
**Vergleichende Analyse der miR171-vermittelten Genregulation in
den Landpflanzen *Physcomitrella patens* und *Arabidopsis thaliana***

Dissertation an der Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von
Christoph Strotbek
aus Husum

München, im Mai 2015

Dissertation eingereicht am: 26.05.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Frank

Zweitgutachter: PD Dr. Cordelia Bolle

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den
(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Landpflanzen <i>Physcomitrella patens</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.1.1 Aufbau und Entwicklung von <i>P. patens</i> und <i>A. thaliana</i>	2
1.2 Die miRNA-vermittelte Genregulation.....	6
1.2.1 Die miRNA-Biogenese	6
1.2.2 Wirkmechanismen von miRNAs in der Genregulation.....	7
1.2.3 Konservierte miRNA-Familien in Landpflanzen	8
1.2.4 Bekannte Funktionen von konservierten miRNA-Familien	9
1.3 Die konservierte miR171-Familie	10
1.4 Konservierte miR171-Zielgene	11
1.5 miR171 und deren Zielgene in <i>A. thaliana</i> und <i>P. patens</i>	13
1.5.1 <i>MIR171</i> -Gene in <i>A. thaliana</i> und <i>P. patens</i>	13
1.5.2 miR171-Zielgene in <i>A. thaliana</i> und <i>P. patens</i>	14
1.5.3 Expressionsdomänen der <i>AthMIR171</i> -Gene und der Zielgene <i>AthSCL6-II</i> , <i>AthSCL6-III</i> und <i>AthSCL6-IV</i> in <i>A. thaliana</i>	15
1.5.4 Bekannte Funktionen der <i>ath</i> -miR171-Zielgene	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Zell- und Pflanzenkultur.....	22
2.1.1 Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	22
2.1.2 Kultivierung von <i>P. patens</i>	23
2.2 Transformation	25
2.2.1 Transformation von Bakterien.....	25
2.2.2 Transformation von <i>A. thaliana</i>	26
2.2.3 Transformation von <i>P. patens</i>	26
2.3 Selektion transgener Pflanzen.....	27
2.3.1 Selektion transgener und reinerbiger <i>A. thaliana</i> -Linien	27
2.3.2 Selektion transgener <i>P. patens</i> -Linien	27
2.4 GUS-Färbung.....	28
2.5 DNA-Isolierung.....	28
2.5.1 DNA-Isolierung aus <i>P. patens</i>	28
2.6 Southern Blot	29
2.7 Standard-PCR.....	29

2.8	Tri-Template-PCR	30
2.9	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.10	Gelextraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten	30
2.11	Restriktionsverdau	30
2.12	Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.13	Kolonie-PCR.....	31
2.14	DNA-Ligation.....	31
2.15	RNA-Extraktion	31
2.16	cDNA-Synthese zur Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	32
2.17	Northern Blot	32
2.17.1	Northern Blot für kleine RNA	33
2.18	RNA-Seq.....	34
2.18.1	DNaseI-Verdau und RNA-Aufreinigung zur <i>Next-Generation-Sequenzierung</i>	34
2.18.2	RNA-Sequenzierung	34
2.18.3	Bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierung	35
2.19	Klonierungen	37
2.19.1	Klonierung der Vektoren p <i>PpMIR171a</i> _{prom} :: <i>GUS</i> und p <i>PpMIR171a</i> _{prom} :: <i>GUS</i>	37
2.19.2	Klonierung der Vektoren pPGX8- <i>PpmGRAS1</i> und pPGX8- <i>PpmGRAS1-DR</i>	37
2.20	Medien, Puffer und Lösungen	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Die Expressionsdomänen von <i>PpMIR171a</i> und <i>PpMIR171b</i> unterscheiden sich	40
3.2	Analyse der Expressionsdomäne der ppt-miR171-Zielgene <i>PpGRAS1</i> und <i>PpGRAS2</i>	45
3.2.1	Klonierung der Vektoren pJET- <i>PpmGRAS1</i> und pJET- <i>PpmGRAS2</i>	46
3.2.2	Klonierung der Vektoren p <i>PpGRAS1-GUS</i> , p <i>PpmGRAS1-GUS</i> und p <i>PpGRAS2-GUS</i> , p <i>PpmGRAS2-GUS</i>	47
3.2.3	Etablierung von <i>PpGRAS1-GUS</i> - und <i>PpGRAS2-GUS</i> -Linien.....	49
3.2.4	Etablierung von <i>PpmGRAS1-GUS</i> - und <i>PpmGRAS2-GUS</i> -Linien	52
3.2.5	<i>PpGRAS2</i> wird in Rhizoiden, achselständigen Haaren und Primordien der Phylloide unabhängig von der ppt-miR171 exprimiert	55
3.3	Die Gametophyten- und Sporophytenentwicklung von <i>PpmGRAS1-GUS</i> und <i>PpmGRAS2-GUS</i> - <i>GUS</i> -Linien ist nicht beeinträchtigt.....	59
3.4	Analyse der <i>PpMIR171a</i> - und <i>PpMIR171b</i> -Überexpression.....	61
3.4.1	Klonierung des Überexpressionsvektors p <i>POsA1n</i>	61
3.4.2	Klonierung der Überexpressionsvektoren p <i>POsA1n-PpMIR171a</i> und p <i>POsA1n-PpMIR171b</i>	63
3.4.3	Etablierung von <i>PpMIR171a</i> - und <i>PpMIR171b</i> -Überexpressionslinien	64
3.4.4	Eine starke Überexpression der <i>PpMIR171</i> -Gene kann nach normaler Entwicklung des Gametophyten die Bildung von Sporophyten blockieren	67
3.5	Analyse von Δ <i>PpGRAS1</i> -Mutanten	69
3.5.1	Klonierung des Knockout-Vektors pJET- <i>PpGRAS1-KO</i>	69
3.6	Etablierung von Δ <i>PpGRAS1</i> -Linien.....	70
3.6.1	Δ <i>PpGRAS1</i> -Linien zeigen eine normale Entwicklung des Gametophyten und Sporophyten....	72

3.7	Analyse der induzierbaren Überexpression von <i>PpmGRAS1</i> und <i>PpmGRAS1-DR</i>	73
3.7.1	Etablierung von induzierbaren XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - und XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> - Überexpressionslinien	74
3.7.2	<i>PpmGRAS1</i> - oder <i>PpmGRAS1-DR</i> -Überexpression blockiert reversibel das Protonemawachstum und hat einen unterschiedlichen Effekt auf den Pigmentgehalt	77
3.8	Transkriptomanalyse von XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - und XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien und einer <i>PptMIR171b</i> -Überexpressionslinie.....	82
3.8.1	Mehr als 70 % der <i>P. patens</i> -Reads können eindeutig einem Transkript zugeordnet werden...	84
3.8.2	β -Estradiol-induzierte XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - und XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien unterscheiden sich in der Genexpression von unbehandelten Linien.....	85
3.8.3	β -Estradiol-Behandlung und anschließende Aktivierung von XVE in der XVE- Vektorkontrolle bewirken eine veränderte Genexpression	86
3.8.4	Die primären Transkripte von <i>PpMIR171a</i> werden im Protonema effizient prozessiert.....	87
3.8.5	Die <i>PpMIR171b</i> -Überexpressionslinie akkumuliert 3'-Spaltprodukte von <i>PpGRAS1</i> - und <i>PpGRAS2</i>	88
3.8.6	XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - und XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien zeigen eine frühe und eine späte Antwort der Genexpression nach β -Estradiol-Induktion	89
3.8.7	Clusteranalyse der <i>P. patens</i> Transkriptomdaten	92
3.8.8	Die induzierte Überexpression von <i>PpmGRAS1</i> im Protonema reduziert die Transkriptmengen von Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate	93
3.9	Induzierbare Überexpression <i>AthmSCL6-II</i> und <i>AthmSCL6-III</i>	96
3.9.1	Klonierung der Vektoren pTA7002- <i>AthmSCL6-II</i> und pTA7002- <i>AthmSCL6-III</i>	97
3.9.2	Etablierung von induzierbaren GVG>> <i>AthmSCL6-II</i> - und GVG>> <i>AthmSCL6-III</i> - Überexpressionslinien	99
3.10	Transkriptomanalyse von GVG>> <i>AthmSCL6-III</i> -Linien und <i>AthMIR171a</i> - Überexpressionslinien	100
3.10.1	Mehr als 90 % der <i>A. thaliana</i> -Reads können eindeutig einem Transkript zugeordnet werden	102
3.10.2	DEX-induzierte GVG>> <i>AthmSCL6</i> -Linien unterscheiden sich in der Genexpression von unbehandelten Linien.....	103
3.10.3	DEX-Behandlung und Aktivierung von GVG in der GVG-Vektorkontrolle bewirkt eine veränderte Genexpression	104
3.10.4	Die primären Transkripte von <i>AthMIR171a</i> , <i>AthMIR171b</i> und <i>AthMIR171c</i> werden effizient prozessiert	104
3.10.5	<i>AthMIR171a</i> -Überexpression verursacht eine Akkumulation der 3'-Spaltprodukte von <i>AthSCL6-II</i> , <i>Ath-SCL6-III</i> und <i>AthSCL6-IV</i>	104
3.10.6	Die DEX-induzierte Überexpression von <i>AthmSCL6-III</i> bewirkt eine frühe und eine späte Antwort in der Genexpression	106
3.10.7	Clusteranalyse der <i>A. thaliana</i> Transkriptomdaten	108
3.10.8	Die induzierte Überexpression von <i>AthmSCL6-III</i> in Keimlingen erhöht die Transkriptmengen von plastidär-codierten Genen der Photosynthese	108
3.10.9	Die induzierte Überexpression von <i>AthmSCL6-III</i> beeinflusst die Transkript-mengen von Genen, die an der Entwicklung und der Meristemregulation beteiligt sind	110
3.10.10	Die induzierte Überexpression von <i>AthmSCL6-III</i> in Keimlingen beeinflusst die Transkriptmengen von Genen der Trichombildung	111
4	Diskussion	113
4.1	Die Rolle des miR171-Regulationsweges in <i>P. patens</i>	113

4.1.1	Die Expressionsdomänen von <i>PpMIR171a</i> und <i>PpMIR171b</i>	113
4.1.2	Die Expressionsdomänen der ppt-miR171-Zielgene	113
4.1.3	Phänotypische Auswirkungen der <i>PpMIR171</i> -Überexpression und Deletion von <i>PpGRAS1</i> ...	115
4.1.4	Die Entwicklung von <i>PpmGRAS1-GUS</i> - und <i>PpmGRAS2-GUS</i> -Linien.....	116
4.1.5	Folgen einer induzierten Überexpression von <i>PpmGRAS1</i> und <i>PpmGRAS1-DR</i>	116
4.2	Die Rolle des miR171-Regulationsweges in <i>A. thaliana</i>	120
4.2.1	Chlorophyllbiosynthese und Photosynthese	120
4.2.2	Erhaltung apikaler Meristeme	120
4.2.3	Ausbildung von Seitenzweigen und laterale Meristemhomöostase	123
4.2.4	Übergang von juvenilem zu adultem vegetativen Stadium	123
4.2.5	Phasenübergang von der vegetativen zur reproduktiven Wachstumsphase	125
4.2.6	Die Rolle der ath-miR171- und ath-miR156-regulierten Zielgene in der reproduktiven Phase.....	126
4.2.7	Das Zusammenspiel der ath-miR171- und ath-miR156-Regulation	127
4.3	Evolutionärer Aspekt des miR171-Regulationsweges	128
4.4	Ausblick.....	130
5	Zusammenfassung.....	131
6	Abstract	132
7	Literaturverzeichnis	133
8	Anhang	140

Abkürzungsverzeichnis

<i>aph4</i>	Aminoglycosid Phosphotransferase 4-Gen
bp	Basenpaare
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> ; Blumenkohlmosaik-Virus
CDS	codierende Sequenz
DEX	Dexamethason
DGE	Digitale Gen-Expression
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC	<i>fold change</i>
GVG	<u>G</u> al4-DNA-Bindedomäne, <u>Y</u> P16-Transaktivierungsdomäne, <u>G</u> lucocorticoid Rezeptor
GAL4-AS	GAL4-Aktivierungssequenz
kb	Kilobasenpaare
KNOP-Medium	Nährmedium mit Kalium (<u>K</u>), Nitrat (<u>NO</u> ₃) und Phosphat (<u>PO</u> ₄).
knt	Kilonukleotide
MA-Plot	<i>Mean-Average-Plot</i> ; Mittelwert-Durchschnitt-Diagramm
miRNA	mikro RNA
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase II-Gen
nt	Nukleotid
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
OLR	Offener Leserahmen
p. a.	<i>pro analysis</i> , Angabe zur Stoffreinheit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNA-Seq	<i>RNA-Sequencing</i> ; Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung mittels NGS
RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse-Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
sRNA	<i>small RNA</i> ; kleine regulatorische RNA
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
XVE	X: LexA DNA-Bindedomäne, V: VP16 Transaktivierungsdomäne, E: Östrogenrezeptor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konservierte miRNA-Familien und ihre Zielgene in Landpflanzen	9
Tabelle 2: Sequenzalignment der reifen ath-miR171- und ppt-miR171-Varianten sowie der ath-miR171a*	13
Tabelle 3: Sequenzalignment der ath-miR171 und ath-miR171* sowie der ppt-miR171a und ppt-miR171b an den Bindestellen der Zieltranskripte	14
Tabelle 4: Reaktionsansatz und Programm einer Standard-PCR	29
Tabelle 5: Reaktionsansatz und Programm der Tri-Template-PCR	30
Tabelle 6: Read-Mapping Parameter	35
Tabelle 7: DNA- und mRNA-Sequenzvergleiche der natürlichen und mutierten ppt-miRNA171a/b-Bindestellen in <i>PpGRAS1/2</i> und <i>PpmGRAS1/2</i> mit kodierte Aminosäuresequenzen	47
Tabelle 8: Sequenzen der <i>PpGRAS1/2</i> -GUS-Fusionsstellen und kodierte Aminosäuresequenz	49
Tabelle 9: MCS der Überexpressionsvektoren <i>pPOsA1n</i> und <i>pPOsA1h</i>	62
Tabelle 10: Übersicht der RNA-Seq-Daten und Read-Mapping der <i>P. patens</i> -Proben	85
Tabelle 11: Normalisierte Verhältnisse der 3'-Fragment-Reads zu 5'-Fragment-Reads der ppt-miR171-Zielgene und schematische Darstellung der Read-Verteilung	89
Tabelle 12: DNA- und mRNA-Sequenzvergleiche der natürlichen und mutierten ath-miRNA171a/b-Bindestellen in <i>AthSCL6-II/III</i> und <i>AthmSCL6-II/III</i> je mit codierten Aminosäuresequenzen	98
Tabelle 13: Übersicht der RNA-Seq-Daten und des Read-Mappings der <i>A. thaliana</i> -Proben	102
Tabelle 14: Normalisierte Verhältnisse der 3'-Fragmentreads zu 5'-Fragmentreads der ath-miR171-Zielgene und schematische Darstellung der Read-Verteilung	105
Anhang Tab. 1: Primer und Oligonukleotide	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenie der Landpflanzen	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung apikaler Meristeme von <i>P. patens</i> und <i>A. thaliana</i> im Querschnitt	3
Abbildung 3: Schematische Lebenszyklen von <i>P. patens</i> und <i>A. thaliana</i>	5
Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der miRNA-Biogenese und posttranskriptionellen Generulation	7
Abbildung 5: Sequenz-Aligment der miR171-pre-miRNAs aus fünf Arten repräsentativ für verschiedene Entwicklungsstufen der Landpflanzenevolution	10
Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der GRAS-Proteinfamilie	12
Abbildung 7: Übersicht der <i>A. thaliana</i> -Linien und deren Behandlung vor der RNA-Sequenzierung	23
Abbildung 8: Übersicht der <i>P. patens</i> Probenbehandlung vor der RNA-Sequenzierung	25
Abbildung 9: Klonierungsstrategien zur Herstellung der Vektoren p <i>PpMIR171a</i> _{prom} :: <i>GUS</i> und p <i>PMIR171b</i> _{prom} :: <i>GUS</i>	37
Abbildung 10: PCR-basierte Reihenuntersuchung zur Identifizierung transgener <i>PpMIR171</i> _{prom} :: <i>GUS</i> -Linien	41
Abbildung 11: Analyse der <i>PpMIR171</i> -Expressionsdomänen im Gametophyten	42
Abbildung 12: Analyse der <i>PpMIR171</i> -Expressionsdomänen in Gametangien und Sporophyten	44
Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pJET- <i>PpmGRAS1</i>	46
Abbildung 14: Klonierungsstrategie zur Herstellung der p <i>PpGRAS1/2-GUS</i> und p <i>PpmGRAS1/2-GUS</i> -Konstrukte am Beispiel von <i>PpGRAS1</i>	48
Abbildung 15: Identifizierung transgener <i>PpGRAS2-GUS</i> -Fusionslinien	51
Abbildung 16: Identifizierung transgener <i>PpmGRAS1-GUS</i> -Fusionslinien	53
Abbildung 17: Identifizierung transgener <i>PpmGRAS2-GUS</i> -Fusionslinien	54
Abbildung 18: Analyse der <i>PpGRAS2</i> - und <i>PpmGRAS2</i> -Expressionsdomänen in Gametophyten	56
Abbildung 19: Histochemische Analyse der <i>PpGRAS2-GUS</i> und <i>PpmGRAS2-GUS</i> -Expressionsdomänen in Gametangien und Sporophyten sowie phänotypische Untersuchung von <i>PpmGRAS2-GUS</i> -Linien im Vergleich zum Wt	58
Abbildung 20: Phänotypische Untersuchung der Entwicklung des Gametophyten von ppt-miR171-resistenten <i>PpmGRAS1-GUS</i> bzw. <i>PpmGRAS2-GUS</i> -Linien sowie von Gametangien und Sporophyten der <i>PpmGRAS1-GUS</i> -Linien im Vergleich zum Wt	60
Abbildung 21: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Überexpressionsvektoren p <i>POSA1h</i> und p <i>POSA1n</i>	62
Abbildung 22: Klonierung der <i>PpMIR171a</i> - und <i>PpMIR171b</i> -Überexpressionsvektoren	63
Abbildung 23: <i>In silico</i> Vorhersage der Transkript-Sekundärstrukturen der in p <i>POSA1n</i> klonierten <i>PpMIR171</i> -Fragmente	64
Abbildung 24: Identifizierung transgener <i>OsACT1::PpMIR171a</i> und <i>OsACT1::PpMIR171b</i> -Linien	66
Abbildung 25: Phänotypische Charakterisierung des Gametophyten und Sporophyten von <i>PpMIR171a</i> - und <i>PpMIR171b</i> -Überexpressionslinien im Vergleich zum Wt	68
Abbildung 26: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Vektors pJET- <i>PpGRAS1-KO</i>	69

Abbildung 27: Identifizierung von $\Delta PpGRAS1$ -Linien	71
Abbildung 28: Phänotypische Analyse des Gametophyten und Sporophyten sowie der Sporenkeimung von $\Delta PpGRAS1$ -Linien im Vergleich zum Wt	72
Abbildung 29: Identifizierung transgener XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - und XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien	75
Abbildung 30: Identifizierung von β -Estradiol induzierbaren <i>PpmGRAS1</i> -Überexpressionslinien mittels <i>PpGRAS1</i> -spezifischen Sonden durch Northern Blots	76
Abbildung 31: Entwicklungspänotyp der XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - bzw. XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien, der XVE-Vektorkontrolle und des Wt auf Induktions-Medium im Vergleich zu normalem Medium	79
Abbildung 32: Entwicklung von β -Estradiol-behandelten Gametophoren der XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - sowie der XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien im Vergleich zur XVE-Vektorkontrolle und dem Wt.....	81
Abbildung 33: Entwicklung von β -Estradiol-behandelten Protonemagewebe von XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - sowie der XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien nach Transfer auf normales KNOP-Medium	82
Abbildung 34: Überprüfung der <i>PpmGRAS1</i> - und <i>PpmGRAS1-DR</i> -Expression in RNA-Proben zur Transkriptomanalyse	84
Abbildung 35: Hauptkomponentenanalyse der Varianz der Genexpression in den <i>P. patens</i> -Transkriptomdaten	86
Abbildung 36: Differentielle Genexpression in der <i>PpMIR171b</i> -Überexpressionslinie und nach β -Estradiolinduktion von XVE>> <i>PpmGRAS1</i> - und XVE>> <i>PpmGRAS1-DR</i> -Linien sowie β -Estradiol-behandlung der XVE-Vektorkontrolle	91
Abbildung 37: Heat-map und Annotationen von differentiell exprimierten Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate in <i>P. patens</i>	95
Abbildung 38: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pTA7002- <i>AthmSCL6-II</i> und pTA7002- <i>AthmSCL6-III</i> beispielhaft gezeigt für <i>AthmSCL6-II</i>	97
Abbildung 39: Identifizierung von DEX-induzierbaren <i>AthmSCL6-II</i> - und <i>AthmSCL6-III</i> -Überexpressions-linien mittels <i>AthSCL6-II</i> - bzw. <i>AthSCL6-III</i> -spezifischen Sonden durch Northern Blots	100
Abbildung 40: Überprüfung der <i>AthmSCL6-III</i> -Expression in RNA-Proben zur Transkriptomanalyse....	101
Abbildung 41: Hauptkomponentenanalyse der Varianz der Genexpressionsstärken der <i>A. thaliana</i> -Sequenzdaten	103
Abbildung 42: Differentielle Genexpression nach DEX-induzierter <i>AthmSCL6-III</i> -Überexpression und DEX-Behandlung der GVG-Vektorkontrolle sowie bei <i>AthMIR171a</i> -Überexpression	107
Abbildung 43: Heat-map und Annotationen von differentiell exprimierten und plastidär-codierten Photosynthesegenen in <i>A. thaliana</i>	109
Abbildung 44: Heat-map und Annotationen von differentiell exprimierten Genen, die an der Meristemregulation und Entwicklung sowie der Trichombildung in <i>A. thaliana</i> beteiligt sind	112
Abbildung 45: Modelle zur potenziellen Funktion von PpGRAS1 bzw. PpGRAS1-DR als Transkriptionsfaktoren	119
Abbildung 46: Modell zur Festlegung der reproduktiven Wachstumsphase durch Alter und Photoperiode	126
Abbildung 47: Erweitertes Modell der Regulation des Trichominitiationskomplexes	128
Anhang Abb. 1: Promotorenbereiche der <i>PpMIR171</i> -Gene im <i>P. patens</i> Genome Browser Version 1.2 ...	140

Anhang Abb. 2: Schematischer Ablauf der Transkriptomdatenauswertung für <i>P. patens</i>	141
Anhang Abb. 3: Schematischer Ablauf der Transkriptomdatenauswertung für <i>A. thaliana</i>	142
Anhang Abb. 4: Vergleichende Expressionsanalyse der <i>P. patens</i> Transkriptomdaten im MA-Plot	143
Anhang Abb. 5: Vergleichende Expressionsanalyse der <i>A. thaliana</i> Transkriptomdaten im MA-Plot	145
Anhang Abb. 6: Identifizierung transgener <i>PpGRAS1-GUS</i> -Fusionslinien	146

1 Einleitung

1.1 Die Landpflanzen *Physcomitrella patens* und *Arabidopsis thaliana*

Im Laufe der Evolution haben sich die Landpflanzen von einfach strukturierten mehrzelligen Organismen bis hin zu den hochkomplexen bedecktsamigen Pflanzen der Magnoliopsida entwickelt (Graham *et al.* 2000). Mit der fortwährenden Anpassung an die Lebensbedingungen an Land hat sich auch der grundlegende Aufbau der Pflanzen verändert. Dabei haben einige Gene, die bereits in den ersten Landpflanzen vorhanden waren, neue Funktionen übernommen, während andere Gene neu entstanden sind (Pires *et al.* 2012). Ein Vergleich der Gene aus verschiedenen Organismen, die unterschiedliche evolutionäre Entwicklungsstufen repräsentieren, ermöglicht es, konservierte Genfamilien von neu entstandenen zu unterscheiden. Es ist davon auszugehen, dass grundlegenden Prozessen in der Entwicklung einer Landpflanze eher konservierte Genfamilien zugrunde liegen, während neue Genfamilien mit erst kürzlich gewonnenen Eigenschaften und einer Anpassung der Pflanze an ihre Umwelt in Verbindung gebracht werden können. Vergleichende und funktionelle Analysen dieser Genfamilien können daher zur Aufklärung der genetischen Mechanismen beitragen, welche für die Gemeinsamkeiten oder aber die Unterschiede innerhalb der Landpflanzen verantwortlich sind. Die Laubmoose (*Bryophyta*) haben sich vor ca. 470 Millionen Jahren entwickelt und nehmen daher phylogenetisch eine Position an der Basis der Landpflanzen ein (Pires and Dolan 2012). Die Kreuzblütler (*Brassicaceae*) sind eine Gruppe innerhalb der Eudicotyledonen, welche sich erst vor ca. 40 Millionen Jahren entwickelt hat und daher eine große evolutionäre Distanz zu den Laubmoosen aufweist (Abbildung 1) (Couvreur *et al.* 2010). Aus diesem Grund werden das Laubmoos *Physcomitrella patens* sowie der Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* – beides etablierte Modellorganismen – für vergleichende Analysen verwendet (Floyd *et al.* 2007; Prigge *et al.* 2010).

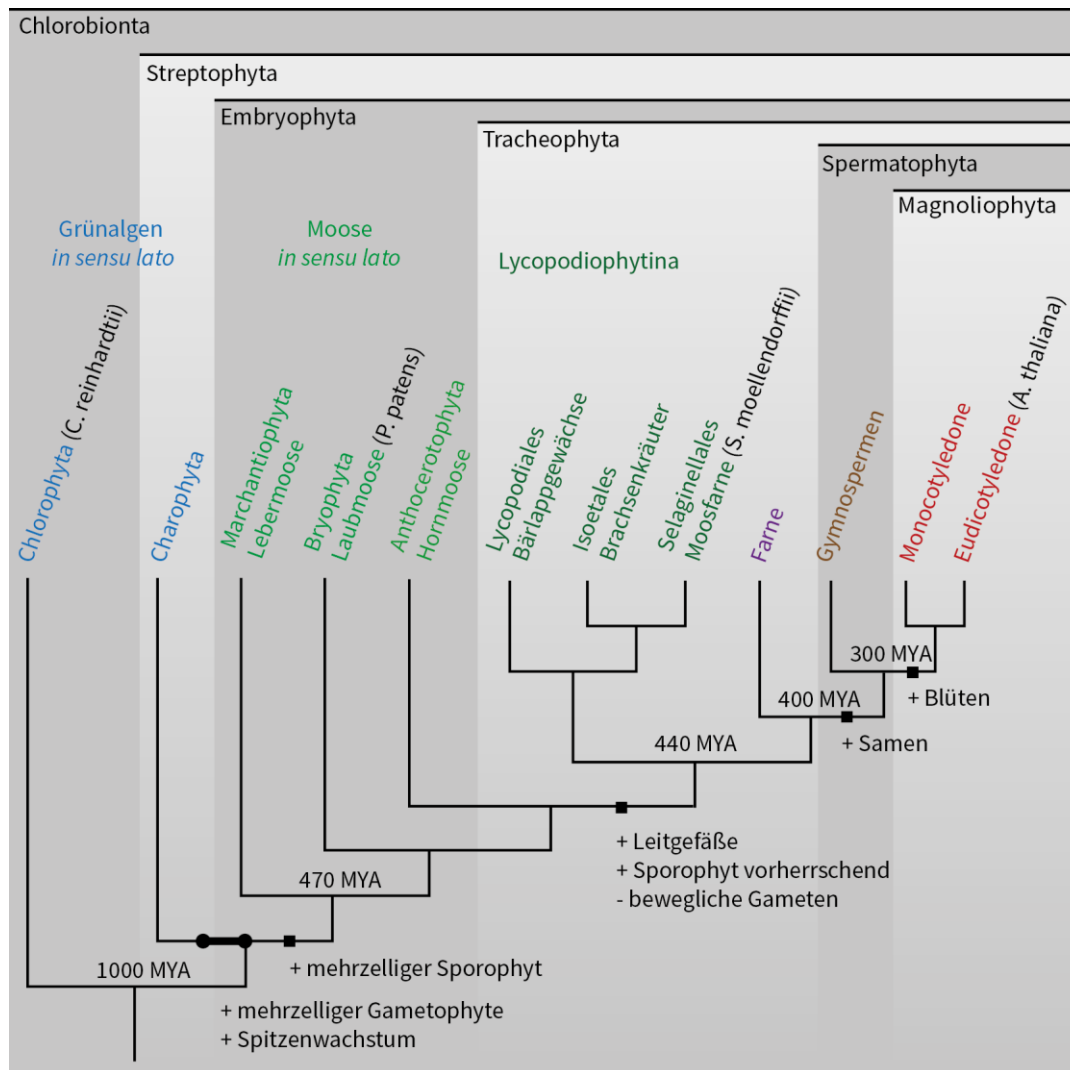


Abbildung 1: Phylogenie der Landpflanzen

Angegeben sind die wichtigsten Entwicklungsschritte und Eigenschaften der einzelnen Taxa, die neu entstanden sind (+) oder verloren gegangen sind (-) sowie die Zeitspanne, vor der sich einzelne Gruppen aufgespalten haben in *million years ago* (MYA). Verändert nach (Strotbek *et al.* 2013)

1.1.1 Aufbau und Entwicklung von *P. patens* und *A. thaliana*

Die Landpflanzen weisen einen heterophasischen und heteromorphen Lebenszyklus auf, in dem sich zwei Generationen, der diploide Sporophyt und der haploide Gametophyt, abwechseln. In den basalen Gruppen der Landpflanzen, wie z.B. den Laubmoosen, herrscht der Gametophyt als dominante Lebensphase vor. Erst mit der Entwicklung der Gefäßpflanzen (*Tracheophyta*) wurde der Sporophyt zur dominanten Lebensphase (Abbildung 1), während der Gametophyt zunehmend reduziert wurde (Pires and Dolan 2012). Sowohl der Sporophyt als auch der Gametophyt der Landpflanzen sind mehrzellig aufgebaut und werden durch Spitzenwachstum gebildet (Pires and Dolan 2012). Dabei unterscheidet sich das Spitzenwachstum bei basalen Vertretern der Landpflanzen, wie z.B. *P. patens*, von dem höherer Vertreter, wie z.B. *A. thaliana*. In *P. patens* werden filamentöse Gewebe ebenso wie die wenig komplexen mehrzelligen Gewebe durch einzelne meristematische Spitzenzellen gebildet (Abbildung 2, A) (Kofuji *et al.* 2014).

