. Bei der Genotypisierung der *xth15-2 xth16-9* Nachkommen wurde nur ein Individuum (*xth15-2 xth16-9.20*) identifiziert, bei dem, zusätzlich zum Wildtyp-Amplifikat, das entsprechend kleinere PCR-Fragment amplifiziert wurde. Es ist davon auszugehen, dass die in der T1 beobachteten Mutationen nicht in die T2 weitervererbt



**Abbildung 3-7: Genotyp der T3 der Linie *xth15-2 xth16-9*.**

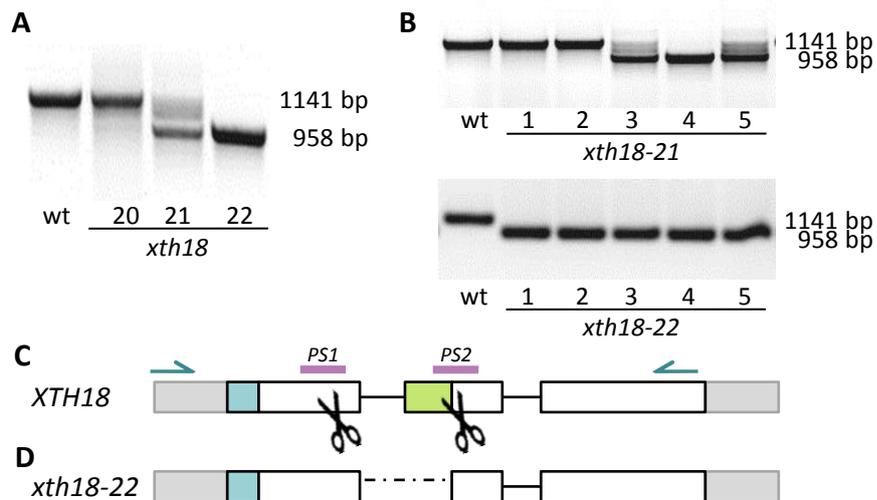
(A) Mittels Sequenzierung wurde die Deletion in der kodierenden Sequenz von *XTH16* bestätigt. Der deletierte Bereich ist als unterbrochene Linien abgebildet. (B) Exemplarisches PCR-Ergebnis der Genotypisierung der T3. Durch die Mendelschen Segregation der Genotypen kann die Vererbung der Mutation nachgewiesen werden.

wurden und es sich bei der Mutation, die in der T2 detektiert wurde, um eine neu entstandene Mutation handelte. Um zu überprüfen, ob diese neue Mutation an die folgende Generation weitergegeben wurde, wurden in diesem Fall 49 Individuen der T3 genotypisch charakterisiert. Wenn die T2-Pflanze heterozygot für die Mutation war, würde in der nächsten Generation eine Aufspaltung im Verhältnis 1:2:1 erfolgen. Da die Genotypisierung der T3 ergab, dass von den 49 untersuchten Pflanzen 10 ausschließlich das Wildtyp-Allel, 13 alleinig das veränderte Allel und 26 beide Allele aufwiesen, wurde geschlussfolgert, dass die Mutation stabil an die nächste Generation vererbt wurde. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab, dass die erwartete Deletion von 400 bp in der kodierenden Sequenz von *XTH16* (Abbildung 3-7 A) erfolgreich induziert wurde.

### 3.1.3.2 Nachweis des *XTH18-Knockouts*

Um den *Knockout* von *XTH18* zu induzieren, wurden zwei *Protospacer* entworfen, die im Genlokus von At4g30280 binden. Der eine *Protospacer* hybridisiert im ersten Exon, der andere im zweiten Exon des Gens (Abbildung 3-8 C). Durch die beiden *Protospacer* sollte ein etwa 200 bp großer Abschnitt aus der kodierenden Sequenz entfernt werden. Dadurch wird erreicht, dass die Sequenz, die für das XTH-typische DEIDFEFLG-Motiv kodiert, zerstört wird. Es wird davon ausgegangen, dass dies die katalytische Domäne darstellt, die sowohl für die Hydrolase- wie auch die Transferaseaktivität der XTHs benötigt wird (Okazawa *et al.*, 1993; Campbell & Braam, 1998).

Nach der stabilen Transformation wurden die T1-Pflanzen *xth18-1* bis *xth18-51* anhand ihrer Phosphinothricin-Resistenz selektiert. Anschließend wurde gDNA aus Rosettenblättern extrahiert und über PCR analysiert. Mit den verwendeten Primern wird von dem Wildtyp-Allel ein 1141 bp großes PCR-Produkt synthetisiert. Durch die etwa 200 bp große Deletion, wurde das mutierte Allel durch ein PCR-Amplifikat von etwa 950 bp nachgewiesen (Abbildung 3-8 A). Von den untersuchten Pflanzen erwiesen sich 41 als Wildtyp für den *XTH18*-Genlokus. In 8 Pflanzen wurden sowohl das Wildtyp-, als auch das PCR-Fragment, welches das mutierte Allel anzeigt, amplifiziert. Das bedeutet, dass die Mutation nicht in allen Zellen, aus denen die gDNA extrahiert wurde, vorhanden war. Bei den Pflanzen *xth18-11* und *xth18-22* wurde ausschließlich das mutierte Allel detektiert. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Mutationen tatsächlich in die nächste Generation weitergegeben wurden, wurden jeweils 25 Pflanzen der T2-Generation über PCR



**Abbildung 3-8: Genotypische Charakterisierung nach der Induktion des *XTH18*-Knockouts.**

(A) Nach der Transformation zur Induktion des *XTH18*-Knockouts wurden in der T1 verschiedene Genotypen identifiziert. (B) In der T2 wurde entweder eine Aufspaltung der Genotypen, oder die homozygote Vererbung der Mutation beobachtet. (C) Schema der *XTH18*-Genstruktur. Exons sind als Kästchen, Introns als durchgezogene Linie dargestellt. UTRs sind in grau, das Signalpeptid ist in blau und die katalytische Domäne in grün gezeichnet. Die Positionen der Protospacer (PS) sind in rosa markiert. Die PCR-Primer für die Genotypisierung sind als halbe Pfeile dargestellt. (D) In der Linie *xth18-22* wurde ein 200 bp großer Abschnitt der genomischen Sequenz entfernt. Die Deletion ist als unterbrochene Linie dargestellt.

genotypisiert. Von den 8 Primärtransformanten, die in der T1 einen heterozygoten Genotyp aufwiesen, wurde bei den Nachkommen von 6 der Pflanzen (*xth18-7*, *-10*, *-17*, *-21*, *-28* und *-45*) ein segregierender Genotyp beobachtet (Abbildung 3-8 B). Daraus kann geschlossen werden, dass in diesen Linien die Mutation vererbt wurde, während in den Linien *xth18-16* und *-34* die Mutation nicht in die Keimbahn eingetreten war, da alle Nachkommen alleinig das Wildtyp-Allel besaßen. Alle T2-Pflanzen der Linien *xth18-11* und *-22*, die bereits in der T1 homozygot für die *XTH18*-Mutation erschienen, wurden ausschließlich homozygot auf die Deletion getestet (Abbildung 3-8 B). Auch in der T3-Generation dieser beiden Linien konnte die Homozygotie für die Mutation bestätigt werden. Allerdings konnte nur für einen Nachkommen der Linie *xth18-22* nachgewiesen werden, dass die Cas9-kodierende T-DNA bereits aus dem Genom herausgekreuzt wurde. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab, dass es gelungen war, die beabsichtigte Deletion von 200 bp in der kodierenden Sequenz von *XTH18* zu induzieren.

Ein wichtiger Aspekt bei der Nutzung von CRISPR/Cas9 ist die Möglichkeit, dass unerwünschte Nebenziele ebenfalls von der Nuklease erkannt und mutagenisiert werden

(Endo, Mikami & Toki, 2015; Sun *et al.*, 2015). Dies ist ein besonderes Problem bei stark konservierten Sequenzen, wie zum Beispiel die kodierenden Bereiche für funktionelle Domänen in Genfamilien. Die *XTHs* bilden in Arabidopsis eine Genfamilie mit 33 Mitgliedern. Das DEIDFEFLG-Motiv, weist dementsprechend ein hohes Maß an Konservierung auf. Da der für den *XTH18*-Genlokus entworfene *Protospacer 2* in einem Teil der kodierenden Sequenz für dieses Motiv bindet, weist er nur eine oder zwei Fehlpaarungen zu den Sequenzen von *XTH7*, *XTH17*, *XTH20* und *XTH23* auf. Durch die Sequenzierung dieser Genomabschnitte wurde jedoch sichergestellt, dass diese keine Punktmutationen aufwiesen.

#### Herstellung der Mehrfach-Knockout Linien *xth18-23 xth19-1* & *xth17-2 xth18-23 xth19-1*

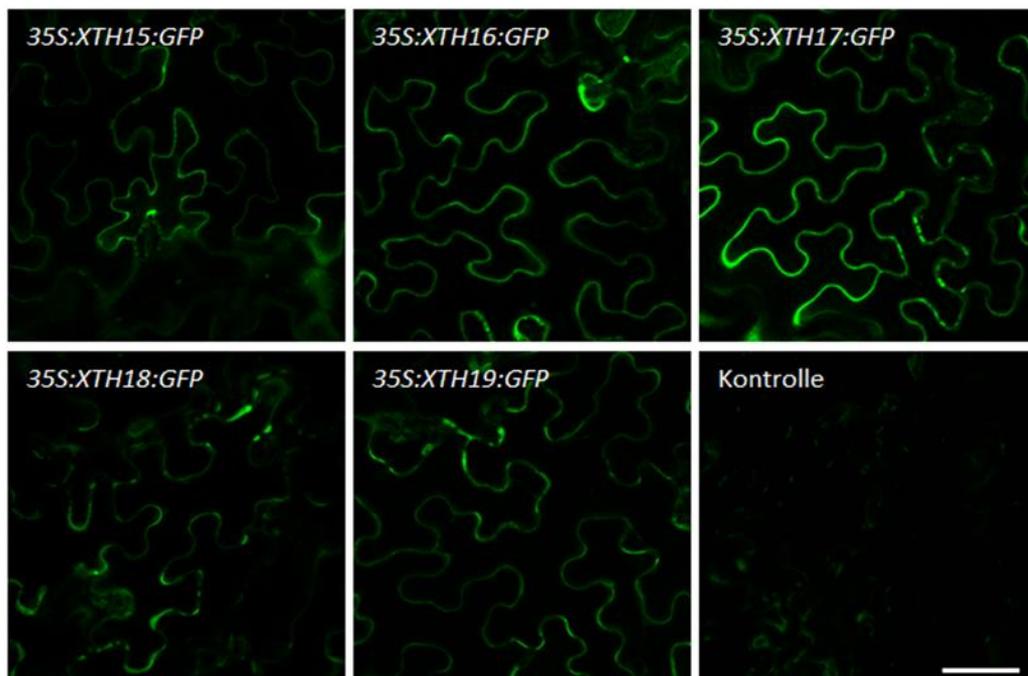
*XTH18* weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *XTH17* und *XTH19* auf. Die Aminosäuresequenz von *XTH18* stimmt zu 93% mit der von *XTH17* und zu 92% mit der von *XTH19* überein. Auch zeigen *XTH17* und *XTH19* zueinander 91% Übereinstimmung. Es wird davon ausgegangen, dass diese Gene durch Genduplikation entstanden sind. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass *XTH17* und *XTH18* auch beinahe identische Promotorsequenzen besitzen (Rose *et al.*, 2002). Aufgrund der starken Ähnlichkeit dieser drei *XTHs* und der Überschneidung der Expression in der Wurzel von Arabidopsis (Vissenberg *et al.*, 2005; Becnel *et al.*, 2006) sind Mehrfachmutanten von besonderem Interesse bei der Aufschlüsselung der Genfunktion.

*XTH18* und *XTH19* sind unmittelbar nebeneinander auf Chromosom 4 lokalisiert. Daher wurde, um den gleichzeitigen Ausfall der beiden Gene analysieren zu können, das CRISPR/Cas9-Konstrukt zum *Knockout* von *XTH18* in die T-DNA-Insertionslinie *xth19-1* eingebracht. Die Analyse der Transformanten wurde analog zu der Analyse des *XTH18-Knockouts* mit Wildtyp-Hintergrund durchgeführt. Auch in diesem Fall konnten zwei unabhängige Linien identifiziert werden (*xth18-13 xth19-1-13* und *xth18-23 xth19-1-23*), die bereits in der T1 homozygot für die Deletion im *XTH18*-Genlokus waren. Auch in den folgenden Generationen war das Wildtyp-Allel von *XTH18* nicht mehr nachweisbar, sodass die homozygote Weitergabe der Mutation bestätigt wurde. Im weiteren Verlauf konnte dann für einen Nachkommen der Linie *xth18-23 xth19-1-23* gezeigt werden, dass die anfangs eingebrachte T-DNA, auf der die Cas9-Nuklease kodiert ist, bereits aus dem Genom herausgekreuzt wurde.

Die Linie *xth17-2* gehört der SAIL-Kollektion (McElver *et al.*, 2001; Sessions *et al.*, 2002) an und trägt daher bereits eine Phosphinothricin-Resistenz auf der T-DNA, die im *XTH17*-Lokus inseriert ist. Aus diesem Grund war es nicht sinnvoll, das CRISPR/Cas9-Konstrukt zum *Knockout* von *XTH18* in diese Linie einzubringen. Um einen *Triple-Knockout* von *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* zu erzeugen, wurden daher Pflanzen der Linie *xth17-2* mit der Doppelmutante *xth18-23 xth19-1-23* gekreuzt.

### 3.2 XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 werden in den Apoplasten sekretiert

Durch bioinformatische Analysen war bekannt, dass XTHs N-terminal ein Signalpeptid besitzen, was mit ihrer Funktion als Zellwandenzyme übereinstimmt (Rose *et al.*, 2002). Durch die Experimente von Yokoyama & Nishitani (2001b) war bekannt, dass Proteine durch dieses Signalpeptid in den sekretorischen Weg der Proteinsynthese gelangen. Um die Lokalisation von XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19, möglicherweise in bestimmten Zellwänden oder Subkompartimenten der Zellwand zu bestimmen, wurden *GFP*-Fusionskonstrukte hergestellt. Um eine hohe Transkriptionsrate zu gewährleisten, wurde die



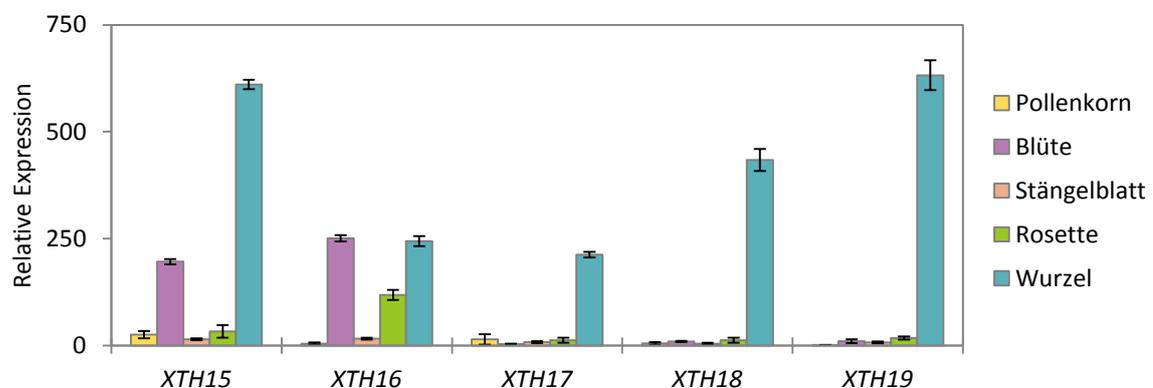
**Abbildung 3-9: Subzelluläre Lokalisation von XTH:GFP-Fusionsproteinen in Tabakepidermis.**

Die Fusionskonstrukte wurden unter der Kontrolle des 35S-Promotores transient in Tabakblättern exprimiert. Die GFP-Fluoreszenz wurde 3 bis 4 Tage nach der Infiltration am CLSM dokumentiert. Als Kontrolle wurden Blätter lediglich mit dem Infiltrationsmedium inokuliert. Der Maßstab entspricht 50 µm und ist für die gesamte Abbildung gültig.

Expression der Fusionkonstrukte unter die Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors gestellt. Die Herstellung der Vektoren ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Anschließend wurden die binären Expressionsvektoren zur transienten Transformation von Tabakblättern verwendet und die GFP-Fluoreszenz am CLSM dokumentiert (Abbildung 3-9). Im Inneren der Zellen wurde keine GFP-Fluoreszenz beobachtet, während durch die Lokalisation der GFP-Signale an den Außenkanten der transformierten Zellen, deutlich die Kontur der Epidermiszellen zu erkennen war. Beides deutete auf eine Lokalisation der Proteine im Apoplasten hin. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Intensität der GFP-Signale nicht gleichmäßig um die gesamte Zelle herum auftrat, sondern die Fluoreszenzintensität in einigen Bereich geringer, in anderen stärker war. Expression der Gene unter ihren endogenen Promotoren und Expression in Arabidopsis müsste nun durchgeführt werden, um auszuschließen, dass dies ein Artefakt heterogene Proteinexpression ist.

### 3.3 Entwicklungs- und gewebespezifische Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19*

Um Hinweise auf die Funktion von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* zu erhalten, wurde die jeweilige entwicklungs- und gewebespezifische Expression untersucht. Zunächst wurden, um einen Überblick über die Transkription der Gene im gesamten Kormus der Pflanze zu bekommen, die Microarraydaten des *eFP-Browsers* (Winter *et al.*, 2007) für eine *in silico* Auswertung der Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* genutzt. Exemplarisch sind in Abbildung 3-10 die Expressionsdaten in reifen Pollenkörnern, Blüten



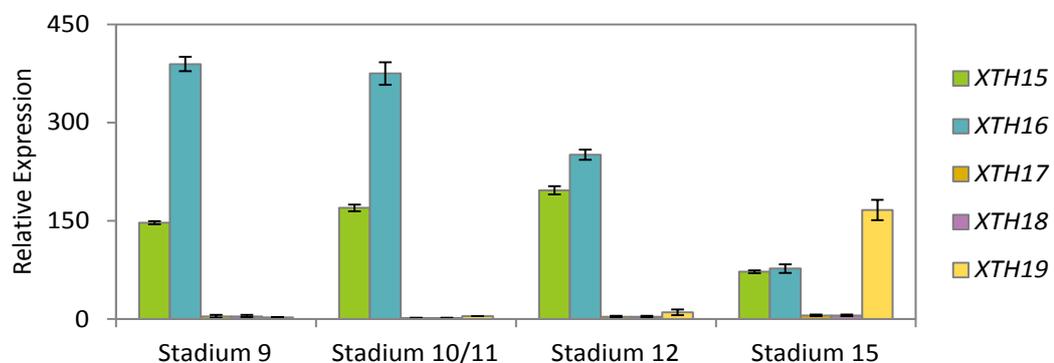
**Abbildung 3-10: Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in verschiedenen Geweben.** Angegeben ist die relative Expression der fünf Gene in reifen Pollenkörnern, Blüten (Stadium 12), Stängelblättern, Rosetten und Wurzeln. Die Expressionsdaten wurden dem *eFP-Browser* (Winter *et al.*, 2007) entnommen. Angegeben ist jeweils die relative Expression  $\pm$ SD.

(Stadium 12), Stängelblättern, Rosetten und Wurzeln gezeigt. Für *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* wurde eine wurzelspezifische Expression nachgewiesen. *XTH15* wurde in jungen Infloreszenzen detektiert, jedoch wurde die stärkste Expression ebenfalls in der Wurzel beobachtet. Hingegen zeigte *XTH16* eine fast ubiquitäre Expression, wobei die größten Transkriptmengen von *XTH16* im Sprossapex, jungen Blüten und in der Wurzel detektiert wurden. Zusätzlich zu den *in silico* Analysen wurden Reporterlinien erzeugt, die das für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodierende Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle der genspezifischen Promotoren der fünf XTHs enthielten. Die stabil transformierten Arabidopsislinien wurden *XTH15:GUS*, *XTH16:GUS*, *XTH17:GUS*, *XTH18:GUS* und *XTH19:GUS* genannt. Es wurden jeweils mindestens 7 unabhängige Linien hinsichtlich ihrer GUS-Expression verglichen.