Im Gegensatz zu *P. patens* ist *A. thaliana* als ein Vertreter der später entstandenen Blütenpflanzen deutlich komplexer aufgebaut. Hier wird die Vielzahl an Gewebetypen des Sporophyten von mehrzelligen und mehrschichtigen Meristemen, den Spross- und Wurzelmeristemen ausgebildet (Abbildung 2, B), die bereits während der Embryonalentwicklung im Samen angelegt werden (Prigge and Bezanilla 2010). Das apikale Wurzelmeristem beherbergt in seiner Mitte das wenige Zellen umfassende Ruhende Zentrum (RZ). Stammzellen supraapikal des RZ bilden die Wurzelhaube, lateral des RZ die Initialen der seitlichen Wurzelhaube und der Epidermis sowie die Cortex- und Endodermisinitialen und subapikal des RZ die Initialen der Endodermis und des Leitbündels. Im apikalen Sprossmeristem befinden sich die Stammzellen in den beiden ersten Schichten, die als L1-Schicht und L2-Schicht bezeichnet werden. Diese zeichnen sich durch antikline Zellteilungsebenen aus und bilden die Urrinde. Die Tochterzellen der L1-Stammzellen bilden dabei die Epidermis. Die Zellen in der L3-Schicht teilen sich sowohl antiklin, als auch periklin und bilden das Urmark.

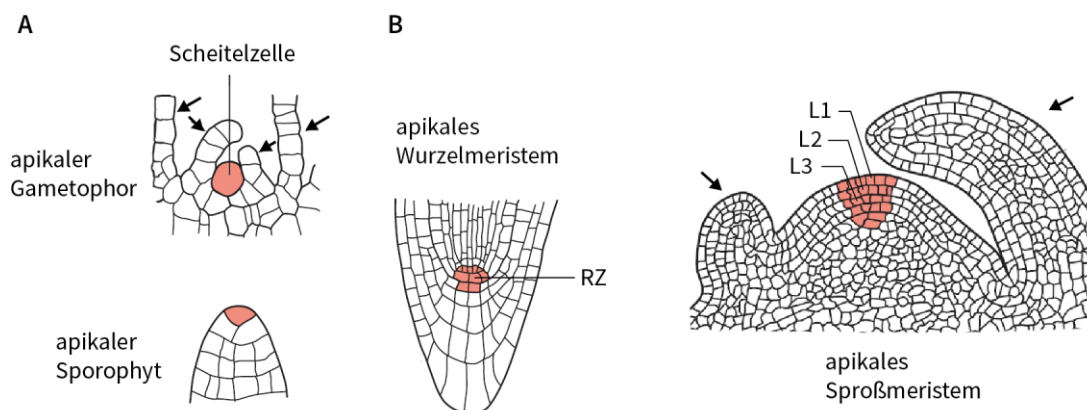


Abbildung 2: Schematische Darstellung apikaler Meristeme von *P. patens* und *A. thaliana* im Querschnitt

A) *P. patens* Stammzellen (in rot) im Gametophor (oben) und im Sporophyt (unten). Seitlich auswachsende Phylloide im Gametophor sind mit Pfeilen markiert.

B) *A. thaliana* Stammzellpopulationen (in rot) im apikalen Wurzelmeristem (links) und apikalen, vegetativen Sprossmeristem (rechts). Seitlich des Sprossmeristems auswachsende Blattprimordien sind mit Pfeilen markiert.

Abbildung verändert nach (Prigge and Bezanilla 2010).

Der Lebenszyklus von *P. patens*

Im Lebenszyklus von *P. patens* bildet der Gametophyt durch das Auskeimen einer haploiden Spore zunächst ein fädiges, verzweigtes Geflecht. Dieses Geflecht wird als Protonema bezeichnet und besteht aus zwei Zelltypen: dem chloroplastenreichen Chloronema und dem chloroplastenarmen Caulonema (Abbildung 3, A). Beide Zelltypen des Protonemas wachsen und verzweigen sich durch Spitzenwachstum (Menand *et al.* 2007). Später bildet der Gametophyt am Protonema mehrzellige Knospen, an deren Spitze eine tetraedische Scheitelzelle sitzt (Abbildung 2, A oben), die durch Zellteilungen nach drei Seiten einen beblätterten Spross, den Gametophoren bildet (Harrison *et al.* 2009). An der Basis des Gametopho-

ren werden Rhizoide ausgebildet, um diesem Halt zu verleihen. Ausgewachsene Gametophoren können an ihrer Spitze Gametangien ausbilden. Diese umfassen die männlichen Antheridien und die weiblichen Archegonien. In den Antheridien werden begeißelte Spermatozoide gebildet, die durch einen Wasserfilm in das Archegonium gelangen, und dort die Eizelle befruchten können. Der diploide Sporophyt entwickelt sich aus der Zygote und sitzt daher auf dem Gametophyten. Auch der Sporophyt wächst bei *P. patens* durch Zellteilung einer einzigen Scheitelzelle (Abbildung 2, A unten). Der Sporophyt bildet eine Sporenkapsel aus, in der Meiosporen gebildet werden. Sind diese herangereift, platzt die Sporenkapsel auf und verbreitet die nächste Generation.

Der Lebenszyklus von *A. thaliana*

Der Lebenszyklus des Sporophyten von *A. thaliana* beginnt mit dem Auskeimen eines Samens (Abbildung 3, B). Der dabei freiwerdende Keimling besitzt bereits mit den Kotyledonen, dem Hypokotyl und der Keimwurzel den grundlegenden Aufbau des Sporophyten. Zwei apikale Meristeme sind im Keimling bereits angelegt: das apikale Sprossmeristem und das apikale Wurzelmeristem (Abbildung 2, B). In der vegetativen Wachstumsphase bildet das apikale Sprossmeristem mehrere laterale Blattanlagen. Diese wachsen zu Beginn der vegetativen Wachstumsphase zu juvenile und später zu adulte Rosettenblätter aus, die durch sehr kurze Internodien dicht übereinander liegen. Das apikale Wurzelmeristem hingegen treibt die Wurzel in den Boden.

Mit dem Übergang des apikalen Sprossmeristems in ein Infloreszenzmeristem beginnt die reproduktive Wachstumsphase. Das primäre Infloreszenzmeristem bildet zunächst anstelle der Rosettenblätter eine Reihe kleiner Stängelblätter (Tragblätter), in dessen Blattachsen weitere, sekundäre Infloreszenzmeristeme entstehen. Später bildet das Infloreszenzmeristem nur noch laterale Blütenmeristeme, bis es letztlich selbst in ein Blütenmeristem übergeht. Das Blütenmeristem bildet mehrere konzentrische Anlagen. Diese wachsen zu vier Kelch- und vier Kronblättern aus sowie zu vier langen und zwei kurzen Staubblättern. In der Mitte des Blütenmeristems wird der Stempel gebildet, mit dem basalen Fruchtknoten, dem darüberliegenden Griffel und der apikalen Narbe. In der Blüte entwickelt sich die Gametophytengeneration. Durch meiotische Zellteilungen werden in den Staubblättern die haploiden Mikrosporen (Pollen) und im Fruchtknoten die haploiden Megasporen (Embryosack mit Eizelle) gebildet. Mit dem Öffnen der Blüten sind die Pollen im Staubbeutel reif und können auf die Narbe übertragen werden. Dort wachsen die Pollenschläuche aus und die Spermatozoide befruchten die reifen Eizellen. Aus den Zygoten entwickeln sich Embryos, die in einem Samen heranreifen. Ist der Samen reif, stirbt der Sporophyt ab und trocknet ein, so dass die Schoten aufspringen und sich die Samen der nächsten Generation ausbreiten.

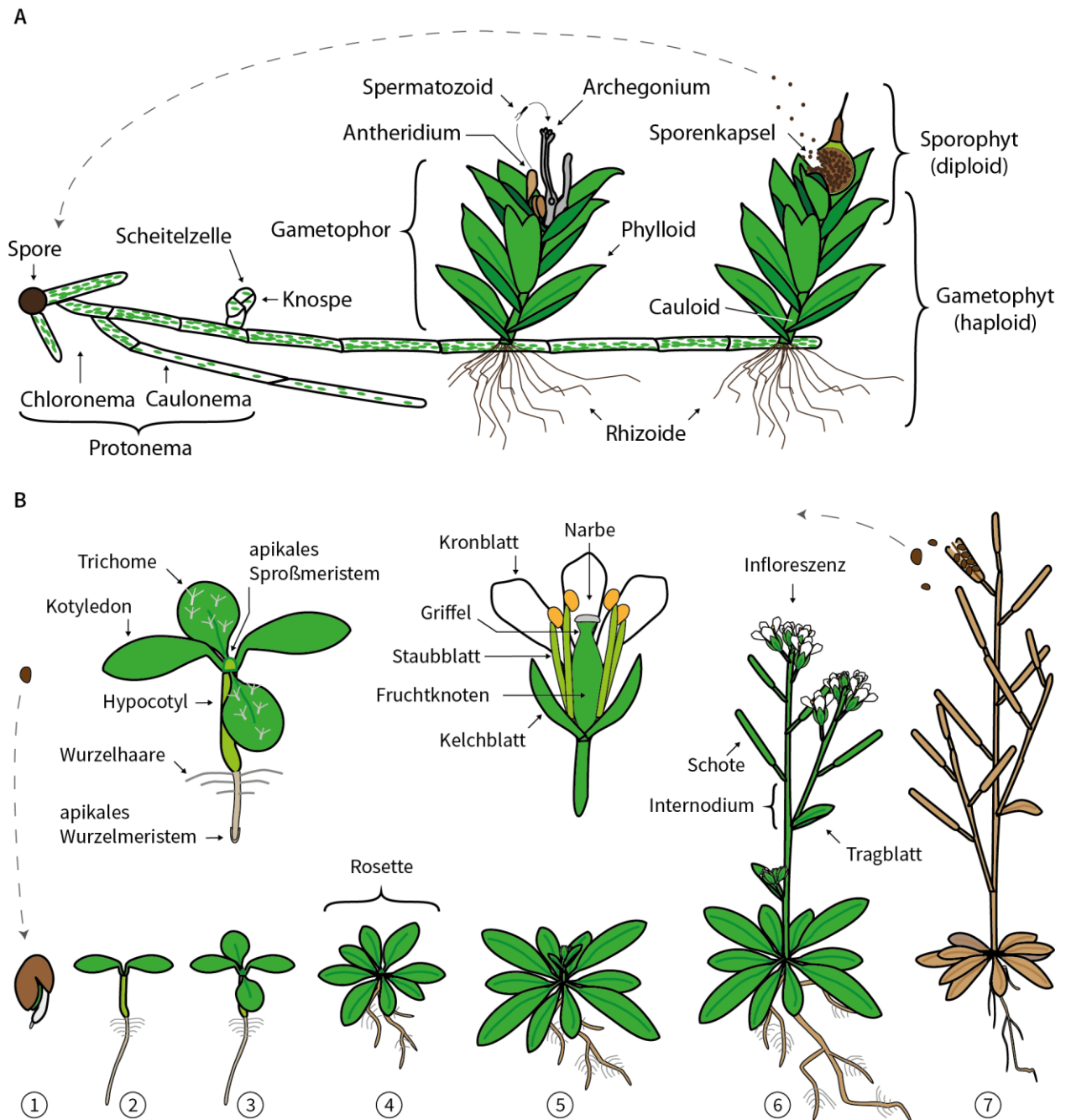


Abbildung 3: Schematische Lebenszyklen von *P. patens* und *A. thaliana*

A) Der Lebenszyklus von *P. patens*.

B) Der Lebenszyklus von *A. thaliana*. 1) Auskeimender Samen mit Embryo. 2) Keimling mit geöffneten Kotyledonen und auswachsender Wurzel mit Wurzelhaaren. 3) und 4) junge sowie ältere Pflanze mit Rosettenblättern in der vegetativen Wachstumsphase. 5) Pflanze mit Infloreszenz in der reproduktiven Wachstumsphase. 6) Pflanze mit Blüten sowie Schoten, die heranreifende Samen enthalten. 7) Abgestorbene Pflanze mit reifen Samen, die aus aufplatzenen Schoten freiwerden.

1.2 Die miRNA-vermittelte Genregulation

Mikro-RNAs (miRNAs) sind eine eigene Klasse von kleinen regulatorischen RNAs (*small RNA*; sRNA), die von endogenen *MIR*-Genen codiert werden (Voinnet 2009). Sie wirken als negative Regulatoren der Genexpression. Einige miRNAs sind an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt, die grundlegende Entwicklungsprozesse steuern wie z.B. die Zellteilung, Zelldifferenzierung oder auch die Musterbildung (Chen 2009; Chuck *et al.* 2009).

1.2.1 Die miRNA-Biogenese

Die Biogenese von miRNAs in Pflanzen wurde weitestgehend für *A. thaliana* aufgeklärt (Rogers *et al.* 2013). Bisher wurden die zentralen, katalytischen Proteine der miRNA-Biogenese in *P. patens* funktionell analysiert und es konnten homologe Proteine zu allen bekannten Faktoren der miRNA-Biogenese in *A. thaliana* auch in *P. patens* identifiziert werden (Arif *et al.* 2013).

Die Transkription von *MIR*-Genen erfolgt durch die RNA-Polymerase II in Verbindung mit dem konservierten Multiproteinkomplex Mediator als Kofaktor (Abbildung 4) (Kim *et al.* 2011). Anschließend werden die Transkripte am 5'-Ende mit einer m⁷G-Kappe versehen und am 3'-Ende poly-adenyliert (Xie *et al.* 2005). Das so entstandene primäre miRNA-Transkript (pri-miRNA) bildet im Zellkern durch Rückfaltung und intramolekulare Basenpaarung eine charakteristische Sekundärstruktur aus: eine Haarnadelstruktur mit einem nahezu doppelsträngigen „Stamm“ und einer terminalen „Schleife“ (Reinhart *et al.* 2002). NEGATIVE ON TATA LESS 2b (NOT2b), ein in Pflanzen konserviertes Protein fördert die Transkription von *MIR*-Genen durch RNA-Polymerase II und stellt die Verbindung zu einem Ribonuklease-III ähnlichen Protein, DICER-LIKE1 (DCL1) und zwei weiteren Faktoren der miRNA-Biogenese her. Dies sind zum einen das Zink-Finger-Protein SERRATE (SE) und die *cap-binding* Proteine CBP20/CBP80 (Lobbes *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008; Wang *et al.* 2013b). DCL1 ist ein Schlüsselenzym in der miRNA-Biogenese. Zunächst spaltet DCL1 in mehreren Schritten den Haarnadelstruktur enthaltenden miRNA-Vorläufer (pre-miRNA) aus der pri-miRNA heraus und danach aus der pre-miRNA den reifen miRNA-enthaltenden RNA-Doppelstrang, der zwei Nukleotide 3'-Überhang aufweist (Park *et al.* 2002; Schauer *et al.* 2002; Kurihara *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2013). In *P. patens* übernimmt PpDCL1a – eines von zwei DCL1-Homologen – diese Funktion (Khraiwesh *et al.* 2010). SE bindet dabei Übergangsbereiche von einzelsträngiger zu doppelsträngiger RNA und fördert über die Zink-Finger-Domäne die enzymatische Aktivität von DCL1 (Iwata *et al.* 2013). DCL1 agiert bei der pri-miRNA-Prozessierung zusammen mit dem RNA-Doppelstrang-bindenden Protein HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) und dem G-patch Protein TOUGH (TGH) (Han *et al.* 2004; Vazquez *et al.* 2004; Ren *et al.* 2012). Der durch DCL1 entstandene RNA-Doppelstrang besteht aus der aktiven (reifen), meist 21 Nukleotide langen miRNA und dem Gegenstrang, der miRNA*. Es wird angenommen, dass der miRNA-miRNA*-Doppelstrang durch ein Exportin-5 Homolog, HASTY, aus dem Zellkern transportiert wird. Zudem wird durch HUA ENHANCER1 (HEN1) die reife miRNA an der 2'-Hydroxy-Gruppe des 3'-terminalen Nukleotids methyliert und so vor einem vorzeitigen

Abbau geschützt (Li *et al.* 2005; Park *et al.* 2005; Huang *et al.* 2009; Zhai *et al.* 2012). Nur die reife miRNA wird schließlich in einen *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen, dessen zentrales miRNA-bindendes Protein ein Mitglied der ARGONAUTE (AGO) Proteinfamilie ist (Mi *et al.* 2008; Iki *et al.* 2010). In *P. patens* ist möglicherweise PpDCL1b, das zweite DCL1-Homolog, an der Beladung von RISC mit reifen miRNAs beteiligt (Khraiwesh, Arif *et al.* 2010). Tatsächlich ist die miRNA-Biogenese von miRNAs, wie z.B. der miR171, aber auch die Spaltung der Zieltranskripte in *A. thaliana*-Mutanten mit funktionslosem DCL1, HYL1 oder HEN1 stark reduziert (Vazquez, Gasciolli *et al.* 2004).

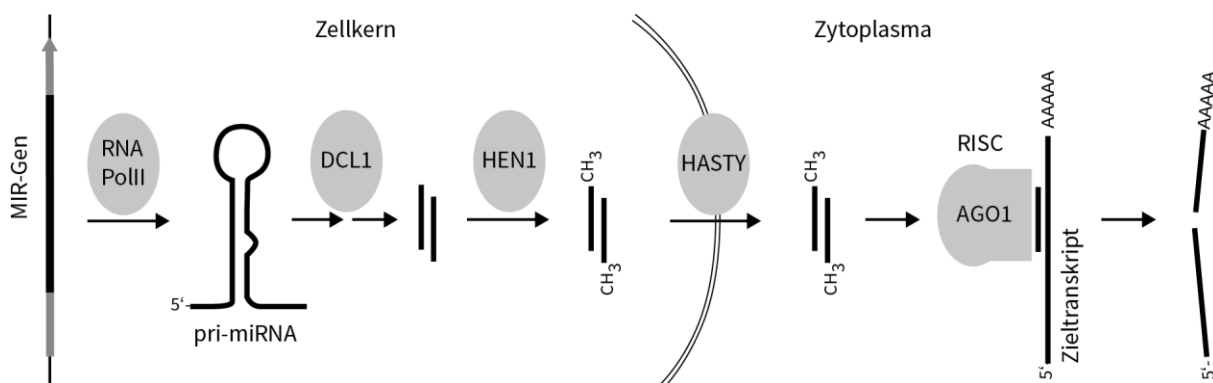


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der miRNA-Biogenese und posttranskriptionellen Genregulation

Nur die grundlegenden Schritte der miRNA-Biogenese sowie die daran beteiligten Proteine (in Grau) sind dargestellt. RISC: *RNA-induced-Silencing-Complex*.

1.2.2 Wirkmechanismen von miRNAs in der Genregulation

Posttranskriptionelles *gene-silencing*

Im Zytoplasma wird die reife miRNA aus dem miRNA-miRNA*-Doppelstrang in ein AGO-Protein eines RISC-Komplexes geladen und der miRNA*-Strang entfernt (Baumberger *et al.* 2005). Dabei wird die reife miRNA anhand des thermodynamisch schwächer gebundenen 5'-Endes ausgewählt (Eamens *et al.* 2009). Die Identität des 5'-terminalen Nukleotides bestimmt dabei in welches AGO-Protein die reife miRNA geladen wird (Mi, Cai *et al.* 2008). Die Mehrheit der miRNAs wird durch ein 5'-terminales Uridin in AGO1 geladen. Die Beladung eines AGO-Proteins und das Entfernen des miRNA*-Stranges ist ein energieabhängiger Schritt, der durch das HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) vermittelt wird (Iki, Yoshikawa *et al.* 2010). Durch die Bindung eines HSP90-Dimers an ein AGO-Protein und die Aktivierung des HSP90 durch ATP wird die Beladung des miRNA/miRNA*-Doppelstranges in das AGO-Protein erleichtert. Eine anschließende Spaltung des ATPs stellt die Energie für eine Konformationsänderung des AGO-Proteins durch HSP90 zur Verfügung, so dass die miRNA von der miRNA* getrennt werden kann.

Die AGO-Proteine besitzen drei funktionelle Domänen: eine PAZ-Domäne, eine Mid-Domäne und eine PIWI-Domäne (Poulsen *et al.* 2013). Die PAZ-Domäne bindet das 3'-Ende der miRNA, während die Mid-Domäne das 5'-Ende bindet und an der Erkennung des 5'-terminalen Nukleotids beteiligt ist

(Frank *et al.* 2012). Die PIWI-Domäne besitzt eine RNaseH-ähnliche Endonukleaseaktivität, mit der doppelsträngige RNA gespalten werden kann (Baumberger and Baulcombe 2005). Durch die Beladung eines AGO-Proteines mit einer miRNA entsteht somit eine funktionelle Einheit, die abhängig von der gebundenen miRNA spezifische Zieltranskripte spalten kann (Llave *et al.* 2002; Vaucheret *et al.* 2004). Eine notwendige Voraussetzung dafür ist, dass die Zieltranskripte eine nahezu vollständig komplementäre Sequenz zur miRNA, die sogenannte miRNA-Bindestelle, besitzen (Liu *et al.* 2014). Die anschließende Spaltung des Zieltranskriptes erfolgt dann zumeist in der Mitte der gebundenen miRNA zwischen Position 9 und 11 (Kasschau *et al.* 2003; Axtell *et al.* 2007). Die gespaltenen Zieltranskripte werden anschließend z.B. durch Exoribonukleasen abgebaut (Souret *et al.* 2004). Die reifen miRNAs hingegen werden durch mehrere Exoribonukleasen der SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN) Familie wieder abgebaut (Ramachandran *et al.* 2008). Die Genexpression eines miRNA-Zielgenes wird posttranskriptionell somit durch die miRNA-vermittelt entweder vermindert oder gänzlich reprimiert (posttranskriptionelles *gene silencing*; PTGS).

Ein alternativer Mechanismus des PTGS stellt die Repression der Translation der Zieltranskripten dar (Iwakawa *et al.* 2013). Hierbei verhindert die Bindung eines miRNA-beladenen RISC am Zieltranskript eine Assemblierung des Ribosoms oder hindert das Ribosom sterisch an der Proteinbiosynthese.

Transkriptionelles *gene-silencing*

Eine weitere Möglichkeit der Genregulation durch miRNAs stellt das transkriptionelle *gene-silencing* (TGS) dar. Hierbei wird die miRNA zusammen mit dem Zieltranskript in ein *RNA-induced transcriptional silencing complex* (RITS) geladen und vermittelt anschließend eine Methylierung des komplementären, genomischen Locus des miRNA-Zielgens. In Folge dessen wird die Transkription des Zielgens inaktiviert. Dieser Mechanismus wurde auch für *P. patens* postuliert (Khraiwesh, Arif *et al.* 2010).

1.2.3 Konservierte miRNA-Familien in Landpflanzen

Ein Set von sechs miRNA-Familien (Tabelle 1) ist in allen Landpflanzen konserviert (Axtell *et al.* 2005; Arif *et al.* 2011). Da diese miRNA-Familien keine Homologie zu bekannten miRNAs der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzen, sind sie vermutlich mit den ersten Landpflanzen entstanden (Arif, Fattash *et al.* 2011; Jones-Rhoades 2012). Die Zielgene der sechs konservierten miRNA-Familien gehören ebenfalls konservierten Genfamilien an. Im Laufe der Evolution sind noch weitere miRNA-Familien entstanden, von welchen einige innerhalb monophyletischer Taxa konserviert sind. Die Mehrzahl ist aber erst innerhalb einzelner Taxa bzw. einzelner Arten entstanden (Zhang *et al.* 2006; Jones-Rhoades 2012; Taylor *et al.* 2014).

Tabelle 1: Konservierte miRNA-Familien und ihre Zielgene in Landpflanzen

miRNA-Familie	Ppt	Smo	Pta	Osa	Ath	konservierte Zielgenefamilie
Gesamt	229:280	58:64	35:36	529:713	325:427	
miR156	3:1	4:4	2:2	12:6 (7)	10:9 (5)	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)
miR160	9:6	2:1	-	6:8 (6)	3:3 (2)	AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)
miR165	-	-	-	-	2:3 (1)	Klasse III Homeodomain-Leucine Zipper (HD-Zip)
miR166	12:3	3:1	3:2	13:13 (11)	7:3 (3)	
miR170	-	-	-	-	1:2 (1)	GIBBERELLIN-INSENSITIVE, REPRESSOR OF <i>ga1-3</i> , SCARECROW (GRAS)
miR171	2:2	4:4	1:1	9:10 (5)	3:6 (3)	
miR159	-	1:1	3:3	6:6 (1)	3:4 (1)	TEOSINTE, CYCLOIDEA, PCF (TCP)
miR319	5:4 (1)	1:1	1:1	2:3 (1)	3:2	
miR408	2:2	1:1	1:1	1:2 (1)	1:2 (1)	Plastocyanin-like

Angegeben ist die Anzahl der MIR-Gene zur Anzahl der möglichen reifen miRNA-Varianten. In Klammern: die Anzahl der MIR-Gene, für welche der reife miRNA Stang nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Ppt: *Physcomitrella patens*; Smo: *Selaginella moellendorffii*; Pta: *Pinus tadea*; Osa: *Oryza sativa*; Ath: *Arabidopsis thaliana*

1.2.4 Bekannte Funktionen von konservierten miRNA-Familien

Die konservierte miR156 reguliert in *A. thaliana* die Expression von zehn Transkriptionsfaktoren der SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Familie, die an altersabhängigen Entwicklungsprozessen beteiligt sind (Wu *et al.* 2009). Mit zunehmendem Alter der Pflanze nimmt die Expression der miR156 ab und ermöglicht so eine stärkere Expression der Zielgene, die z.B. den Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum einleiten oder die Blütezeit bestimmen (Wang *et al.* 2009; Wu, Park *et al.* 2009; Wang 2014). In *P. patens* fördert die miR156 die Bildung von Gametophoren und somit den Übergang vom filamentösen Wachstum als Protonema im frühen Entwicklungsstadium hin zum dreidimensionalen Wachstum, das mit der Bildung von Gametophoren im späten Entwicklungsstadium einhergeht (Cho *et al.* 2012). Die miR165/miR166 steuert in *A. thaliana* die räumliche Expression mehrerer Mitglieder der Klasse III Homeodomain-Leucine Zipper (HD-Zip) Genfamilie. Diese sind an der Bildung und Aufrechterhaltung der apikalen Spross- und Wurzelmeristeme beteiligt (Williams *et al.* 2005; Miyashima *et al.* 2013). Funktionelle Analysen der miR166 und ihrer Zielgene in *P. patens* wurden jedoch noch nicht durchgeführt und es ist unbekannt, ob sie hier die gleichen Funktionen erfüllen. Eine weitere in *A. thaliana* gut untersuchte miRNA stellt die miR319 dar. Die ath-miR319 reguliert die Expression von TEOSINTE, CYCLOIDEA, PCF (TCP) Transkriptionsfaktoren, die z.B. an der Blütenentwicklung beteiligt sind (Nag *et al.* 2009). Die Rolle der miR319 in *P. patens* wurde allerdings noch nicht eingehend untersucht. Die konservierte miR408 reguliert die Expression von Kupfer bindenden Proteinen, die mögli-

cherweise an der Licht- und Kupferregulation beteiligt sind (Zhang *et al.* 2014). Auch für diese miRNA liegen noch keine experimentellen Daten aus *P. patens* vor. Die Funktion der miR171 und deren Zielgene in *A. thaliana* und *P. patens* ist Gegenstand dieser Arbeit und wird im Folgenden näher behandelt.