### 3.3.1 Aktivität der *XTH15*- und *XTH16*-Promotoren während der Blütenentwicklung

Expressionsdaten des *eFP-Browsers* (Winter *et al.*, 2007) zeigten, dass *XTH15* und *XTH16* in jungen Infloreszenzen exprimiert werden und ein Rückgang der Expressionsrate in adulten Blüten erfolgt. Im Gegensatz dazu werden *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* während der Entwicklung der Infloreszenzen nicht exprimiert. Erst in der reifen Blüte, nachdem die Selbstpollinierung bereits abgeschlossen ist, findet ein Anstieg der Expression von *XTH19* statt (Abbildung 3-11).

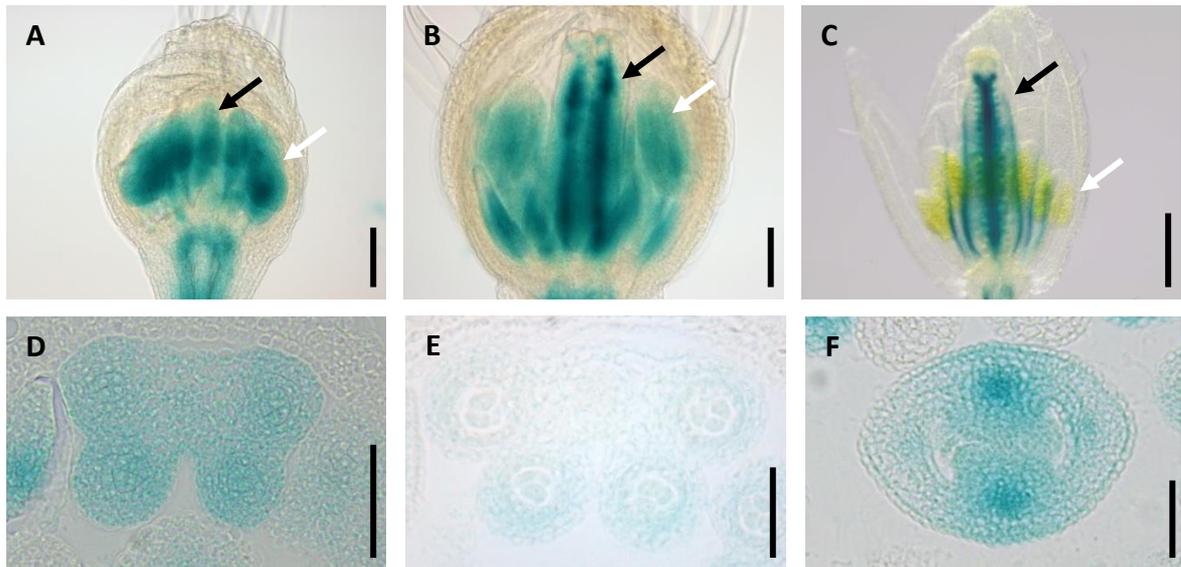
Um detailliertere Einblicke in das Expressionmuster und damit Hinweise auf die mögliche Funktion von *XTH15* und *XTH16* während der Blütenentwicklung zu erhalten, wurden die Reporterlinien *XTH15:GUS-6* und *XTH16:GUS-7* untersucht. Beide Promotoren



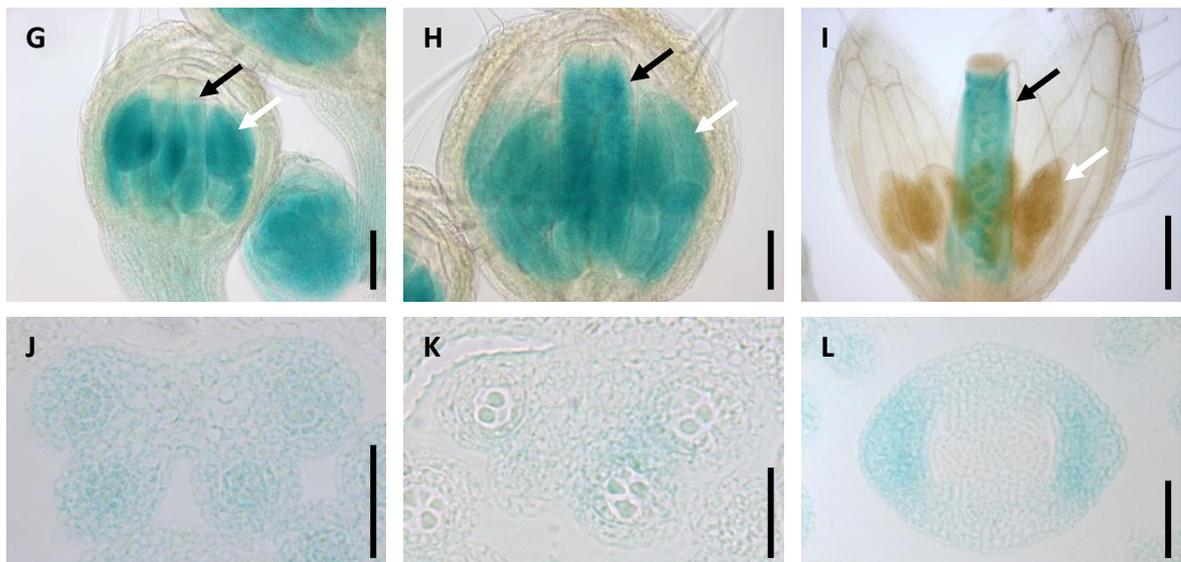
**Abbildung 3-11: Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in Infloreszenzen.**

Die Expressionsdaten wurden dem *eFP-Browser* (Winter *et al.*, 2007) entnommen. Angegeben ist die relative Expression der *XTHs* in kompletten Blütenständen des jeweils angegebenen Entwicklungsstadiums der Blüten (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010),  $\pm$ SD.

*XTH15:GUS-6*



*XTH16:GUS-7*



**Abbildung 3-12: Expression von *XTH15* und *XTH16* während der Entwicklung der Infloreszenzen.**

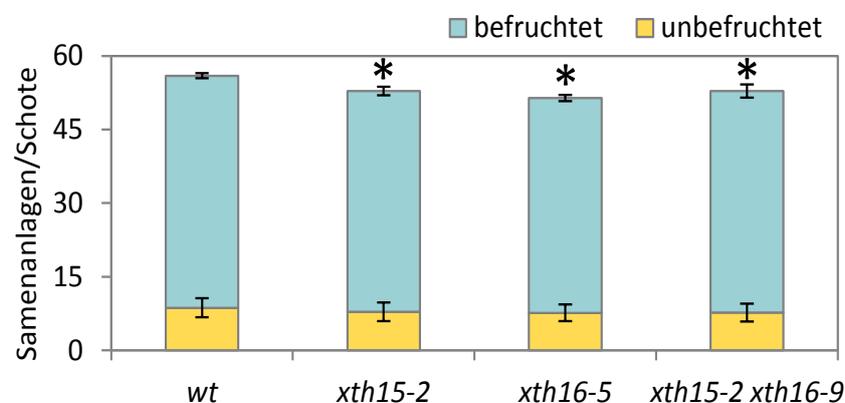
Die Aktivität der *XTH15*- und *XTH16*-Promotoren wurde in Blüten verschiedener Entwicklungsstadien histochemisch untersucht. In (A & G) sind Blüten im Stadium 8, in (D & J) die korrespondierenden Antheren im Querschnitt abgebildet. (B & H) zeigen Blüten im Stadium 9. In (E & K) sind die entsprechenden Antheren, in (F und L) entsprechende Fruchtknoten im Querschnitt dargestellt. In (C & I) sind Blüten im Stadium 12 zu sehen. Die Einteilung der Blütenstadien erfolgte nach Alvarez-Buylla *et al.*, 2010. Die weißen Pfeile zeigen auf Antheren, die schwarzen auf das Gynoeceum. Der Maßstab entspricht in C und I 500  $\mu$ m, in den anderen Abbildungen 100  $\mu$ m.

wiesen im Stadium 8 der Blütenentwicklung (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) eine starke Aktivität in den Anlagen der Antheren und des Gynoeceums auf, während keine GUS-Expression in den Sepalen beobachtet wurde (Abbildung 3-9 A und G). Zu diesem Zeitpunkt sind alle Gewebeschichten der Antheren vorhanden und in den Theken erscheinen die

Mikrosporenmutterzellen (Sanders *et al.*, 1999). Im Querschnitt zeigte sich, dass in diesem Stadium die Promotoren von *XTH15* und *XTH16* in allen Gewebeschichten der Antheren aktiv sind (Abbildung 3-9 D und J). Im Laufe der Antherenentwicklung war eine stete Abnahme der Promotoraktivität von *XTH15* und *XTH16* zu beobachten (Abbildung 3-9 E und K). Nachdem die Entwicklung der Antheren soweit abgeschlossen war, dass sich reife Pollenkörner im Inneren der Theken befanden, war in den Stamina eine GUS-Expression unter Kontrolle des *XTH15*-Promotors nur noch in den Filamenten erkennbar (Abbildung 3-9 C). Der *XTH16*-Promotor war in diesen Entwicklungsstadien nicht in den Stamina aktiv (Abbildung 3-9 I). In späteren Entwicklungsstadien der Blüten war die Aktivität beider Promotoren auf das Gynoeceum beschränkt. Ein Querschnitt durch das Fruchtblatt zeigte, dass die Expressionsmuster der *XTH15*- und *XTH16*-Promotoren nicht vollständig übereinstimmten. Zwar zeigten beide Promotoren eine leichte Aktivität in allen Gewebeschichten des Gynoeceums, jedoch war der *XTH15*-Promotor verstärkt im Bereich der Vaskulatur aktiv (Abbildung 3-9 F), der *XTH16*-Promotor hingegen verstärkt im Bereich der Klappen der Kapelle (Abbildung 3-9 L). Außerdem war der *XTH15*-Promotor, jedoch nicht der *XTH16*-Promotor im inneren des Sprosses aktiv.

### 3.3.1.1 Einfluss von *XTH15* und *XTH16* auf die Bildung von Samen

Da beide Promotoren während der Entwicklung der Blüten primär in den reproduktiven Organen aktiv waren, wurde untersucht, ob sich der *Knockout* einer oder beider Gene auf die Ausbildung der Samen auswirkt. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der befruchteten



**Abbildung 3-13: Samenbildung in *XTH15*- und *XTH16*-*Knockout*-Linien.**

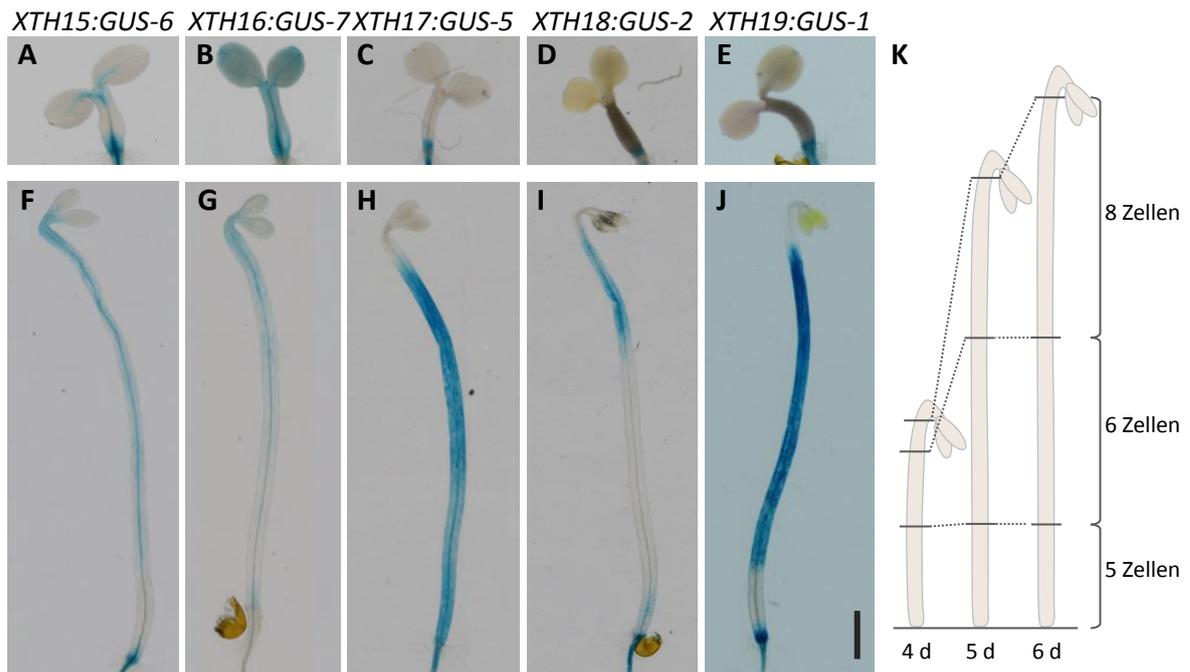
Anzahl der befruchteten (blau), sowie der unbefruchteten (gelb) Samenanlagen in den jeweils ersten 10 Schoten des Haupttriebs der Linien *xth15-2*, *xth16-5* und *xth15-2 xth16-9* im Vergleich zum Wildtyp. \* signalisieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp mit  $p < 0,05$  (*Student's t-Test*,  $n \geq 17$ ,  $\pm SE$ ).

Samenanlagen in den jeweils ersten 10 Schoten des Haupttriebs der Linien *xth15-2*, *xth16-5* und *xth15-2 xth16-9* mit der des Wildtyps verglichen (Abbildung 3-10). Der Wildtyp bildete durchschnittlich 47,3 Samen je Schote, was einer Befruchtungsrate von 84,5% entsprach. Schoten der Linie *xth15-2* trugen im Schnitt 45,0 befruchtete Samenanlagen, bei *xth16-5*-Schoten waren es 43,8 und in Schoten von *xth15-2 xth16-9*-Pflanzen waren im Schnitt 45,2 Samen enthalten. Dies entspricht einer jeweiligen Befruchtungsrate von 85,2% (*xth15-2*), 85,1% (*xth16-5*) und 85,5% (*xth15-2 xth16-9*). Da dies mit der rate des Wildtyps übereinstimmte, wurde zwar keine Auswirkung des *Knockouts* von *XTH15* und/oder *XTH16* auf die Befruchtungsrate festgestellt, allerdings war die Anzahl der Samenanlagen insgesamt in den *Knockout*-Linien signifikant reduziert.

### 3.3.2 Promotoraktivität von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in Hypokotylen etiolierter Keimlinge

Die Epidermis des Hypokotyls von *Arabidopsis* weist von der Basis bis zum Apex Zellreihen mit einer festen Anzahl von etwa 20 Zellen auf (Gendreau *et al.*, 1997). Aus diesem Grund eignet sich das Hypokotyl besonders, um Streckungswachstum von Zellen zu analysieren. Um zu untersuchen, ob *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* eine Rolle beim Streckungswachstum von etiolierten Keimlingen zukommt, wurde zunächst die Expression der Gene mit Hilfe von Reporterlinien histochemisch untersucht.

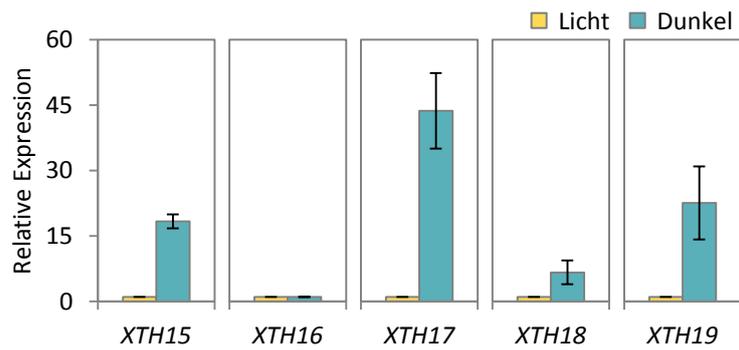
Beim Vergleich der GUS-Aktivität in Hypokotylen von fünf Tage alten Keimlingen, die entweder im Licht oder im Dunkeln angezogen wurden, wurde für jedes der fünf Gene eine Veränderung des Expressionsmuster durch die Etiolierung beobachtet (Abbildung 3-14). Im Hypokotyl von Keimlingen, die im Licht angezogen wurden, war die Aktivität des *XTH15*-Promotors an der Basis, im Apex und im Leitgewebe der Kotyledonen zu beobachten (Abbildung 3-14 A). Der *XTH16*-Promotor war im gesamten Hypokotyl, einschließlich der Kotyledonen aktiv (Abbildung 3-14 B). Hingegen waren die Promotoren von *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in den Hypokotylen der im Licht angezogenen Keimlinge nicht aktiv (Abbildung 3-14 C bis E). In den Hypokotylen der etiolierten Keimlinge war die *XTH15*-Expression am stärksten im Bereich des Hypokotylhakens und nahm zur Basis hin ab (Abbildung 3-14 F). Ein ähnliches Muster wies auch der *XTH16*-Promotor auf, allerdings war die Expression insgesamt schwächer, als die von *XTH15* (Abbildung 3-14 G). Eine Aktivität des *XTH17*-Promotors war, mit Ausnahme der Zellen des Hypokotylhakens, im gesamten Hypokotyl zu



**Abbildung 3-14: Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in fünf Tage alten Keimlingen.** Die Aktivität der Promotoren wurde in Hypokotylen von im Licht und im Dunkeln angezogenen Keimlingen histochemisch analysiert. In (A - E) sind Keimlinge, die unter Langtagbedingungen angezogen wurden, in (F - J) im Dunkel angezogene Keimlinge abgebildet. (K) zeigt eine schematische Darstellung der Streckungszonen etiolierter Keimlinge vom vierten bis zum sechsten Tag (verändert nach Gendreau *et al.*, 1997). Der Maßstab entspricht 1 mm und ist für A - J gültig.

beobachten (Abbildung 3-14 H). Die Expression von *XTH18* fand räumlich begrenzt auf das obere Drittel des Hypokotyls, ohne den Hypokotylhaken, statt (Abbildung 3-14 I). Mit Ausnahme des basalen Bereichs des Hypokotyls sowie des Hypokotylhakens, war der Promotor von *XTH19* über die gesamte Länge des Hypokotyls aktiv (Abbildung 3-14 J). Es ist bekannt, dass die Streckung der Zellen bei der Elongation des Hypokotyls nicht gleichmäßig stattfindet (Gendreau *et al.*, 1997). Vom vierten auf den fünften Tag findet das stärkste Wachstum im apikalen und mittleren Bereich des Hypokotyls statt, vom fünften auf den sechsten Tag strecken sich hauptsächlich die Zellen in der apikalen Bereich (Gendreau *et al.*, 1997). Beim Vergleich der Bereiche in denen das Streckungswachstum der Zellen stattfindet, mit den Bereichen, in denen die Promotoraktivitäten in den fünf Tage alten Keimlingen nachgewiesen wurde, konnten deutliche Übereinstimmung festgestellt werden. Die Promotoraktivität von *XTH17* und *XTH19* stimmte mit den Streckungszonen vom vierten auf den fünften Tag überein, die Aktivität der *XTH15*-, *XTH16*- und *XTH18*-Promotoren korrelierte mit der Wachstumszone vom fünften auf den sechsten Tag (Abbildung 3-14 K).