1.3 Die konservierte miR171-Familie

Die miR171 wurde in *A. thaliana* bereits 2002 nachgewiesen und ihre Funktionalität experimentell überprüft (Llave, Xie *et al.* 2002; Reinhart, Weinstein *et al.* 2002). Inzwischen sind insgesamt 237 MIR171-Gene in 42 Pflanzenarten nachgewiesen bzw. vorhergesagt und in der miRNA-Datenbank miRBase (www.mirbase.org, Version 21) aufgenommen. Ein Sequenzalignment der miR171-pre-miRNAs von verschiedenen Arten, die repräsentativ für evolutionär verschiedene Entwicklungsstufen der Landpflanzen ausgewählt wurden, ist in Abbildung 5 gezeigt. Die miR-Region, aus der die reife miRNA prozessiert wird, weist einen höheren Grad an Konservierung auf als die restliche Haarnadelstruktur. Letztere unterliegt nur einem Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung der RNA-Sekundärstruktur, die für eine korrekte pre-miRNA-Prozessierung durch DCL1 benötigt wird (Song *et al.* 2010). Die miR-Region hingegen unterliegt zusätzlich einem Selektionsdruck für eine korrekte Basenpaarung mit den Zieltranskripten. Der sich stets am 5'-Ende befindende Uridinrest der zwei häufigsten Varianten der reifen miR171 weist auf eine Beladung dieser Varianten in AGO1 hin (Mi, Cai *et al.* 2008).

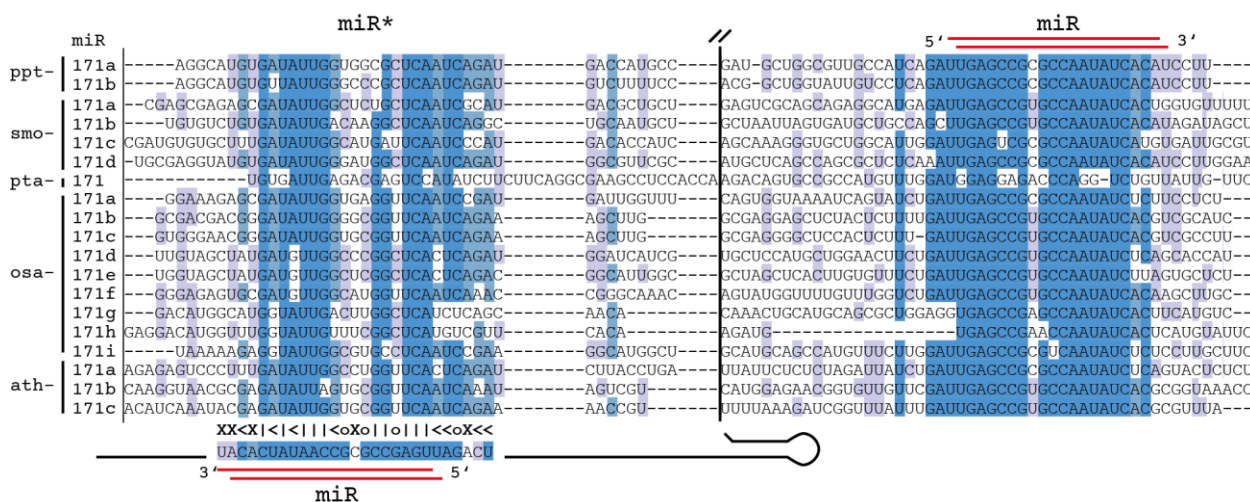


Abbildung 5: Sequenz-Alignment der miR171-pre-miRNAs aus fünf Arten repräsentativ für verschiedene Entwicklungsstufen der Landpflanzenevolution

Die Sequenzbereiche der Schleifen wurden größtenteils ausgeblendet (horizontaler Strich in der Mitte), so dass nur die miR*- und miR-Regionen der pre-miRNAs dargestellt sind. Die zwei häufigsten Varianten der reifen miR171 sind durch rote Linien gekennzeichnet. Zusätzlich ist die miR-Region der ppt-miR171a invers zur miR171*-Region im Alignment dargestellt. Die Sequenzen sind nach dem Anteil der Übereinstimmung in drei Stufen eingefärbt. Die pre-miR171 von *P. taeda* basiert auf einer *in silico* Vorhersage. ppt: *Physcomitrella patens*; smo: *Selaginella moellendorffii*; pta: *Pinus taeda*; osa: *Oryza sativa*; ath: *Arabidopsis thaliana*. Anzahl der Fehlpaarungen X: >6, <: ≤6, o: ≤2, |, o.

Der Grad der Konservierung nimmt im Bereich der miR-Region in den letzten drei 3'-terminalen Positionen ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, dass Fehlpaarungen am 3'-Ende der miRNA zum Zieltranskript kaum Auswirkungen auf die miRNA-Funktion besitzen (Liu, Wang *et al.* 2014). Auffällig ist eine variable Base an der Position 8 bzw. 9 der beiden häufigsten miR171-Varianten, die merheitlich auf einen Wechsel von Uracil zu Cytosin beruht, wobei Uracil eine *Wobble*-Paarung mit Guanin eingehen kann.

1.4 Konservierte miR171-Zielgene

Nicht nur die miR171-Familie selbst ist konserviert, sondern auch deren Zielgene. Alle miR171-Zielgene codieren für Proteine, die der evolutionär konservierten GRAS-Proteinfamilie angehören (Abbildung 6). Die GRAS-Proteinfamilie ist nach den ersten beschriebenen Mitgliedern GIBBERELLIN-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF *ga*1–3 (RGA) und SCARECROW (SCR) benannt (Pysh *et al.* 1999). Alle Mitglieder dieser Genfamilie besitzen ein charakteristisches Sequenzmuster am C-terminalen Ende. Dieses besteht aus fünf einzelnen Sequenzmotiven, die nach ihren am stärksten konservierten Aminosäuren benannt sind. Diese sind ein VHDII-Motiv, das von zwei Leucin Hepta-Repeats umfasst wird und nachfolgend ein PFYRE-Motiv sowie ein SAW-Motiv (Pysh, Wysocka-Diller *et al.* 1999). Nur wenige der GRAS-Gene sind miR171-Zielgene, die ihre miR171-Bindestelle stets zu Beginn des C-terminalen Teils besitzen, der auch für die GRAS-Domäne codiert. Die GRAS-Proteine ähneln in ihrem C-terminalen Aufbau der in Metazoa konservierten Proteinfamilie der *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) (Richards *et al.* 2000). In *A. thaliana* wurde für viele GRAS-Proteine die zelluläre Lokalisation mittels *green fluorescent protein*-Fusion (GFP-Fusion) aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass die GRAS-Proteine im Zellkern lokalisiert sind (Lee *et al.* 2008; Gallagher *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010). Daher wird angenommen, dass die GRAS-Proteine als Transkriptionsfaktoren fungieren können.

Der N-Terminus der GRAS-Proteine weist hingegen kaum konservierte Bereiche auf und ist sehr variabel zwischen den Mitgliedern der GRAS-Proteinfamilie. Bioinformatische Analysen der GRAS-Proteinsequenzen ergaben, dass die N-terminalen Bereiche der GRAS-Proteine flexible und ungeordnete Sekundärstrukturen enthalten (Sun *et al.* 2011). Diese Bereiche werden auch als *intrinsic unfolded domains* bezeichnet. Weiterhin befinden sich im N-Terminalen Bereich kurze Sequenzmotive, die vermutlich α -helikale Sekundärstrukturen ausbilden, die eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln können (Sun, Xue *et al.* 2011). In *A. thaliana* werden die GRAS-Proteine auch als SCARECROW-LIKE-Proteine bezeichnet.

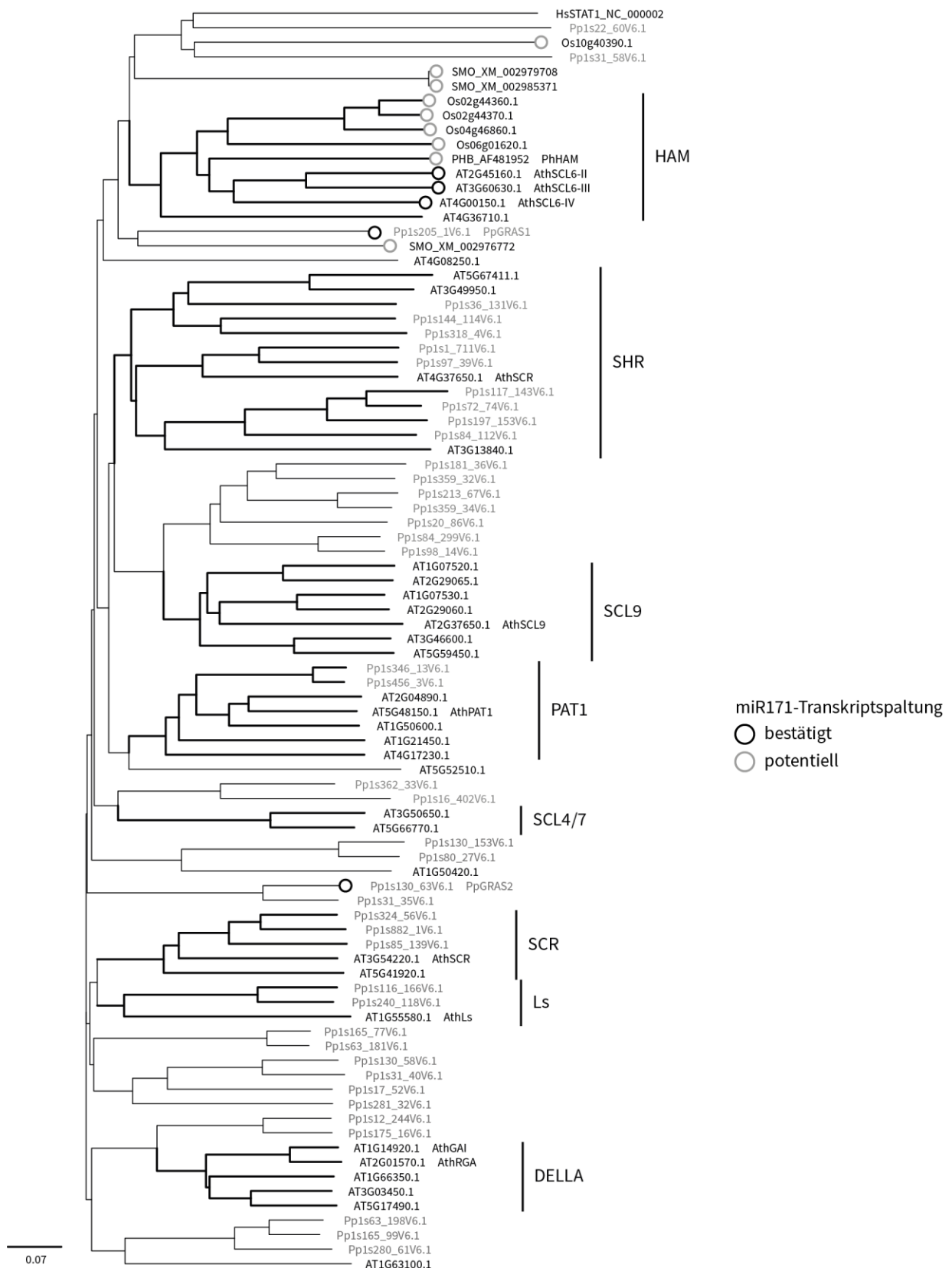


Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der GRAS-Proteinfamilie

Neighbour-joining tree anhand der N-terminalen GRAS-Motive der GRAS-Proteine von *P. patens* (Grau) und *A. thaliana* zusammen mit potenziell miR171-regulierten Mitgliedern aus *O. sativa* (Os) und *S. moellendorffii* (SMO) sowie von *P. hybrida* (PHB) HARIY MERISTEM (HAM) und *Homo sapiens* STAT1. Untergruppen Bolle (2004)

1.5 miR171 und deren Zielgene in *A. thaliana* und *P. patens*

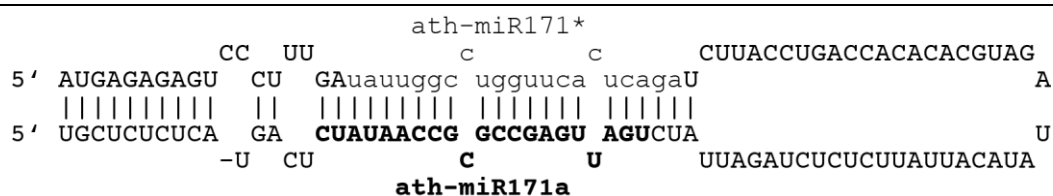
1.5.1 MIR171-Gene in *A. thaliana* und *P. patens*

Die *MIR171*-Genloci in *A. thaliana* und *P. patens* befinden sich jeweils in intergenischen Regionen der Chromosomen. In *A. thaliana* wird die miR171 von drei *MIR*-Genen codiert: *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c* (AT3G51375, AT1G11735 und AT1G62035) (Reinhart, Weinstein *et al.* 2002; Sunkar *et al.* 2004). Die reifen miRNAs, die von *AthMIR171b* und *AthMIR171c* codiert werden, stimmen in ihrer Sequenz überein und sind um 3 Nukleotide versetzt zur ath-miR171a, die von *AthMIR171a* codiert wird (Tabelle 2). Die ath-miR171a besitzt an Position 12 ein Cytosin anstelle eines Uracils. Die *AthMIR171a* codiert darüber hinaus für eine zweite, biologisch aktive miRNA, die ath-miR171a*, die aus dem Gegenstrang der ath-miR171a gebildet wird und ein SU(VAR)3-9 HOMOLOG 8 (*SUVH8*), eine putative Histon-Methyltransferase mit unbekannter Funktion, als Zielgen besitzt (Manavella *et al.* 2013).

Tabelle 2: Sequenzalignment der reifen ath-miR171- und ppt-miR171-Varianten sowie der ath-miR171a*

miRNA	Sequenz
ppt-miR171a	5' UGAGCCGCGCCAAUAUCACAU 3'
ppt-miR171b	5' UUGAGCCGCGCCAAUAUCACA 3'
ath-miR171a	5' UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC 3'
ath-miR171b/c	5' UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG 3'
ath-miR171a*	5' UAUUGGCCUGGUUCACUCAGA 3'

AthMIR171a-Haarnadelstruktur



Die konservierten Sequenzbereiche der reifen miRNAs sind grau hinterlegt. Aus *AthMIR171a* wird ath-miR171a und ath-miR171a* und aus *AthMIR171b* bzw. *AthMIR171c* werden ath-miR171b/c als Hauptvarianten prozessiert. Aus *PpMIR171a* und *PpMIR171b* werden die Varianten ppt-miR171a und ppt-miR171b im Mengenverhältnis 1,8:1 prozessiert (miRBase Version 21). In der Haarnadestruktur der *AthMIR171a* sind die Bereiche, aus denen die ath-miR171a (in Fett) und ath-miR171a* (in Kleinbuchstaben) prozessiert werden, gekennzeichnet.

In *P. patens* hingegen wird die miR171 von zwei *MIR*-Genen codiert: *PpMIR171a* und *PpMIR171b* (Pp3c22_14084V1.1 und Pp3c18_8369V1.1) (Axtell, Snyder *et al.* 2007; Fattash *et al.* 2007). Von diesen beiden *MIR*-Genen können jeweils zwei ppt-miR171-Varianten gebildet werden (ppt-miR171a und ppt-miR171b). Anhand von RNA-Sequenzierungen, deren Ergebnisse in der öffentlichen miRNA-Datenbank miRBase zugänglich sind, lassen sich die Häufigkeit der verschiedenen miR171-Varianten relativ zueinander vergleichen und ihr Mengenverhältnis berechnen. So zeigte sich auch, dass die vorherrschende ppt-miR171a um ein Nukleotid versetzt zur selteneren ppt-miR171b ist (Tabelle 2).

Im Folgenden werden die drei reifen miRNAs ath-miR171a, ath-miR171b und ath-miR171c zusammengefasst als ath-miR171 bezeichnet und die beiden reifen miRNAs ppt-miR171a und ppt-miR171b als ppt-miR171.

1.5.2 miR171-Zielgene in *A. thaliana* und *P. patens*

Untersuchungen mittels Northern Blots und 5'-RACE-PCRs zeigten, dass beide ath-miR171-Varianten (ath-miR171a und ath-miR171b/c) die Spaltung von drei Zieltranskripten vermitteln können, die für drei SCARECROW-LIKE/GRAS-Proteine codieren (Llave, Xie *et al.* 2002; Wang, Mai *et al.* 2010). Diese Proteine sind AthSCL6-II (AT2G45160.1 *alias* SCL27/LOM1/HAM1), AthSCL6-III (AT3G60630.1 *alias* SCL22/LOM2/HAM2) und AthSCL6-IV (AT4G00150.1 *alias* SCL6/LOM3/HAM3). Alle drei gehören zu der HAM-Untergruppe der GRAS-Proteine, die nach dem GRAS-Protein HAIRY MERISTEM (HAM) aus *Petunia hybrida* benannt ist (Abbildung 6). Die ath-miR171a bindet vollständig komplementär an alle drei Zieltranskripte (Tabelle 3). Die ath-miR171b/c hingegen bindet um drei Nukleotide versetzt an die Zieltranskripte und mit zwei Fehlpaarungen im 3'-Bereich. Die ath-miR171a* vermittelt die Spaltung eines Transkriptes, das für ein SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 (AthSUVH8) codiert und bindet mit zwei Fehlpaarungen im 5'-Bereich und drei im 3'-Bereich an *AthSUVH8* (Manavella, Koenig *et al.* 2013).

Tabelle 3: Sequenzalignment der ath-miR171 und ath-miR171* sowie der ppt-miR171a und ppt-miR171b an den Bindestellen der Zieltranskripte

miRNA / Transkript	Sequenz	
ath-miR171a	3'	CUAUAACCGCGCCGAGUUAGU 5'
<i>AthSCL6-II</i> mRNA	5'	AGGGAUAUUGGCGGGCUCAAUCA 3'
<i>AthSCL6-III</i> mRNA	5'	AGGGAUAUUGGCGGGCUCAAUCA 3'
<i>AthSCL6-IV</i> mRNA	5'	GGGGAUAUUGGCGGGCUCAAUCA 3'
		X X :
ath-miR171b/c	3'	GCACUAUAACCGUGCCGAGUU 5'
<i>AthSUVH8</i> mRNA	5'	GCUGAGGAAACCAGGCCAACC 3'
		X XX XX
Ath-miR171a*	3'	AGACUCACUUGGUCCGGUUAU 5'
<i>PpGRAS1</i> mRNA	5'	AAGCGAUAUUGGCGGGCUCAA 3'
		X X
ppt-miR171a	3'	UACACUAUAACCGCGCCGAGU 5'
ppt-miR171b	3'	ACACUAUAACCGCGCCGAGUU 5'
		: : X
<i>PpGRAS2</i> mRNA	5'	AUGUGGUGUUGACGCGGGCUCAA 3'

Der konservierte Sequenzbereich in den miR171-Bindestellen ist jeweils Grau hinterlegt. X: Fehlpaarung; |: Basenpaarung; :: G-U-Basenpaarung

Anhand von 5'-RACE-PCRs und Untersuchungen des RNA-Degradoms konnte gezeigt werden, dass beide ppt-miR171-Varianten (ppt-miR171a und ppt-miR171b) die Spaltung von zwei Zieltranskripten vermitteln können, die ebenfalls für GRAS-Proteine codieren (Axtell, Snyder *et al.* 2007; Addo-Quaye *et al.* 2009). Diese ppt-miR171-Zielgene sind Pp1s205_1V6.1 und Pp1s130_63V6.1, die im folgenden *PpGRAS1* und *PpGRAS2* genannt werden. Das nächste Homolog zu *PpGRAS2* ist Pp1s31_35V6.1, dessen Transkript einen Bereich mit Homologie zu ppt-miR171 besitzt. Anhand der oben erwähnten Untersuchungen des RNA-Degradoms wurde Pp1s31_35V6.1 nicht als miRNA-Zielgen identifiziert. Interessanterweise besitzt der zur ppt-miR171 homologe Bereich in Pp1s31_35V6.1 fünf Fehlpaarungen zur ppt-miR171, von denen sich zwei an zentraler Position befinden (Position 9 und 10 relativ zur ppt-miR171a bzw. 10 und 11 relativ zu ppt-miR171b). Untersuchungen zeigten, dass eine Fehlpaarung in einer ath-miR171-Bindestelle eines GFP-Reporterkonstruktes in den Positionen 10 oder 11 relativ zur ath-miR171a die Spaltung des Reporterkonstruktes *in vivo* verhindert (Parizotto *et al.* 2004). Daher wird Pp1s31_35V6.1 nicht als ppt-miR171 Zielgen angesehen. Die ppt-miR171a und ppt-miR171b binden mit zwei Fehlpaarungen im 3'-Bereich an *PpGRAS1* und mit einer Fehlpaarung an Position zehn bzw. elf an *PpGRAS2*. *PpGRAS1* lässt sich anhand der C-terminalen Aminosäuresequenz nicht eindeutig der HAM-Untergruppe zuordnen, während *PpGRAS2* sich ebenso keiner einzelnen Untergruppe zuordnen lässt.

1.5.3 Expressionsdomänen der *AthMIR171*-Gene und der Zielgene *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* in *A. thaliana*

AthMIR171-Expressionsdomänen

Alle drei *AthMIR171*-Gene, *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c*, werden transkribiert (Xie, Allen *et al.* 2005) und reife ath-miR171 wurde anhand von RNA-Blots in Blättern und im Blütenstand nachgewiesen (Llave, Xie *et al.* 2002). Durch die Analyse von transgenen *A. thaliana*-Linien, die ein *GUS*-Reporter gen unter der Kontrolle der *AthMIR171*-Promotoren exprimieren, wurden die Expressionsdomänen der *AthMIR171*-Gene untersucht (Wang, Mai *et al.* 2010; Manavella, Koenig *et al.* 2013). Die Expressionsdomänen von *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c* stimmen in einigen Bereichen überein. Sie sind am stärksten exprimiert in den Kotyledonen und jungen Blättern sowie in den Frucht- und den Staubblättern. In der Epidermis der Blätter ist *AthMIR171a* vornehmlich in den Stomata exprimiert sowie schwach im Parenchym. Im Gegensatz dazu weisen *AthMIR171b* und *AthMIR171c* zusätzlich eine Expression in den Blattadern auf. Darüber hinaus werden alle drei *AthMIR171*-Gene in den Wurzelspitzen der Haupt- und Nebenwurzeln exprimiert. Die *AthMIR171a*-Expression wurde zudem in transgenen *A. thaliana*-Linien untersucht, die ein GFP-Reporter gen unter der Kontrolle des *AthMIR171a*-Promoters exprimierten (Parizotto, Dunoyer *et al.* 2004). Dabei konnte eine schwache *AthMIR171a*-Expression in der Epidermis der Blätter und des Stängels, sowie eine stärkere in den Geleitzellen der Stomata und eine schwache im Mesophyll nachgewiesen werden. Weiterhin wurde das GFP-Reporter gen in den Blüten-

ständen am stärksten im Fruchtknoten, nicht aber in der Narbe, dem Griffel oder dem Replum exprimiert. Eine Expression des GFP-Reportergens in den Wurzeln konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

ath-miR171-Aktivitätsdomäne

Die Aktivität der ath-miR171 wurde *in vivo* zuerst mit Hilfe von ubiquitär exprimierten GFP-Reporterkonstrukten untersucht, die eine ath-miR171-Bindestelle aus *AthSCL6-IV* fusioniert an den offenen Leserahmen des GFP-Gens enthalten (Parizotto, Dunoyer *et al.* 2004). Als Kontrolle diente dabei ein ubiquitär exprimiertes GFP ohne miR171-Bindestelle. In Pflanzen, die das ath-miR171-sensitive GFP-Reporterkonstrukt exprimierten, wurde kein GFP-Signal in der Epidermis und den Stomata nachgewiesen und nur ein schwaches im Parenchym. In den Blütenständen wurde kein GFP-Signal im Fruchtknoten nachgewiesen, jedoch in der Narbe, dem Griffel sowie dem Replum. Die GFP-Kontrolle hingegen wies ein gleichmäßiges GFP-Signal in allen Geweben auf.

In einem alternativen Ansatz wurde die Aktivität der ath-miR171 *in vivo* anhand von transgenen *A. thaliana*-Linien untersucht, die zwei verschiedene GUS-Reporterkonstrukte unter der Kontrolle des *AthMIR171a*-Promoters exprimieren (Manavella, Koenig *et al.* 2013). Eines dieser GUS-Reporterkonstrukte enthielt eine ath-miR171a-Bindestelle, während das zweite GUS-Reporterkonstrukt keine besaß und als Referenz diente. Dieser Ansatz erlaubt den Nachweis der ath-miR171-Aktivität somit nur in der Expressionsdomäne von *AthMIR171a*. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die ath-miR171 in allen Geweben aktiv ist, in der auch die *AthMIR171a* exprimiert wird – mit Ausnahme des apikalen Sprossmeristems.

PpMIR171-Expressionsdomänen

Durch die Untersuchung von RNA-Degradomdaten und RNA-Sequenzierungen wurde gezeigt, dass beide *PpMIR171*-Gene, *PpMIR171a* und *PpMIR171b* transkribiert werden (Axtell *et al.* 2006; Addo-Quaye, Snyder *et al.* 2009). Die reife ppt-miR171 wurde überwiegend im Protonema, jedoch auch in Gametophoren nachgewiesen (Fattash, Voss *et al.* 2007). Die Expressionsdomänen von *PpMIR171a* und *PpMIR171b* wie auch die Aktivitätsdomäne der ppt-miR171 konnten bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden und sind Teil dieser Arbeit.

Die Expressionsdomänen von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV*

Die Expressionsdomänen von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* wurden anhand von transgenen *A. thaliana*-Linien untersucht, die Promoter-GUS-Reporterkonstrukte der *AthSCL6-II*-, *AthSCL6-III*- und *AthSCL6-IV*-Promotoren enthalten (Lee, Kim *et al.* 2008; Wang, Mai *et al.* 2010). Mit diesem experimentellen Ansatz kann jedoch lediglich die Transkription der Gene untersucht werden. Die Transkripte von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* werden nämlich durch die ath-miR171 noch posttranskriptionell reguliert, bevor die Proteine gebildet werden können. Die Analyse von transgenen Linien mit Pro-

moter-GUS-Reporterkonstrukten der *AthSCL6-II*- und *AthSCL6-III*-Promotoren ergab für beide Gene eine vergleichbare Transkriptionsdomäne. *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* zeigten eine starke Transkription in jungen Blättern, die zum Blattstiel hin abnimmt sowie im basalen Bereich des Hypokotyls, die zum Sprossmeristem hin abnimmt. Weiterhin zeigten beide Gene eine schwache Transkription im Sprossmeristem. In den Wurzeln zeigen *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* eine Transkription im gesamten ausdifferenzierten Leitbündel und in den Initialen der Endodermis und des Cortex. *AthSCL6-IV* weist zusätzlich eine Transkription in jungen Blättern und den Kotyledonen auf, welche sich aber gleichmäßig bis in das gesamte Hypokotyl fortsetzt. Im Hypokotyl zeigt *AthSCL6-IV* eine verstärkte Transkription im Leitgewebe, die sich in der Wurzel ebenfalls im gesamten ausdifferenzierten Leitbündel fortsetzt. Alle drei *AthSCL6*-Gene wiesen im Blütenstand eine Transkription im Griffel und den Staubfäden auf.

Weiterhin wurden die Expressionsdomänen von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* in Meristemen von *A. thaliana* durch RNA-*in-situ*-Hybridisierungen von Dünnschnitten mit *AthSCL6-II*-, *AthSCL6-III*- und *AthSCL6-IV*-Antisensesonden untersucht (Schulze *et al.* 2010). Da die Antisensesonden im 5'-Bereich der Transkripte und vor der *ath-miR171*-Bindestelle binden, können auch ungespaltene Transkripte mit voller Länge nachgewiesen werden. Dieser Ansatz ermöglicht es, die Expressionsdomänen von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* auch nach der posttranskriptionellen Regulation durch die *ath-miR171* nachzuweisen. *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* wiesen dabei ein nahezu identisches Expressionsmuster auf, jedoch ist *AthSCL6-III* stets am schwächsten exprimiert. Beide werden im Apikalmeristem von der L2-Schicht bis zum Markmeristem exprimiert, die stärkste Expression findet sich jedoch lateral im äußeren Bereich, dem Flankenmeristem. *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* werden auch in Seitenmeristemen der Blattachsen und im Blütenmeristem exprimiert. Darüber hinaus werden beide Gene im Leitgewebe junger Blatt- und Blütenanlagen sowie im sich bildenden Leitgewebe des Sprosses exprimiert. *AthSCL6-IV* hingegen weist ein anderes Expressionsmuster auf und ist im Grenzbereich zwischen dem apikalen Sprossmeristem und den Blattanlagen exprimiert sowie im Grenzbereich zwischen Blütenmeristemen und Blütenanlagen.