Durch den histochemischen Nachweis deutete sich ein Anstieg der Transkription der



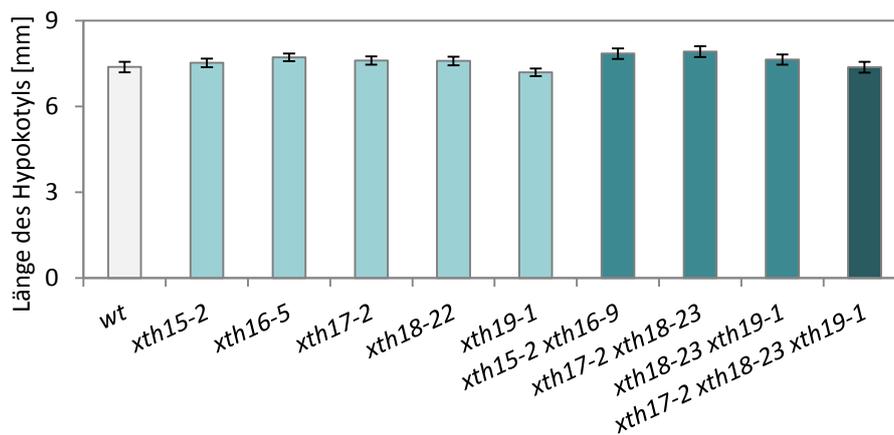
**Abbildung 3-15: Expression von XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 in Hypokotylen etiolierter und deetiolierter Keimlinge.**

Die Expression wurde in Hypokotylen von im Licht und im Dunkel angezogenen Keimlingen über qRT-PCR bestimmt. Die relative Expression der *XTHs* in etiolierten Hypokotylen wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Als Referenzgene für die qRT-PCR wurden *TIP41* (At4g34270) und *AP2M* (At5g46630) verwendet.

untersuchten *XTHs* in etiolierten Hypokotylen an. Um die Veränderung der Expression zu quantifizieren, wurde eine *Realtime*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt (im Rahmen dieser Arbeit betreute Bachelorarbeit: Hansen 2017). Da über RT-PCR herausgefunden wurde, dass die Expression der üblicherweise verwendeten Referenzgene *ACTIN 2* und *GAPC* ebenfalls durch die Etiolierung der Keimlinge beeinflusst wurde, wurden in diesem Fall *TAP42 INTERACTING PROTEIN OF 41 KDA (TIP41, At4g34270)* und *ADAPTOR PROTEIN-2 MU-ADAPTIN (AP2M, At5g46630)* als Referenzgene verwendet (im Rahmen dieser Arbeit betreute Bachelorarbeit: Hansen 2017). Über die qRT-PCR konnte ein Anstieg der relativen Expression der Gene in Hypokotylen etiolierter Keimlinge nachgewiesen werden. Die Transkriptmenge von *XTH15* war in den sich streckenden Hypokotylen um das 18,3-fache, von *XTH17* um das 43,7-fache, von *XTH18* um das 6,6-fache und von *XTH19* um das 22,5-fache erhöht. Eine Ausnahme stellte *XTH16*, welches bereits im Spross der im Licht angezogenen Keimlinge exprimiert wurde, dar. In diesem Fall blieb die Transkriptmenge auch bei der Etiolierung der Keimlinge konstant (Abbildung 3-15).

### 3.3.2.1 Einfluss von XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 auf das Streckungswachstum etiolierter Keimlinge

Da *XTH15*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in den sich streckenden Zellen etiolierter Hypokotyle verstärkt exprimiert waren, wurde überprüft, ob sich der *Knockout* von einem, zwei oder drei der Gene auf das Streckungswachstum des Hypokotyls auswirkt. Dazu wurden Keimlinge für fünf Tage im Dunkeln



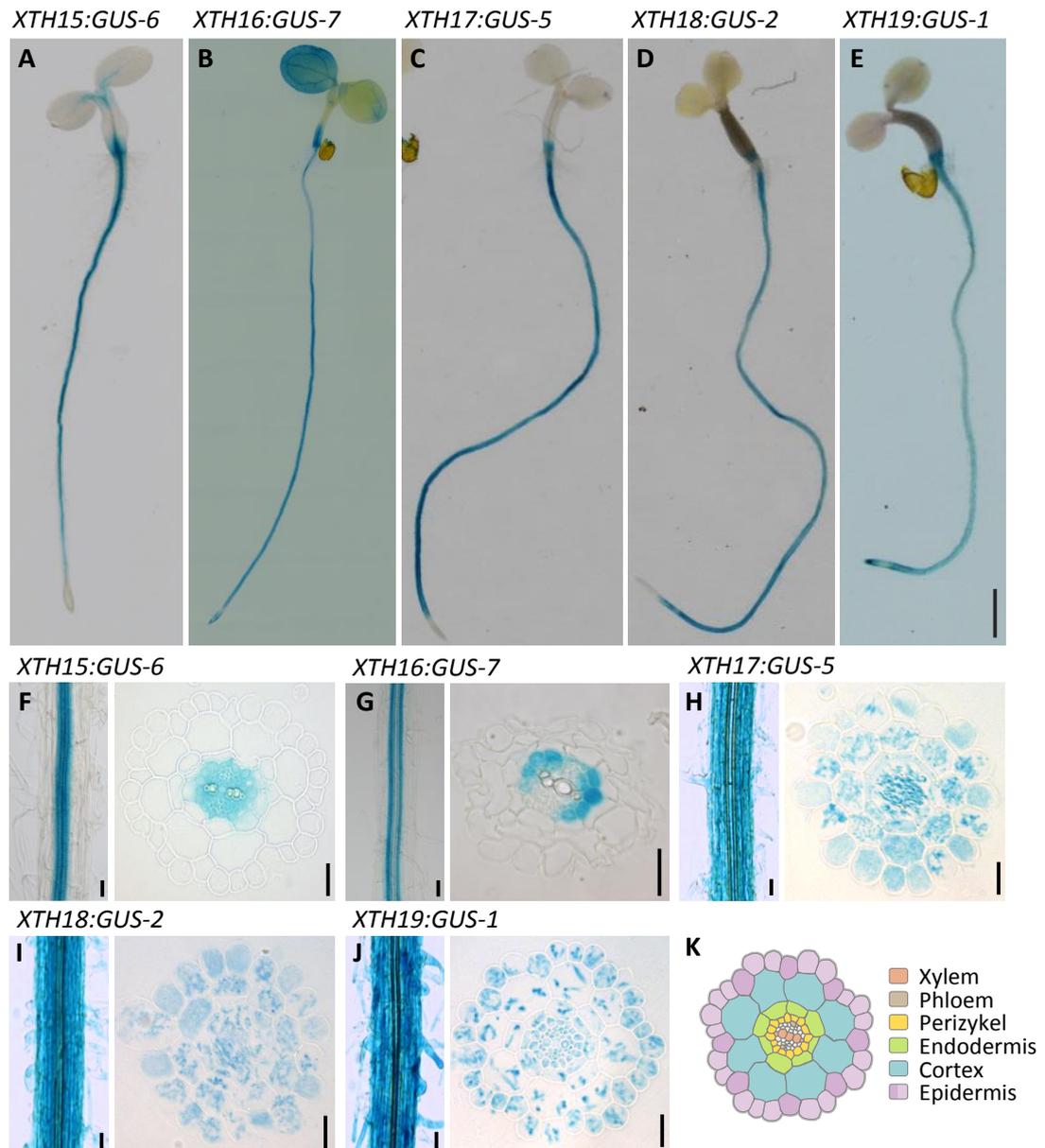
**Abbildung 3-16: Hypokotyllänge etiolierter ein-, zwei- und dreifach-*Knockout*-Keimlinge.**

Länge der Hypokotyle von fünf Tage im Dunkeln angezogenen Keimlingen von einfachen (hellblau), zweifachen (blau) oder dreifachen (dunkelblau) *Knockout*-Linien von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden zwischen den Linien keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) festgestellt (*Student's t*-Test,  $n \geq 30$ ,  $\pm$ SE).

angezogen und anschließend die Länge der Hypokotyle vermessen (Abbildung 3-16). Es konnte in den Mutanten jedoch kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Aktivität von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in der Wurzel

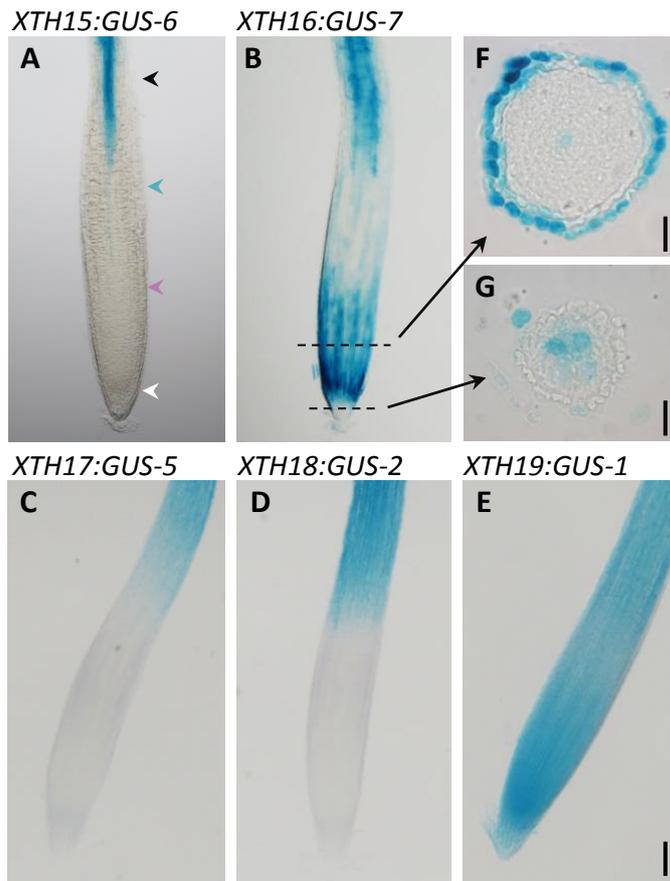
Die Daten des *eFP-Browsers* (Winter *et al.*, 2007) zeigten für alle fünf untersuchten *XTHs* eine Expression in der Wurzel an. Um aufzuklären, welche Funktionen den *XTHs* in der Wurzel zukommen könnten, wurden zunächst Reporterlinien verwendet, um die Expression der *XTHs* in der Wurzel differenziert zu untersuchen. Interessanterweise waren zwar alle Promotoren in der Elongations- und Differenzierungszone der Wurzel aktiv, gleichzeitig konnten jedoch auch deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der Gene festgestellt werden (Abbildung 3-17). Unter der Kontrolle des *XTH15*-Promotors wurde eine GUS-Expression ausschließlich im Zentralzylinder der Wurzel beobachtet. In der Spitze der Wurzel ist die Expression erst in der Elongations- und Differenzierungszone nachweisbar (Abbildung 3-18 A). Im Querschnitt konnte gezeigt werden, dass die Expression von *XTH15* auf das Leitgewebe, inklusive des Perizykels, begrenzt war (Abbildung 3-17 F). Der *XTH16*-Promotor war ebenfalls in der Elongations- und Differenzierungszone in den inneren Wurzelschichten aktiv. Im Unterschied zu der *XTH15*-Expression, erschien die GUS-Expression unter der Kontrolle des *XTH16*-Promotors in zwei parallelen angeordneten Strängen. Im Querschnitt war zu erkennen, dass *XTH16* spezifisch in den Xylem-assoziierten Perizykelzellen exprimiert wurde (Abbildung 3-17 G). Ein weiterer Unterschied zum *XTH15*-



**Abbildung 3-17: Expressionsmuster von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in der Wurzel.**

(A - E) Die Promotoraktivitäten der *XTHs* wurden in fünf Tage alten Keimlingen histochemisch untersucht. (F - J) Aufsicht auf die Wurzeln in der Differenzierungszone und die entsprechenden Querschnitte. (K) Schematische Darstellung einer Wurzel im Querschnitt. Der Maßstab in E entspricht 1 mm und ist für A - E gültig, in F - J entspricht der Maßstab 25  $\mu$ m.

Expressionsmuster bestand darin, dass der *XTH16*-Promotor auch in der Wurzelspitze im Bereich der meristematischen Zone aktiv war (Verbelen *et al.*, 2006). Ein Querschnitt durch diesen Bereich zeigte, dass die beobachtete Aktivität des *XTH16*-Promotors jedoch nicht in den Zellen des Meristems, sondern in den darüber liegenden Zellen der Wurzelhaube stattfand. *XTH16* wurde besonders stark in den Zellen der lateralen Wurzelhaube und vereinzelt in Zellen der Columella exprimiert (Abbildung 3-18 F und G). Eine deutliche



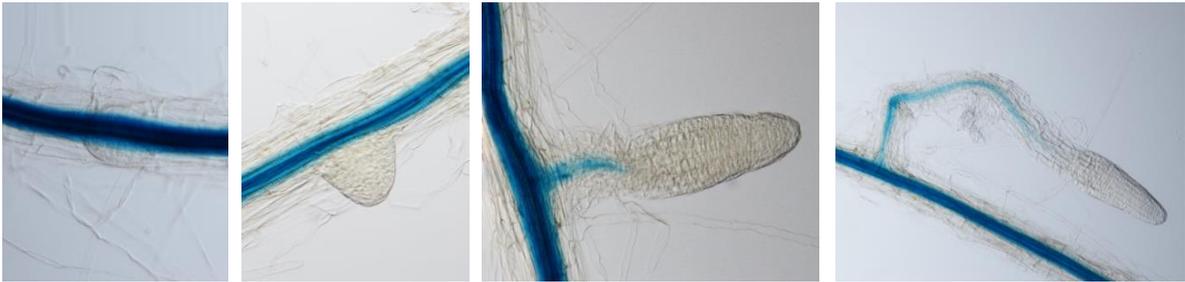
**Abbildung 3-18: Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in der Wurzelspitze.**

(A – E) Histochemischer Nachweis der Promotoraktivität in der Wurzelspitze fünf Tage alter Keimlinge. In Abbildung F sind exemplarisch die verschiedenen Entwicklungszonen der Wurzelspitze mit Pfeilen markiert. weiß: Übergang von Wurzelhaube zu Wurzel, lila: Ende der Meristematischen Zone, blau: Ende der Übergangszone, schwarz: Ende der Streckungs- und Beginn der Differenzierungszone (Verbelen *et al.*, 2006). (F) Querschnitt durch den meristematischen Bereich mit der lateralen Wurzelhaube. (G) Querschnitt durch Zellen der Columella. Der Maßstab in E entspricht 100 µm und ist für A - E gültig, der Maßstab in F und G entspricht 20 µm.

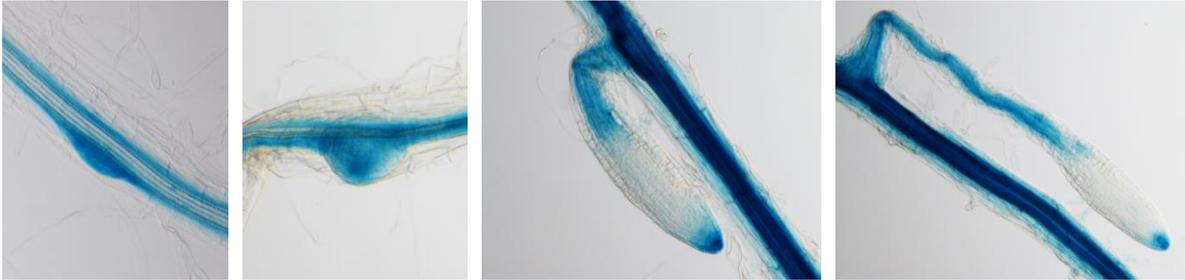
Überschneidung in der Aktivität wurde bei den Promotoren von *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* beobachtet. Alle drei Promotoren waren in der Elongations- und Differenzierungszone der Wurzeln aktiv. Auch wurde unter der Kontrolle dieser Promotoren eine GUS-Expression in den Wurzelhaaren beobachtet. Im Querschnitt zeigte sich, dass die drei Promotoren in allen Gewebeschichten der Wurzel aktiv sind (Abbildung 3-17 H - J). Im Gegensatz zu den Promotoren von *XTH17* und *XTH18* war der *XTH19*-Promotor zusätzlich in der gesamten Wurzelspitze aktiv (Abbildung 3-18 E).

Zusammenfassend konnte für die *XTH15*-, *XTH16*-, *XTH17*-, *XTH18*- und *XTH19*-Promotoren eine starke Aktivität in der Wurzel bestätigt werden. Alle fünf untersuchten Promotoren sind in der Elongations- und Differenzierungszone aktiv. Da im Gegensatz zu *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* die Expression von *XTH15* und *XTH16* nicht in allen Gewebeschichten stattfindet, findet eine Überschneidung der Promotoraktivität nur in den Perizykelzellen über den Xylempolen des Leitgewebes statt. Dies ist besonders interessant, da es sich bei diesen Zellen um die Gründerzellen der Lateralwurzeln handelt (Dolan *et al.*, 1993; Casimiro *et al.*, 2003). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Reporterlinien