Ein anderer Ansatz, die Expressionsdomäne von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* zu untersuchen, ist die Expression von *AthSCL6-II*-, *AthSCL6-III*- und *AthSCL6-IV*-Fusionsproteinen. Hierbei wird die CDS eines fluoreszierenden Reporterproteins mit den offenen Leserahmen der *ath-miR171*-Zielgene fusioniert unter der Kontrolle der *AthSCL6-II*-, *AthSCL6-III*- und *AthSCL6-IV*-Promotoren exprimiert. Dies ermöglicht die Untersuchung der Translationsdomänen, d.h. die tatsächliche Genexpression des Proteins nach der posttranskriptionellen Regulation der *ath-miR171*. So konnte gezeigt werden, dass *AthSCL6-III* unterhalb der L1-Schicht im Zentrum des apikalen Sprossmeristems und im apikalen Wurzelmeristem im und oberhalb des ruhenden Zentrums exprimiert wird (Zhou *et al.* 2014).

Die subzelluläre Lokalisation von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* wurde anhand von Fusionsproteinen mit GFP untersucht. Alle drei Proteine zeigten in Wurzelzellen eine Kernlokalisation und es konnten potenzielle Kernlokalisationssequenzen in den Aminosäuresequenzen der Proteine identifiziert

werden (Lee, Kim *et al.* 2008; Wang, Mai *et al.* 2010). Zudem wurde mittels *Yeast-one-hybrid*-Untersuchungen in Hefe gezeigt, dass AthSCL6-II, AthSCL6-III und AthSCL6-IV fusioniert mit einer LexA-DNA-Bindedomäne die Transkription eines Reportergens aktivieren können, das unter der Kontrolle des LexA-Operators steht (Wang, Mai *et al.* 2010).

1.5.4 Bekannte Funktionen der ath-miR171-Zielgene

Die Funktion von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* in Sprossmeristemen

P. hybrida ham-Nullmutanten können nach der Bildung einiger Blätter keine neuen Organe bilden (Stuurman *et al.* 2002). Dabei stoppt das Wachstum des apikalen Sprossmeristems, das anschließend ausdifferenziert und Trichome bildet. *PhHAM* enthält ebenso wie *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* eine miR171-Bindestelle, die nahezu vollständig komplementär zu der in *P. hybrida* exprimierten *pth-miR171* ist (Tedder *et al.* 2009; Bari *et al.* 2013). In *Athsc16-II* und *Athsc16-III* Doppel-Nullmutanten (*Athsc16-II/III*-Nullmutanten) und in *Athsc16-II*, *Athsc16-III* und *Athsc16-IV* Dreifach-Nullmutanten (*Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten) kommt es bei Kurztagbedingungen nach der Bildung von einigen Rosettenblättern zu einem Stillstand im Wachstum der apikalen Sprossmeristeme (Schulze, Schafer *et al.* 2010). Zudem nimmt die Anzahl der Seitenzweige bei Kurztagbedingungen von *Athsc16-II*- über *Athsc16-II/III*- zu *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten zunehmend ab (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010). Die Bildung von Seitenzweigen ist gestört, da die achselständigen Meristeme ihr Wachstum eingestellt haben und eine ausdifferenzierte Epidermis mit Stomata aufweisen (Engstrom *et al.* 2011). Auch unter Langtagbedingungen bilden sowohl die *Athsc16-II/III*-Nullmutanten als auch die *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten kaum achselständige Seitenknospen (Schulze, Schafer *et al.* 2010).

Weiterhin bildeten einige der achselständigen Knospen der *Athsc16-II/III*-Nullmutanten und *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten unter Langtagbedingungen und der *Athsc16-II/IV*-Nullmutanten unter Kurztagbedingungen ektopische Organe aus. Diese können blattähnliche Strukturen im basalen Bereich des Sprosses sein oder ein ein blattloser Spross mit apikal ausdifferenzierter Epidermis sowie Seitenzweige mit Blütenständen erst an den oberen Knoten.

Eine Überexpression von *AthMIR171a* oder *AthMIR171c* unter der Kontrolle des konstitutiv und ektopisch aktiven *CaMV35S*-Promoters bewirkte eine verstärkte Spaltung der *AthSCL6-II*-, *AthSCL6-III*- und *AthSCL6-IV*-Transkripte und führte zu einem Phänotyp, der dem von *Athsc16-II/III/IV*-Mutanten ähnelte (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010). Sowohl die *AthMIR171a*- als auch die *AthMIR171c*-Überexpressionslinien bildeten bei Langtagbedingungen keine achselständigen Knospen. Weitere Untersuchungen der *AthMIR171a*-Überexpressionslinien unter Kurztagbedingungen zeigten einen vorzeitigen Stopp der Sprossentwicklung (Schulze, Schafer *et al.* 2010).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass AthSCL6-II, AthSCL6-III und AthSCL6-IV vermutlich über ihre N-terminalen Domänen mit dem Stammzellregulator WUSCHEL (WUS) im apikalem Sprossmeristem interagieren können (Zhou *et al.* 2015). WUS reguliert zusammen mit *CLAVATA3* (*CLV3*) in einer Signal-

rückkopplungsschleife die Größe des apikalen Sprossmeristems und die Anzahl der darin befindlichen Stammzellen (Aichinger *et al.* 2012). *WUS* wird in der zentralen Zone unterhalb der Stammzellen exprimiert und aktiviert von dort aus die Expression von *CLV3* in den darüber liegenden Stammzellen. Das dabei entstehende Signalpeptid *CLV3* reprimiert wiederum die Expression von *WUS*. Die Interaktion von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* oder *AthSCL6-IV* mit *WUS* ermöglicht es mehrere *WUS*-nachgeschaltete Gene zu steuern. So wird die Transkription von *TOPLESS (TPL)*, *GLUTAMINE-RICH PROTEIN 23 (GRP23)* und *TCP DOMAIN PROTEIN 9 (TCP9)* durch die Interaktion von *WUS* mit *AthSCL6-III* aktiviert und die von *TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2;2 (TIP2;2)* reprimiert (Zhou, Liu *et al.* 2015). Zudem wurde gezeigt, dass *JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)* ebenfalls durch die Interaktion von *WUS* mit *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* oder *AthSCL6-IV* reprimiert werden kann. Ein umfassendes Bild, welche Rollen die *ath-miR171*-Zielgene in der Meristemregulation durch die Interaktionen mit *WUS* spielen, konnte noch nicht gewonnen werden.

Die Funktion von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* in der Entwicklung von Blättern und Epidermis

Die Phyllotaxis der *AthscL6-II/III/IV*-Nullmutanten ist verändert und teilweise werden gegenständige Blätter gebildet oder es entspringen drei Blätter an einem Knoten (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010; Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Die Rosettenblätter und Stängelblätter dieser Mutanten wurden in ihrer Struktur genauer untersucht (Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Dabei zeigten die Rosettenblätter ein geringeres Blattspreitenwachstum und mehr Einkerbungen sowie vergrößerte Epidermiszellen. Die Stängelblätter hingegen wiesen eine stärkere Blattkrümmung auf, welche auf eine verstärkte Zellteilungsrate in der Blattoberseite zurückgeführt wurde. Darüber hinaus bildeten *AthscL6-II/III/IV*-Nullmutanten weniger Trichome an der Sprossachse aus als der Wildtyp (Wt), während die Überexpression von *ath-miR171*-resistenten *AthSCL6-IV*, vor allem aber von *AthSCL6-II* oder *AthSCL6-III* die Anzahl an Trichomen erhöht (Xue *et al.* 2014). Neben einer veränderten Morphologie wurde in *AthscL6-II/III/IV*-Nullmutanten und *AthMIR171c*-Überexpressionslinien ein höherer Gehalt an Chlorophyll a und Chlorophyll b im Vergleich zum Wt nachgewiesen (Wang, Mai *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu wiesen *ath-miR171*-resistente *AthSCL6-II*-Überexpressionslinien gelbe Blätter mit einem geringeren Chlorophyllgehalt auf (Ma *et al.* 2014). Der veränderte Chlorophyllgehalt in diesen Mutanten wird von einer Repression der Chlorophyllbiosynthese durch *AthSCL6-II* verursacht (Ma, Hu *et al.* 2014). Es konnte gezeigt werden, dass *AthSCL6-II* als direkter Repressor der Transkription eines Gens agiert, das für ein Schlüsselenzym der Chlorophyllbiosynthese codiert: die Protochlorophyllid-Reduktase *AthPORC* (Ma, Hu *et al.* 2014).

In transgenen *A. thaliana*-Linien, die für die *ath-miR171* nicht spaltbare Mimikryzieltranskripte exprimieren (*MIM171*-Linien), wird die reife *ath-miR171* abgefangen und die Spaltung der endogenen Zieltranskripte reduziert (Todesco *et al.* 2010). Die Reduzierung der *ath-miR171a*-Aktivität durch die Expres-

sion eines ath-miR171a-Mimikryzieltranskripts bewirkte die Ausbildung von Blättern mit runden Blattspreiten und einer blassgrünen Farbe. Die Expression von ath-miR171b- bzw. von ath-miR171c-Mimikryzieltranskripten verursachte dagegen keine Veränderungen.

Die Funktion von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* in der Blütenbildung

Es konnte gezeigt werden, dass *Athsc6-II/III/IV*-Nullmutanten unter Langtagbedingungen früher blühen als der Wt und weniger Blüten bilden (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Xue, Zhao *et al.* 2014). Überexpressionslinien, die eine ath-miR171-resistente Version von *AthSCL6-II* exprimieren, blühen hingegen später als der Wt. Zudem entwickeln *Athsc6-II/III/IV*-Nullmutanten von der ersten Blüte an zunehmend mehr defekte Blüten (Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Die ersten Blüten bilden dabei zum Teil mehr oder auch weniger als 4 Kronblätter. Die daraufhin entstandenen Blüten bilden keine Seitenorgane aus und schließlich stellen die Blütenmeristeme und später auch das Infloreszenzmeristem die Entwicklung vollständig ein (Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Transgene *A. thaliana*-Linien, die ein ath-miR171a-Mimikryzieltranskript exprimierten, zeigten ebenfalls Blütendefekte (Todesco, Rubio-Somoza *et al.* 2010). Dies zeigte sich dadurch, dass die Kelchblätter sich nicht richtig trennen um die Blüte zu öffnen. Auch hier wirkte sich die Expression von ath-miR171b- bzw. von ath-miR171c-Mimikryzieltranskripten nicht auf die Blütenentwicklung aus.

Die Funktion von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* in der Wurzel

Nicht nur die Meristeme des oberirdischen Teils von *AthMIR171c*-Überexpressionslinien und *Athsc6-II/III/IV*-Nullmutanten sind im Vergleich zum Wt verändert, sondern auch die Wurzelmeristeme (Wang, Mai *et al.* 2010; Engstrom, Andersen *et al.* 2011). In beiden Fällen ist die primäre Wurzel von jungen Keimlingen im Vergleich zum Wt stark verkürzt und weist bei gleichem radialem Aufbau ein insgesamt verkürztes und kleineres Wurzelmeristem auf. Ältere Wurzelmeristeme von *Athsc6-II/III/IV*-Nullmutanten differenzieren teilweise aus und stellen somit das Wachstum ein (Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Des Weiteren bilden die *Athsc6-II/III/IV*-Nullmutanten verzweigte Wurzelhaare, wie sie im Wt nicht vorkommen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der ppt-miR171-Regulationsweg ist für *P. patens* noch weitgehend unaufgeklärt. Daher sollen im Folgenden zunächst die Expressionsdomänen der beiden *MIR171*-Gene in *P. patens*, *PpMIR171a* und *PpMIR171b*, sowie die Expressionsdomänen deren Zielgene *PpGRAS1* und *PpGRAS2* untersucht werden. Danach sollen erste Erkenntnisse über die Funktion von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* und deren Regulation durch die ppt-miR171 gewonnen werden. Hierfür werden ppt-miR171-resistente *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Linien sowie ppt-miR171-Überexpressionslinien erzeugt, in denen die Transkriptmengen von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* dereguliert sind und diese anschließend auf eine veränderte Entwicklung hin

untersucht. Zudem sollen Knockout-Mutanten erzeugt und untersucht werden, in denen das *PpGRAS1*-Gen ausgeschaltet ist. Weiterhin soll die Funktion von *PpGRAS1* anhand Hormon-induzierbaren Überexpressionslinien untersucht werden. Hierfür werden zwei verschiedene Ansätze verwendet: zum einen die Überexpression eines ppt-miR171-resistentem *PpGRAS1* und zum anderen die Überexpression eines dominanten PpGRAS1-basierten Repressors. Letzterer entsteht aus einem ppt-miR171-resistentem *PpGRAS1* fusioniert mit der codierenden Sequenz einer Transkriptionsrepressordomäne. Anschließend sollen erste, potenziell *PpGRAS1*-nachgeschaltete Gene durch Transkriptomanalysen dieser Hormon-induzierbaren Linien identifiziert werden.

In *A. thaliana* ist der ath-miR171-Regulationsweg weitreichender aufgeklärt. Hier sollen potenziell *AthSCL6-III*-nachgeschaltete Gene durch Transkriptionsanalysen in einem ähnlichen Ansatz wie bei *P. patens* identifiziert werden. Für diese Transkriptomanalysen sollen Hormon-induzierbare und ath-miR171-resistente *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien erzeugt und analysiert werden.

Zuletzt sollen konservierte bzw. evolutionär neu entstandene Funktionen der miR171-vermittelte Genregulation in *P. patens* und *A. thaliana* aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden analysereine Chemikalien (p. a.) von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Enzyme von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und NEB (Ipswich, USA) verwendet. In Fällen, in denen der Typ der verwendeten Geräten oder die Art der benutzten Verbrauchsmaterialien für eine Wiederholung der Experimente von Bedeutung sind, wurden diese in den jeweiligen Abschnitten angegeben.

2.1 Zell- und Pflanzenkultur

2.1.1 Kultivierung von *A. thaliana*

Kultivierung von *A. thaliana*-Keimlingen

Zu Beginn wurden *A. thaliana*-Samen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durch 1 ml 70 %igem Ethanol und 0,05 % (v/v) Triton x-100 für 10 min sterilisiert. Anschließend wurde für 30 s bei 450 RZB zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Samen viermal mit 1 ml 100 % Ethanol gewaschen und in der Sterilbank getrocknet. Zur Aussaat wurden die sterilen Samen in autoklaviertem H₂O mit 0,1 % (w/v) Plant Agar (P1001; Duchefa, Haarlem, Niederlande) suspendiert und auf MS-Medium in quadratischen Petrischalen in einer Linie aufgetragen. Die Platten wurden anschließend für zwei Tage in Dunkelheit bei 4 °C zur Stratifikation gelagert. Danach wurden die Platten senkrecht aufgestellt (Linie der Samen waagrecht) und in einer Klimakammer bei 23 ± 1 °C (50 – 70 % relative Luftfeuchte) unter Langtagbedingungen von 16 h Beleuchtung mit 70 µmol/(s m²) (Luxline® Plus FHE 14W/T5/830; Sylvania, Denvers, USA) und 8 h Dunkelheit kultiviert.

Kultivierung von *A. thaliana*-Keimlingen zur RNA-Sequenzierung

Für jede Linie wurden 20 mg Samen wie oben angegeben sterilisiert und in 1,2 ml steriler 0,1 %iger Agaroselösung suspendiert. In drei Replikaten wurden pro Linie 250 µl suspendierter Samen in einer Linie auf vier quadratische Petrischalen mit MS-Medium aufgetragen. Die Samen des Wt und der Vektorkontrolle *CaMV35S::GVG* wurden pro Replikat auf jeweils fünf Petrischalen aufgetragen. Homozygote Samen der *PpMIR171a*-Überexpressionslinien *CaMV35S::AthMIR171a* #3w.p.2, #5w.p.4 und #6w.p.1 (freundlicherweise von N. V. Fedoroff zur Verfügung gestellt; Pennsylvania State University, USA) wurden jeweils auf eine Petrischale aufgetragen. Nach Stratifikation und zehn Tagen Kultivierung wurden die Keimlinge, wie in Abbildung 7 dargestellt, behandelt. Die Dexamethason-Induktion (DEX-Induktion) erfolgte durch Aufträufeln von 2 ml einer 10 µM DEX-Lösung (20 mM DEX-Stammlösung in Ethanol) mit 0,2 % (v/v) Silvet L-77 (Leu+Gygax AG, Birmenstorf, Schweiz). Die Lösungsmittelkontrollbehandlung erfolgte durch Aufträufeln von 2 ml einer 0,2 ‰ (v/v) Silvet L-77 Lösung mit 0,5 ‰ (v/v) Ethanol. Die Replikate wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen ausgesät und jeweils zeitgleich nach Abschluss der Behandlungen geerntet.

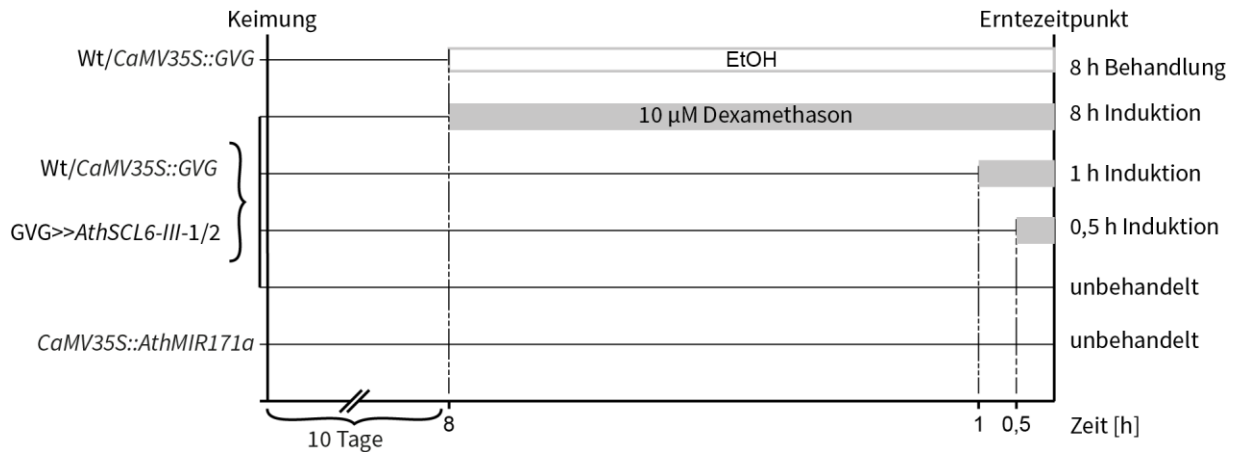


Abbildung 7: Übersicht der *A. thaliana*-Linien und deren Behandlung vor der RNA-Sequenzierung

Kultivierung von *A. thaliana*-Pflanzen bis zur Samenernte

Samen wurden auf Blumenerde (Mischungsverhältnis Typ P/Vermiculit 3:1 (v/v)) in Töpfen ausgesät, gewässert und mit Folie abgedeckt in Dunkelheit für zwei Tage bei 4 °C zur Stratifikation gelagert. Anschließend wurden die Töpfe zehn Tage mit transparenter Folie abgedeckt und danach ohne Folie bis zur Samenreife bei 21 ± 1 °C und Langtagbedingungen von 16 h Beleuchtung mit $70 \mu\text{mol}/(\text{s m}^2)$ (25W/T8/840; Sylvania, Denvers, USA) und 8 h Dunkelheit kultiviert.

2.1.2 Kultivierung von *P. patens*

Kultivierung von *P. patens* in Flüssigmedium

P. patens Wt und transgene Linien wurden standardmäßig in 80 ml KNOP-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit gasdurchlässigen Silikonstopfen axenisch verschlossen, in einer Klimakammer bei 23 ± 1 °C (50 – 70 % relative Luftfeuchte) und Langtagbedingungen von 16 h Beleuchtung mit $70 \mu\text{mol}/(\text{s m}^2)$ (Luxline® Plus FHE 14W/T5/830) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Die Kolben wurden während der Kultivierung auf einem Horizontalschüttler bei einer Drehzahl von 110 min^{-1} geschüttelt. Für kleinere Kulturmengen wurden 30 ml in 100 ml bzw. für größere Mengen 160 ml in 500 ml oder 400 ml in 1 L Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kulturen wurden im Intervall von 14 Tagen subkultiviert. Dazu wurde das Gewebe bei einer Drehzahl von 16000 min^{-1} für 1 min mit einem Dispergiergerät (Micra D-9, DS-20/PF EMR; ART Prozess- & Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) zerkleinert, ausgesiebt (100 μm Maschenweite) und in frisches KNOP-Medium überführt.

Kultivierung von *P. patens* auf Festmedium

Unter Standardkulturbedingungen wurden *P. patens* Wt und transgene Linien auf KNOP-Agarose in Petrischalen mit dehnbare Verschlussfolie (Parafilm M®; Bemis, Soignies, Belgien) versiegelt, axenisch unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen für Flüssigmedium kultiviert. Zur Untersuchung der

Entwicklung des Gametophyten wurden zuerst Flüssigkulturen der zu untersuchenden Linien angesetzt. Nach der dritten Subkultivierung wurde das Trockengewicht bestimmt. Dafür wurde von Flüssigkulturen mit homogen verteiltem Moosgewebe 10 ml entnommen und bis zur Trocknung auf Miracloth-Filtergewebe vakuumfiltriert. Das Moosgewebe wurde für 30 min bei 60 °C weiter getrocknet und das Gewicht bestimmt. Anschließend wurden die Gewebemengen der Flüssikkulturen auf 0,2 mg/ml Trockengewicht eingestellt. Es wurden für jede Linie fünf Tropfen (5 µl) aus den eingestellten und gründlich gemischten Kulturen auf je eine Petrischale mit KNOP-Agarose in gleichmäßigem Abstand zueinander aufgetropft. Alle zu vergleichenden Linien wurden gemeinsam in einer Petrischale in drei Replikaten kultiviert. Zur Hormoninduktion wurde KNOP-Festmedium mit 1 µM β-Estradiol versetzt verwendet.

Sporophyteninduktion bei *P. patens*

Jeweils zwölf Gametophoren der zu untersuchenden Linien wurden in separaten Petrischalen vier Wochen unter Standardkulturbedingungen auf KNOP-Festmedium mit 300 mg/l D-Glucose kultiviert. Die dabei gebildeten Kolonien wurden danach bis zur Bildung von Sporophyten bei konstanten 15 °C unter Kurztagbedingungen von 8 h Beleuchtung mit 20 µmol/(s m²) (Fluora L 18W/77; OSRAM GmbH, München, Deutschland) und 16 h Dunkelheit im Klimaschrank (KBW400; Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert. Nach drei Wochen Kultivierung wurden die Petrischalen mit 9 ml autoklaviertem Leitungswasser gewässert, um optimale Bedingungen zur Befruchtung herzustellen. Die Sporophyteninduktion erfolgte jeweils in zwei Replikaten.

Zellkultur im Vorfeld der RNA-Sequenzierung

Frische Kulturen wurden in 80 ml KNOP-Flüssigmedium durch Zerkleinern von Gametophoren, die zuvor auf Festmedium kultiviert wurden, angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Zuerst wurden diese nach sieben Tagen und anschließend für zwölf Tage alle vier Tage in 160 ml KNOP-Medium subkultiviert. Abschließend wurde die Gewebemenge der Kulturen auf 12,5 mg/ml (Trockengewicht) eingestellt und in drei Replikate zu je vier Kulturen mit 30 ml KNOP-Flüssigmedium aufgeteilt. Die Kulturen der Wt- und Vektorkontrolle *GX8::XVE* wurden pro Replikat auf jeweils fünf Kulturen mit 30 ml Flüssigmedium aufgeteilt. Die *PpMIR171b*-Überexpressionslinie wurde auf eine Kultur mit 30 ml Flüssigmedium pro Replikat aufgeteilt. Das 1. Replikat wurde nach drei Tagen Kultivierung, das 2. Replikat nach vier Tagen und das 3. Replikat nach fünf Tagen, wie in Abbildung 8 angegeben, behandelt. Die β-Estradiolinduktion der Flüssigkulturen erfolgte durch Zugabe von 30 µl einer 10 mM β-Estradiollösung (Art.Nr.: E2758; Sigma-Aldrich; gelöst in DMSO) mit einer Endkonzentration von 10 µM im KNOP-Medium. Die Lösungsmittel-Kontrollbehandlung erfolgte durch Zugabe von 30 µl DMSO. Alle Kulturen eines Replikates wurden zeitgleich geerntet.

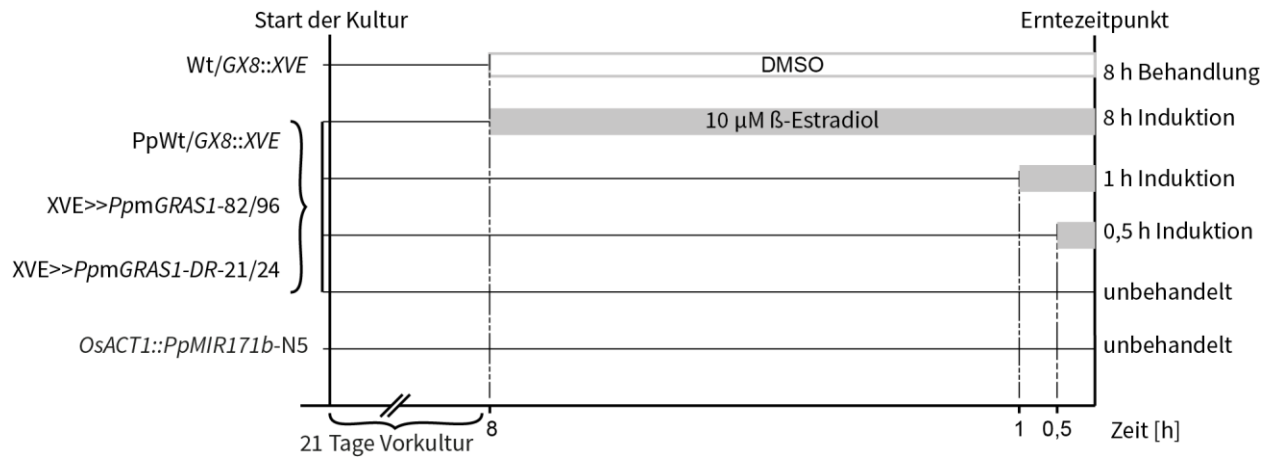


Abbildung 8: Übersicht der *P. patens* Probenbehandlung vor der RNA-Sequenzierung

2.2 Transformation

2.2.1 Transformation von Bakterien

Transformation chemisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Transformation von Plasmid-DNA in CaCl_2 -chemisch kompetente *A. tumefaciens* (Stamm: GV3101), wurde pro DNA-Konstrukt ein 50 μl Bakterien-Aliquot in gefrorenen Zustand auf Eis mit 1 μg zu transformierender Plasmid-DNA versetzt. Unmittelbar danach wurde der Transformationsansatz für 5 min bei 37 °C und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 2 – 4 h bei 28 °C im Horizontalschüttler (Drehzahl 225 min^{-1}) inkubiert. Zuletzt wurde ein 100 μl Aliquot der Bakterien zur Selektion positiv transformierter Zellen in einer Petrischale mit 50 mg/l Kanamycin versetztem LB-Festmedium ausplattiert und 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Antibiotikum-resistente Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das korrekte Konstrukt hin überprüft.

Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde pro DNA-Konstrukt ein 50 μl Aliquot CaCl_2 -kompetente *E. coli* (Stamm: DH5 α) auf Eis aufgetaut, 5 μl des Ligationsansatz hinzugefügt, vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 45 s bei 42 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt für 1 h im Horizontalschüttler (Drehzahl 225 min^{-1}) bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden 200 μl der transformierten Zellen in einer Petrischale mit LB-Festmedium ausplattiert und zur Selektion über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das LB-Festmedium wurde hierfür mit einem, dem Antibiotikumresistenzgen des Vektors entsprechenden Antibiotikum (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Antibiotikum-resistente Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das korrekte Konstrukt hin überprüft.

2.2.2 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* Wt-Pflanzen erfolgte nach Clough *et al.* (1998). Pro DNA-Konstrukt wurden drei Töpfe mit jeweils zehn *A. thaliana* Wt-Pflanzen (Ökotyp Columbia) im Alter von fünf bis acht Wochen mit noch ungeöffneten Blüten zur Agrobakterium-vermittelten Transformation verwendet. Pro DNA-Konstrukt wurden 600 ml transformierter Agrobakterienkultur mit einer OD_{600} von 2 für 10 min bei 4000 RZB zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 3 ml LB-Medium resuspendiert. Zur Bakteriensuspension wurde zunächst unter Rühren tropfenweise 30 ml Infiltrationsmedium hinzugegeben und anschließend langsam mit Infiltrationsmedium auf 200 ml aufgefüllt. Die Pflanzen wurden für 15 s in die vorbereitete Agrobakterienlösung getaucht und 24 h horizontal und mit Folie abgedeckt bei RT gelagert. Die transformierten Pflanzen wurden anschließend bis zur Samenernte weiterkultiviert.