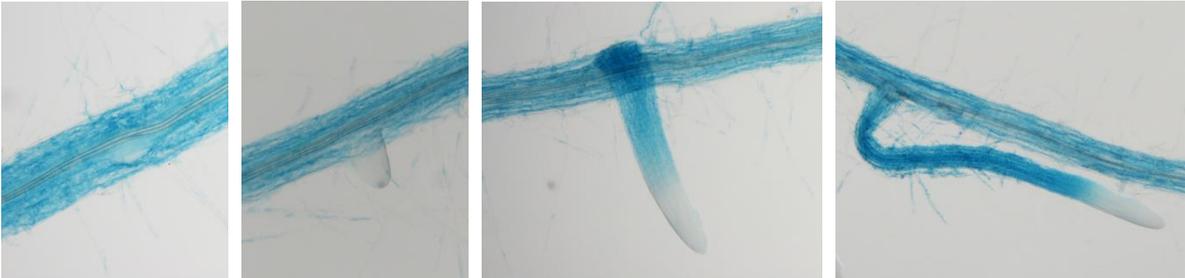
*XTH15:GUS-6*



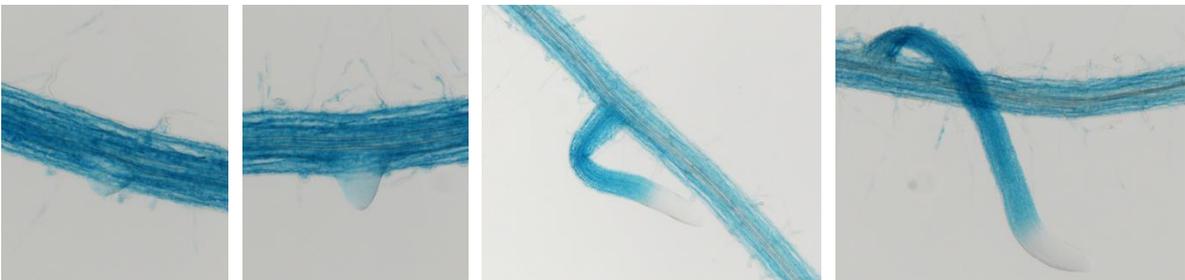
*XTH16:GUS-7*



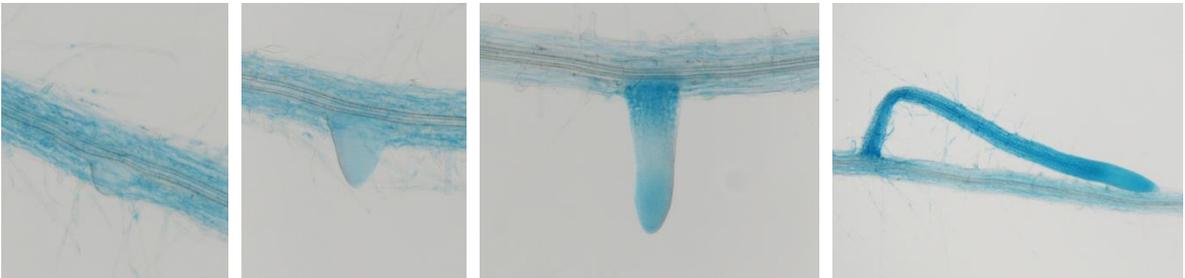
*XTH17:GUS-5*



*XTH18:GUS-2*



*XTH19:GUS-1*



**Abbildung 3-19: Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* während des Wachstums der Lateralwurzeln.**

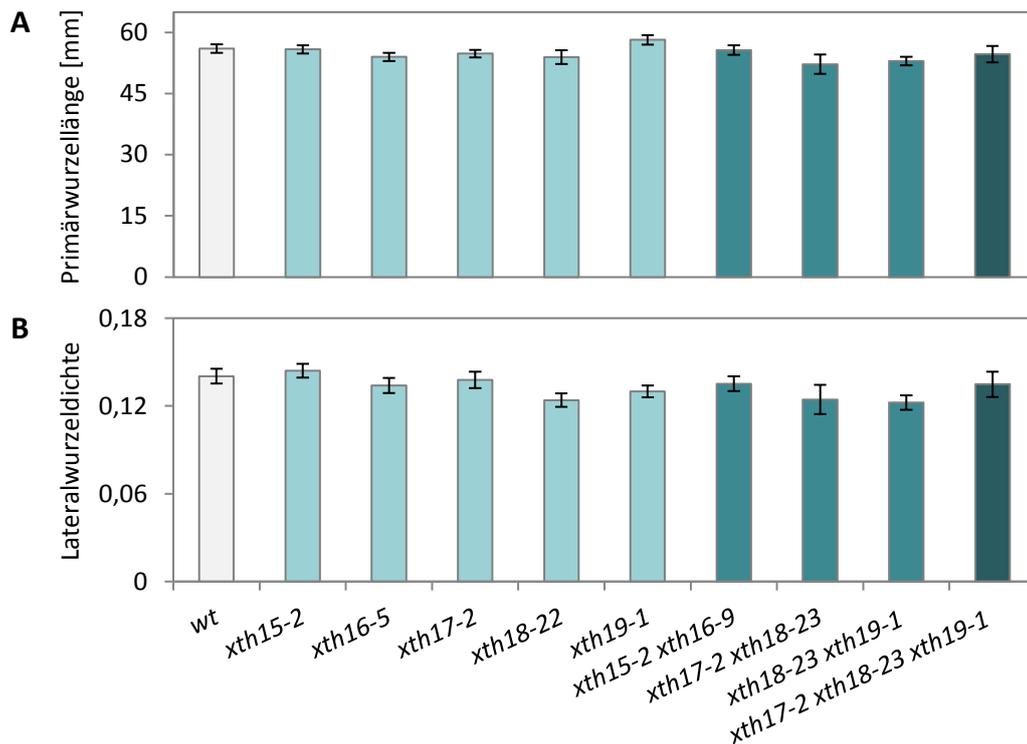
Die Aktivität der Promotoren wurde während verschiedener Elongationsstadien der Lateralwurzeln histochemisch untersucht. Von links nach rechts ist die graduelle Entwicklung der Lateralwurzeln sowie die GUS-Expression unter der Kontrolle des jeweiligen *XTH*-Promotors abgebildet. Ganz links sind Lateralwurzeln kurz vor und nach dem Austreten aus der Primärwurzel gezeigt, ganz rechts sind deutlich gestreckte Lateralwurzeln zu sehen.

verwendet, um zu untersuchen, ob *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* ebenfalls während der Entwicklung von Lateralwurzeln exprimiert werden (Abbildung 3-19). In jungen Lateralwurzeln, die sich in einem Entwicklungsstadium kurz vor oder nach dem Austreten aus der Primärwurzel befinden, waren lediglich die Promotoren von *XTH16* und *XTH19* aktiv. Unter der Kontrolle der Promotoren von *XTH15*, *XTH17* und *XTH18* war eine GUS-Expression erst ab der Elongationszone der Lateralwurzeln zu beobachten. In der Elongations- und der Differenzierungszone der Lateralwurzeln konnte eine auf die inneren Gewebeschichten begrenzte Expression von *XTH15* und *XTH16* beobachtet werden, während die Expression von *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* diese Spezifität nicht aufwies. Insgesamt betrachtet, zeigten die Promotoren der fünf *XTHs* in den Lateralwurzeln die gleichen Expressionsmuster, die bereits in der Primärwurzel beobachtet wurden.

### 3.4 *XTH16*, *XTH17* und *XTH18* fördern das Wachstum von Lateralwurzeln

Aufgrund der starken Expression von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* sowohl in den Primär- als auch in den Lateralwurzeln, wurde im Folgenden untersucht, welche Rolle diese *XTHs* bei der Morphogenese der Wurzel einnehmen. Zu diesem Zweck wurden einfach, zweifach und dreifach *Knockout*-Linien hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht.

Veranlasst durch die Expression aller fünf untersuchten *XTHs* in der Elongations- und Differenzierungszone der Primärwurzel wurde zunächst überprüft, ob der *Knockout* von einem, zwei oder drei der Gene Einfluss auf das Längenwachstum der Primärwurzel nahm. Dazu wurde die Länge der Primärwurzel von neun Tage alten Keimlingen bestimmt (Abbildung 3-20 A). Jedoch konnte durch den Verlust der *XTHs* kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. Da die Promotoren von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* in den über den Xylempolen gelegenen Perizykelzellen aktiv sind, wurde außerdem untersucht, ob sich der Verlust der Genfunktion der untersuchten *XTHs* auf die Initiierung von Lateralwurzeln auswirkt. Zu diesem Zweck wurde die Dichte der Lateralwurzeln bei neun Tage alten Keimlingen ermittelt (Abbildung 3-20 B). Es wurde jedoch auch in diesem Fall kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt. Als nächstes wurde, aufgrund der Expression in der Elongations- und Differenzierungszone der Lateralwurzeln, analysiert, ob der einfach, zweifach oder dreifach *Knockout* das Längenwachstum der Lateralwurzeln beeinflusst. Bei der Bestimmung der Gesamtlänge der Lateralwurzeln von neun Tage alten

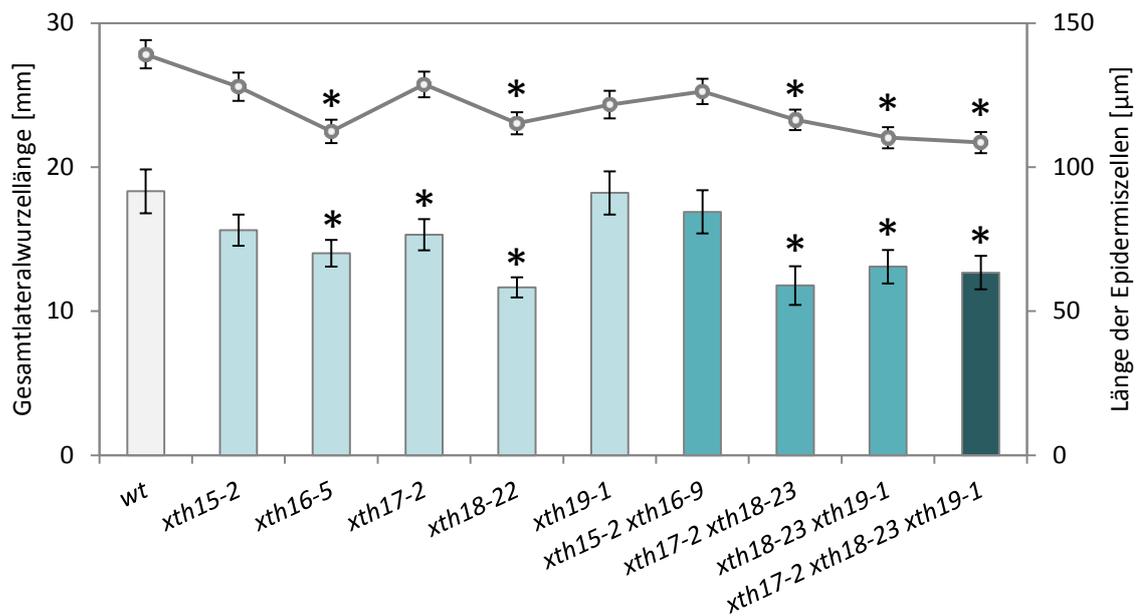


**Abbildung 3-20: Morphogenese der Wurzel von ein-, zwei- und dreifach-Knockout-Linien.**

(A) Länge der Primärwurzel, (B) Dichte der Lateralwurzeln neun Tage alter Keimlingen einfacher (hellblau), zweifacher (blau) oder dreifacher (dunkelblau) *Knockout*-Linien von *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden zwischen den Linien keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) festgestellt (*Student's t*-Test,  $n \geq 30$ ,  $\pm$ SE).

Keimlingen zeigte sich, dass bereits der einfache *Knockout* von *XTH16*, *XTH17* und *XTH18* zu einer geringeren Gesamtlateralwurzellänge führte (Abbildung 3-21). Entsprechend war auch die Lateralwurzellänge in den Doppelmutanten *xth17-2 xth18-23* und *xth18-23 xth19-1* sowie der dreifachen Mutante *xth17-2 xth18-23 xth19-1* verringert. Interessanterweise rief der Doppel-*Knockout* von *XTH15* und *XTH16* keine Verkürzung der Lateralwurzeln hervor. Da die Promotoren von *XTH16*, *XTH17* und *XTH18* nicht im Bereich des Meristems der Lateralwurzeln exprimiert wurden, wurde angenommen, dass die Verkürzung der Lateralwurzeln auf ein geringeres Streckungswachstum der Zellen, und nicht auf eine verminderte Zellteilung zurückzuführen war. Um dies zu überprüfen, wurden ausdifferenzierte Atrichoblasten der Lateralwurzeln vermessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Epidermis der Mutanten signifikant kürzere Zellen als der Wildtyp aufwies (Abbildung 3-21).

Zusammenfassend führten die Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass, obwohl laut



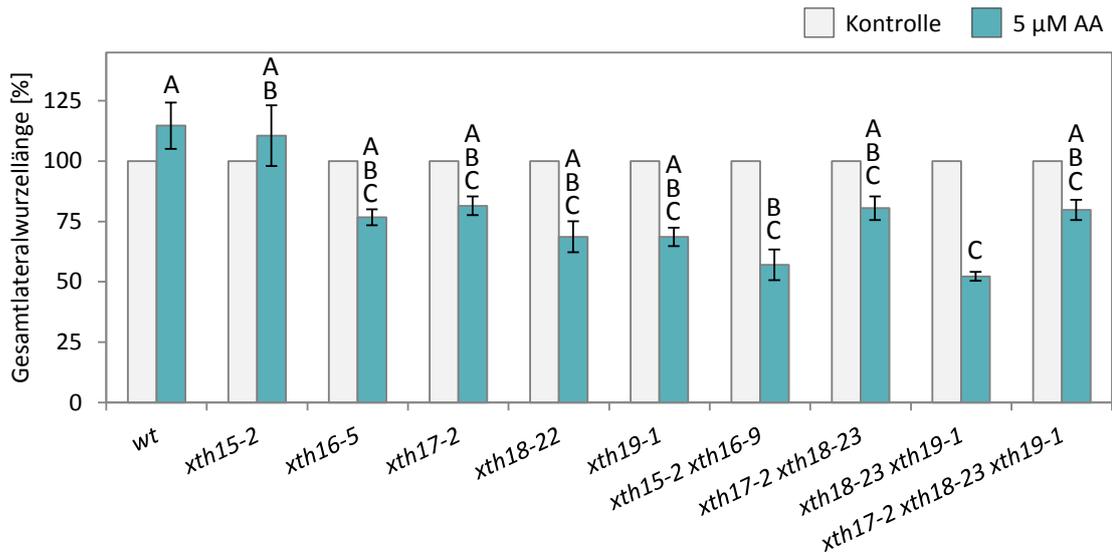
**Abbildung 3-21: Einfluss des Knockouts von XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 auf das Streckungswachstum von Lateralwurzeln.**

Dargestellt ist die aufsummierte Länge der Lateralwurzeln pro Keimling sowie die durchschnittliche Länge ausdifferenzierter Atrichoblasten der Lateralwurzeln von neun Tage alten Keimlingen. Der einfache *Knockout* von XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 ist in hellblau, der zweifache in blau und der dreifache in dunkelblau angedeutet. \* signalisieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp, mit  $p < 0,05$  (*Student's t-Test*,  $n \geq 30$ ,  $\pm SE$ ).

der Expressionsdaten des *eFP-Browsers* XTH15 und XTH19 in der Wurzel eine stärkere Expression aufwiesen, als die anderen drei Gene, die Funktionsverluste von XTH16, XTH17 und XTH18, durch ein eingeschränktes Streckungswachstum der Lateralwurzeln, einen Einfluss auf die Morphogenese der Wurzel nahmen.

### 3.4.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum der Lateralwurzeln

Beim Streckungswachstum von Zellen ist ein Gleichgewicht von Lockerung und Verknüpfung der Zellwandpolymere der primären Zellwand von großer Bedeutung. Die Spaltung der Verbindungen von Zellwandpolysacchariden kann zum einen enzymatisch, beispielsweise durch XTHs geschehen, andererseits wird Spaltung von Xyloglucan auch durch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gefördert (Fry, 1998). Zusätzlich wurde bereits ein Einfluss verschiedener ROS auf das Wachstum der Primärwurzel beschrieben. Von Dunand *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass eine Abnahme von Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) oder Hydroxyl-Radikalen (<sup>•</sup>OH) eine inhibierende Wirkung, hingegen die Verringerung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine



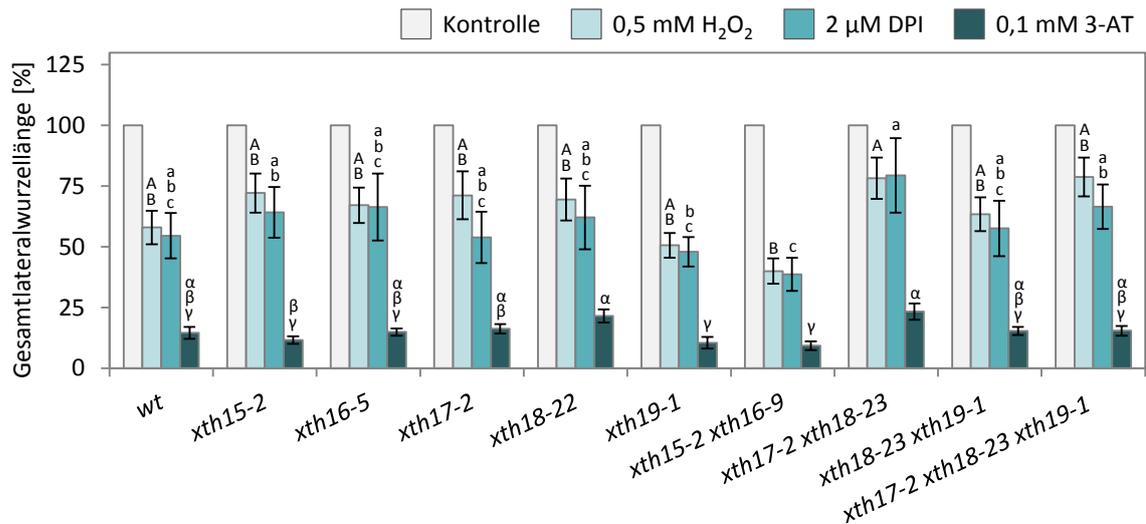
**Abbildung 3-22: Lateralwurzellänge der XTH-Knockout-Linien nach Behandlung mit Antimycin A.**

Keimlinge wurden auf MS-Medium mit oder ohne 5 µM Antimycin A umgesetzt. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der aufsummierten Länge der Lateralwurzeln im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Unterschiedliche Buchstaben weisen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin,  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test),  $n \geq 18$ ,  $\pm$ SE.

fördernde Wirkung auf das Wachstum der Primärwurzeln haben.

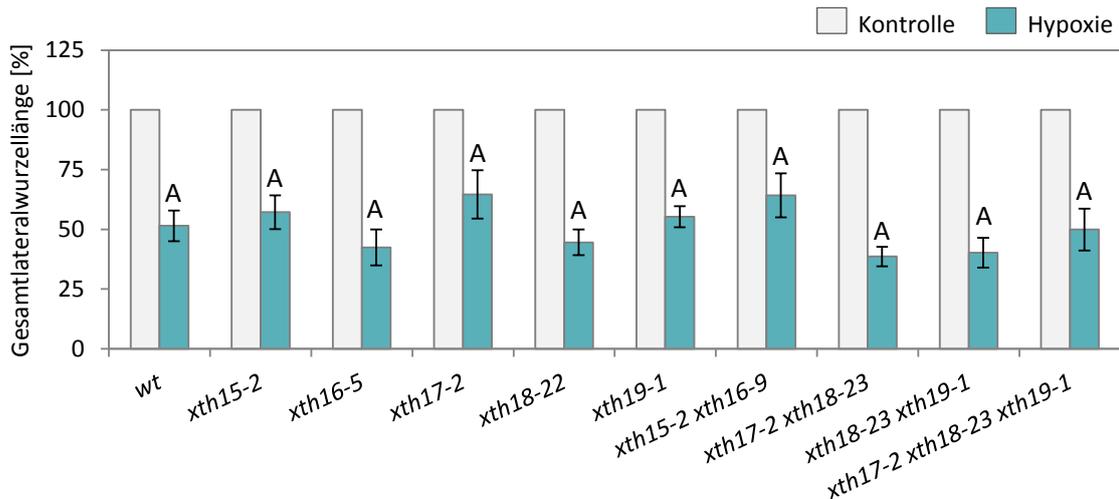
Da gezeigt wurde, dass in den *Knockout*-Linien von *XTH16* und *XTH18* ein geringeres Streckungswachstum der Epidermiszellen der Lateralwurzeln stattfindet, wurde untersucht, ob eine Wechselwirkung zwischen dem verringertem Lateralwurzelwachstum der *XTH-Knockout*-Linien und der ROS-Konzentration innerhalb der primären Zellwand besteht. Daher wurden Keimlinge mit Antimycin A (AA) behandelt. Dieses bindet an den Komplex III der Elektronentransportkette in der inneren Membran der Mitochondrien, wodurch es zu einer Inhibierung des Elektronentransports kommt. Dies führt zum einen zu einer verminderten Produktion von  $O_2^{\bullet-}$  und  $H_2O_2$  (Chandel *et al.*, 1998; Quinlan *et al.*, 2011). Nachdem 5 Tage alte Keimlinge für 4 Tage mit 5 µM AA behandelt wurden, wurde die Gesamtlänge der Lateralwurzeln pro Keimling bestimmt (Abbildung 3-22). Im Wildtyp sowie in der Linie *xth15-2* hatte die Behandlung mit AA im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine Zunahme der Gesamtlänge der Lateralwurzeln von etwa 10% zur Folge. Hingegen zeigten die Einfach- und Mehrfach-*XTH-Knockout*-Linien ein verringertes Wachstum der Lateralwurzeln von etwa 20% bis 30%. Ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp wurde lediglich in den Linien *xth15-2 xth16-9* und *xth18-23 xth19-1* beobachtet. Diese zeigten eine Verkürzung der Lateralwurzeln um etwa 45% im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 3-23: Lateralwurzellänge der XTH-Knockout-Linien nach DPI, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 3-AT-Behandlung.** Keimlinge wurden auf MS-Medium mit oder ohne 2 μM DPI, 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 0,1 mM 3-AT umgesetzt. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der aufsummierten Länge der Lateralwurzeln im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Unterschiedliche Buchstaben weisen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin,  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test),  $n \geq 20$ ,  $\pm$ SE.