2.2.3 Transformation von *P. patens*

Protoplastierung von Protonema zur Transfektion

Zu Beginn wurden 250 ml Flüssigkultur mit Wt-Protonema (Wt X) ausgesiebt (100 μ m Maschenweite) und in eine Petrischale überführt. Das Gewebe wurde mit 8 ml 0,5 M Mannitollösung und 4 ml Driselase-lösung versetzt. Die Petrischale wurde verschlossen und lichtgeschützt für 2 h auf einem Taumelschüttler bei einer Drehzahl von 15 min^{-1} bei RT inkubiert, um die Zellwände zu verdauen. Die Protoplastenlösung wurde zunächst mit 100 μ m Maschenweite und anschließend 50 μ m Maschenweite gesiebt, um Zellwandrückstände und unverdaute Zellen zu entfernen. Die gesiebte Protoplastenlösung wurde 10 min bei 45 RZB mit geringster Zentrifugenbeschleunigung und –verzögerung zentrifugiert. Die Zentrifugeneinstellung wurde für die nachfolgenden Schritte beibehalten. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne Protoplasten aufzuwirbeln, abgenommen und verworfen. Um verbleibende Driselaselösung auszuwaschen, wurden die Protoplasten in 10 ml 0,5 M Mannitollösung aufgenommen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Protoplasten in 5 ml 0,5 M Mannitollösung aufgenommen. Die Protoplastenzahl wurde anhand einer 100 μ l-Probe mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopisch bestimmt.

Polyethylenglykol-vermittelte Transfektion

Die aufgereinigte Protoplastenlösung wurde, wie im oberen Abschnitt angegeben, erneut zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und die Protoplasten auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Protoplasten/ml durch Zugabe von 3M-Medium eingestellt. Pro Transformationsansatz wurde in einem sterilen Zellkulturröhrchen 100 μ l DNA-Lösung mit 20 – 25 μ g zu transformierender, linearer Plasmid-DNA vorgelegt. Diese wurde vorsichtig mit 250 μ l der vorbereiteten Protoplasten-DNA-Lösung und 350 μ l PEG-Lösung versetzt und vermischt. Die Transformationsansätze wurden für 30 min bei RT

inkubiert und in Intervallen von 5 min durch vorsichtiges Drehen der Röhrchen gemischt. Anschließend wurden die Ansätze mit 3M-Medium schrittweise verdünnt; zuerst mit 1 ml 3M-Medium, dann in Schritten von 5 min mit 2 ml, 3 ml und zuletzt mit 4 ml 3M-Medium. Nach jedem Verdünnungsschritt wurde, wie zuvor beschrieben, gemischt. Die verdünnten Transformationsansätze wurden zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Protoplasten wurden in 3 ml Regenerationsmedium aufgenommen und auf zwei Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen verteilt, im Dunkeln bei RT über Nacht inkubiert und für weitere zehn Tage unter Standard-Kulturbedingungen für *P. patens* zur Zellwandregeneration inkubiert.

2.3 Selektion transgener Pflanzen

2.3.1 Selektion transgener und reinerbiger *A. thaliana*-Linien

Die Selektion von transgenen *A. thaliana*-Linien erfolgte nach Harrison *et al.* (2006) auf MS-Medium mit 14 mg/l Hygromycin B (Sigma-Aldrich). Das Antibiotikum wurde entsprechend der *hpt*-Kassette der T-DNA von pTA7002-basierten Vektoren ausgewählt. Homozygote transgene Linien wurden ausgehend von antibiotikaresistenten Pflanzen der T₁-Generation gewonnen. Dafür wurden jeweils 40 Samen von individuellen Pflanzen der T₁-Generation auf MS-Medium mit 14 mg/l Hygromycin B zur Keimung gebracht und selektioniert. T₁-Pflanzen, deren Samen zu $\frac{3}{4}$ antibiotikaresistente Pflanzen ergaben, enthalten mit großer Wahrscheinlichkeit eine Einzelintegration des transformierten Konstrukts. Von jeweils zehn der antibiotikaresistenten Pflanzen (T₂-Generation), die von T₁-Pflanzen mit einer Einzelintegration abstammen, wurden die Samen (T₃-Generation) gewonnen. 40 dieser Samen wurden von jeder Pflanze erneut auf MS-Medium mit 14 mg/l Hygromycin B zur Keimung gebracht und selektioniert. T₂-Pflanzen, deren Samen nur antibiotikaresistente Pflanzen ergaben, sind homozygot. Um mehr Samen für Experimente zu erhalten, wurden die Pflanzen der T₃-Generation, die von homozygoten T₂-Pflanzen abstammten, bis zur Samenernte weiterkultiviert und die T₄-Generation als Samen geerntet.

2.3.2 Selektion transgener *P. patens*-Linien

Regenerierte Protoplasten aus der PEG-vermittelten Transformation wurden auf drei Petrischalen mit Cellophan bedecktem KNOP-Festmedium gleichmässig verteilt und drei Tage unter Standard-Kulturbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte die Selektion stabiler Transformanten in drei Phasen: zu Beginn 14 Tage auf KNOP-Selektionsmedium, dann sieben Tage auf normalem KNOP-Festmedium (antibiotikafrei) und zuletzt 14 Tage auf KNOP-Selektionsmedium. Die Pflanzen wurden dabei durch umsetzen des Cellophans in die Petrischalen mit den verschiedenen Medien überführt. Das KNOP-Selektionsmedium enthielt 25 mg/l Hygromycin B (Sigma-Aldrich) für *aph4*-enthaltende Pflanzen und 25 mg/l Genticin (G418; Sigma-Aldrich) für *nptII*-enthaltende Pflanzen. Pflanzen, die die Selektion überlebten, wurden auf KNOP-Festmedium in Petrischalen ohne Cellophan umgesetzt und durch PCR-basierte Reihenuntersuchungen weiter analysiert.

2.4 GUS-Färbung

Für den Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität wurde das Pflanzenmaterial über Nacht bei 37 °C in der GUS-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial für 10 min in 5 %iger Formaldehydlösung fixiert und für weitere 10 min in 5 %iger Essigsäure inkubiert. Das Chlorophyll wurde in 5 min-Schritten bei 37 °C durch Ethanollösungen mit zunehmender Konzentration von 30 %, 50 %, 70 % und 80 % bis zur vollständigen Entfärbung ausgewaschen.

2.5 DNA-Isolierung

2.5.1 DNA-Isolierung aus *P. patens*

DNA-Isolierung zur PCR-Reihenuntersuchung

Für jede zu untersuchende *P. patens*-Linie wurden ein bis vier Gametophoren bzw. eine äquivalente Menge Protonemagewebe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer Edelstahlkugel ($\emptyset = 3$ mm) und 200 μ l DNA-Extraktionspuffer versetzt. Das Gewebe wurde mittels einer Schwingmühle in vorgekühlten Kunststoffhalterungen (-20 °C) für 2 min bei 28 s⁻¹ aufgeschlossen. Anschließend wurde das aufgeschlossene Gewebe für 4 min bei 13 200 RZB und 4 °C zentrifugiert, 150 μ l des Überstandes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die gelöste DNA mit 150 μ l Isopropanol für 2 min bei RT gefällt. Die DNA wurde für 10 min bei 13 200 RZB und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde mit 150 μ l eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 3 min bei 13 200 RZB zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand verworfen, die DNA für 15 – 30 min bei RT getrocknet und mit 30 μ l TE-Puffer mit 0,1 % (w/v) RNase aufgenommen.

DNA-Isolierung für Southern Blot

Die Isolierung von hochmolekularer, genomischer DNA (gDNA) erfolgte wie in von Stackelberg *et al.* (2006) beschrieben. Moosgewebe aus zu untersuchenden Flüssigkulturen wurde zuerst bis zur Trocknung vakuumfiltriert (Rotilabo®-Rundfilter, quantitativ, Größe: 90 mm; Carl Roth GmbH + Co. KG) und 0,4 – 1 g Gewebe in flüssigem Stockstoff gemörsert. Das gemörserte Gewebe wurde unmittelbar mit 8 ml CTAB-Puffer versetzt, durchmischt und für 60 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und für 10 min bei 2500 RZB und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 100 μ g/ml RNase A versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) hinzugefügt und die gDNA mit einem Volumen Isopropanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Die ausgefällte gDNA wurde für 30 min bei 2500 RZB und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die gDNA mit 10 ml Waschlösung (76 % Ethanol und 10 mM Ammoniumacetat) für 20 min bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift wie oben mit 10 ml 70 %igem Ethanol. Anschließend wurde die gDNA für 5 min bei 2500 RZB und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen

und die gDNA für 10 min bei RT getrocknet. Die gDNA wurde über Nacht in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die DNA-Menge sowie deren Qualität wurden nach Auftrennung durch Gelelektrophorese abgeschätzt.

2.6 Southern Blot

Der Southern Blot zur Bestimmung der Integrationsanzahl wurde nach dem QIAGEN® Bench Guide (Qiagen 2001, Hilden, Deutschland) wie im Abschnitt *DNA – A Guide to Analytical Gels* (S. 34 – 41) beschrieben durchgeführt. Pro Gelspur im Agarosegel wurden 2 µg verdaute Gesamt-DNA mit dem Perfect-Blue Gelsystem Mini L Revolution (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond-N+; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen. Als DNA-Größenmarker wurde der GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die DNA wurde mit 120 mJ/cm² in einer UV-Kammer zweifach auf der Membran fixiert. Der Nachweis des *PpGRAS1*-Knockout-Konstruktes erfolgte mit einer [α -³²P]dCTP radioaktiv markierten DNA-Sonde wie im Abschnitt Northern Blot (Seite 32) beschrieben. Die Sonde wurde mit den Primern #1802 und #1803 per PCR von der *aph4*-Selektionskassette amplifiziert und durch eine Gelextraktion aufgereinigt.

2.7 Standard-PCR

Zur Bestimmung der Bindungstemperatur (T_A) im PCR-Programm wurden die Bindungstemperaturen beider Primer wie folgt berechnet: $T_{A \text{ Primer}} = (2(\sum T + \sum A) + 4(\sum G + \sum C)) - 5$. Die niedrigere Temperatur wurde als T_A ausgewählt. Als Beispiel ist ein Standard-PCR-Reaktionsansatz und das PCR-Programm in Tabelle 4: aufgeführt. PCRs zur Amplifizierung von CDS wurden mit *Proof-reading*-Polymerasen, wie der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB), nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Eine Liste aller Primer ist im Anhang Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz und Programm einer Standard-PCR

Reaktionsgemisch	PCR-Programm
3 µl 10X PCR Puffer S (Genaxxon Bioscience GmbH; Ulm)	95 °C
1 µl Vorwärts-Primer (10 µM)	25 – 35 Zyklen: 95 °C T_A 72 °C
1 µl Rückwärts-Primer (10 µM)	
0,6 µl dNTP (jeweils 10 mM)	
0,2 – 2 µl Template (1 ng Plasmid-DNA; 50 – 100 gDNA)	72 °C
0,3 µl Taq Polymerase (5 u/µl; Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland)	72 °C 12 °C
mit H ₂ O auf 30 µl Gesamtvolumen auffüllen	
30 µl Gesamtvolumen	

2.8 Tri-Template-PCR

Die Templates, die in der Tri-Template-PCR eingesetzt wurden, sind zuvor in Standard-PCR-Reaktionen hergestellt worden und wurden über Gelextraktion aufgereinigt. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz und Programm der Tri-Template-PCR

Reaktionsgemisch	PCR-Programm
4 µl 5X Phusion®-Puffer (NEB)	98 °C
1 µl Vorwärts-Primer (10 µM)	5 Zyklen:
1 µl Rückwärts-Primer (10 µM)	
0,6 µl dNTP (jeweils 10 mM)	55 °C
0,2 – 2 µl 1. Template (5 ng)	72 °C
0,2 – 2 µl 2. Template (äquimolar zum 1. Template)	35 Zyklen:
0,2 – 2 µl 2. Template (äquimolar zum 1. Template)	
0,2 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	65 °C
mit H ₂ O auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen	72 °C
	72 °C
	12 °C
20 µl Gesamtvolumen	

2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe aus PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdauen und zur Konzentrations- und Qualitätsabschätzung von DNA- bzw. RNA-Proben wurden 1 %ige Agarosegele mit 1X TAE-Puffer verwendet. Die Gele wurden mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 70 ml Gel versetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer in 1X TAE Puffer bei 60 – 120 V. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden mit einem Geldokumentationssystem dokumentiert.

2.10 Gelextraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Gelextraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY NAGEL, Düren, Deutschland) nach dem beiliegenden Protokoll.

2.11 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau und -analysen wurden nach den Empfehlungen der Enzymhersteller durchgeführt. Vektoren wurden zu Klonierungszwecken mit 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase während des Restriktionsverdaues dephosphoryliert.

2.12 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation kleiner Plasmid-DNA Mengen erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit nach dem beiliegenden Protokoll. Große Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit extrahiert. Beide Kits sind von MACHEREY NAGEL (Düren, Deutschland).

2.13 Kolonie-PCR

Für jedes transformierte DNA-Konstrukt wurden acht antibiotikumresistente Kolonien per PCR auf die Aufnahme des klonierten Konstruktes hin überprüft. Pro Kolonie wurden wenige Bakterien auf eine LB-Agarplatte (Masterplatte) mit Antibiotikum überimpft und als Template in der Kolonie-PCR eingesetzt, für das ein Standard-PCR-Gemisch sowie 35 PCR-Zyklen verwendet wurden.

2.14 DNA-Ligation

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor (50 - 100 ng): Fragment) mit 5 U T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 5 min bei RT ligiert. DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt end*) wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Zur Klonierung eines DNA-Fragmentes aus Oligonukleotiden wurden die Oligonukleotide im gleichen molaren Verhältnis vor der Ligation hybridisiert und mit 1 U T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert.

2.15 RNA-Extraktion

Moosgewebe aus zu untersuchenden Flüssigkulturen wurde zuerst bis zur Trocknung vakuumfiltriert (Rotilabo®-Rundfilter) und *A. thaliana*-Pflanzenmaterial direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Große Mengen wurden dafür in 15 bzw. 50 ml Schraubdeckelröhrchen (PP) und kleine Mengen in 2 ml Schraubdeckelröhrchen (PP, konischer Boden, zu ¼ gefüllt mit Glasperlen Ø = 1,7 – 2,1 mm), überführt. Die gefrorenen Proben wurden entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Große Mengen an Pflanzenmaterial wurden in Flüssigstickstoff gemörsert und in vorgekühlte 15 ml Schraubdeckelröhrchen gefüllt. Kleinere Mengen wurden im 2 ml Schraubdeckelröhrchen zusammen mit den Glasperlen in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und per Mini Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, USA) homogenisiert. Pro 50 – 100 mg gemörsertem bzw. homogenisiertem und in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenem Gewebe, wurde 1 ml TRIzol® Reagent (Invitrogen™, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und das Gewebe durch das TRIzol® per Vortex-Kreisschüttler aufgetaut und vermischt. Das Gemisch wurde für 10 min bei RT inkubiert. Zellreste wurden 20 min bei 4500 RZB abzentrifugiert, der klare Überstand in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und mit 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol® Reagent versetzt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 15 s geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert sowie für 30 min bei 4500 RZB und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol® Reagent vermischt. Die ausgefal-

lene RNA wurde für 10 min bei 4500 RZB und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA wurde mit 1 ml 75 %igem Ethanol (RNase-freies Wasser) pro 1 ml TRIzol® Reagent gewaschen. Die RNA wurde erneut für 8 min bei 4500 RZB und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA für 5 min unter der Sterilbank getrocknet. Die RNA wurde danach in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und 10 min bei 65 °C gelöst. Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit dem Nanodrop ND2000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

2.16 cDNA-Synthese zur Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte ausgehend von 2 – 4 µg Gesamt-RNA. DNA-Kontaminationen wurden durch einen Verdau mit 1 U DNaseI für 30 min bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 18 µl entfernt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 2 µl EDTA (50 mM) für 10 min bei 65 °C gestoppt. Die RNA wurde mit 1 µl Oligo dT(23)VN (100 µM) und 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM) versetzt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz aufgeteilt und eine Hälfte zur cDNA-Synthese mit 200 U M-MuLV (RNase H-; NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die andere Hälfte wurde gleichbehandelt, jedoch die Reverse-Transkriptase (RTase) durch Wasser ersetzt. Zuletzt wurden die Reaktionen für 5 min bei 85 °C gestoppt. Zur RT-PCR wurde als Template die cDNA aus 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese und der DNaseI-Verdau wurden mit den Primern #B52 und #B53 für *PpEF1α* überprüft. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm zur RT-PCR erfolgte wie im Abschnitt Standard-PCR beschrieben (Seite 29).

2.17 Northern Blot

Der Northern Blot wurde nach dem QIAGEN® Bench Guide (Qiagen 2001, Hilden), wie im Abschnitt *RNA – A Guide to Analytical Gels* (S. 57 – 64) beschrieben, durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen mit dem PerfectBlue Gelsystem Maxi M bzw. Mini L Revolution (PEQLAB Biotechnologie GmbH) aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond-N+; GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg, Deutschland) übertragen. Als RNA-Größenmarker wurde der RiboRuler High Range (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die RNA wurde, wie bereits für DNA im Abschnitt Southern Blot (Seite 29) beschrieben, fixiert.

Für den spezifischen Nachweis von RNA-Fragmenten wurden mittels dem NEBlot® Kit (N1500L; NEB) mit [α -³²P]dCTP radioaktiv markierte DNA-Sonden von PCR-amplifizierten Templates hergestellt. Die Templates zu den Sonden spezifisch für die 5'-Bereiche von *Ath-SCL6-II* wurden mit den Primern #1690 und #1691 und von *Ath-SCL6-III* mit den Primern #1692 und #1693 amplifiziert. Die Templates zu den Sonden spezifisch für die *PpGRAS1*-CDS wurden mit den Primern #1366 und #A5 amplifiziert. Für die Untersuchung von ppt-miR171 erzeugten Spaltprodukten wurden die Templates zu den Sonden spezifisch für *PpGRAS1* mit den Primern #1750 und #1362 und für *PpGRAS2* mit den Primern #1364 und #1753

amplifiziert. Die Templates zu den Sonden spezifisch für *PpEF1 α* wurden mit den Primern # B52 und #B53 und für *Ath18S* rRNA mit den Primern #A8 und #A9 amplifiziert.

Die RNA-Membranen wurden im Hybridisierungssofen für 4 h mit 50 ml Hybridisierungspuffer A bei 67 °C prähybridisiert. Anschließend wurde der Puffer durch 20 ml frischen Hybridisierungspuffer A ersetzt. Die radioaktiv markierten Sonden wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert und direkt zur Membran und den 20 ml Hybridisierungspuffer A hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 67 °C.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran in mehreren Schritten gewaschen: im ersten Schritt für 1 min in 15 ml, dann einmal 10 min in 20 ml 1X Waschlösung (1X SSC, 0,1 % (v/v) SDS) und zuletzt mehrfach für 10 min in 20 ml 0,5X Waschlösung (0,5X SSC, 0,2 % (v/v) SDS) bis ein Tropfen der Waschlösung weniger als 20 Bq aufwies. Anschließend wurde die feuchte Membran in eine Polyethylen-Folie eingeschlagen. Das radioaktive Signal der Membran wurde mit dem Phosphorschirm BAS-MP MS 2025 P (GE Healthcare Europe GmbH) über Nacht aufgenommen und mit dem Typhoon Trio (GE Healthcare Europe GmbH) ausgelesen. Die Signalstärken wurden mit der Software Quantity One, Version 4.6.3 (Bio-rad, München, Deutschland) quantifiziert. Für eine erneute Hybridisierung wurde die Membran dreimal mit 50 ml 0,1 % (v/v) SDS-Lösung bei 90 °C gewaschen, um zuvor gebundene Sonden zu entfernen.

2.17.1 Northern Blot für kleine RNA

Northern Blots optimiert für den Nachweis kleiner RNAs wurden nach Pall *et al.* (2007) und Pall *et al.* (2008) durchgeführt. Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in 12 %igen Polyacrylamidgelen (Acrylamid/Bisacrylamid: 37,5:1) mit 8,25 M Harnstoff über Nacht bei 60 V in der PROTEAN II xi Cell (Biorad). Als RNA-Größenmarker wurde der microRNA-Marker (N2102S; NEB) verwendet.

Für den Nachweis der kleinen RNAs wurden 10 pmol DNA-*antisense*-Sonde zur ppt-miR171a (Primer #1) mit 20 U T4 Polynukleotid-Kinase (M0201; NEB) und 5 μ l [γ -³²P]dATP mit einer Aktivität von 1,85 MBq in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 1 h bei 37 °C radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde für 10 min bei 68 °C gestoppt. Währenddessen wurden die RNA-Membranen im Hybridisierungssofen für 2 h mit 50 ml Hybridisierungspuffer B bei 10 °C unter der Schmelztemperatur der markierten DNA-Sonde prähybridisiert. Anschließend wurde der Puffer durch 20 ml frischen Hybridisierungspuffer B ersetzt. Die radioaktiv markierten DNA-*antisense*-Sonden wurde für 5 min bei 75 °C denaturiert und direkt zur Membran und den 20 ml Hybridisierungspuffer B hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der Prähybridisierungstemperatur. Nach der Hybridisierung wurde die Membran in mehreren Schritten gewaschen: zuerst 1 min in 15 ml, dann zweimal in 20 ml 2X Waschlösung (2X SSC, 0,2 % (v/v) SDS) und zuletzt in 20 ml 1X Waschlösung (1X SSC, 0,2 % (v/v) SDS) bis ein Tropfen der Waschlösung weniger als 20 Bq aufwies. Das radioaktive Signal wurde, wie im vorigen Abschnitt für Northernblots beschrieben, detektiert und quantifiziert.

2.18 RNA-Seq

2.18.1 DNaseI-Verdau und RNA-Aufreinigung zur *Next-Generation-Sequenzierung*

Für jede Linie wurden 1,5 µg Gesamt-RNA pro Replikat vereint. Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen in den RNA-Präparationen wurden 4,5 µg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1,5 U DNaseI (RNase frei; NEB, IPSWICH, USA) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und auf 200 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Die RNA-Lösung wurde in einem 1,5 ml Phase Lock Gel™ (Heavy; 5 PRIME GmbH, Hilden, Deutschland) Reaktionsgefäß mit 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohollösung (im Verhältnis 25:24:1, pH 7,5-8,0) versetzt und 30 s gemischt. Die wässrige Phase wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 16 100 RZB und 4 °C von der organischen Phase getrennt, abgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform versetzt und 30 s gemischt. Nach 1 min Phasentrennung wurde erneut, wie oben angegeben, für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 20 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) vermischt und die RNA mit 550 µl Ethanol absolut für 1 h bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde für 15 min bei 20 620 RZB und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand restlos abgenommen. Die RNA wurde anschließend mit 1 ml 75 %igem Ethanol (Ethanol absolut mit RNase-freiem Reinstwasser) gewaschen. Zuletzt wurde die RNA für 5 min bei 20 620 RZB und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und 3 min bei RT getrocknet. Die RNA wurde in 10 µl RNase-freiem Reinstwasser aufgenommen und bis zum Probenversand bei -80 °C gelagert.

2.18.2 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Proben wurden von GATC Biotech AG in Konstanz mit dem HiSeq 2000 (Illumina; San Diego, USA) sequenziert (Sequenziermodus 50 bp *single read*). Ausgehend von den aufgereinigten RNA-Proben erfolgte die Herstellung der cDNA-Bibliotheken und die Sequenzierung bei GATC Biotech nach folgenden Arbeitsschritten:

1. Eingangskontrollen der aufgereinigten RNA-Proben mit Agilent 2100 BioAnalyzer
2. Poly-A-Anreicherung
3. cDNA-Synthese, *End-repair*, *A-tailing* und Adapter-Ligation nach Illumina-TrueSeq-RNA-SamplePrep-v2 Guide (HS Methode)
4. Amplifikation der cDNA-Bibliothek (15 PCR-Zyklen)
5. Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek mit Agilent 2100 BioAnalyzer und Konzentrationsbestimmung mit dem Invitrogen Qubit® 2.0 Fluorometer
6. Sequenzierung mit Illumina HiSeq 2000 im 50 SR Modus

2.18.3 Bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierung

Nach der Sequenzierung wurde das De-multiplexing (Entfernen der Tags) und das Entfernen der Adaptersequenzen von den Sequenz-Rohdaten mit der Casava Pipeline v1.8.2. (Illumina; San Diego, USA) von GATC Biotech durchgeführt. Die ausgelesenen Sequenzen (Reads) wurden im FASTQ-Format erhalten und in CLC Genomics Workbench 7.0.4 (CLC bio; Aarhus, Dänemark) unter Entfernung der Read-Namen importiert. Das Read-Mapping der *A. thaliana*-Reads wurde mit repräsentativen *A. thaliana* cDNA-Genmodellen (TAIR10, www.arabidopsis.org) und miRNA-Vorläufersequenzen (TAIR10) als Referenzsequenzen durchgeführt. Das Readmapping der *P. patens*-Reads wurde mit jeweils der ersten Spleißvariante (v6.1) der *P. patens* mRNA-Sequenzen (Genomannotation Version 1.6 (Zimmer *et al.* 2013)) und der miRNA-Vorläufersequenzen (miRBase-Annotation; www.mirbase.org, Version 20) durchgeführt. Es wurde der in CLC Genomics Workbench 7.0.4 implementierte Read-Mapper (CLC Assembly Cell 4.3.) mit den in Tabelle 10 angegebenen Einstellungen verwendet. Reads, die mit gleicher Qualitätskennzahl des Alignments mehreren Transkripten zugeordnet werden konnten, wurden anteilig nach dem Verhältnis von eindeutig zuordenbaren Reads verteilt. Nach dem Readmapping wurde die Anzahl von zugeordneten Reads pro Transkript und *reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads* (RPKM-Werte) berechnet.

Tabelle 6: Read-Mapping Parameter

Parameter	Wert
Reference sequence per transcript	1
Mismatch costs	2
Insertion costs	3
Deletion costs	3
Length fraction	0,9 (= Minimum 45 nt)
Similarity fraction	0,9
Maximum Number of hits	10
Expression value	Total counts

Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Um zwischen zwei Proben bzw. Gruppen differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde das in CLC Genomics Workbench 7.0.4 implementierte Tool zur empirischen Analyse von digitalen Genexpressionswerten mit dem Exact-Tests von Robinson und Smyth (Robinson *et al.* 2008) verwendet. Dieses Tool entspricht im wesentlichen dem edgeR Bioconductor package (Robinson *et al.* 2010) in der Grundeinstellung. Dabei wurden für jedes Gen zwei Schlüssel-Parameter anhand der für die zu vergleichenden Proben gemessenen Expressionswerten (Anzahl der Zugeordneten Reads) durch das Tool berechnet. Zum einen wird die Veränderung der Expressionstärke des Genes (*fold change*, FC) als Verhältnis der modellierten *counts per million* Werte (CPM-Werte) und zum anderen der Signifikanzwert (p-Wert) des Exact-Tests berechnet. Aufgrund der großen Testanzahl wurden die p-Werte nach der *false discovery rate* (FDR) korri-

giert. Gene, deren Betrag des FC größer als 2 und der FDR-korrigierte p-Wert (q-Wert) kleiner als 0,001 ist, wurden als differentiell exprimierte Gene angesehen. Für die Generierung von Heat-maps wurden differentiell exprimierte Gene mit einem q-Wert kleiner als 0,1 ausgewählt, um schwach exprimierte Gene, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, besser zu berücksichtigen.

Hauptkomponentenanalyse, hierarchische Clusteranalyse und Heat-map

Die in der CLC Genomics Workbench generierten Daten wurden in R (Version 3.1; <http://cran.r-project.org/>) weiter ausgewertet. Das Zusammenfassen, Umformatieren und Filtern der Daten erfolgte mit dem Softwarepaket reshape2 (CRAN mirror; cran.r-project.org/mirrors.html). Die Korrelationsmatrix zur hierarchischen Clusteranalyse wurde mit dem Softwarepaket WGCNA (CRAN mirror) durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalysen zur Untersuchung der Varianz zwischen den Genexpressionswerten der untersuchten *P. patens*- und *A. thaliana*-Proben und die Heat-maps mit hierarchischem Clustering zur Visualisierung der Genexpressionswerte wurden mit den Softwarepaketen ggplot2, ggdendro und grid (CRAN mirror) durchgeführt.

2.19 Klonierungen

2.19.1 Klonierung der Vektoren $pPpMIR171a_{prom}::GUS$ und $pPpMIR171b_{prom}::GUS$

Als putativer *PpMIR171a*-Promotor wurde ein 1021 bp großes Fragment 327 bp vor dem *PpMIR171a*-Vorläufer (MI0005688, miRBase-Annotation; Release 20) von genomischer Wt-DNA amplifiziert und in das Plasmid $pPMIR534a_{prom}::GUS$ (Seumel 2008) kloniert (Abbildung 9, Schritt 1). Das resultierende Konstrukt wurde $pPpMIR171a_{prom}::GUS$ genannt. Als putativer *PpMIR171b*-Promotor wurde ein 879 bp großes Fragment 507 bp vor dem *PpMIR171b*-Vorläufer (MI0005689, miRBase-Annotation; Release 20) analog zum putativen *PpMIR171a*-Promotor in $pPMIR534a_{prom}::GUS$ kloniert (Abbildung 9, Schritt 2). Durch die Sequenzierung der klonierten Promotoren mit dem Primer #1024 konnten für beide Promotoren fehlerfreie Konstrukte identifiziert werden.