Um zu untersuchen, ob die erhöhte ROS-Konzentration für die Inhibierung des Lateralwurzelwachstums verantwortlich war, wurden Keimlinge mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Diphenyliodonium (DPI) und 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) behandelt (Abbildung 3-24). DPI hemmt die NADPH-Oxidase in der Plasmamembran, wodurch es zu einer verringerten ROS-Produktion im Apoplasten kommt (Bolwell & Wojtaszek, 1997), während 3-AT die Katalasen hemmt, wodurch die Umwandlung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser und Sauerstoff verringert ist (Prasad, 1997). Der stärkste Effekt auf das Wachstum der Lateralwurzeln wurde durch die Behandlung mit 3-AT beobachtet. Dies hemmte das Lateralwurzelwachstums am stärksten in den Linien *xth19-1* und *xth15-2 xth16-5*. Die Lateralwurzellängen waren hier im Vergleich zur Kontrolle um etwa 90% kürzer. Die beiden Genotypen unterschieden sich damit signifikant zu den Linien *xth17-2*, *xth18-22* und der entsprechenden Doppelmutante *xth17-2 xth18-23*, jedoch nicht zu der entsprechenden Dreifach-Mutante *xth17-2 xth18-23 xth19-1*. In den Linien *xth18-22* und *xth17-2 xth18-23* fand eine Inhibierung des Lateralwurzelwachstums von etwa 80% statt. Die anderen Einfach- und Mehrfach-Knockout-Linien, sowie der Wildtyp, zeigten einen intermediären Phänotyp und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen festgestellt werden. Die exogene Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf das Lateralwurzelwachstum. Die stärkste Inhibierung war in der Linie *xth15-2 xth16-5* zu beobachten. Die Lateralwurzeln waren im Vergleich zur Kontrolle um etwa 60% verkürzt,



**Abbildung 3-24: Veränderung der Lateralwurzellänge in den XTH-Knockout-Linien nach Hypoxie.**

Sechs Tage alte Keimlinge wurden für 4 Tage entweder im Dunkeln (Kontrolle) oder im Dunkeln mit 2% O<sub>2</sub> (Hypoxie) inkubiert. Nach 2 Tagen Regeneration in Normoxie (21% O<sub>2</sub>) unter Langtagbedingungen wurde die Gesamtlateralwurzellänge pro Keimling bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der aufsummierten Länge der Lateralwurzeln im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden,  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test),  $n \geq 20$ ,  $\pm$ SE

wodurch sich diese Linie signifikant von der Linie *xth17-2 xth18-23* unterschied. Hier betrug die Verkürzung der Lateralwurzeln etwa 20% im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise hatte DPI einen ähnlichen Effekt auf das Lateralwurzelnwachstum wie die exogene Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wiederum war die stärkste Inhibierung, von etwa 60% im Vergleich zur Kontrolle, in der Linie *xth15-2 xth16-5* zu beobachten. Diese unterschied sich dadurch signifikant von der Doppel- sowie der Dreifach-Mutante *xth17-2 xth18-23* und *xth17-2 xth18-23 xth19-1*, in denen die Lateralwurzeln um etwa 20% und 30% verkürzt waren. In den anderen XTH-Knockout-Linien, sowie im Wildtyp, wurden auch hier intermediäre Phänotypen beobachtet, die jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen aufzeigten. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DPI oder 3-AT die durch AA induzierte Hemmung des Lateralwurzelnwachstums in den XTH-Knockout-Linien nicht phänotypisch kopieren konnten, wurde untersucht, ob das geringere Lateralwurzelnwachstum nicht durch die erhöhte Produktion von ROS, sondern durch die verminderte ATP-Synthese verursacht worden sein könnte. Dazu wurden 6 Tage alte Keimlinge für 4 Tage im Dunkeln hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>) ausgesetzt. Als Kontrolle wurden Keimlinge für den gleichen Zeitraum unter normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) im Dunkeln gehalten. Anschließend wurden die Keimlinge zur Regeneration für 48 h zurück in Normoxie unter Langtagbedingungen transferiert, bevor die Länge der Lateralwurzeln

bestimmt wurde (Abbildung 3-24). Durch die verminderte O<sub>2</sub> Versorgung der Keimlinge wurde die Länge der Lateralwurzeln im Wildtyp um 45% vermindert. In den *Knockout*-Linien wurde eine Verringerung des Lateralwurzelnwachstums von 30% bis 60% dokumentiert. Da die erhobenen Daten jedoch eine starke Streuung aufwiesen, konnte insgesamt weder ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp, noch zwischen den unterschiedlichen *XTH-Knockout*-Linien festgestellt werden.

Insgesamt führten die Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass ROS nicht nur, wie von Dunand *et al.* (2006) gezeigt, einen Einfluss auf das Wachstum der Primärwurzel, sondern auch auf das Wachstum der Lateralwurzeln haben. Wobei durch die Erhöhung der ROS-Konzentration das Lateralwurzelnwachstum in der Linie *xth15-2 xth16-2* signifikant stärker inhibiert wurde, als in der Doppelmutante *xth17-2 xth18-23*. Beide Linien unterschieden sich jedoch nicht statistisch signifikant vom Wildtyp.

## 4 Diskussion

Die Mitglieder der Arabidopsis *XTH*-Genfamilie *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* sind phylogenetisch nah miteinander verwandt und gehören der Untergruppe II an. Durch die Untersuchungen von Maris *et al.* (2009, 2011) ist bekannt, dass *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* sowie weitere Vertreter der Untergruppe II *in vitro* ausschließlich XET- und keine nachweisbare XEH-Aktivität aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass sich die fünf Gene bei ihrer Expression in der Vaskulatur der Wurzel überschneiden. Um zu untersuchen, ob den Genen eine bestimmte physiologische Funktion zukommt, oder ob sie funktionell redundant sind, wurden Einfach- und Mehrfach-*Knockout*-Linien identifiziert oder erzeugt und untersucht. Da für *XTH16* und *XTH18* keine T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung standen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst *Knockdown*-Linien mit Hilfe von amiRNA-Konstrukten hergestellt. Als im Verlauf dieser Arbeit das CRISPR/Cas9-System als molekulargenetisches Werkzeug verfügbar wurde, wurden anschließend gezielt *Knockout*-Linien erzeugt.

### 4.1 Mit CRISPR/Cas9 können mit hoher Effizienz und Spezifität größere Deletionen induziert werden

Für die Konzeption der amiRNA-Konstrukte zum *Knockdown* von *XTH16* wurde der *WMD3 – Web MicroRNA Designer* (Schwab *et al.*, 2006; Ossowski, Schwab & Weigel, 2008) verwendet. Basierend auf verschiedenen Kriterien, wie beispielsweise die Position der Fehlpaarungen mit der Ziel-mRNA oder die Differenz zwischen der Hybridisierungsenergie zu der Ziel-mRNA und eventuellen ungewünschten Nebenzielen (Schwab *et al.*, 2006), wird von diesem eine Rangfolge möglicher amiRNA-Sequenzen erstellt. Die vorgeschlagenen amiRNA-Sequenzen zum *Knockdown* von *XTH16*, die weit oben in der Rangfolge des *WMD3* gelistet waren, befanden sich alle innerhalb der kodierenden Sequenz. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen *Knockdown* zu induzieren, wurden drei Sequenzen (amiR-A, -B und -C) ausgewählt, die an möglichst verschiedenen Positionen auf der mRNA von *XTH16* binden sollten. amiR-A war so gewählt, dass diese kurz hinter dem Start-ATG, also nah am 5'-UTR bindet, während amiR-B mitten in der kodierenden Sequenz mit der mRNA hybridisierte. Die Position von amiR-C befand sich hingegen kurz vor dem Stopp-Codon, also nahe des 3'UTRs

(Abbildung 3-3). Obwohl es gut erforscht ist, dass natürlich vorkommende miRNAs im 3'UTR der entsprechenden mRNA binden und dadurch der Abbau dieser mRNAs induziert wird (Wightman, Ha & Ruvkun, 1993; Lai, 2002; Reinhart, 2002), konnte in den Linien, die das amiR-C-Konstrukt trugen, unabhängig ob im Wildtyp- oder *xth15-2*-Hintergrund, über RT-PCR keine Reduktion der Transkriptmenge festgestellt werden. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch miRNAs, die im 5'-UTR oder der kodierenden Sequenz binden, effektiv die Expression von Genen posttranskriptionell regulieren können (Kloosterman *et al.*, 2004; Lytle, Yario & Steitz, 2007). Tatsächlich konnte auch hier die stärkste Reduktion der Transkriptmenge mit dem amiR-B-Konstrukt, welches mittig in der mRNA hybridisierte, herbeigeführt werden. Über qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass in der Linie *xth15-2 amiR xth16-B4* die Transkriptmenge um etwa 78% im Vergleich zum Wildtyp oder der *xth15-2 Knockout*-Linie reduziert wurde. In anderen unabhängigen *xth15-2 amiR xth16-B*-Linien wurde eine Reduktion der Transkripte von ungefähr 60% beobachtet. Obwohl damit gezeigt wurde, dass mit dem amiR-B-Konstrukt eine deutliche posttranskriptionelle Regulation der *XTH16*-mRNA möglich ist, konnte in den *Knockdown*-Linien optisch kein Phänotyp festgestellt werden. Dies könnte sowohl auf die mögliche Redundanz der *XTH*-Genfamilie, als auch auf die vorhandene, restliche Funktion von *XTH16* zurückzuführen sein. Generell ist die Analyse von RNAi-Linien mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden. Eine Schwierigkeit stellt die Spezifität der amiRNA-Sequenz dar, da lediglich eine etwa 20 Nukleotide umfassende Erkennungssequenz ausgewählt wird. Daher besteht die Möglichkeit, dass unerwünschte Nebenziele ebenfalls erkannt und degradiert werden (Small, 2007). Dies ist im Besonderen ein Problem, wenn Gene, wie beispielsweise die *XTHs*, von einer großen Genfamilien kodiert werden, die vermutlich durch Genduplikation und -translokation entstanden ist (Blanc *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2002). Dementsprechend weisen dann die kodierenden Sequenzen eine starke Sequenzähnlichkeit zueinander, insbesondere innerhalb der funktionellen Domänen, auf. Aus diesem Grund wäre es unbedingt notwendig, zu verifizieren, dass die Expression anderer *XTHs* in den amiR-Linien nicht ebenfalls reguliert ist. Ein weiterer Nachteil bei der Nutzung von amiRNA-Linien besteht darin, dass der Effekt der Transkriptreduktion nicht verlässlich in die folgenden Generationen weitergegeben wird (Wang *et al.*, 2005). Das bedeutet, dass für Experimente entweder nur das Saatgut, das von einer einzigen Pflanze geerntet wurde, verwendet werden kann, da nur in diesem Fall davon ausgegangen werden sollte, dass diese Nachkommen etwa das gleiche Transkriptlevel

aufweisen und daher die Auswirkung auf den Phänotyp vergleichbar ist. Verwendet man Saatgut verschiedener Pflanzen oder aus verschiedenen Generationen, kann es zu einer Abschwächung des Phänotyps kommen (Wang *et al.*, 2005). Dies kann besonders im Fall eines nicht sehr stark ausgeprägten Phänotyps die Analysen erheblich erschweren.

Mit der Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems als molekulargenetisches Werkzeug ist es möglich geworden, in die Genexpression nicht nur auf posttranskriptioneller Ebene einzugreifen, sondern mit hoher Effizienz gezielte Veränderung in die genomische Sequenz einzuführen und dadurch bereits die Transkription zu beeinflussen oder diese gänzlich zu verhindern. Wie bei dem Entwerfen der amiRNA, werden bei der Konzeption von CRISPR/Cas9-Experimenten etwa 20 Nukleotid lange Erkennungssequenzen, die *Protospacer*, im entsprechenden Bereich der DNA ausgewählt. Einzige Voraussetzung dieser Sequenz ist, dass sie direkt neben einem bestimmten DNA-Motiv, dem sogenannten *protospacer-adjacent motif* (PAM) liegt. Daher stellen auch hier große Genfamilien, mit konservierten Sequenzen ein Problem für die Spezifität dar. In dieser Arbeit wurde zur Induktion des *Knockout* von *XTH16* und *XTH18* ein Ansatz gewählt, bei welchem jeweils zwei *Protospacer* im Abstand von mehreren Hundert Basenpaaren zueinander gewählt wurden. Ziel dieses Ansatzes war, dass an jeweils zwei Stellen im entsprechendem Genlokus ein DNA-Doppelstrangbruch induziert werden sollte, sodass bei der anschließenden Reparatur der DNA durch die Pflanze, der dazwischenliegende Teil der genomischen Sequenz deletiert werden würde. Obwohl zwei *Protospacer* je Genlokus verwendet wurden, wurde dadurch keine höhere Spezifität des Systems erreicht. Es ist zwar unwahrscheinlich, dass beide *Protospacer* in einem anderen Genlokus binden und dort ebenfalls eine Deletion von mehreren Hundert Basenpaaren induzieren, jedoch genügt es bereits, dass einer der beiden *Protospacer* an einer anderen Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch induziert. Wird dieser Doppelstrangbruch mit dem fehleranfälligen *non-homologous end joining* repariert, wird dort mit großer Wahrscheinlichkeit eine Punktmutation entstehen (Salomon & Puchta, 1998; Weterings & Chen, 2008). Daher stellt die Mutation ungewollter Nebenziele ein Problem bei der Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems dar (Cho *et al.*, 2014), insbesondere da bereits gezeigt wurde, dass von der Cas9-Nuklease auch dann ein Doppelstrangbrüche induziert werden kann, wenn die *Protospacer*-Sequenz nicht vollständig mit der Ziel-DNA übereinstimmt (Endo, Mikami & Toki, 2015; Sun *et al.*, 2015). Doch obwohl einer der beiden für den *XTH18*-Genlokus entworfenen *Protospacer* mit nur einer oder zwei Fehlpaarungen

ebenfalls in den Sequenzen von *XTH7*, *XTH17*, *XTH20* und *XTH23* hätte binden können, waren in den entsprechenden Genabschnitten bei der Sequenzierung keine Mutationen vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass das verwendete System in Arabidopsis besonders spezifisch zu funktionieren scheint.

Ein besonders wichtiger, wenn nicht sogar der wichtigste Aspekt bei der Nutzung von CRISPR/Cas9 liegt darin, sicher zu stellen, dass die induzierte Veränderung der Erbinformation auch tatsächlich in die folgenden Generationen weitergegeben werden (Feng *et al.*, 2014; Schiml & Puchta, 2016). Damit eine Mutation in die nächste Generation gelangen kann, muss nicht nur das entsprechende Mutationsereignis stattfinden, sondern darüber hinaus muss dies in einer Zelle geschehen, die in die Keimbahn eintritt. Da nach der Untersuchung der Primärtransformanten nur die Linien weitergehend analysiert wurden, in denen bereits in der T1 die vorgesehene Deletion detektiert werden konnte, kann die Frequenz, mit welcher die Mutation in die T2 weitergegeben wurde, nur annäherungsweise ermittelt werden. Bei der Identifizierung des *XTH16-Knockouts*, konnte in 30,8% der Primärtransformanten eine Deletion in dem Genlokus detektiert werden. Bei der anschließenden Genotypisierung der T2- und T3-Generation zeigte sich, dass die Hälfte der beobachteten Mutationen tatsächlich in die Keimbahn eingetreten und vererbt worden waren, wodurch sich eine theoretische Effizienz von 15,4% ergibt. Bei der Analyse der Primärtransformanten zum *Knockout* von *XTH18* wurde in 19,6% der T1-Pflanzen eine Mutation nachgewiesen. Jedoch wurden diese sogar zu 80% in die nächste Generation weitergegeben, was zu einer theoretischen Vererbungsrate von 15,7% führt. Bei den Experimenten von Fauser, Schiml & Puchta (2014) wurde gezeigt, dass mit dem hier verwendeten CRISPR/Cas9-System mit einer Rate von 15% bis 28% vererbte Punktmutationen eingeführt werden konnten. Obwohl in dem hier gewählten Ansatz, der, im Gegensatz zur Induktion einer Punktmutation, zwei Mutationsereignisse innerhalb einer Zelle benötigt, wurde die Frequenz, mit welcher die Mutation in die folgende Generation vererbt wurde, nicht nennenswert beeinträchtigt. Da auf diese Weise jedoch die Genotypisierung der Transformanten über einfache PCR möglich ist, stellt dieser Ansatz eine gute und einfache Methode dar, *Knockout*-Linien gezielt und mit guter Effizienz herzustellen.

Allerdings zeigt sich hier auch, dass die Veränderung des Genoms mittels des CRISPR/Cas9-Systems ein fehleranfälliges System darstellt. Bei der Genotypisierung der *xth16-Knockout*-Linien, wurden bei den Linien *xth16-1* und *xth16-5* deutlich kleinere PCR-

Fragmente amplifiziert, als erwartet wurde. Die Sequenzierung ergab, dass in diesen Fällen tatsächlich größere Teile aus der genomischen DNA deletiert worden waren, als vorgesehen war (Abbildung 3-6). Das Herbeiführen von DNA-Doppelstrangbrüchen kann enorme Auswirkung auf ein Genom haben. Neben der bereits erwähnten Möglichkeit, dass durch das *non-homologous end joining* Punktmutationen in unbeabsichtigten Nebenzielen eingeführt werden können (Weterings & Chen, 2008), besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass es zur Translokation ganzer chromosomaler Abschnitte kommt (Richardson & Jasin, 2000). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich mit der Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems als Instrument der Molekularbiologie zwar viele Möglichkeiten ergeben haben, wie beispielsweise gezielt bestimmte Gene auszuschalten. Gleichzeitig zeigt sich jedoch auch, dass das Resultat des Eingriffs in die Genomstruktur nicht mit Sicherheit vorhergesagt werden kann und daher unbedingt tiefergehende Forschungen durchgeführt werden sollten.

#### 4.2 Der *Knockout* von XTH15 und XTH16 führt zu in einer geringeren Anzahl von Samenanlagen

Durch die Microarraydaten des *eFP-Browsers* (Winter *et al.*, 2007) war bekannt, dass *XTH15* und *XTH16* während der Entwicklung junger Infloreszenzen exprimiert werden und die Expression in älteren Blüten abnimmt. Durch die Analyse von *Promotor:GUS*-Reporterlinien konnten diese Daten bestätigt werden. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Expression nicht in allen Teilen der jungen Blüte stattfindet, sondern spezifisch auf Androeceum und Gynoeceum begrenzt ist.

Obwohl die Promotoren beider *XTHs* während der Entwicklung der Stamina in allen Gewebeschichten aktiv sind, waren die Staubblätter in den *Knockout*-Linien *xth15-2*, *xth16-5* sowie der Doppelmutante *xth15-2 xth16-9* äußerlich in Größe und Form nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Da im Gegensatz zur widerstandsfähigen äußeren Zellwand des Pollenkorns, der Exine, die innere Zellwand, die Intine, ähnlich der primären Zellwand aufgebaut ist (Lou, Zhu & Yang, 2014), war auch eine Rolle der *XTHs* bei der Bildung fertiler Pollenkörner denkbar. Jedoch zeigte sich, dass in den *Knockout*-Linien, genauso wie im Wildtyp, 85% der Samenanlagen befruchtet wurden. Daher scheint eine essentielle Funktion von XTH15 oder XTH16 bei der Vermittlung der männlichen Fertilität unwahrscheinlich. Allerdings besaßen die *Knockout*-Linien im Schnitt zwei bis drei Samenanlagen pro Schote

weniger als der Wildtyp. Samenanlagen entwickeln sich aus Primordien, die durch eine Reihe periklinaler Zellteilungen als Seitenorgane aus dem meristematischen Plazentagewebe des Gynoeceums hervorgehen (Schneitz, Hulskamp & Pruitt, 1995). Es ist bekannt, dass dieser Prozess durch ein koordiniertes Zusammenspiel verschiedener Phytohormone und Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird (Cucinotta, Colombo & Roig-Villanova, 2014; Chávez Montes *et al.*, 2015), aber inwiefern XTHs an diesem Vorgang beteiligt sind, wurde bisher nicht untersucht. Tatsächlich konnte in den Reporterlinien beobachtet werden, dass die Promotoren von *XTH15* und *XTH16* während der jungen Entwicklungsstadien der Blüten, in denen die Primordien der Samenanlagen sich aus dem Plazentagewebe herausbilden (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010; Cucinotta, Colombo & Roig-Villanova, 2014), im Gynoeceum aktiv waren (Abbildung 3-12). Es wäre daher möglich, dass diese XTHs in den Prozess der Initiierung der Samenanlagenprimordien involviert sind.

In späteren Entwicklungsstadien war der Promotor von *XTH15* verstärkt in der Vaskulatur des Fruchtknotens, der *XTH16*-Promotor verstärkt im Bereich der Klappen der Kapelle aktiv. Da Pflanzenzellen durch ihre Zellwände fest miteinander verbunden sind, und daher die Morphogenese der Organe von lokalisierten Zellteilungen und gerichtetem Zellwachstum der beteiligten Gewebeschichten bestimmt wird (Cosgrove, 2005), ist es ebenfalls möglich, dass ein vermindertes Wachstum der Vaskulatur oder der Klappen dazu führt, dass das gesamte Gynoeceum in seiner Entwicklung beeinträchtigt ist. Da für XTHs bereits gezeigt wurde, dass diese an Prozessen der Zellteilung und Zellwachstum involviert sein können (Yokoyama & Nishitani, 2001b; Shin *et al.*, 2006), wäre beispielsweise denkbar, dass eine bestimmte räumlich Distanz zwischen den einzelnen Primordien der Samenanlagen eingehalten wird, sodass später gewährleistet ist, dass ausreichend Raum für die Entwicklung der Samen vorhanden ist. Auch wenn der Prozess, der die Anzahl der Samenanlagen kontrolliert, Gegenstand der laufenden Forschung ist, ist dieser noch nicht vollständig verstanden (Cucinotta, Colombo & Roig-Villanova, 2014; Cucinotta *et al.*, 2018). Durch die verminderte Anzahl an Samenanlagen in den *Knockout*-Linien, zusammen mit der starken Expression der beiden *XTH*-Gene in den jungen Entwicklungsstadien des Fruchtblatts, in denen die Samenanlagen angelegt werden, ist eine Beteiligung von *XTH15* und *XTH16* an diesem Prozess denkbar.

### 4.3 XTH15, XTH16, XTH17, XTH18 und XTH19 und ihre Rolle beim Streckungswachstum

Ein gutes System zur Untersuchung des Streckungswachstums von Zellen stellt das Hypokotyl etiolierter Keimlinge dar, da dieses eine feste Anzahl Zellen besitzt und die Streckung des Hypokotyls ausschließlich auf der Streckung dieser Zellen beruht (Gendreau *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der histochemischen Untersuchung von Reporterlinien gezeigt werden, dass bei der Etiolierung von Keimlingen einer Zunahme der Promotoraktivität von *XTH15*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* stattfindet. Die verstärkte Transkription wurde anschließend über qRT-PCR bestätigt.

Bei dem Streckungswachstums des Hypokotyls strecken sich die Zellen nicht gleichmäßig (Gendreau *et al.*, 1997). Vom vierten auf den fünften Tag längen sich besonders die Zellen in der oberen Hälfte des Hypokotyls, während sich dann vom fünften auf den sechsten Tag hauptsächlich die Zellen im oberen Drittel verlängern (Abbildung 3-14). Betrachtet man die GUS-Analyse der untersuchten *XTHs* in fünf Tage alten Keimlingen, so kann eine deutliche Korrelation zwischen den Streckungszonen und den Bereichen mit verstärkter Promotoraktivität festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang, dass *XTHs*, basierend auf ihrer Fähigkeit, Xyloglucan spezifisch entweder zu transglycosylieren oder zu hydrolysieren, eine bedeutende Rolle bei der kontrollierten, turgorgesteuerten Expansion der primären Zellwand zugeschrieben wird (Rose *et al.*, 2002; Eklöf & Brumer, 2010). Zusätzlich wurde bereits mehrfach eine Beteiligung von *XTHs* an der Elongation von Zellen bestätigt, beispielsweise von Shin *et al.* (2006), Michailidis *et al.* (2009), Sasidharan *et al.* (2010) oder Harada *et al.* (2011). Darüber hinaus ist durch die Experimente von Miedes *et al.* (2013) bekannt, dass eine Überexpression von *XTH18*, *XTH19* und *XTH20* in *Arabidopsis* das Hypokotylwachstum in etiolierten Keimlingen stimuliert. Interessanterweise konnte jedoch in den *Knockout*-Linien, einschließlich der Doppel- und Dreifach-Mutanten, keine signifikante Veränderung in der Länge des Hypokotyls beobachtet werden. Obwohl das Fehlen eines Phänotyps beim *Knockout* eines Gens andeutet, dass dies für den betrachteten Prozess nicht essentiell zu sein scheint, besteht die Möglichkeit, dass der Verlust der Genfunktion teilweise oder vollständig durch die Aktivität anderer Gene mit gleicher oder ähnlicher Funktion kompensiert werden kann (Pickett & Meeks-Wagner, 1995; Zhang, 2012). Durch die Daten von Becnel *et al.* (2006) ist bekannt, dass mindestens noch

zwei weitere, hier nicht betrachtete *XTHs* (*XTH9* und *XTH28*), ebenfalls in etiolierten Hypokotylen exprimiert werden. Es ist also denkbar, dass es mehr als den *Knockout* dreier *XTHs* benötigt, um das Hypokotylwachstum zu inhibieren. Da einerseits in den *Knockout*-Linien keine Veränderung im Wachstum festgestellt werden konnte, andererseits eine gute Korrelation zwischen Promotoraktivität und Streckungszonen beobachtet werden konnte, konnte basierend auf diesen Ergebnissen eine Beteiligung der untersuchten *XTHs* an der Zellelongation zwar nicht bestätigt, aber auch nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.4 *XTH15*, *XTH16*, *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* sind auf unterschiedliche Weise am Wurzelwachstum beteiligt

Weitere Hinweise zur Beteiligung der untersuchten *XTHs* an der Zellstreckung konnte bei der Untersuchung des Wurzelwachstums erlangt werden. Aufgrund von Expressionsanalysen, war bekannt, dass *XTH17*, *XTH18* und *XTH19* vorrangig eine Expression in der Wurzel aufweisen (Yokoyama & Nishitani, 2001a; Vissenberg *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *XTH15* und *XTH16* ebenfalls stark in der Wurzel exprimiert werden. Die Promotoren aller fünf Gene sind sowohl in der Primärwurzel, als auch in den Lateralwurzeln aktiv. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der *Knockout* von *XTH16* oder *XTH18* dazu führt, dass Keimlinge kürzere Lateralwurzeln mit kürzeren Epidermiszellen entwickeln. Dies steht im Einklang damit, dass der *Knockout* von *XTH21* einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Wurzelepidermis und der Wurzel selbst hat (Liu *et al.*, 2007). *XTH21* gehört, wie die in dieser Arbeit untersuchten *XTHs*, der Untergruppe II an, für die *in vitro* ausschließlich XET-Aktivität nachgewiesen wurde (Maris *et al.*, 2009, 2011). Diese Ergebnisse deuten zum einen wiederum an, dass diese *XTHs* an der Zellexpansion beteiligt sind, gleichzeitig zeigen die Ergebnisse auch, dass sich diese fünf in der Wurzel exprimierten *XTHs* nicht vollständig in ihrer Funktion überschneiden, da sich die *Knockout*-Linien *xth15-2* und *xth19-1* in ihrem Lateralwurzelwachstum nicht signifikant vom Wildtyp unterscheiden.

Interessant ist, dass sich der *Knockout* von *XTH16* und *XTH18* negativ auf das Wachstum der Lateralwurzeln, nicht aber auf das Wachstum der Primärwurzel auswirkt, obwohl sich die beiden Wurzeltypen in ihrem Aufbau sehr ähnlich sind. Ein ähnlicher Effekt kann beobachtet werden, wenn man Arabidopsiskeimlinge einer erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-

Konzentration aussetzt. Während  $\text{H}_2\text{O}_2$  das Wachstum der Primärwurzel inhibiert, wird das Wachstum der Lateralwurzel gefördert (Orman-Ligeza *et al.*, 2016). Da bereits beschrieben wurde, dass verschiedenen ROS Einfluss auf die Zellwand und dadurch auf das Wachstum der Wurzel nehmen (Liszky, Zalm & Schopfer, 2004; Dunand, Crèvecoeur & Penel, 2006), sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der ROS-vermittelten Zellwandlockerung und der XTH-Aktivität besteht. Dazu wurden Keimlinge mit Antimycin A (AA), Diphenyliodonium (DPI), 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt und das Wachstum der Lateralwurzeln analysiert. AA bindet an den Komplex III der Elektronentransportkette in der inneren Membran der Mitochondrien, wodurch der Elektronentransport inhibiert wird. Dies hat zur Folge, dass vermehrt ROS, im besonderem  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gebildet werden (Chandel *et al.*, 1998; Quinlan *et al.*, 2011). Durch die Behandlung mit DPI wird die NADPH-Oxidase in der Plasmamembran gehemmt, sodass weniger  $\text{O}_2^{\bullet-}$  im Apoplast entsteht (Bolwell & Wojtaszek, 1997). Hingegen hemmt 3-AT die Katalase, sodass die Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff verringert wird (Prasad, 1997).

Interessanterweise konnte dabei beobachtet werden, dass, auch wenn beide Linien sich nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden, die Doppel-*Knockout*-Linie *xth15-2 xth16-9* durch die erhöhte ROS-Konzentration deutlich stärker in ihrem Lateralwurzelwachstum inhibiert wurde, als die Doppel-*Knockout*-Linie *xth17-2 xth18-23*. Abgesehen von dieser Beobachtung, besteht der prominenteste, in dieser Arbeit beobachtete Unterschied zwischen *XTH15* und *XTH16* zu *XTH17* und *XTH18*, in ihren Expressionsprofilen. Während die Promotoren von *XTH17* und *XTH18*, wie auch noch weitere *XTH*-Gene (Becnel *et al.*, 2006), in allen Gewebeschichten der Wurzel aktiv waren, wurden *XTH15* und *XTH16* spezifisch in der Vaskulatur der Wurzel exprimiert. Auch für andere *XTHs* aus *Arabidopsis* wurde bereits eine spezifische Expression im Leitgewebe von Blütenorganen beschrieben (Becnel *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde eine Co-Lokalisierung von XET-Aktivität und der Entwicklung der sekundären Zellwand beobachtet (Bourquin, 2002). Daher wäre es möglich, dass *XTH15* und *XTH16* eine Funktion bei der Bildung der sekundären Zellwand zukommen könnte. Zum einen stimmt dies mit der Beobachtung überein, dass *XTH27* aus *Arabidopsis* eine essentielle Rolle bei der Bildung des Leitgewebes in der Rosette zukommt (Matsui *et al.*, 2005), zum anderen deckt sich dies mit der Beobachtung, dass *XTHs* ebenfalls in Geweben exprimiert werden, in denen kein Wachstum mehr stattfindet (Yokoyama & Nishitani, 2001a). Da  $\text{H}_2\text{O}_2$

eine notwendige Komponente zur Lignifizierung der sekundären Zellwand darstellt, könnte dies den nur in dieser Linie beobachteten additiven Effekt durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung und den *Knockout* von *XTH15* und *XTH16* erklären.

Da *XTHs* in Höheren Pflanzen durch große Genfamilien kodiert werden, wird vermutet, dass ihnen eine wichtige physiologische Bedeutung zukommt (Eklöf & Brumer, 2010). Bisher wurde davon ausgegangen, dass *XTHs* am Aufbau und der Modifizierung der primären Zellwand beteiligt sind, da Xyloglucan in großer Menge Bestandteil dieser ist (Cosgrove, 2005). Im Gegensatz dazu stellt Xyloglucan nur eine geringe Komponente der primären Zellwände von Poaceae, wie Reis und Mais dar, und trotzdem werden *XTHs* auch in diesen Pflanzen von großen Genfamilien kodiert (Genovesi *et al.*, 2008). Zusammen mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen, dass hohe XET-Aktivität mit der Bildung der sekundären Zellwand zusammenfällt und *XTH27* an der Bildung des Leitgewebes beteiligt ist (Bourquin, 2002; Matsui *et al.*, 2005), scheint eine Funktion von *XTHs* bei der Entwicklung von sekundären Zellwänden plausibel.

#### 4.5 Ausblick

Obwohl es gelungen ist, einzelnen Genen der 33 *XTHs* aus *Arabidopsis* eine spezifische Funktion zuzuschreiben (zum Beispiel Matsui *et al.*, 2005; Kurasawa *et al.*, 2008), stellt die Redundanz der *XTH* Gene eines der großen Probleme bei der molekulargenetischen Analyse durch *Knockout*-Linien dar (Pickett & Meeks-Wagner, 1995; Zhang, 2012). Daher sind Mehrfach-*Knockout*-Linien ein gutes Werkzeug zur Analyse der Genfunktionen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Doppel- und eine Dreifach-*Knockout*-Linien erzeugt, welche für Analysen, insbesondere der Wurzelstruktur, genutzt wurden. Diese Linien könnten genutzt werden, um die biologische Bedeutung der *XTHs* für das Wurzelwachstum, zum Beispiel unter biotischen oder abiotischen Stressen zu verstehen. Darüber könnte die mögliche Beteiligung der *XTHs* an der Bildung der sekundären Zellwand experimentell untersucht werden. Durch die Verwendung von Sulforhodamin-fluoreszenzmarkierten Xyloglucan können analysiert werden, ob durch den Funktionsverlust von einem oder mehrerer *XTH*-Gene eine geringere Menge an Xyloglucan in die Zellwände eingebaut wird, bei entsprechend hoher Auflösung des verwendeten Mikroskops, könnte die Lokalisation der markierten Oligosaccharide innerhalb der Zellwand beobachtet werden. Außerdem könnten

massenspektrometrische Analysen, beispielsweise MALDI-TOF, darüber Aufschluss geben, ob sich der *Knockout* der *XTH*-Gene auf die Zusammensetzung der primären oder sekundären Zellwand auswirkt. Darüberhinaus könnten, um weitere Redundanzen der Genfunktionen auszuschließen, die vorhandenen Doppel- und Dreifach-*Knockout*-Linien genutzt werden, um höhere Mehrfach-*Knockout*-Linien zu erzeugen. Dies könnte entweder über die Kreuzung mit T-DNA-Insertionslinien, oder durch die Nutzung des CRISPR/Cas9-Systems erreicht werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim, C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy, N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C. & Ecker J. R. (2003) 'Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*', *Science*, 301(5633), pp. 653-657. doi: 10.1126/science.1086391.
- Alvarez-Buylla E. R., Benítez M., Corvera-Poiré A., Chaos Cador A., de Folter S., Gamboa de Buen A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R. V., Piñeyro-Nelson, A. & Sánchez-Corrales, Y. E. (2010) 'Flower development.', *The Arabidopsis Book*, 8, The American Society of Plant Biologists, p. e0127. doi: 10.1199/tab.0127.
- Atkinson R. G., Johnston S. L., Yauk Y. K., Sharma N. N. & Schröder R. (2009) 'Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple', *Postharvest Biology and Technology*, 51(2), pp. 149-157. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.06.014.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A & Horvath P. (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes', *Science*, 315(5819), pp. 1709-1712. doi: 10.1126/science.1138140.
- Bartel D. P. (2004) 'MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function', *Cell*, 116(2), pp. 281-297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Baumberger N. & Baulcombe D. C. (2005) 'Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), pp. 11928-11933. doi: 10.1073/pnas.0505461102.

- Becnel J., Natarajan M., Kipp A. & Braam J. (2006) 'Developmental Expression Patterns of Arabidopsis *XTH* Genes Reported by Transgenes and Genevestigator', *Plant Molecular Biology*, 61(3), pp. 451-467. doi: 10.1007/s11103-006-0021-z.
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S. & Nekrasov V. (2013) 'Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system', *Plant Methods*, 9(39), pp. 1-10. doi: 10.1186/1746-4811-9-39.
- Benfey P. N., Bennett M. & Schiefelbein J. (2010) 'Getting to the root of plant biology: impact of the Arabidopsis genome sequence on root research', *The Plant Journal*, 61(6), pp. 992-1000. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04129.x.
- Berardini T. Z., Reiser L., Li D., Mezheritsky Y., Muller R., Strait E. & Huala E. (2015) 'The Arabidopsis Information Resource: Making and Mining the "Gold Standard" Annotated Reference Plant Genome', *Genesis*, 53(8), pp. 474-485. doi: 10.1002/dvg.22877.
- Blanc G., Barakat A., Guyot R., Cooke R. & Delseny M. (2000) 'Extensive Duplication and Reshuffling in the Arabidopsis Genome.', *The Plant cell*, 12(7), pp. 1093-1101. doi: 10.1105/tpc.12.7.1093.
- Bolwell G. P. & Wojtaszek P. (1997) 'Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51(6), pp. 347-366. doi: 10.1006/pmpp.1997.0129.
- Boratyn G. M., Camacho C., Cooper P. S., Coulouris G., Fong A., Ma N., Madden T. L., Matten W. T., McGinnis S. D., Merezhuk Y., Raytselis Y., Sayers E. W., Tao T., Ye J. & Zaretskaya I. (2013) 'BLAST: a more efficient report with usability improvements.', *Nucleic Acids Research*, 41(W1), pp. 29-33. doi: 10.1093/nar/gkt282.
- Bourquin V., Nishikubo N., Abe H., Brumer H., Denman S., Eklund M., Christiernin M., Teeri T. T., Sundberg B. & Mellerowicz E. J. (2002) 'Xyloglucan Endotransglycosylases Have a Function during the Formation of Secondary Cell Walls of Vascular Tissues', *The Plant Cell*, 14(12), pp. 3073-3088. doi: 10.1105/tpc.007773.

- Campbell P. & Braam J. (1998) 'Co- and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity', *The Plant Journal*, 15(4), pp. 553-561. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00239.x.
- Carpita N. C. & Gibeaut D. M. (1993) 'Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth', *The Plant Journal*, 3(1), pp. 1-30. doi: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. & Bennett M. J. (2003) 'Dissecting *Arabidopsis* lateral root development', *Trends in Plant Science*, 8(4), pp. 165-171. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00051-7.
- Cederholm H. M., Iyer-Pascuzzi A. S. & Benfey P. N. (2012) 'Patterning the primary root in *Arabidopsis*', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), pp. 675-691. doi: 10.1002/wdev.49.
- Chandel N. S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C. E., Simon M. C. & Schumacker P. T. (1998) 'Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), pp. 11715-11720. doi: 10.1073/pnas.95.20.11715.
- Chávez Montes, R. A., Herrera-Ubaldo H., Serwatowska J. & de Folter, S. (2015) 'Towards a comprehensive and dynamic gynoecium gene regulatory network', *Current Plant Biology*, 3-4, pp. 3-12. doi: 10.1016/j.cpb.2015.08.002.
- Cho S. K., Kim J. E., Park J. A., Eom T. J. & Kim W. T. (2006) 'Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants', *FEBS Letters*, 580(13), pp. 3136-3144. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.062.
- Cho S. W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H. S., Bae S. & Kim J. (2014) 'Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases', *Genome Research*, 24(1), pp. 132-141. doi: 10.1101/gr.162339.113.

- Clough S. J. & Bent A. F. (1998) 'Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*', *The Plant Journal*, 16(6), pp. 735-743.
- Cosgrove D. J. (2005) 'Growth of the plant cell wall', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), pp. 850-861. doi: 10.1038/nrm1746.
- Cosgrove D. J. (2017) 'Diffuse growth of plant cell walls', *Plant Physiology*, 176(1), pp.16-27. doi: 10.1104/pp.17.01541.
- Cucinotta M., Colombo L. & Roig-Villanova I. (2014) 'Ovule development, a new model for lateral organ formation', *Frontiers in Plant Science*, 5(3), pp. 1-12. doi: 10.3389/fpls.2014.00117.
- Cucinotta M., Manrique S., Cuesta C., Benkova E., Novak O. & Colombo L. (2018) 'CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis*', *Journal of Experimental Botany*, 1(7), pp. 1-8. doi: 10.1093/jxb/ery281.
- D'Ario M., Griffiths-Jones S. & Kim M. (2017) 'Small RNAs: Big Impact on Plant Development', *Trends in Plant Science*, 22(12), pp. 1056-1068. doi: 10.1016/j.tplants.2017.09.009.
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M. & Gonzales K. (2011) 'CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III', *Nature*, 471(7340), pp. 602-607. doi: 10.1038/nature09886.CRISPR.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. & Scheres B. (1993) 'Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root', *Development*, 119(1), pp. 71-84.
- Dunand C., Crèvecoeur M. & Penel C. (2006) 'Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases', *New Phytologist*, 174(2), pp. 332-341. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x.