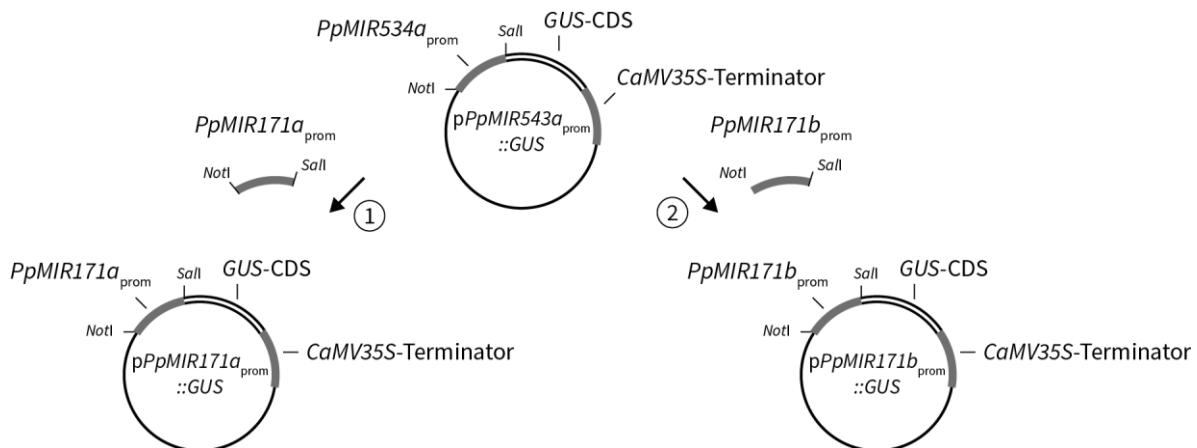


Abbildung 9: Klonierungsstrategien zur Herstellung der Vektoren $pPpMIR171a_{prom}::GUS$ und $pPpMIR171b_{prom}::GUS$

- 1) Amplifikation des putativen *PpMIR171a*-Promotors mit den Primern #1622 und #1623 von gDNA und Klonierung über *NotI* und *Sall* in $pPpMIR534a_{prom}::GUS$
- 2) Amplifikation des putativen *PpMIR171b*-Promotors mit den Primern #1624 und #1625 von gDNA und Klonierung über *NotI* und *Sall* in $pPpMIR534a_{prom}::GUS$

2.19.2 Klonierung der Vektoren $pPGX8-PpmGRAS1$ und $pPGX8-PpmGRAS1-DR$

Die *PpmGRAS1*-CDS des Vektors $pJET-PpmGRAS1$ wurde mit den Primern #1747 und #1748 und die *PpmGRAS1*-CDS ohne Stop-Codon mit den Primern #1747 und #1749 per PCR amplifiziert und jeweils in $pENTR/D-TOPO^{\circledR}$ kloniert ($pENTR^{\text{TM}}$ Directional $TOPO^{\circledR}$ Cloning Kit; Invitrogen). Die klonierten Fragmente wurden mit den Primern M13-forward und M13-reverse sowie #A5 zur Überprüfung sequenziert. Anschließend wurden die Fragmente über eine LR-Rekombinations-Reaktion (Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix; Invitrogen) in die Expressionsvektoren $pPGX8$ (für *PpmGRAS1*-CDS) und $pPGX8-DR$ (für *PpmGRAS1*-CDS ohne STOP-Codon) kloniert.

2.20 Medien, Puffer und Lösungen

In den folgenden Angaben zur Zusammensetzung verwendeter Medien, Puffer und Lösungen sind einigen Prozentangaben mit dem in der Biologie gebräuchlichen und veralteten Zusatzvermerk (w/v) anstelle der Massenkonzentration ρ angegeben. Die Angabe 1 % (w/v) entspricht dabei 10 g/l. Prozentangaben mit dem in der Biologie gebräuchlichen und veralteten Zusatzvermerk (v/v) sind als Volumenanteil ϕ zu verstehen. Aus historischen Gründen und zur Vereinfachung wurden für das KNOP-Medium die Massenkonzentrationen anstatt der Stoffmengenkonzentrationen angegeben.

0,5 M Mannitollösung

91,1 g/l Mannit
eingestellt mit KOH auf pH 5,6
eingestellt mit Mannit auf 560 mOS
sterilfiltriert mit 0,22 μ m Filter

3M-Medium

15 mM MgCl₂
0,1 % (w/v) 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)
0,48 M Mannit
eingestellt mit KOH auf pH 5,6
eingestellt mit Mannit auf 580 mOS
sterilfiltriert mit 0,22 μ m Filter

Lauria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g/l Trypton/Pepton aus Casein
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
in Reinstwasser angesetzt
eingestellt mit NaOH auf pH 7,5
autoklaviert

LB-Fest-Medium

15g/l Bacto Agar
in LB-Medium
autoklaviert
bei 60 °C gegossen

DriselaseLösung

4 % (w/v) Driselase (Sigma)
in 10 ml 0,5 M Mannitollösung
für 1 h bei RT im Überkopfschüttler gelöst
10 min bei 12000 RZB zentrifugiert
Überstand sterilfiltriert mit 0,22 μ m Filter

KNOP-Medium

0,25 g/l KH₂PO₄
0,25 g/l KCl
0,25 g/l MgSO₄ X 7H₂O
1 g/l Ca(NO₃)₂ X 7H₂O
16,5 mg/l NaFeEDTA
in Reinstwasser angesetzt
eingestellt mit KOH auf pH 5,8
autoklaviert

KNOP-Festmedium

1 % (w/v) Phyto Agar (P1003 Duchefa)
in KNOP-Medium
autoklaviert
bei 60 °C gegossen

Für Festmedien mit Glucose wurde nach dem Autoklavieren dem bei 60 °C flüssigem Medium mit 0,22 μ m Filtern sterilfiltrierte Glucoselösung hinzugefügt. 1 g/l D-Glucose für Sterilkontrollen der Zellkultur und 300 mg/l zur Sporophyten-Induktion.

Regenerationsmedium

5 % (w/v) D-Glucose
30 g/l Mannit
in KNOP-Medium (nicht autoklaviert)
eingestellt mit KOH auf pH 5,8
eingestellt mit Mannit auf 580 mOS
sterilfiltriert mit 0,22 μ m Filter

40 % PEG-Lösung

40 % (w/v) Polyethylenglykol 4000 (PEG 4000)
in 3M-Medium
sterilfiltriert mit 0,22 µm Filter

1X TAE-Puffer

40 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
1 mM Na₂Ethylendiamintetraacetat (Na₂EDTA)
40 mM Essigsäure
Autoklaviert

6X Ladelösung

0.03 % (w/v) Bromophenolblau; Natriumsalz
0.03 % (w/v) Xylencyanol FF
60 % Glycerin
1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
100 mM Na₂EDTA (pH 7,6 eingestellt mit TRIS-HCl)

Hybridisierungspuffer B; Northern Blot für kleine RNAs

3,42 mM Na₂HPO₄
1,58 mM NaH₂PO₄
0,1 mM Na₂EDTA (eingestellt mit HCl auf pH 8,0)
5 % (w/v) SDS
6X SSC-Lösung
1X Denhardt's

2X RPA-Ladepuffer

0,4 µM Na₂EDTA
1 ‰ (w/v) Bromophenolblau; Natriumsalz
1 ‰ (w/v) Xylencyanol FF
in Formamid (98 %), deionisiert

0,5X Murashige-Skoog-Medium (MS-Medium)

0,22 % (w/v) MS-Medium mit Gamborg-B5-Vitamine (Duchefa)
eingestellt mit KOH auf pH 5,8
1,5 % (w/v) Plant Agar (P1001 Duchefa)
Autoklaviert

Hybridisierungspuffer A; Northern Blot

3,42 mM Na₂HPO₄
1,58 mM NaH₂PO₄
1 mM Na₂EDTA (eingestellt mit HCl auf pH 8,0)
7 % (w/v) SDS
0,01 % (w/v) Lachs-Sperma-DNA (sonifiziert und denaturiert)

100X Denhardt's

1 % Ficoll 400
1 % Polyvinylpyrrolidon (PVP)
1 % Rinderserum Albumin (Fraktion V)
in H₂O reinst

1X TBE-Lösung

89 mM TRIS
89 mM Borsäure
2 mM Na₂EDTA (pH 8,0)

DNA-Extraktionspuffer

200 mM TRIS (eingestellt mit HCl auf pH 7,5)
250 mM NaCl
25 mM Na₂EDTA
0,5 % (w/v) SDS

20X SSC-Lösung

3 M NaCl
300 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat
eingestellt mit HCl auf pH 7,0

GUS-Färbelösung (X-Gluc)

0,95 mM X-Gluc
in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0
(5 mg X-Gluc gelöst in 60 µl N,N-Dimethylformamid (DMF))

Infiltrationsmedium

5 % (w/v) Sucrose
44,4 nM 6-Benzylaminopurin
0,02 % Silvet-L77

20X SDS-Lösung

20 % (m/v) SDS
in Reinstwasser

CTAB-Puffer

2 % CTAB
1,4 M NaCl
0,2 % β-Mercaptoethanol
20 mM EDTA
0,5 % PVP 40 (wasserlöslich)
100 mM TRIS/HCl (pH 8,0)

3 Ergebnisse

3.1 Die Expressionsdomänen von *PpMIR171a* und *PpMIR171b* unterscheiden sich

Die Zielgene der konservierten miR171 sind in *P. patens* bereits identifiziert worden (Axtell, Snyder *et al.* 2007). Allerdings gibt es noch keine Informationen darüber in welchem Gewebe die beiden miR171-Varianten ppt-miR171a und ppt-miR171b exprimiert werden. Die *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Gene sind im Genom jeweils zwischen zwei Protein-kodierenden Genen lokalisiert. Dies bedeutet, dass sie aus eigenständigen transkriptionellen Einheiten bestehen müssen, um von der Polymerase II transkribiert werden zu können. Diese Einheit besteht aus einem Promoter, der pri-miRNA-Sequenz und einem Terminator. Tatsächlich konnte für ein ca. 1200 bp großes Fragment vor dem *AthMIR171a*-Vorläufer Promoteraktivität nachgewiesen werden (Parizotto, Dunoyer *et al.* 2004). Daher liegt es nahe, dass die Expression der *PpMIR171*-Gene ebenfalls in ähnlicher Weise gesteuert werden. Anhand der von im *P. patens* Genome Browser veröffentlichten *expressed sequence tags (ESTs)*, 5'-Prime Illumina Reads und konservierten Sequenzmotiven aus Pflanzen-Promotoren, lässt sich der Transkriptionsstart der pri-ppt-miR171a und pri-ppt-miR171b eingrenzen (Anhang Abb. 1). In *A. thaliana* befinden sich die Promotoren von *MIR*-Genen, inklusive der *AthMIR171*-Gene, unmittelbar vor dem Transkriptionsstart in einem Bereich von ca. 1 kb (Megraw *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2007). Um die Aktivität der *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Promotoren *in vivo* nachzuweisen, wurden daher 1021 bp bzw. 879 bp große Bereiche vor den jeweiligen Transkriptionsstarts als potenzielle *PpMIR171a/b*-Promotoren vor die CDS der β -Glucuronidase (*GUS*) und einen *CaMV35S*-Terminator kloniert und in *P. patens* transformiert (siehe Abschnitt 2.19.1 im Material- und Methodenteil). Es konnten sechs transgene Pflanzen isoliert werden, die das *PpMIR171a*_{prom}::*GUS*-Konstrukt enthalten und zwei transgene Pflanzen, die das *PpMIR171b*_{prom}::*GUS*-Konstrukt enthalten (Abbildung 10, A und B).

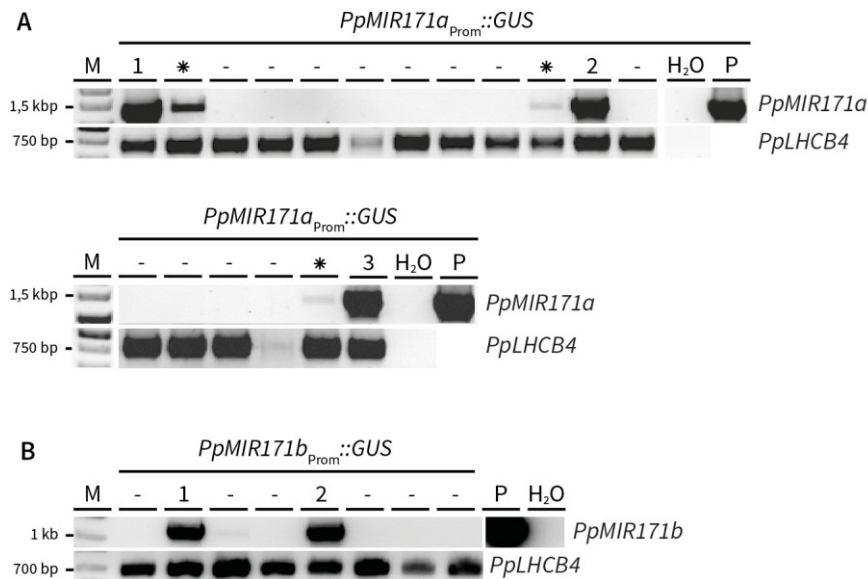


Abbildung 10: PCR-basierte Reihenuntersuchung zur Identifizierung transgener *PpMIR171_{Prom}::GUS*-Linien

A) Agarosegelbild der aufgetrennten PCR-Produkte der PCR von genomischer DNA mit einem Vorwärtsprimer auf dem *PpMIR171a*-Promotorbereich und Rückwärtsprimer auf der CDS von GUS.

B) Agarosegelbild der aufgetrennten PCR-Produkte der PCR von genomischer DNA mit einem Vorwärtsprimer auf dem *PpMIR171b*-Promotorbereich und Rückwärtsprimer auf der CDS von GUS.

P: Kontroll-PCR von der Plasmid-DNA, die zur Transformation eingesetzt wurde; *PpLHCB4*: Positivkontrolle für gDNA (Primer #1696 und #1697); (*): Positive Linien, auf die im Folgenden nicht weiter eingegangen wird; H₂O: Kontroll-Reaktion ohne gDNA; M: DNA-Größenmarker.

Die GUS-Aktivität wurde von drei *PpMIR171a_{Prom}::GUS*-Linien (*PpMIR171a_{Prom}::GUS*-1, -2, -3) und den beiden *PpMIR171b_{Prom}::GUS*-Linien im Protonema, in Knospen, jungen und älteren sowie voll ausgewachsenen Gametophoren und Rhizoiden untersucht (Abbildung 11). GUS-Aktivität konnte in allen drei *PpMIR171a_{Prom}::GUS*-Linien im gesamten Protonema, in Knospen und jungen Gametophoren sowie in deren Rhizoiden nachgewiesen werden (Abbildung 11, A und B). Erst in voll entwickelten Phylloiden (Blättchen) und später im ausgewachsenen Gametophoren lässt die GUS-Aktivität nach, wobei der apikale meristematische Bereich des Caluoids (Stämmchens) stets weiterhin GUS-Aktivität zeigt (Abbildung 11, C und D). Im Gegensatz dazu lässt sich keine GUS-Aktivität in den *PpMIR171b_{Prom}::GUS*-Linien im Protonema, Knospen, jungen Gametophoren und Rhizoiden nachweisen (Abbildung 11, A bis C). Lediglich in der Linie *PpMIR171b_{Prom}::GUS*-1 konnte GUS-Aktivität im apikalen meristematischen Bereich des Cauloids nachgewiesen werden (Abbildung 11 D).

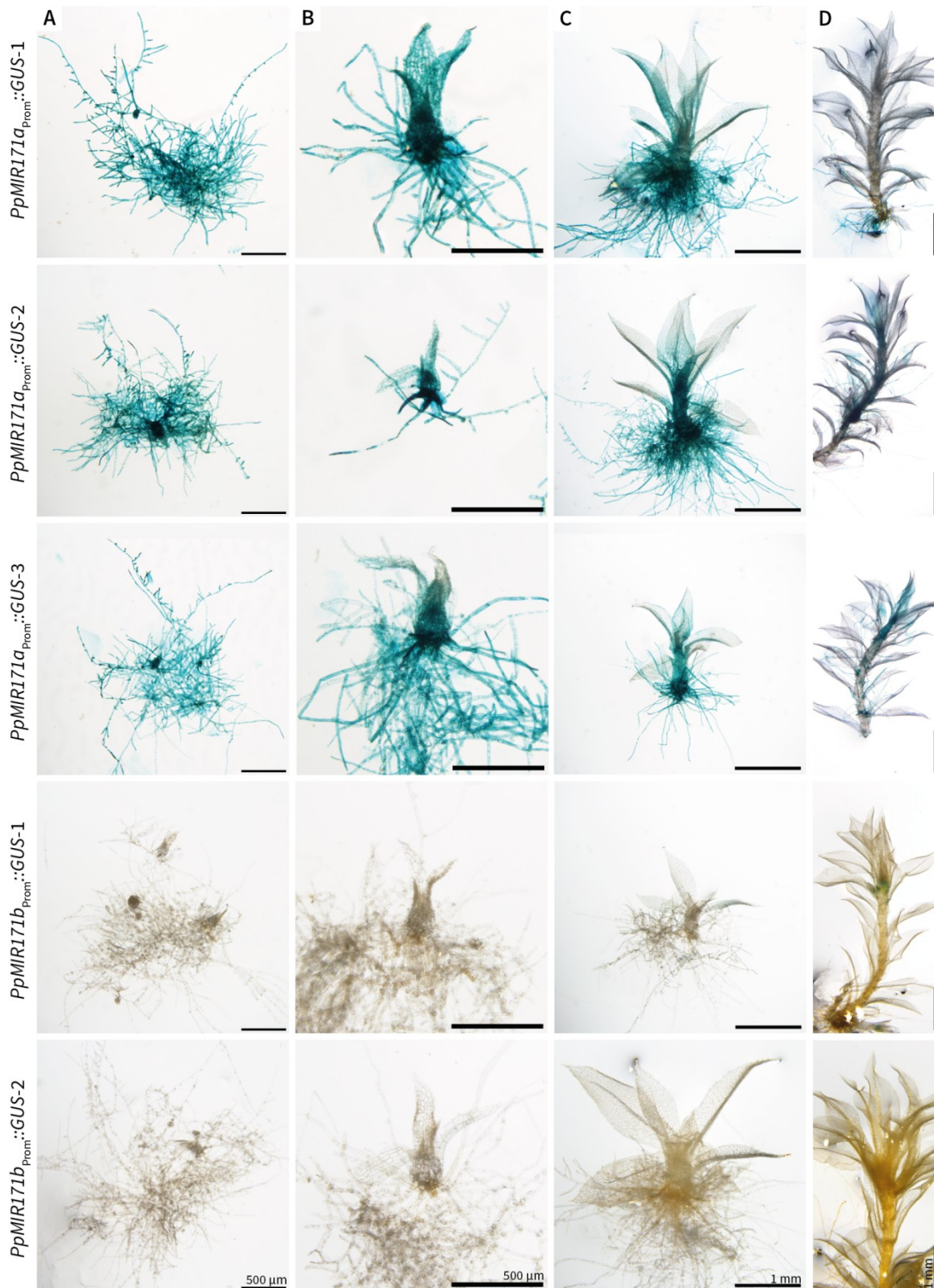


Abbildung 11: Analyse der *PpMIR171*-Expressionsdomänen im Gametophyten

GUS-Färbung (über Nacht in X-Gluc inkubiert) von *PpMIR171a*_{Prom}::GUS- und *PpMIR171b*_{Prom}::GUS-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

A) Protonema mit Knospen; B) Protonema mit jungen Gametophoren; C) ältere Gametophoren; D) voll ausgewachsene Gametophoren. Die Größenbalken der Spalten sind jeweils identisch.

Weiterführend wurde die GUS-Aktivität der *PpMIR171*_{prom}::GUS-Linien in den Gametangien und im Sporophyten untersucht (Abbildung 12). In den Linien *PpMIR171a*_{prom}::GUS-2 und -3 konnte GUS-Aktivität in den Antheridien und den Archegonien nachgewiesen werden, allerdings nicht in den Sporophyten (Abbildung 12, A). In den Archegonien nimmt die GUS-Aktivität apikal zu. In einem Archegonium der Linie *PpMIR171a*_{prom}::GUS-3 konnte in einer Eizelle deutliche GUS-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 12, A; Mitte untere Reihe). Ob es sich dabei um eine befruchtete oder unbefruchtete Eizelle handelt, ist nicht bestimmt. In der *PpMIR171b*_{prom}::GUS-Linie konnte GUS-Aktivität in sich entwickelnden Archegonien nachgewiesen werden und in der Seta zweier Sporophyten (Abbildung 12, B). Dies lässt darauf schließen, dass die ppt-miR171a die vorherrschende miRNA ist, die in allen teilungsaktiven Geweben des Gametophyten exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ließ sich die miR171b-Expression nicht sicher bestimmen. Nur in einer Linie ist sie im Apex älterer Gametophoren und in jungen Archegonien exprimiert sowie zu bestimmten Phasen in der Seta von heranreifenden Sporophyten.

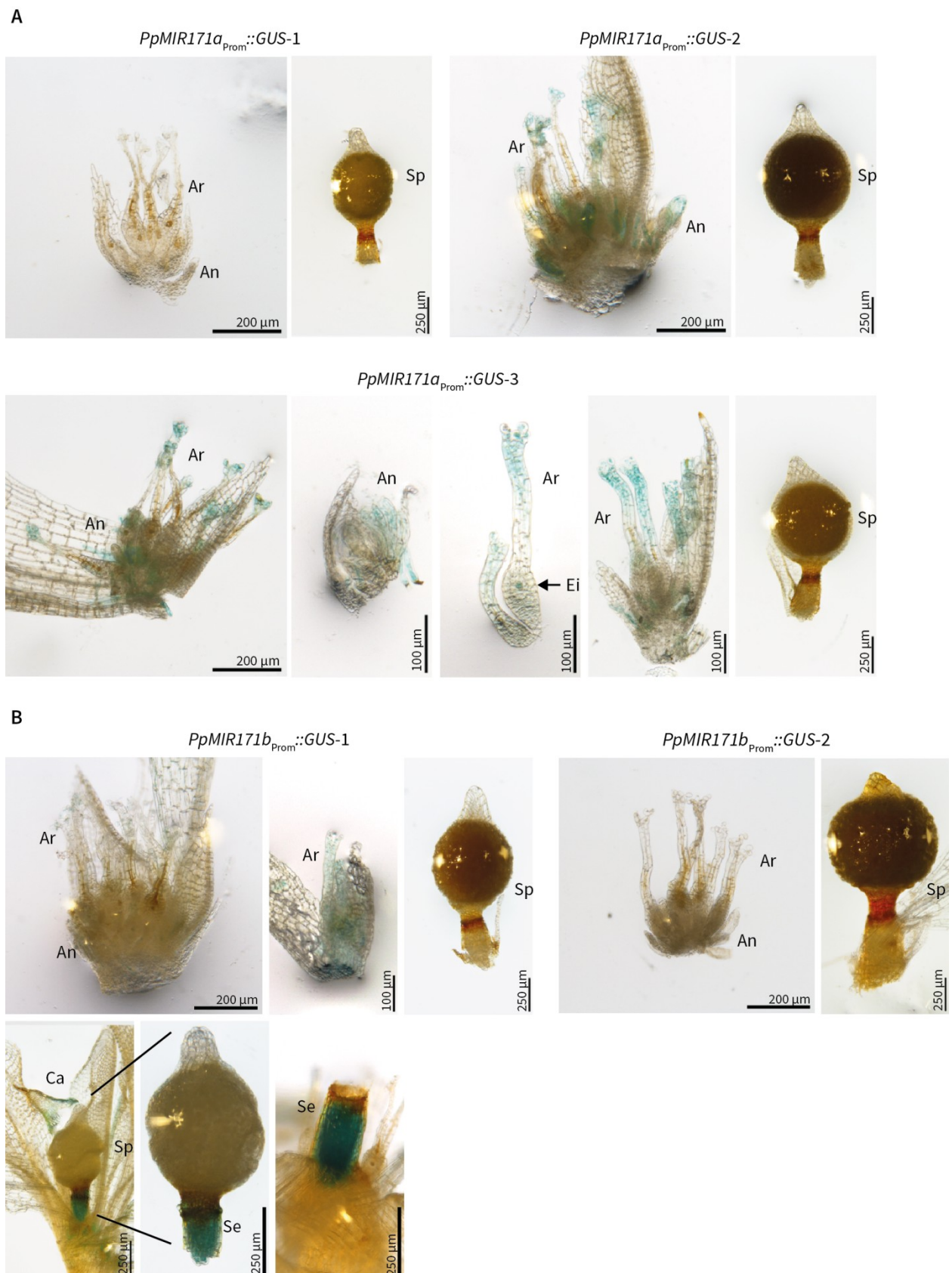


Abbildung 12: Analyse der *PpMIR171*-Expressionsdomänen in Gametangien und Sporophyten

GUS-Färbung (über Nacht in X-Gluc inkubiert) von Gametangien mit Antheridien (An) und Archegonien (Ar) sowie von Sporophyten (Sp).

A) *PpMIR171a_{Prom}::GUS*-Linien; Eizelle (Ei). **B)** *PpMIR171b_{Prom}::GUS*-Linien; Calyptra (Ca), Seta (Se).

3.2 Analyse der Expressionsdomäne der ppt-miR171-Zielgene *PpGRAS1* und *PpGRAS2*

Die Expressionsdomänen der miR171-Zielgene in *P. patens* wurden ebenso wie die der ppt-miR171 selbst noch nicht untersucht. Im Gegensatz zur Analyse der *MIR171a/b*-Promotoren lässt sich die Expression der ppt-miR171-Zielgene durch C-terminale GUS-Fusion an die endogene CDS von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* untersuchen. Die Expression der GUS-Fusionen *PpGRAS1-GUS* und *PpGRAS2-GUS* wird daher auf transkriptioneller Ebene durch die endogenen Promotoren von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* kontrolliert. Auf posttranskriptioneller Ebene hingegen können die Transkripte von *PpGRAS1-GUS* und *PpGRAS2-GUS* durch die ppt-miR171 negativ reguliert werden. Die Expression der Fusionsproteine *PpGRAS1-GUS* und *PpGRAS2-GUS* unterliegt somit den gleichen Faktoren wie die Expression von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* im Wt.

Ein Weg, um Informationen über die biologische Funktion der ppt-miR171 zu erhalten, ist die Entkopplung von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* von der posttranskriptionellen Regulation durch ppt-miR171. Dies kann durch Veränderungen in der Sequenz der miR171-Bindestelle erreicht werden. Wird die miR171-Bindestelle in *PpGRAS1* und *PpGRAS2* durch stille Mutationen so verändert, dass beide ppt-miR171-Varianten nicht mehr binden können, kann auch keine Spaltung der Transkripte mehr stattfinden. Solche ppt-miR171-resistenten Varianten von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* werden im Folgenden, aufgrund der mutierten ppt-miR171-Bindestellen, *PpmGRAS1* und *PpmGRAS2* genannt. Durch den Vergleich von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* mit *PpmGRAS1* und *PpmGRAS2* kann bei Expressions- und Funktionsanalysen die biologische Funktion der ppt-miR171 untersucht werden.

Um die Expressionsdomänen von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* unabhängig von der Regulierung der ppt-miR171 zu untersuchen, wurden transgene *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien erzeugt und die GUS-Aktivität mit der in *PpGRAS1-GUS* und *PpGRAS2-GUS*-Linien verglichen. Weicht das Expressionsmuster der miR171-resistenten Varianten (*PpmGRAS1/2-GUS*) von den Wt-Varianten (*PpGRAS1/2-GUS*) ab, so kann dieser Unterschied auf die Aktivität der ppt-miR171 zurückgeführt werden. Für die Wt-Varianten wurden durch homologe Rekombination die natürlichen Stopcodons durch die GUS-CDS ersetzt und diese mit den endogenen CDS von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* fusioniert. Um diese homologe Rekombination zu ermöglichen, wurde die GUS-CDS mit zwei, ca. 1400 bp große, flankierenden Fragmenten umfasst, die homolog zu *PpGRAS1* bzw. *PpGRAS2* sind. Die ppt-miR171-Bindestelle befindet sich jeweils in den 5'-flankierenden Fragmenten. Daher wurde für die ppt-miR171-resistenten Varianten die 5'-flankierenden Fragmente jeweils durch ein Fragment mit einer mutierten ppt-miR171-Bindestelle ersetzt.

3.2.1 Klonierung der Vektoren pJET-*PpmGRAS1* und pJET-*PpmGRAS2*

Die natürlichen *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Varianten sowie die ppt-miR171-resistenten Varianten *PpmGRAS1* und *PpmGRAS2* wurden zunächst in den Vektor pJET1.2 kloniert. Diese Vektoren dienten als Ausgangspunkt zur Klonierung der Konstrukte, die zur Expressions- und Funktionsanalyse eingesetzt wurden. Die codierenden Sequenzen und 5'UTRs von *PpGRAS1* (Pp1s205_1V6.1) und *PpGRAS2* (Pp1s205_1V6.1) wurden bereits zuvor in pJET1.2 kloniert – pJET-*PpGRAS1* und pJET-*PpGRAS2* (Strotbek 2010). Ausgehend von der natürlichen CDS von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* wurden die Plasmidvarianten kloniert, die *PpmGRAS1* und *PpmGRAS2* mit den mutierten ppt-miR171-Bindestellen enthalten. Dafür wurden jeweils zwei, sich in der miR171-Bindestelle überlappende Fragmente per PCR amplifiziert. Die sich überlappenden Primer wurden so entworfen, dass sich stille Punktmutationen in Bereichen der ppt-miR171-Bindestellen ergeben. Diese Punktmutationen wurden so gewählt, dass sich neue Restriktionsschnittstellen ergeben, die zum Zusammenfügen der Fragmente genutzt wurden (Abbildung 13). Diese Restriktionsschnittstellen kommen in den *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Genen des Wt nicht vor. Daher können über einen Restriktionsverdau von PCR-Produkten, die die ppt-miR171-Bindestellen enthalten, transgene *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS2*-Linien von Wt-Pflanzen unterschieden werden. In Tabelle 7 sind die Punktmutationen und die Restriktionsschnittstellen aufgeführt.

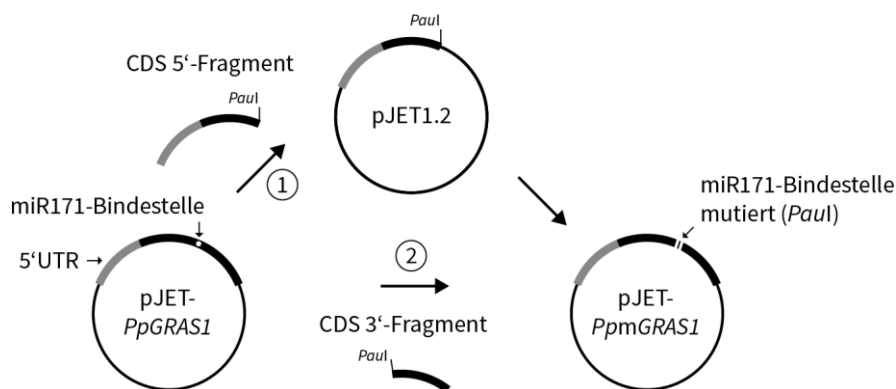


Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pJET-*PpmGRAS1*

1) Amplifikation des 5'-Fragments der CDS mit den Primern #1411 und #1412 und *blunt end*-Klonierung in pJET1.2.

2) Amplifikation des 3'-Fragments der CDS mit den Primern #1435 und #1416 und Klonierung hinter das 5'-Fragments über *Paul* und *blunt end*.

Die Herstellung von pJET-*PpmGRAS2* erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Das 5'-Fragment wurde mit den Primern #1370 und #1415 und das 3'-Fragment mit den Primern #1414 und #1413 amplifiziert. Beide Fragmente wurden über *HpaI* zusammengefügt.

Tabelle 7: DNA- und mRNA-Sequenzvergleiche der natürlichen und mutierten ppt-miR171a/b-Bindestellen in *PpGRAS1/2* und *PpmGRAS1/2* mit kodierten Aminosäuresequenzen

<i>PpGRAS1/PpmGRAS1</i>	
Aminosäuresequenz	K A I L A R L N
<i>PpGRAS1</i> DNA	5' AAGCGATATTGGCGCGGCTCAA 3'
<i>PpmGRAS1</i> DNA (mutiert mit <i>PauI</i> -Restriktionsschnittstelle)	5' AAGCGATTCTAGCGCGCTTAAA 3'
Aminosäuresequenz	K A I L A R L N
<i>PpGRAS1</i> mRNA	5' AAGCGAUAUUGCGCGGCUCAA 3'
ppt-miR171a	3' UACACUAUAACCGCGCCGAGU 5'
ppt-miR171b	3' ACACUAUAACCGCGCCGAGUU 5'
<i>PpmGRAS1</i> mRNA (mutiert)	5' AAGCGAUUCUAGCGCGCUUAAA 3'
Aminosäuresequenz	K A I L A R L N
<i>PpGRAS2/PpmGRAS2</i>	
Aminosäuresequenz	H V V L T R L N
<i>PpGRAS2</i> DNA	5' ATGTGGTGTGACGCGGCTCAA 3'
<i>PpmGRAS2</i> DNA (mutiert mit <i>HpaI</i> -Restriktionsschnittstelle)	5' ACGTAGTGTTAACTCGACTGAA 3'
Aminosäuresequenz	H V V L T R L N
<i>PpGRAS2</i> mRNA	5' AUGUGGUGUUGACGCGGCUCAA 3'
ppt-miR171a	3' UACACUAUAACCGCGCCGAGU 5'
ppt-miR171b	3' ACACUAUAACCGCGCCGAGUU 5'
<i>PpmGRAS2</i> mRNA (mutiert)	5' ACGUAGUGUUAACUCGACUGAA 3'
Aminosäuresequenz	H V V L T R L N

Ausgetauschte Basen in der ppt-miR171-Bindestelle sind fett hervorgehoben. X: Fehlpaarung; |: Basenpaarung; :: G-U-Basenpaarung

3.2.2 Klonierung der Vektoren p*PpGRAS1-GUS*, p*PpmGRAS1-GUS* und p*PpGRAS2-GUS*, p*PpmGRAS2-GUS*

Ausgehend von den zuvor in pJET1.2 klonierten natürlichen und ppt-miR171-resistenten Varianten von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* wurden die GUS-Konstrukte kloniert, die anschließend zur Generierung von *PpGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS1-GUS*-Linien bzw. *PpGRAS2*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien eingesetzt wurden.

Im ersten Schritt wurde dafür die CDS des GUS-Gens (*uidA*) von dem Vektor pHSP-GUS (Saidi *et al.* 2005) amplifiziert und zurück in den Vektor pHSP-GUS kloniert (Abbildung 14, Schritt 1). Dabei wurde durch zwei stille Punktmutationen im Vorwärtsprimer eine *EagI*-Schnittstelle in die GUS-CDS eingeführt. Die

klonierte GUS-CDS wurde zur Überprüfung mit dem Primer #1024 sequenziert. Allerdings wurde hierbei der 3'-Bereich der GUS-CDS nicht ganz abgedeckt. Es wurde ein Plasmid mit fehlerfreier Sequenz des 5'-Bereichs für die nächsten Klonierungsschritte verwendet. Im zweiten Schritt wurden 1534 bp bzw. 1413 bp große 3'-UTR-Bereiche von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* von genomischer Wt-DNA amplifiziert und jeweils in das zuvor klonierte GUS-Konstrukt eingefügt (Abbildung 14, Schritt 2). Bei diesem Schritt wurde die ursprüngliche Expressionskassette aus pHSP-GUS entfernt. Die entstandenen Konstrukte wurden *pGUS-PpGRAS1-3'UTR* und *pGUS-PpGRAS2-3'UTR* genannt. Die 3'-UTR-Bereiche wurden mit den zur Amplifikation verwendeten Primern sequenziert und Plasmide mit korrekten Sequenzen wurden für die nächsten Schritte verwendet.

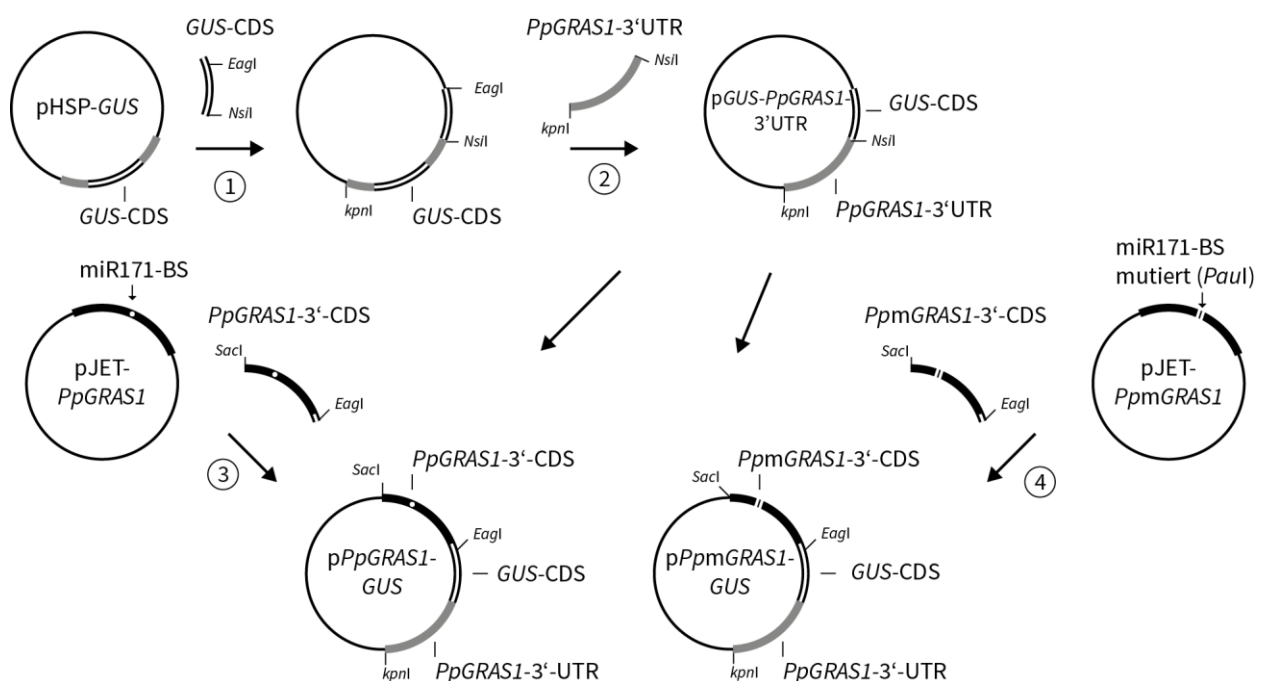


Abbildung 14: Klonierungsstrategie zur Herstellung der *pPpGRAS1/2-GUS* und *pPpmGRAS1/2-GUS*-Konstrukte am Beispiel von *PpGRAS1*

1) Amplifikation der GUS-CDS mit den Primern #1586 und #1587 von pHSP-GUS und Klonierung über *EagI* und *NsiI* in pHSP-GUS. Die *EagI*-Restriktionsschnittstelle befindet sich in der GUS-CDS und wurde durch stille Mutationen im Vorwärtsprimer #1586 eingeführt.

2) Amplifikation des 3'-UTR-Bereichs von *PpGRAS1* mit den Primern #1580 und #1581 von genomischer Wt-DNA und Klonierung über *NsiI* und *KpnI* hinter die zuvor klonierte GUS-CDS.

3) Amplifikation der *PpGRAS1-3'-CDS* mit den Primern #1578 und #1579 von pJET-*PpGRAS1* und Klonierung über *SacI* und *EagI* in *pGUS-PpGRAS1-3'UTR*. ppt-miR171-Bindestelle (miR171-BS).

4) Amplifikation der *PpmGRAS1-3'-CDS* mit den Primern #1578 und #1579 von pJET-*PpGRAS1* und Klonierung über *SacI* und *EagI* in *pGUS-PpGRAS1-3'UTR*. ppt-miR171-Bindestelle (miR171-BS).

Die Klonierung der Plasmide *pPpGRAS2-GUS* und *pPpmGRAS2-GUS* erfolgte analog zur Klonierung der *PpGRAS1*-Konstrukte. Die Amplifikation des 3'-UTR-Bereichs von *PpGRAS2* erfolgte dabei mit den Primern #1584 und #1585 und die Amplifikation der *PpGRAS2-3'-CDS* und *PpmGRAS2-3'-CDS* mit den Primern #1582 und #1583.

Im letzten Schritt wurden 1476 bp bzw. 1383 bp große Fragmente vor dem Stopcodon der *PpGRAS1*-CDS bzw. der *PpGRAS2*-CDS amplifiziert. Dies erfolgte für beide Gene von Templates in zwei Varianten: den natürlichen CDS in pJET-*PpGRAS1* und pJET-*PpGRAS2* und den CDS mit mutierter miRNA-Bindestelle in pJET-*PpmGRAS1* und pJET-*PpmGRAS2* (Abbildung 14, Schritt 3 und 4). Die Rückwärtsprimer beinhalteten dabei die ersten 12 bp der GUS-CDS mit der *EagI*-Restriktionsschnittstelle. Die vier PCR-Produkte wurden über die *EagI*-Schnittstelle mit der GUS-CDS in pGUS-*PpGRAS1*-3'UTR bzw. pGUS-*PpGRAS2*-3'UTR kloniert. Die Sequenzen der *PpGRAS1/2*-GUS-Fusionsstellen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Zur Überprüfung wurden die klonierten CDS-Fragmente sequenziert (Primern #1024 und #1602 sowie #1366 für die *PpGRAS1/ PpmGRAS1*-CDS und #1368 für die *PpGRAS2/ PpmGRAS2*-CDS). Es konnten für alle Konstrukte Plasmide mit korrekten Sequenzierungsergebnissen gewonnen werden.

Tabelle 8: Sequenzen der *PpGRAS1/2*-GUS-Fusionsstellen und kodierte Aminosäuresequenz

PpGRAS1-GUS

CDS mit Stopcodon	...TCTGCTGA
Aminosäuresequenz	...A S S W I C M V R P V
GUS-Fusionsstelle	...GCGTCCTCGTGGATCTGCATGGTCCGGCCGGTAGAAACCCCAACCCGTG...
Restriktionsschnittstelle	<i>EagI</i>

PpGRAS2-GUS

CDS mit Stopcodon	...CGGGCGTGA
Aminosäuresequenz	...A S A W R A M V R P V
GUS-Fusionsstelle	...GCAAGCGCTTGGCGGGCGATGGTCCGGCCGGTAGAAACCCCAACCCGTG...
Restriktionsschnittstelle	<i>EagI</i>

Die GUS-CDS sind in Grau markiert; die stillen Punktmutationen sind fett hervorgehoben.

3.2.3 Etablierung von *PpGRAS1-GUS*- und *PpGRAS2-GUS*-Linien

Zur Untersuchung der natürlichen Expressionsdomänen von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* wurden *PpGRAS1*- und *PpGRAS2-GUS*-Linien generiert. Dafür wurden die *GUS*-Konstrukte mit *SacI* und *KpnI* aus den Vektoren p*PpGRAS1-GUS* und p*PpGRAS2-GUS* ausgeschnitten (Abbildung 14) und in *P. patens* Wt-Protoplasten transformiert. Die *GUS*-Konstrukte enthalten auch die flankierenden Bereiche zur Integration der *GUS*-CDS durch homologe Rekombination in die endogenen Loci von *PpGRAS1* und *PpGRAS2*. Da die *GUS*-Konstrukte keine Selektionskassetten enthalten, wurden sie zusammen mit einem zirkulären Plasmid, das eine *nptII*-Selektionskassette enthält, in äquimolarem Verhältnis transformiert (pBSNNEV, Egener *et al.* (2002)). Zellen, die während der Transformation die DNA des zirkulären Plasmids aufgenommen haben, können auch die DNA der *GUS*-Konstrukte aufnehmen. Anhand der Antibiotikumresistenz, die durch die Selektionskassette des zirkulären Plasmids vermittelt wird, können diese transformierten Zellen selektioniert werden. Anschließend kann durch PCRs überprüft werden, ob die *GUS*-Konstrukte ebenfalls aufgenommen und in das Genom durch homologe Rekombination korrekt

integriert wurden. Das zirkuläre Plasmid wird dabei sehr selten in das Genom integriert und geht ohne Selektionsdruck verloren (Muren *et al.* 2009).

Von transgene Linien, die das *PpGRAS1-GUS*-Konstrukt enthalten, konnten für den Nachweis der 3'-Integrationsstelle des *PpGRAS1-GUS*-Konstrukt keine PCR-Produkte gewonnen werden (Anhang Abb. 6). Eine anschließende Sequenzierung des vollständigen *PpGRAS1-GUS*-Konstrukts zeigte, dass ein 370 bp großes Fragment der GUS-CDS vor dem Stopcodon während der Klonierung des Vektors *pPpGRAS1-GUS* deletiert wurde (Anhang Abb. 6, A). Durch diese Deletion ist das GUS-Reporterkonstrukt funktionslos geworden und kann nicht mehr zur Bestimmung von Expressionsdomänen verwendet werden. Daher wird auf diese Linien im Folgenden nicht weiter eingegangen.

Neun potenzielle *PpGRAS2-GUS*-Linien konnten isoliert werden, bei denen sich ein ca. 470 bp großer Bereich um das *PpGRAS2*-Stopcodon per PCR nicht von gDNA wie im Wt amplifizieren lässt (Abbildung 15, A und B). Dies weist darauf hin, dass am betreffenden Locus die GUS-CDS integriert sein könnte und sich daher nur ein größerer Bereich per PCR amplifizieren lässt. Um zu überprüfen, ob die GUS-CDS korrekt anstelle des Stopcodons integriert ist, wurde der 5'- und 3'-Integrationsbereich in der gDNA per PCR nachgewiesen (Abbildung 15, A, C und D). In vier transgenen Linien konnte eine korrekte GUS-CDS-Integration nachgewiesen werden.

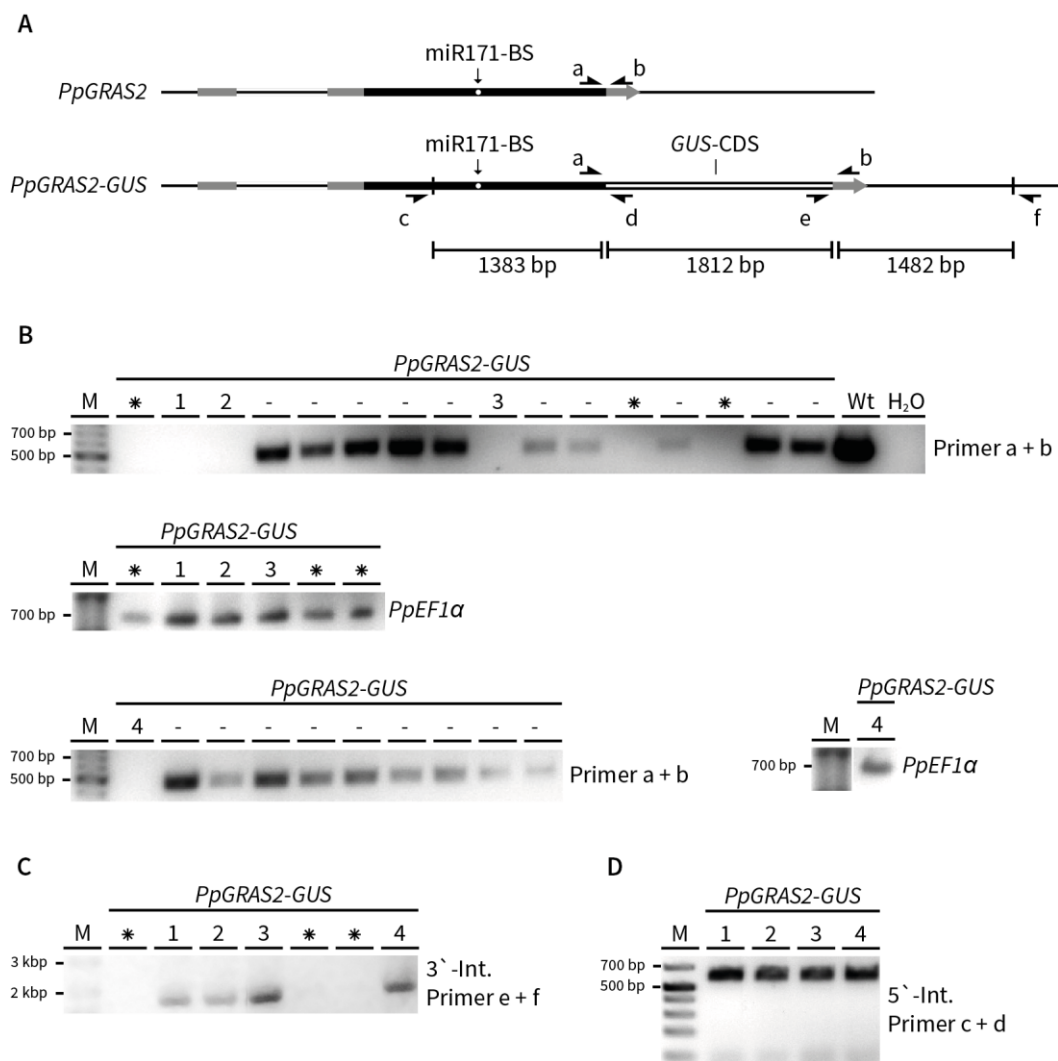


Abbildung 15: Identifizierung transgener *PpGRAS2-GUS*-Fusionslinien

A) Übersicht über die genomischen Loci von *PpGRAS2* (Wt) und *PpGRAS2-GUS*. Angegeben sind die Größen der *GUS*-CDS und der flankierenden homologen Regionen, über die die *GUS*-CDS anstelle des *PpGRAS2*-Stopcodons eingeführt wurde. a – f: Primerpositionen zur Identifizierung von *PpGRAS2-GUS*-Linien. Schwarz: CDS; Grau: 5'UTR und 3'UTR.

B) PCR von gDNA mit den Primern a und b (#1371 und #A4), die die *GUS*-Integrationsstelle am 3'-Ende der *PpGRAS2*-CDS umfassen. Von Linien, die kein Wt-PCR-Produkt aufwiesen, sind jeweils die gDNA Positivkontrollen gezeigt.

C) und **D)** Nachweis der 3'-Integration (3'-Int.) und 5'-Integration (5'-Int.) des *GUS*-Fusionskonstruktes per PCR von gDNA mit den Primerpaaren e und f (#1754 und #A16) sowie c und d (#1753 und #1367).

Wt: Kontroll-PCR von Wt-DNA; *PpEF1α*: Positivkontrolle für gDNA (Primer #B52 und #B53); (*): positive Linien, auf die im Folgenden nicht weiter eingegangen wird; H₂O: Kontroll-Reaktion ohne gDNA; M: DNA-Größenmarker.

3.2.4 Etablierung von *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien

Zur Untersuchung der Expressionsdomänen von ppt-miR171-unbeeinflussten *PpmGRAS1* und *PpmGRAS2* wurden *PpmGRAS1*- und *PpmGRAS2*-GUS-Linien generiert. Dafür wurden die GUS-Konstrukte ebenfalls mit *SacI* und *KpnI* aus den Vektoren *pPpmGRAS1-GUS* und *pPpmGRAS2-GUS* ausgeschnitten (Abbildung 14). Die Transformation der GUS-Konstrukte und die Selektion transgener Linien erfolgten nach demselben Prinzip wie zuvor bei der Generierung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2-GUS*-Linien.

Nach der Transformation in *P. patens* konnten fünf potenzielle *PpmGRAS1-GUS*-Linien isoliert werden, bei denen sich per PCR mit Primern, die den Bereich um das *PpGRAS1*-Stopcodon umfassen, anstelle eines Wt-Fragments nur ein größeres Fragment amplifizieren ließ (Abbildung 16, A und B). Da das *PpmGRAS1-GUS*-Konstrukt dieselbe GUS-CDS wie das *PpGRAS1-GUS*-Konstrukt enthält, ist auch hier die GUS-CDS um 370 bp verkürzt. Dennoch führt die Integration des verkürzten *PpmGRAS1-GUS*-Konstrukts durch ein Stopcodon 7 nt hinter dem ursprünglichen GUS-Stopcodon und im Leseraster von *PpGRAS1* zu einem offenen Leserahmen (OLR). Dieser enthält die vollständige *PpmGRAS1*-CDS, gefolgt von dem endogenen *PpGRAS1*-Terminator (Abbildung 16, A). Das resultierende Genprodukt ist ein Fusionsprotein aus *PpGRAS1* mit einem C-terminalem und funktionslosen GUS-Proteinfragment. In diesen Linien ließ sich per PCR eine korrekte 5'-Integration am endogenen *PpGRAS1*-Locus nachweisen (Abbildung 16, C). Die Untersuchung der 3'-Insertionsstelle per PCR zeigte einen sonst intakten genomischen Locus (Abbildung 16, D). Der nachfolgende genomische Bereich ist somit durch die Integration des Konstruktes unbeeinflusst. Die PCR-Produkte der amplifizierten ppt-miR171 Bindestelle zweier Linien konnten mit dem Restriktionsenzym *PauI* verdaut werden (Abbildung 16, E). Die Linien *PpmGRAS1-GUS*-1 und -2 enthalten somit anstelle der natürlichen eine mutierte ppt-miR171-Bindestelle und einen OLR, der um die verkürzte GUS-CDS C-terminal erweitert ist.

Analog dazu konnten sieben potenzielle *PpmGRAS2-GUS*-Linien isoliert werden (Abbildung 17, A bis C). Für sechs dieser Linien konnte per PCR eine korrekte 5'- und 3'-Integration der GUS-CDS am endogenen *PpGRAS2*-Locus nachgewiesen werden (Abbildung 17, C). Die PCR-Produkte der amplifizierten ppt-miR171-Bindestellen von den Linien *PpmGRAS2-GUS*-1 und *PpmGRAS2-GUS*-2 ließ sich mit *HpaI* verdauen (Abbildung 17, D). Somit konnten zwei Linien isoliert werden, die anstelle des endogenen *PpGRAS2*-Gens das ppt-miR171-resistente *PpmGRAS2-GUS*-Fusionskonstrukt enthalten.

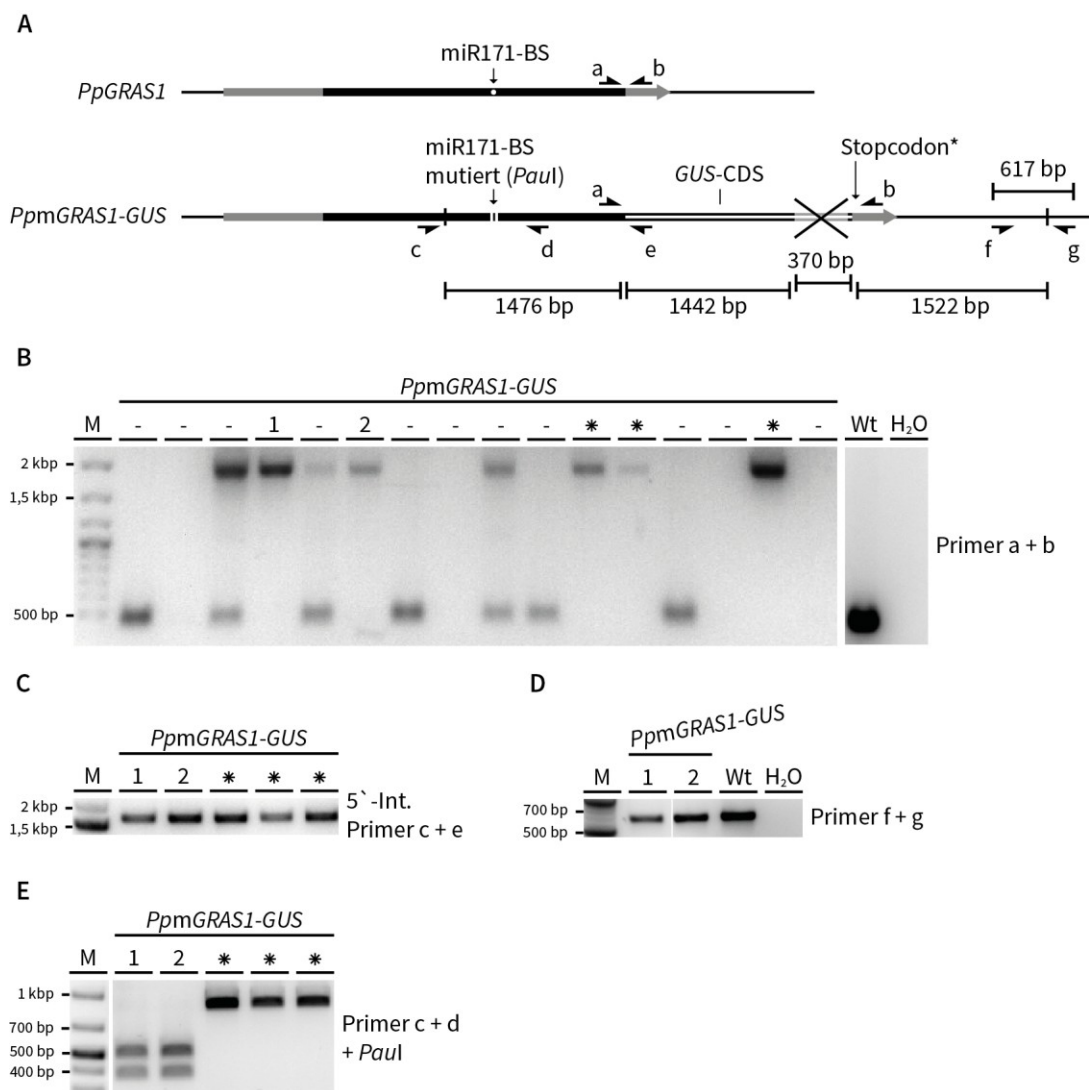


Abbildung 16: Identifizierung transgener *PpmGRAS1-GUS*-Fusionslinien

A) Übersicht über die genomischen Loci von *PpGRAS1* (Wt) und *PpmGRAS1-GUS*. Angegeben sind die Größen der *GUS*-CDS mit fehlendem Fragment und der flankierenden homologen Regionen, über die die *GUS*-CDS anstelle des *PpGRAS1*-Stopcodons eingeführt wurde. (*) Stopcodon des neuen OLR. a – g: Primerpositionen zur Identifizierung von *PpmGRAS1-GUS*-Linien. Schwarz: CDS; Grau: 5'UTR und 3'UTR.