- Eklöf J. M. & Brumer H. (2010) 'The XTH Gene Family: An Update on Enzyme Structure, Function, and Phylogeny in Xyloglucan Remodeling', *Plant Physiology*, 153(2), pp. 456-466. doi: 10.1104/pp.110.156844.
- Endo M., Mikami M. & Toki S. (2015) 'Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice', *Plant and Cell Physiology*, 56(1), pp. 41-47. doi: 10.1093/pcp/pcu154.
- Fausser F., Schiml S. & Puchta H. (2014) 'Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*, 79(2), pp. 348-359. doi: 10.1111/tpj.12554.
- Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B., Wei P., Yang D.-L., Wang Z., Zhang Z., Zheng R., Yang L., Zeng L., Liu X. & Zhu J.-K. (2014) 'Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), pp. 4632-4637. doi: 10.1073/pnas.1400822111.
- Fry S. C. (1989) 'The Structure and Functions of Xyloglucan', *Journal of Experimental Botany*, 40(210), pp. 1-11. doi: 10.1093/jxb/40.1.1
- Fry S. C. (1998) 'Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals', *The Biochemical Journal*, 332, pp. 507-15.
- Fry S. C. (2010) 'Cell Wall Polysaccharide Composition and Covalent Crosslinking' in: *Annual Plant Reviews*, Wiley-Blackwell, 41, pp. 1-42. doi: 10.1002/9781444391015.ch1.
- Garneau J. E., Dupuis M. È., Villion M., Romero D. A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A. H. & Moineau S. (2010) 'The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA', *Nature*, 468(7320), pp. 67-71. doi: 10.1038/nature09523.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R. D. & Bairoch A. (2003) 'ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis', *Nucleic Acids Research*, 31(13), pp. 3784-3788. doi: 10.1093/nar/gkg563.

- Geisler-Lee J., Geisler M., Coutinho P. M., Segerman B., Nishikubo N., Takahashi J., Aspeborg H., Djerbi S., Master E., Andersson-Gunnerås S., Sundberg B., Karpinski S., Teeri T. T., Kleczkowski L. A., Henrissat B. & Mellerowicz E. J. (2006) 'Poplar Carbohydrate-Active Enzymes. Gene Identification and Expression Analyses, Plant Physiology, 140(3), pp. 946-962. doi: 10.1104/pp.105.072652.
- Gendreau E., Traas J., Demos T., Grandjean O., Caboche M. & Hofte H. (1997) 'Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*', Plant Physiology, 114(1), pp. 295-305. doi: 10.1104/pp.114.1.295
- Genovesi V., Fornalé S., Fry S. C., Ruel K., Ferrer P., Encina A., Sonbol F. M., Bosch J., Puigdomènech P., Rigau J. & Caparrós-Ruiz D. (2008) 'ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in maize, affects cell wall structure and composition in *Arabidopsis thaliana*', Journal of Experimental Botany, 59(4), pp. 875-889. doi: 10.1093/jxb/ern013.
- Hammond S. M., Bernstein E., Beach D. & Hannon G. J. (2000) 'An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells', Nature, 404(6775), pp. 293-296. doi: 10.1038/35005107.
- Han Y., Wang W., Sun J., Ding M., Zhao R., Deng S., Wang F., Hu Y., Wang Y., Lu Y., Du L., Hu Z., Diekmann H., Shen X., Polle A. & Chen S. (2013) '*Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants', Journal of Experimental Botany, 64(14), pp. 4225-4238. doi: 10.1093/jxb/ert229.
- Harada T., Torii Y., Morita S., Onodera R., Hara Y., Yokoyama R., Nishitani K. & Satoh S. (2011) 'Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening', Journal of Experimental Botany, 62(2), pp. 815-823. doi: 10.1093/jxb/erq319.
- Hayashi T. (1989) 'Xyloglucans in the primary cell wall', Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 40, pp. 139-168.

- Horvath P. & Barrangou R. (2010) 'CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea', *Science*, 327(5962), pp. 167-170. doi: 10.1126/science.1179555.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W. & Zimmermann P. (2008) 'Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes', *Advances in Bioinformatics*, 2008, pp. 1-5. doi: 10.1155/2008/420747.
- Jansen R., van Embden J. D. A., Gaastra W. & Schouls L. M. (2002) 'Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes', *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1565-1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A. & Charpentier E. (2012) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816-821. doi: 10.1126/science.1225829.
- Kaewthai N., Gendre D., Eklof J. M., Ibatullin F. M., Ezcurra I., Bhalerao R. P. & Brumer H. (2013) 'Group III-A *XTH* genes of *Arabidopsis thaliana* encode predominant pyloglucan *endo*-hydrolases that are dispensable for normal growth', *Plant Physiology*, 161(1), pp. 440-454. doi: 10.1104/pp.112.207308.
- Karimi M., Inze D. & Depicker A. (2002) 'GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation', *Trends in Plant Science*, 7(5), pp. 193-195. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3.
- Kim V. N., Han J. & Siomi M. C. (2009) 'Biogenesis of small RNAs in animals', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), pp. 126-139. doi: 10.1038/nrm2632.
- Kleinboelting N., Huet G., Kloetgen A., Viehoveer P. & Weisshaar B. (2012) 'GABI-Kat SimpleSearch: New features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database', *Nucleic Acids Research*, 40(1), pp. 1211-1215. doi: 10.1093/nar/gkr1047.
- Kloosterman W. P., Wienholds E., Ketting R. F. & Plasterk R. H. A. (2004) 'Substrate requirements for *let-7* function in the developing zebrafish embryo', *Nucleic Acids Research*, 32(21), pp. 6284-6291. doi: 10.1093/nar/gkh968.

- Kurasawa K., Matsui A., Yokoyama R., Kuriyama T., Yoshizumi T., Matsui M., Suwabe K., Watanabe M. & Nishitani K. (2008) 'The *AtXTH28* Gene, a Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase, is Involved in Automatic Self-Pollination in *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 50(2), pp. 413-422. doi: 10.1093/pcp/pcp003.
- Kurihara Y. & Watanabe Y. (2004) '*Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), pp. 12753-12758. doi: 10.1073/pnas.0403115101.
- Lai E. C. (2002) 'Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation', *Nature Genetics*, 30(4), pp. 363-364. doi: 10.1038/ng865.
- Liszak A., van der Zalm E. & Schopfer P. (2004) 'Production of Reactive Oxygen Intermediates ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , and  $^{\bullet}OH$ ) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth', *Plant Physiology*, 136(2), pp. 3114-3123. doi: 10.1104/pp.104.044784.3114.
- Liu Y.-B., Lu S.-M., Zhang J.-F., Liu S. & Lu Y.-T. (2007) 'A xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase involves in growth of primary root and alters the deposition of cellulose in *Arabidopsis*', *Planta*, 226(6), pp. 1547-1560. doi: 10.1007/s00425-007-0591-2.
- Lou Y., Zhu J. & Yang Z. (2014) 'Molecular Cell Biology of Pollen Walls' in: *Applied Plant Cell Biology*, edited by Nick P. & Opatrny Z., Springer, 22, pp. 179-205. doi: 10.1007/978-3-642-41787-0.
- Lytle J. R., Yario T. A. & Steitz J. A. (2007) 'Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), pp. 9667-9672. doi: 10.1073/pnas.0703820104.
- Malamy J. E. (2005) 'Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture', *Plant Cell and Environment*, 28(1), pp. 67-77. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01306.x.

- Malamy J. E. & Benfey P. N. (1997) 'Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*', *Development*, 124(1), pp. 33-44.
- Mao Y., Zhang H., Xu N., Zhang B., Gou F. & Zhu J.-K. (2013) 'Application of the CRISPR-Cas System for Efficient Genome Engineering in Plants', *Molecular Plant*, 6(6), pp. 2008-2011. doi: 10.1093/mp/sst121.
- Maris A., Kaewthai N., Eklöf J. M., Miller J. G., Brumer H., Fry S. C., Verbelen J. P. & Vissenberg K. (2011) 'Differences in enzymic properties of five recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Experimental Botany*, 62(1), pp. 261-276. doi: 10.1093/jxb/erq263.
- Maris A., Suslov D., Fry S. C., Verbelen J. P. & Vissenberg K. (2009) 'Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of *Arabidopsis* and their effect on root growth and cell wall extension', *Journal of Experimental Botany*, 60(13), pp. 3959-3972. doi: 10.1093/jxb/erp229.
- Matsui A., Yokoyama R., Seki M., Ito T., Shinozaki K., Takahashi T., Komeda Y. & Nishitani K. (2005) '*AtXTH27* plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements', *The Plant Journal*, 42(4), pp. 525-534. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02395.x.
- McElver J., Tzafrir I., Aux G., Rogers R., Ashby C., Smith K., Thomas C., Schetter A., Zhou Q., Cushman M. A., Tossberg J., Nickle T., Levin J. Z., Law M., Meinke D. & Patton D. (2001) 'Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*', *Genetics*, 159(4), pp. 1751-1763.
- McFarlane H. E., Döring A. & Persson S. (2014) 'The Cell Biology of Cellulose Synthesis', *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), pp. 69-94. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040240.
- McNeil M., Darvill A. G., Fry S. C. & Albersheim P. (1984) 'Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants', *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), pp. 625-663. doi: 10.1146/annurev.bi.53.070184.003205.

- McQueen-Mason S. J. & Cosgrove D. J. (1995) 'Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding.', *Plant physiology*, 107(1), pp. 87-100. doi: 10.1104/pp.107.1.87.
- McWilliam H., Li W., Uludag M., Squizzato S., Park Y. M., Buso N., Cowley A. P. & Lopez R. (2013) 'Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI.', *Nucleic acids research*, 41(W1), pp. 597-600. doi: 10.1093/nar/gkt376.
- de Mendiburu F. (2017). 'agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research', R package version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Michailidis G., Argiriou A., Darzentas N. & Tsaftaris A. (2009) 'Analysis of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) genes from allotetraploid (*Gossypium hirsutum*) cotton and its diploid progenitors expressed during fiber elongation', *Journal of Plant Physiology*, 166(4), pp. 403-416. doi: 10.1016/j.jplph.2008.06.013.
- Miedes E. & Lorences E. P. (2009) 'Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) during tomato fruit growth and ripening', *Journal of Plant Physiology*, 166(5), pp. 489-498. doi: 10.1016/j.jplph.2008.07.003.
- Miedes E., Suslov D., Vandebussche F., Kenobi K., Ivakov A., Van Der Straeten D., Lorences E. P., Mellerowicz E. J., Verbelen J.-P. & Vissenberg K. (2013) 'Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) overexpression affects growth and cell wall mechanics in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls', *Journal of Experimental Botany*, 64(8), pp. 2481-2497. doi: 10.1093/jxb/ert107.
- Mohnen D. (2008) 'Pectin structure and biosynthesis', *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), pp. 266-277. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.
- Nicholas K. B. & Nicholas H. B. J. (1997) 'GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments', <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nishitani K. & Tominaga R. (1992) 'Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule', *Journal of Biological Chemistry*, 267(29), pp. 21058-21064.

- Nishitani, K. & Vissenberg, K. (2007) 'Roles of the XTH protein family in the expanding cell' in: *The Expanding Cell*, edited by Verbelen J.-P., Springer, 6, pp. 89-116. doi: 10.1007/7089\_2006\_072.
- Okazawa K., Sato Y., Nakagawa T., Asada K., Kato I., Tomita E. & Nishitani K. (1993) 'Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls', *Journal of Biological Chemistry*, 268(34), pp. 25364-25368.
- Orman-Ligeza B., Parizot B., de Rycke R., Fernandez A., Himschoot E., Van Breusegem F., Bennett M. J., Périlleux C., Beeckman T. & Draye X. (2016) 'RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*', *Development*, 143(18), pp. 3328-3339. doi: 10.1242/dev.136465.
- Ossowski S., Schwab R. & Weigel D. (2008) 'Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs.', *The Plant Journal*, 53(4), pp. 674-90. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03328.x.
- Page R. D. M. (1996) 'TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers', *Computer Applications in the Biosciences*, 12(4), pp. 357-358.
- Petricka J. J., Winter C. M. & Benfey P. N. (2012) 'Control of *Arabidopsis* Root Development', *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), pp. 563-590. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105501.
- Pfaffl M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), p. 45e. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pickett F. B. & Meeks-Wagner D. R. (1995) 'Seeing Double: Appreciating Genetic Redundancy', *The Plant Cell*, 7(9), pp. 1347-1356. doi: 10.1105/tpc.7.9.1347.
- Prasad T. K. (1997) 'Role of Catalase in Inducing Chilling Tolerance in Pre-Emergent Maize Seedlings', *Plant Physiology*, 114(4), pp. 1369-1376. doi: 10.1104/pp.114.4.1369.

- Quinlan C. L., Gerencser A. A., Treberg J. R. & Brand M. D. (2011) 'The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-inhibited Mitochondrial Q-cycle', *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), pp. 31361-31372. doi: 10.1074/jbc.M111.267898.
- R Core Team (2018) 'R: A language and environment for statistical computing', R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rayle D. L. & Cleland R. (1970) 'Enhancement of Wall Loosening and Elongation by Acid solutions.', *Plant physiology*, 46(2), pp. 250-253. doi: 10.1104/pp.46.2.250.
- Reinhart B. J. (2002) 'MicroRNAs in plants', *Genes & Development*, 16(13), pp. 1616-1626. doi: 10.1101/gad.1004402.
- Richardson C. & Jasin M. (2000) 'Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks', *Nature*, 405(6787), pp. 697-700. doi: 10.1038/35015097.
- Rose J. K. C., Braam J., Fry S. C. & Nishitani K. (2002) 'The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature', *Plant Cell Physiology*, 43(12), pp. 1421-1435.
- RStudio Team (2016) 'RStudio: Integrated Development for R', RStudio Inc., Boston, MA, <http://www.rstudio.com/>.
- Salomon S. & Puchta H. (1998) 'Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells', *The EMBO Journal*, 17(20), pp. 6086-6095. doi: 10.1093/emboj/17.20.6086.
- Sambrook J. & Russell D. W. (2001) 'Molecular cloning: a laboratory manual', 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samuels A. L., Giddings T. H. & Staehelin L. A. (1995) 'Cytokinesis in Tobacco BY-2 and Root Tip Cells: A New Model of Cell Plate Formation in Higher Plants', *Journal of Cell Biology*, 130(6), pp. 1345-1357. doi: 10.1083/jcb.130.6.1345.
- Sasidharan R., Chinnappa C. C., Staal M., Elzenga J. T. M., Yokoyama R., Nishitani K., Voesenek L. A. C. J. & Pierik R. (2010) 'Light Quality-Mediated Petiole Elongation in Arabidopsis during Shade Avoidance Involves Cell Wall Modification by Xyloglucan

- Endotransglucosylase/Hydrolases', *Plant Physiology*, 154(2), pp. 978-990. doi: 10.1104/pp.110.162057.
- Shaner N. C., Lambert G. G., Chammas A., Ni Y., Cranfill P. J., Baird M. A., Sell B. R., Allen J. R., Day R. N., Davidson M. W. & Wang, J. (2013) 'A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*', 10(5), pp. 407-409. doi: 10.1038/nmeth.2413.A.
- Scheller H. V. & Ulvskov P. (2010) 'Hemicelluloses', *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp. 263-289. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Scheres B. (2007) 'Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), pp. 345-354. doi: 10.1038/nrm2164.
- Schiml S., Fauser F. & Puchta H. (2014) 'The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny', *Plant Journal*, 80(6), pp. 1139-1150. doi: 10.1111/tpj.12704.
- Schiml S. & Puchta H. (2016) 'Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas', *Plant Methods*, 12(8), pp. 1-9. doi: 10.1186/s13007-016-0103-0.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P. & Cardona A. (2012) 'Fiji: An open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneitz K., Hulskamp M. & Pruitt R. E. (1995) 'Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue', *The Plant Journal*, 7(5), pp. 731-749. doi: 10.1046/j.1365-313X.1995.07050731.x.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N. & Weigel D. (2006) 'Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*', *The Plant Cell*, 18(5), pp. 1121-1133. doi: 10.1105/tpc.105.039834.1.

- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J. D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M. & Goff S. A. (2002) 'A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System', *The Plant Cell*, 14, pp. 2985-2994. doi: 10.1105/tpc.004630.netics.
- Shin Y.-K., Yum H., Kim E.-S., Cho H., Gothandam K. M., Hyun J. & Chung Y.-Y. (2006) 'BcXTH1, a *Brassica campestris* homologue of Arabidopsis XTH9, is associated with cell expansion', *Planta*, 224(1), pp. 32-41. doi: 10.1007/s00425-005-0189-5.
- Small I. (2007) 'RNAi for revealing and engineering plant gene functions', *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), pp. 148-153. doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.012.
- Steinert J., Schiml S., Fauser F. & Puchta H. (2015) 'Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*', *The Plant Journal*, 84(6), pp. 1295-1305. doi: 10.1111/tpj.13078.
- Stothard P. (2000) 'The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences'. *Biotechniques*, 28, pp. 1102-1104.
- Sun X., Hu Z., Chen R., Jiang Q., Song G., Zhang H. & Xi Y. (2015) 'Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system', *Scientific Reports.*, 5(1), pp. 1-10. doi: 10.1038/srep10342.
- Turowski T. W. & Tollervey D. (2016) 'Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation', *Biochemical Society Transactions*, 44(5), pp. 1367-1375. doi: 10.1042/BST20160062.
- Valent B. S. & Albersheim P. (1974) 'The Structure of Plant Cell Walls', *Plant Physiology*, 54(1), pp. 105-108. doi: 10.1104/pp.54.1.105.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. & Speleman F. (2002) 'Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes', *Genome Biology*, 3(7), pp. 0034.1-0034.11. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

- Verbelen J.-P., Cnodder T. D., Le J., Vissenberg K. & Baluška F. (2006) 'The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities', *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), pp. 296-304. doi: 10.4161/psb.1.6.3511.
- Vincze T., Posfai J. & Roberts R. J. (2003) 'NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes', *Nucleic Acids Research*, 31(13), pp. 3688-3691. doi: 10.1093/nar/gkg526.
- Vissenberg K., Oyama M., Osato Y., Yokoyama R., Verbelen J. P. & Nishitani K. (2005) 'Differential Expression of *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* and *AtXTH20* Genes in *Arabidopsis* Roots. Physiological Roles in Specification in Cell Wall Construction', *Plant and Cell Physiology*, 46(1), pp. 192-200. doi: 10.1093/pcp/pci013.
- Wang T., Iyer L. M., Pancholy R., Shi X. & Hall T. C. (2005) 'Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the *Arabidopsis phytoene desaturase* gene', *New Phytologist*, 167(3), pp. 751-760. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01454.x.
- Weterings E. & Chen D. J. (2008) 'The endless tale of non-homologous end-joining', *Cell Research*, 18(1), pp. 114-124. doi: 10.1038/cr.2008.3.
- Wightman B., Ha I. & Ruvkun G. (1993) 'Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*', *Cell*, 75(5), pp. 855-862. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V. & Provart N. J. (2007) 'An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets', *PLoS ONE*, 2(8), pp. 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0000718.
- Yanagisawa M., Desyatova A. S., Belteton S. A., Mallery E. L., Turner J. A. & Szymanski D. B. (2015) 'Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis', *Nature Plants*, 1(3), pp. 1-8. doi: 10.1038/nplants.2015.14.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S. & Madden T. (2012) 'Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.', *BMC Bioinformatics*, 13(134), pp. 1-11. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

- Yokoyama R. & Nishitani K. (2001a) 'A Comprehensive Expression Analysis of all Members of a Gene Family Encoding Cell-Wall Enzymes Allowed us to Predict *cis*-Regulatory Regions Involved in Cell-Wall Construction in Specific Organs of *Arabidopsis*', *Plant and Cell Physiology*, 42(10), pp. 1025-1033. doi: 10.1093/pcp/pce154.
- Yokoyama R. & Nishitani K. (2001b) 'Endoxyloglucan Transferase is Localized both in the Cell Plate and in the Secretory Pathway Destined for the Apoplast in Tobacco Cells', *Plant and Cell Physiology*, 42(3), pp. 292–300. doi: 10.1093/pcp/pce034.
- Yokoyama R., Rose J. K. C. & Nishitani K. (2004) 'A Surprising Diversity and Abundance of Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolases in Rice. Classification and Expression Analysis', *Plant Physiology*, 134(3), pp. 1088-1099. doi: 10.1104/pp.103.035261.sis.
- Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R. W., Steward R. & Chen X. (2005) 'Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis', *Science*, 307(5711), pp. 932-935. doi: 10.1126/science.1107130.
- Zhang J. (2012) 'Genetic Redundancies and Their Evolutionary Maintenance' in: *Evolutionary Systems Biology*, edited by Soyer, O. S., Springer, 751, pp. 279-300. doi: 10.1007/978-1-4614-3567-9.
- Zhu X. F., Shi Y. Z., Lei G. J., Fry S. C., Zhang B. C., Zhou Y. H., Braam J., Jiang T., Xu X. Y., Mao C. Z., Pan Y. J., Yang J. L., Wu P. & Zheng S. J. (2012) '*XTH31*, Encoding an in Vitro XEH/XET-Active Enzyme, Regulates Aluminum Sensitivity by Modulating in Vivo XET Action, Cell Wall Xyloglucan Content, and Aluminum Binding Capacity in *Arabidopsis*', *The Plant Cell*, 24(11), pp. 4731–4747. doi: 10.1105/tpc.112.106039.

## Anhang

### A1 Primer

**Tabelle A1-1:** Für die Amplifizierung der Promotoren, ORFs sowie zur Genotypisierung verwendete Primer. Überhänge und Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Verwendung
XTH15ProF1	<u>CACCACGGATAACTGATCCACAGAGG</u>	Promotor At4g14130
XTH15ProR1	GGGTTTGGTTGATAGAAATGAAAG	Promotor At4g14130
XTH16ProF1	<u>CACCCGTGTTTTCGAAGAGTTGCG</u>	Promotor At3g23730
XTH16ProR1	GGGGTTGGATGATGTGAATGAAAG	Promotor At3g23730
pXTH17 BamHI F2	AT <u>GGATCC</u> AGTGAAGTATGCCACATAAACT	Promotor At1g65310
pXTH17 XhoI R1	AT <u>CTCGAGG</u> TCTCACAGGAGTATTGATATCTC	Promotor At1g65310
pXTH18 BamHI F3	AT <u>GGATCC</u> AGTACTGGTTGGATGACGC	Promotor At4g30280
pXTH18 XhoI R1	AT <u>CTCGAGG</u> GAGGTGTATTGATATCTCAAATG	Promotor At4g30280
pXTH19 BamHI F1	AT <u>GGATCC</u> GTGTATGAAGGAGAACCTTC	Promotor At4g30290
pXTH19 XhoI R1	AT <u>CTCGAG</u> TATTAGATCTCTCTAGGAGTTTTG	Promotor At4g30290
XTH15-Sall-F2	at <u>GTCGAC</u> ATGGGTCCAAGTTCGAGCC	ORF At4g14130
XTH15-NotI-R2	at <u>GCGGCCG</u> CGACTCTGGACTTCTTGCAATC	ORF At4g14130
XTH16-Sall-F2	at <u>GTCGAC</u> ATGGGTCCAATCTTGAACCG	ORF At3g23730
XTH16-NotI-R2	at <u>GCGGCCG</u> CGACTCTAGACTTCTTACACTC	ORF At3g23730
XTH17ORF Sall F1	at <u>GTCGAC</u> ATGAAGCTTTCTTGTGGTACAAGC	ORF At1g65310
XTH17ORF NotI R1	at <u>GCGGCCG</u> CGAGTGCCTCGGCAGGAACT	ORF At1g65310
XTH18ORF Sall F1	at <u>GTCGAC</u> ATGAAGCTTTCTTGTGGTACAAGT	ORF At4g30280
XTH18ORF NotI R1	at <u>GCGGCCG</u> CGACTGCACTCTACAGGAACA	ORF At4g30280
XTH19ORF Sall F1	at <u>GTCGAC</u> ATGAAGTCTTTTACGTTCTTGATTC	ORF At4g30290
XTH19ORF NotI R1	at <u>GCGGCCG</u> CGCTGCACTCTGGAGGAAC	ORF At4g30290
mNEON NotI F1	at <u>GCGGCCG</u> CGATGGTGAGCAAGGGAGAGGAG	CDS mNEON GFP
mNEON XbaI R1	at <u>TCTAGAT</u> TACTTGTAAGCTCGTCCATTC	CDS mNEON GFP
SAIL LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	Genotypisierung
SAIL LB1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	Genotypisierung
SAIL LB3	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC	Genotypisierung
SAIL QRB1	CAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCA	Genotypisierung
SALK LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Genotypisierung

Fortsetzung Tabelle A1-1.

Name	Sequenz	Verwendung
GK LB 8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Genotypisierung
xth15-2 LP	CCAAACTCACCCCCACAAC	Genotypisierung
xth15-2 RP	GGGGTCTCCAGACAATGGAG	Genotypisierung
xth15-1 RP	GCATCAAACAAGCAGAGAAATATG	Genotypisierung
xth16-b LP	TCATTCACATCATCCAACCCC	Genotypisierung
xth16-b RP	TGAAGAACATAAGGCTTCCCTG	Genotypisierung
xth16-a RP	TGCACTAAACAACAACAAGAGAG	Genotypisierung
xth17 F2	GAGATATCAATACTCCTGTGAGAAC	Genotypisierung
xth17 R2	GAAGAGAACGTAAGTTCATGAGCG	Genotypisierung
XTH16 CC F1	ACTGTAGTTGGCTTCCCAAGG	Genotypisierung
XTH16 CC R1	ACTTCTACACTCTGGTGGA	Genotypisierung
XTH18 CC F1	GGGAGGGTTTACGCTCATGT	Genotypisierung
XTH18 CC R1	CCTCCCCTGTAGCCCAATG	Genotypisierung
xth19 F1	TGCAGCACAATCTATCAGCG	Genotypisierung
xth19 R1	TTAACCATAACACATCCCTCG	Genotypisierung
Actin2 F1	CAAAGACCAGCTCTTCCATCG	Genotypisierung
Actin2 R1	CTGTGAACGATTCTGGACCT	Genotypisierung

Tabelle A1-2: Für die Erstellung und Analyse der amiR-Linien verwendete Primer.

Name	Sequenz	Verwendung
miR-A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	
miR-B	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG	
A-I miR-s	gaTATTAACACGGTACGGTTCAtctctctttgtattcc	Konstrukt amiR-A
A-II miR-a	gaTGGAACCGTACCGTGTAATAtcaaagagaatcaatga	
A-III miR*s	gaTGAAACCGTACCGAGTTAATTcacaggtcgtgatatg	
A-IV miR*a	gaAATTAACCTCGGTACGGTTTCAtctacatatattcct	
B-I miR-s	gaTCGATGACAAGTAATAGGCAGtctctctttgtattcc	Konstrukt amiR-B
B-II miR-a	gaCTGCCTATTACTTGTTCATCGAtcaaagagaatcaatga	
B-III miR*s	gaCTACCTATTACTTCTCATCGTcacaggtcgtgatatg	
B-IV miR*a	gaACGATGAGAAGTAATAGGTAGtctacatatattcct	

Fortsetzung Tabelle A1-2.

Name	Sequenz	Verwendung
C-I miR-s	gaTAGACTCTAGACTACCTACGCtctctctttgtattcc	Konstrukt amiR-C
C-II miR-a	gaGCGTAGGTAGTCTAGAGTCTAtcaaagagaatcaatga	
C-III miR*s	gaGCATAGGTAGTCTTGAGTCTTtcacaggtcgtgatatg	
C-IV miR*a	gaAAGACTCAAGACTACCTATGCtctacatatattcct	
qPCR XTH16 F1	TCCAACCAAGAACTTCCACACT	qRT-PCR, <i>XTH16</i>
qPCR XTH16 R1	GGTTCTTGGGAAATGGAACACC	qRT-PCR, <i>XTH16</i>
CB24-for	GATTCTACAATGGCTGACAAGAAGA	qRT-PCR, <i>GAPC1</i> <sup>1</sup>
CB24-rev	ATGAAGGGGTCGTTGACAGC	qRT-PCR, <i>GAPC1</i> <sup>1</sup>
CB25-for	ACATTCCAGCAGATGTGGATCTC	qRT-PCR, <i>ACTIN2</i> <sup>1</sup>
CB26-rev	GATCCCATTCATAAAACCCAGC	qRT-PCR, <i>ACTIN2</i> <sup>1</sup>

**Tabelle A1-3:** Für die Erstellung und Analyse der CRISPR/Cas9-Linien verwendete Primer. Überhänge und Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Verwendung
CCPS XTH18 F2	<u>ATTGCTGTTCCAGCTGAGTTACCA</u>	Protospacer
CCPS XTH18 R2	<u>AAACTGGTAACTCAGCTGGAACAG</u>	Protospacer
CCPS XTH18 F3	<u>ATTGGAGTTCTTAGGAAACCTAAG</u>	Protospacer
CCPS XTH18 R3	<u>AAACCTTAGGTTTCCTAAGAACTC</u>	Protospacer
CCPS XTH16 F1	ATTGCACATCATCCAACCCCAAT	Protospacer
CCPS XTH16 R1	AAACATTGGGGGTTGGATGATGTG	Protospacer
CCPS XTH16 F2	ATTGAGTTTCTTGTAATGAAACA	Protospacer
CCPS XTH16 R2	AAACTGTTTCATTACCAAGAACT	Protospacer
XTH18 CC F1	GGGAGGGTTTACGCTCATGT	Genotypisierung
XTH18 CC R1	CCTCCCCTGTAGCCAATG	Genotypisierung
XTH16 CC F1	ACTGTAGTTGGCTTCCCAAGG	Genotypisierung
XTH16 CC R1	ACTTCCTACACTCTGGTGGGA	Genotypisierung
SS42	TCCAGGATTAGAATGATTAGG	Kolonie-PCR/ Sequenzierung
SS43	CGACTAAGGGTTTCTTATATGC	Kolonie-PCR
SS61	GAGCTCCAGGCCTCCAGCTTTTCG	Sequenzierung

<sup>1</sup> zur Verfügung gestellt von C. Kaufmann, AG Sauter, CAU Kiel

Fortsetzung Tabelle A1-3.

Name	Sequenz	Verwendung
SS129	CACAGGAAACAGCTATGAC	Kolonie-PCR
KoloniePS F1	ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGA	Kolonie-PCR
KoloniePS R1	GACTCGGTGCCACTTTTTCA	Kolonie-PCR
CR XTH7 F1	CCGGTTATGAGTAGACCGGC	<i>off target</i> Analyse
CR XTH7 R1	GGCCCATGGGTCGACAAAAT	<i>off target</i> Analyse
xth17 F2	GAGATATCAATACTCCTGTGAGAAC	<i>off target</i> Analyse
xth17 R2	GAAGAGAACGTAAGTTCATGAGCG	<i>off target</i> Analyse
CR XTH20 F1	ATATGAGCGTGTCTACGCTGG	<i>off target</i> Analyse
CR XTH20 R1	TTGGGAAGGGAACTCCAAGG	<i>off target</i> Analyse
xth22 F1	AACTCCGCAGGAACAGTCAC	<i>off target</i> Analyse
xth22 R1	CAAGAAGACTTGCCGTTTGAC	<i>off target</i> Analyse
CR XTH23 F2	CACCATTGTGGTTGCTCTGC	<i>off target</i> Analyse
xth23 R1	TTACGCAGCTAAGCACTCGC	<i>off target</i> Analyse

## A2 Vektoren

**Tabelle A2-1:** Im Rahmen der Promotor:GUS-Klonierung hergestellte Vektoren.

Name	Eingangsvektor	Restriktion	Zielvektor
<i>pEN:proXTH15</i>	<i>pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup></i>		
<i>pEN:proXTH16</i>	<i>pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup></i>		
<i>pEN:proXTH17</i>	<i>pENTR3C<sup>TM</sup></i>	<i>BamHI/XhoI</i>	
<i>pEN:proXTH18</i>	<i>pENTR3C<sup>TM</sup></i>	<i>BamHI/XhoI</i>	
<i>pEN:proXTH19</i>	<i>pENTR1A<sup>TM</sup></i>	<i>BamHI/XhoI</i>	
<i>proXTH15:GUS</i>	<i>pEN:proXTH15</i>	LR-Reaktion	<i>pBGWFS7</i>
<i>proXTH16:GUS</i>	<i>pEN:proXTH16</i>	LR-Reaktion	<i>pBGWFS7</i>
<i>proXTH17:GUS</i>	<i>pEN:proXTH17</i>	LR-Reaktion	<i>pBGWFS7</i>
<i>proXTH18:GUS</i>	<i>pEN:proXTH18</i>	LR-Reaktion	<i>pBGWFS7</i>
<i>proXTH19:GUS</i>	<i>pEN:proXTH19</i>	LR-Reaktion	<i>pBGWFS7</i>

**Tabelle A2-2:** Im Rahmen der 35S:XTH:GFP-Klonierung hergestellte Vektoren.

Name	Eingangsvektor	Restriktion	Zielvektor
<i>pEN:GFP</i>	<i>pENTR1A<sup>TM</sup></i>	<i>NotI/XbaI</i>	
<i>pEN:XTH15:GFP</i>	<i>pEN:GFP</i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>pEN:XTH16:GFP</i>	<i>pEN:GFP</i>	<i>Sall/NotI</i>	

Fortsetzung Tabelle A2-2.

Name	Eingangsvektor	Restriktion	Zielvektor
<i>pEN:XTH17:GFP</i>	<i>pEN:GFP</i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>pEN:XTH18:GFP</i>	<i>pEN:GFP</i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>pEN:XTH19:GFP</i>	<i>pEN:GFP</i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>35S:XTH15:GFP</i>	<i>pEN:XTH15</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>
<i>35S:XTH16:GFP</i>	<i>pEN:XTH16</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>
<i>35S:XTH17:GFP</i>	<i>pEN:XTH17</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>
<i>35S:XTH18:GFP</i>	<i>pEN:XTH18</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>
<i>35S:XTH19:GFP</i>	<i>pEN:XTH19</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>

Tabelle A2-3: Im Rahmen der amiR-Klonierung hergestellte Vektoren.

Name	Eingangsvektor	Restriktion	Zielvektor
<i>pEN:XTH16amiR-A</i>	<i>pENTR1A<sup>TM</sup></i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>pEN:XTH16amiR-B</i>	<i>pENTR1A<sup>TM</sup></i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>pEN:XTH16amiR-C</i>	<i>pENTR1A<sup>TM</sup></i>	<i>Sall/NotI</i>	
<i>35S:XTH16amiR-A</i>	<i>pEN:XTH16amiR-A</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>
<i>35S:XTH16amiR-B</i>	<i>pEN:XTH16amiR-B</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>
<i>35S:XTH16amiR-C</i>	<i>pEN:XTH16amiR-C</i>	LR-Reaktion	<i>pB7WG2</i>

Tabelle A2-4: Im Rahmen der CRISPR/Cas9-Klonierung hergestellte Vektoren.

Name	Eingangsvektor	Restriktion	Zielvektor
<i>pEnChi:PS16-1</i>	<i>pEn-Chimera</i>	<i>BbsI</i>	
<i>pENChi:PS18-2</i>	<i>pEn-Chimera</i>	<i>BbsI</i>	
<i>pEnC1.1:PS16-2</i>	<i>pEn-C1.1</i>	<i>BbsI</i>	
<i>pEnC1.1:PS18-3</i>	<i>pEn-C1.1</i>	<i>BbsI</i>	
<i>pDeCAS9:PS16-1</i>	<i>pEnChi:PS16-1</i>	LR-Reaktion	<i>pDe-CAS9</i>
<i>pDeCAS9:PS18-2</i>	<i>pENChi:PS18-2</i>	LR-Reaktion	<i>pDe-CAS9</i>
<i>pDeCAS9:PS16-1:PS16-2</i>	<i>pEnC1.1:PS16-2</i>	<i>MluI</i>	<i>pDeCAS9:PS16-1</i>
<i>pDeCAS9:PS18-2:PS18-3</i>	<i>pEnC1.1:PS18-3</i>	<i>MluI</i>	<i>pDeCAS9:PS18-2</i>

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation „Einfluss von Xyloglucan Endotransglucosylasen/Hydrolasen auf die Wurzelentwicklung in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.“, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin Frau Prof. Dr. Margret Sauter, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Dissertation wurde an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, den

---

Tanja Rehders

## Danksagung

Als erstes möchte ich Frau Prof. Dr. Margret Sauter für die Möglichkeit zur Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas in bedanken. Außerdem weiß ich die gute Versorgung mit Keksen sehr zu schätzen!

Martina Schönhof, Emese Eysholdt-Derzsó, Christine Kaufmann, Komathy Rajamanickam und Lena Carstens danke ich sowohl für wissenschaftlichen Hilfestellungen, als auch ihre nette Gesellschaft, besonders während der *coffee and cookie breaks*.

Ein besonderer Dank gilt Chen Lin, da er auf so nette Art die Einsamkeit aus unserem Labor vertrieben hat. Ebenso möchte ich mich bei Ullrich Herrmann dafür bedanken, dass er mich auf die CRISPR-Idee gebracht hat.

Zudem möchte ich mich bei Michael Motzkus für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und das stets offene Ohr bedanken. Ebenso danke ich Timo Staffel für die fleißige und tatkräftige Unterstützung im Labor.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Studenten, ins besondere Christian Hansen, Marius Theune und Jan Hartmann bedanken.

Ganz doll bedanke ich mich bei Janto, nicht nur für die Unterstützung in allen Lebenslagen, sondern besonders dafür, dass er mich auch noch ertragen kann, wenn ich sehr gestresst bin. Dabei sollen Emma und Hetty nicht unerwähnt bleiben, deren Flauschigkeit eine so beruhigende Wirkung auf mich hat.

## Lebenslauf

Tanja Rehders  
geboren am 14. Mai 1979  
in Henstedt-Ulzburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

- 1990 - 1995      Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Quickborn (Schleswig-Holstein)
- 1995 - 1996      Heinrich-Hertz-Realschule zum Erwerb der mittleren Reife in  
Quickborn (Schleswig-Holstein)
- 1996 - 1999      Ausbildung zur Bekleidungsschneiderin bei der Jil Sander GmbH  
in Ellerau (Schleswig-Holstein)
- 1999 - 2003      Bekleidungsschneiderin im Muster-Atelier der Jil Sander AG  
in Hamburg
- 2003 - 2006      Besuch des Hansakollegs Hamburg zum Erwerb der Hochschulreife  
Abschluss: Abitur
- 2007 - 2010      Bachelorstudiengang 'Biologie'  
an der Universität Hamburg (6 Semester)  
Thema der Bachelorarbeit:  
„Molekulare Analysen zur Expression, Funktion und Lokalisation der  
Serin/Threonin-Kinase ZmPTI1e aus *Zea mays* L.“  
Abschluss: Bachelor of Science
- 2010 - 2013      Masterstudiengang 'Angewandte und Molekulare Botanik'  
an der Universität Hamburg (6 Semester)  
Thema der Masterarbeit:  
„Molekulare Analysen von PTI1-Kinasen und deren Einfluss auf das  
Pollenschlauchwachstum bei *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYHN.“  
Abschluss: Master of Science
- 2013 - 2018      Promotionstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
in der AG 'Plant Developmental Biology and Plant Physiology'