B) PCR von gDNA mit den Primern a + b (#1358 und #A3), die die *GUS*-Integrationsstelle am 3'-Ende der *PpmGRAS1*-CDS umfassen.

C) Nachweis der 5'-Integration (5'-Int.) des *GUS*-Fusionskonstruktes in *PpGRAS1* per PCR von gDNA mit den Primern c + e (#1750 und #A17).

D) Nachweis der intakten genomischen 3'-Insertionsstelle des *GUS*-Fusionskonstruktes in *PpGRAS1* per PCR von gDNA mit den Primern f + g (#A20 und #A1751).

E) Nachweis der mutierten ppt-miR171-Bindestelle in *PpmGRAS1-GUS* durch den Verdau mit *Paul* von PCR-Produkten mit den Primern c + d (#1750 und #A5), die die ppt-miR171-Bindestelle umfassen.

M: DNA-Größenmarker.

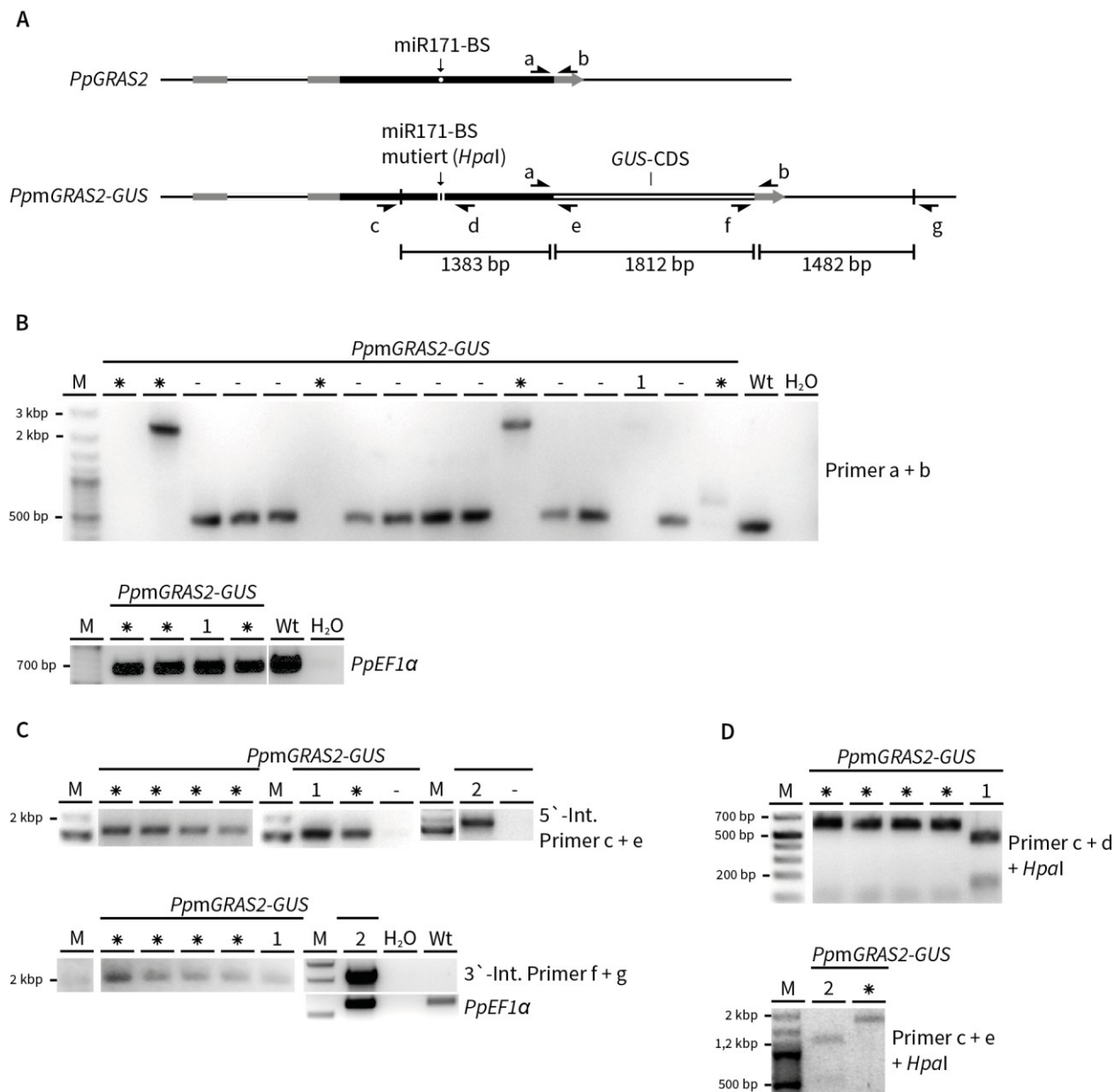


Abbildung 17: Identifizierung transgener *PpmGRAS2-GUS*-Fusionslinien

A) Übersicht über die genomischen Loci von *PpGRAS2* (Wt) und *PpmGRAS2-GUS*. Angegeben sind die Größen der *GUS*-CDS und der flankierenden homologen Regionen, über die die *GUS*-CDS anstelle des *PpGRAS2*-Stopcodons eingeführt wurde. a – g: Primerpositionen zur Identifizierung von *PpmGRAS2-GUS*-Linien. Schwarz: CDS; Grau: 5'UTR und 3'UTR.

B) PCR von gDNA mit den Primern a + b (#1371 und #A4), die die *GUS*-Integrationsstelle am 3'-Ende der *PpGRAS2*-CDS umfassen. Nur von Linien, die kein Wt- oder vergrößertes PCR-Produkt aufwiesen, sind darunter die gDNA-Positivkontrollen gezeigt.

C) Oben: Nachweis der 5'-Integration (5'-Int.) des *GUS*-Fusionskonstruktes in *PpGRAS2* per PCR von gDNA mit den Primern c + e (#1753 und #1367). Die Linie *PpmGRAS2-GUS-2* wurde direkt durch den Nachweis der 5'-Integration identifiziert. Unten: Nachweis der 3'-Integration (3'-Int.) analog zur 5'-Integration mit den Primern f + g (#1754 und #A16).

D) Nachweis der mutierten ppt-miR171-Bindestelle in *PpmGRAS2-GUS*-Linien durch den Verdau mit *Paul* von PCR-Produkten mit den Primern c + d (#1753 und #1367) und c + e (#1753 und #1367), die die ppt-miR171-Bindestelle umfassen.

Wt: Kontroll-PCR von Wt-DNA; *PpEF1α*: Positivkontrolle für gDNA (Primer #B52 und #B53); (*): positive Linien, auf die im Folgenden nicht weiter eingegangen wird; H₂O: Kontroll-Reaktion ohne gDNA; M: DNA-Größenmarker.

3.2.5 *PpGRAS2* wird in Rhizoiden, achselständigen Haaren und Primordien der Phylloide unabhängig von der ppt-miR171 exprimiert

Die *PpGRAS2-GUS*-Linien exprimieren *PpGRAS2-GUS*-Fusionsproteine unter der Kontrolle des natürlichen *PpGRAS2*-Promotors. Um die *PpGRAS2*-Expressionsdomäne zu bestimmen, wurde die GUS-Aktivität in drei unabhängigen *PpGRAS2-GUS*-Linien zu verschiedenen Entwicklungsstadien des Gametophyten untersucht. Die Expression von *PpGRAS2* im Wt kann ebenso wie *PpGRAS2-GUS* posttranskriptionell durch die ppt-miR171 negativ reguliert werden. Dies ist dann der Fall, wenn *PpGRAS2* bzw. *PpGRAS2-GUS* in einem Bereich transkribiert wird, in dem auch die ppt-miR171 exprimiert ist. Durch eine ppt-miR171-vermittelte Spaltung von *PpGRAS2-GUS* kann die Expressionsdomäne von *PpGRAS2-GUS* verkleinert werden.

In *A. thaliana* überlappt sich die Expressionsdomäne der ath-miR171 weitestgehend mit dem Bereich, in dem auch deren Zielgene, *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV*, transkribiert werden (Wang, Mai *et al.* 2010). Dies könnte in *P. patens* auch für die Expression der ppt-miR171 und die Transkription von *PpGRAS2* bzw. *PpGRAS2-GUS* zutreffen. Um zu untersuchen, ob die ppt-miR171 die Expressionsdomäne von *PpGRAS2* festlegt, wurde GUS-Aktivität in den zwei *PpmGRAS2-GUS*-Linien untersucht und die Expressionsdomäne von *PpmGRAS2-GUS* mit der von drei unabhängigen *PpGRAS2-GUS*-Linien verglichen. Wird dabei eine Abweichung festgestellt, die sich mit der Expressionsdomäne der ppt-miR171 deckt, wird die *PpGRAS2*-Expressionsdomäne durch die ppt-miR171-vermittelte Spaltung begrenzt.

Im Protonema und den Knospen der *PpGRAS2-GUS*-Linien konnte keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden, mit Ausnahme der Linie *PpGRAS2-GUS-2*, die in apikalen Chloronemazellen GUS-Aktivität zeigt (Abbildung 18, A). Die *PpmGRAS2-GUS*-Linien weisen keine von den *PpGRAS2-GUS*-Linien abweichende oder verstärkte GUS-Aktivität im Protonema und jungen Knospen auf (Abbildung 18, A unten). Die Rhizoide und der Apex junger Gametophoren der Linien *PpGRAS2-GUS-1* und *-2* weisen GUS-Aktivität auf. Im Gegensatz dazu konnte in den *PpmGRAS2-GUS*-Linien eine vergleichbare GUS-Aktivität nur in den Rhizoiden nachgewiesen werden (Abbildung 18, B und C). Im Apex älterer Gametophoren konnte in allen Linien, bis auf *PpmGRAS2-GUS-2* eine vergleichbare GUS-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 18, D). Zusammengefasst wird *PpGRAS2-GUS* in den Rhizoiden und in achselständigen Haaren im Apex der Gametophoren exprimiert. Erstaunlicherweise weicht die Expressionsdomäne des ppt-miR171-resistentem *PpmGRAS2-GUS* nicht von *PpGRAS2-GUS* ab, obwohl die ppt-miR171a in denselben Geweben wie *PpGRAS2-GUS* exprimiert wird. Die Expressionsdomäne von *PpGRAS2* scheint somit nicht von der ppt-miR171a reguliert zu sein.

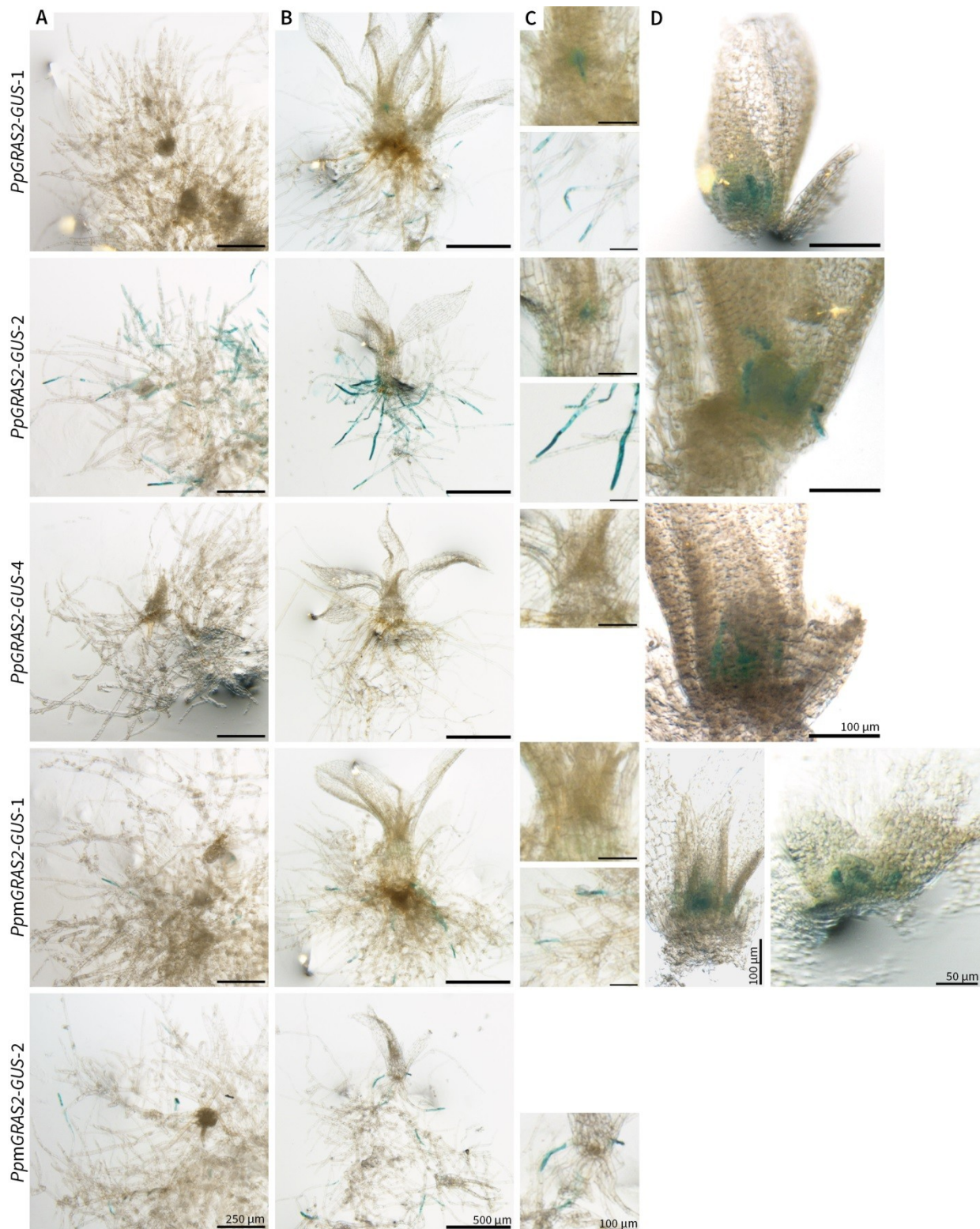


Abbildung 18: Analyse der *PpGRAS2*- und *PpmGRAS2*-Expressionsdomänen in Gametophyten

GUS-Färbung (über Nacht in X-Gluc inkubiert) von:

A) Protonema-Gewebe mit Knospen; **B)** Protonema-Gewebe mit jungen Gametophoren; **C)** Ausschnittsvergrößerungen von B); **D)** apikaler Teil der Sprossachse. Die Größenbalken sind spaltenweise jeweils identisch.

Die GUS-Aktivität wurde weiterhin in den Gametangien und Sporophyten derselben *PpGRAS2*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien untersucht und miteinander verglichen. Es konnte keine GUS-Aktivität in den Gametangien oder in den älteren Sporophyten der *PpGRAS2-GUS*-Linien nachgewiesen werden (Abbildung 19, A). Nur in der Seta eines einzigen Sporophyten, in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der Linie *PpGRAS2-GUS-3*, konnte deutliche GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Weitere Sporophyten der *PpGRAS2-GUS*-Linien, die sich im selben Entwicklungsstadium befanden, wurden nicht beobachtet. In der *PpmGRAS2-GUS-1* Linie konnte keine GUS-Aktivität in Gametangien oder Sporophyten nachgewiesen werden (Abbildung 19, B). Im Gegensatz dazu konnte in der *PpmGRAS2-GUS-2* Linie GUS-Aktivität in nur einem Antheridium nachgewiesen werden. Zudem konnte in derselben Linie in der Seta eines einzigen älteren Sporophyten GUS-Aktivität nachgewiesen werden, die im Gegensatz zur Linie *PpGRAS2-GUS-3* nicht in der Seta eines heranreifenden Sporophyten nachgewiesen wurde. *PpGRAS2* wird daher vermutlich nur zu bestimmten Zeitpunkten in den Gametangien exprimiert. Eine Expression des GUS-Reportergens in der Seta konnte lediglich in zwei Fällen und zu verschiedenen Entwicklungsstadien des Sporophyten beobachtet werden. Ein ähnliches Expressionsmuster weist *PpMIR171b* auf. Auch hier konnte in zwei Fällen eine Expression in der Seta nachgewiesen werden.

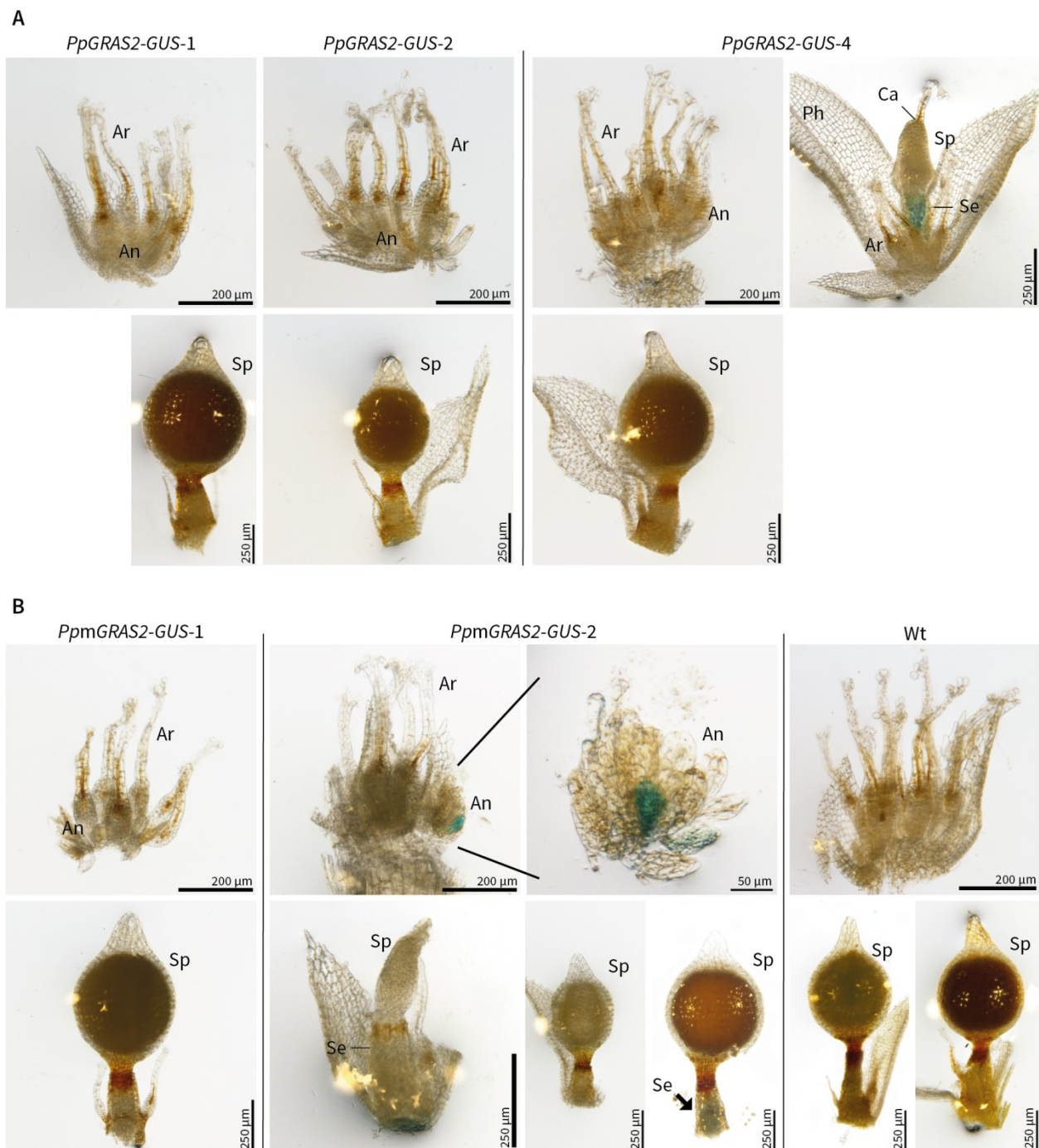


Abbildung 19: Histochemische Analyse der *PpGRAS2-GUS* und *PpmGRAS2-GUS*-Expressionsdomänen in Gametangien und Sporophyten sowie phänotypische Untersuchung von *PpmGRAS2-GUS*-Linien im Vergleich zum Wt

Histochemische GUS-Färbung von Gametangien und Sporophyten (über Nacht in X-Gluc inkubiert).

A) *PpGRAS2-GUS*-Linien mit Gametangien in der oberen Reihe sowie Sporophyten in der unteren Reihe.

B) *PpmGRAS2-GUS*-Linien mit Gametangien in (oberer Reihe) und Sporophyten (unterer Reihe; für *PpmGRAS2-GUS-2* in verschiedenen Entwicklungsstufen) sowie der Wt wie in Abbildung 20, C zum Vergleich.

Antheridien (An), Archegonien (Ar), Sporophyten (Sp), Seta (Se) und Calyptra (Ca).

3.3 Die Gametophyten- und Sporophytenentwicklung von *PpmGRAS1-GUS* und *PpmGRAS2-GUS*-Linien ist nicht beeinträchtigt

Um zu untersuchen, ob die Entkopplung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Expression von der Regulierung der ppt-miR171 einen Einfluss auf die Entwicklung des Gametophyten oder Sporophyten hat, wurden gleiche Mengen von Protonema aus Flüssigkulturen des Wt und der *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien parallel kultiviert und miteinander verglichen. Sowohl die Entwicklung des Protonemas der *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien (Abbildung 20, A), als auch die Entwicklung der Gametophoren (Abbildung 20, B) unterscheidet sich nicht vom Wt. Die Entwicklung der Gametangien und der Sporophyten der *PpmGRAS1-GUS*-Linien unterscheidet sich ebenfalls nicht vom Wt oder von den *PpGRAS2*- und den *PpmGRAS2-GUS*-Linien, in denen die GUS-Aktivität untersucht wurde (Abbildung 19, B und Abbildung 20, C). Eine Regulierung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Expression durch die ppt-miR171 scheint daher nicht für eine normale Entwicklung des Gametophyten oder des Sporophyten notwendig zu sein.

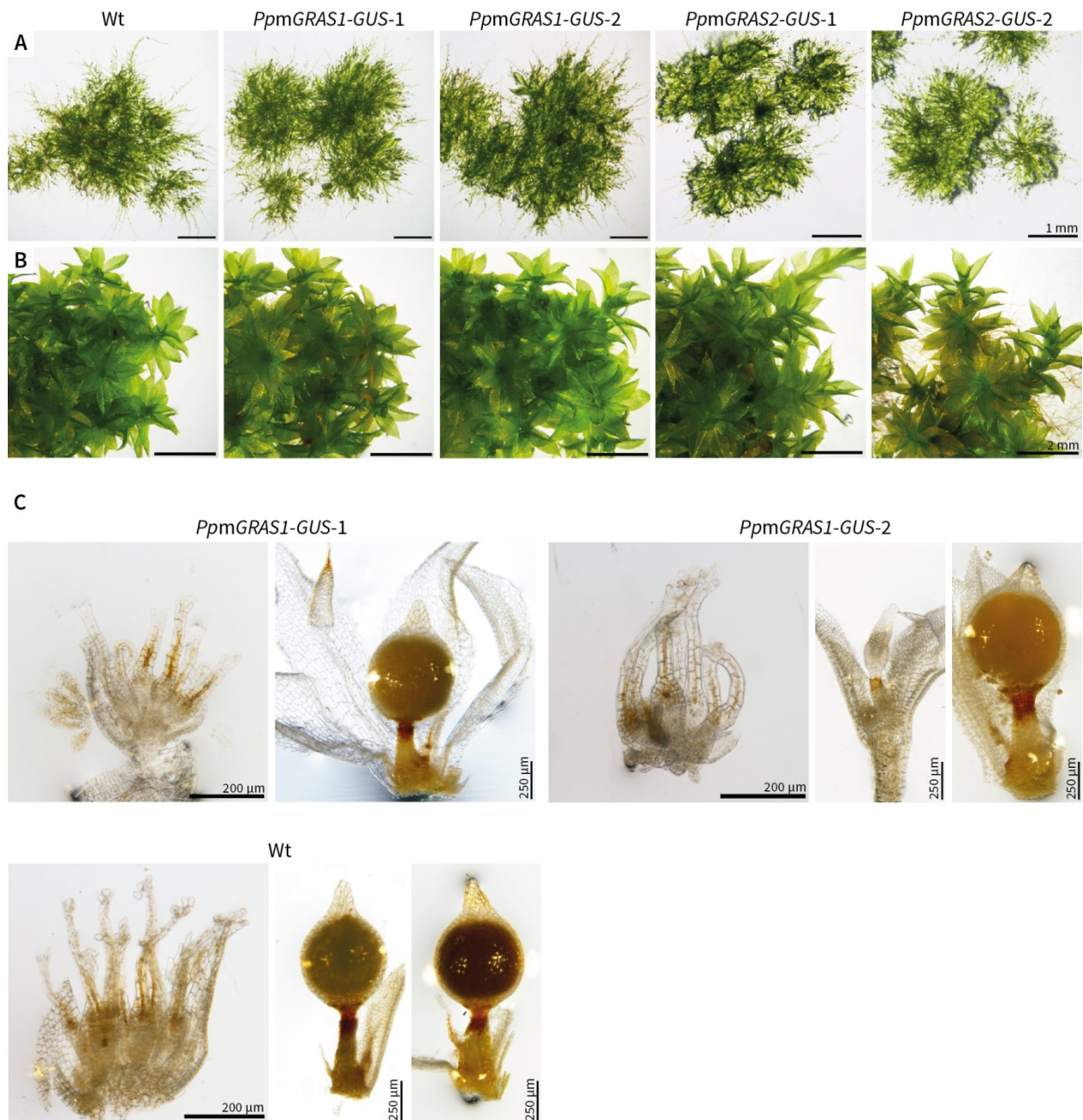


Abbildung 20: Phänotypische Untersuchung der Entwicklung des Gametophyten von ppt-miR171-resistenten *PpmGRAS1-GUS* bzw. *PpmGRAS2-GUS*-Linien sowie von Gametangien und Sporophyten der *PpmGRAS1-GUS*-Linien im Vergleich zum Wt

A) Protonema mit jungen Gametophoren nach 10 Tagen Kultivierung.

B) ausgewachsene Gametophoren nach 50 Tagen Kultivierung.

C) Gametangien und Sporophyten der *PpmGRAS1-GUS*-Linien im Vergleich zum Wt. Zu Vergleichszwecken mit den Gametangien und Sporophyten der *PpmGRAS2*-Linien in Abbildung 19, C wurden die Gametangien und Sporophyten ebenfalls in einer Ethanolreihe entfärbt.

Die Größenbalken in A) und B) geben zeilenweise jeweils die gleiche Länge wieder.

3.4 Analyse der *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpression

Um zu untersuchen, ob eine verstärkte Expression der miRNA und eine damit einhergehende Verringerung der *PpGRAS1/2*-Expression einen Einfluss auf die Entwicklung von *P. patens* hat, wurden ppt-miR171a- und ppt-miR171b-Überexpressionslinien generiert und deren Entwicklung untersucht. Der *ACTIN1*-Promoter aus *Oryza sativa* (*OsACT1*-Promoter) wurde bereits als heterologer Promoter für *P. patens* getestet und weist eine stärkere Aktivität als der *CaMV35S*-Promoter auf (Horstmann *et al.* 2004). Dementsprechend wurde der *OsACT1*-Promoter in Kombination mit dem *nos*-Terminator zur Herstellung eines neuen Überexpressionsvektors verwendet, der zur konstitutiven Überexpression der beiden ppt-miR171 Varianten eingesetzt wurde.

3.4.1 Klonierung des Überexpressionsvektors *pPOsA1n*

Der *OsACT1*-Promotor wurde aus dem Vektor *pluc-Act1* (Horstmann, Huether *et al.* 2004) per PCR amplifiziert und in den Vektor *mAV4-hpt-mcs* kloniert (Abbildung 21, Schritt 1). Das klonierte Fragment wurde zur Überprüfung mit dem Primer #1431 sequenziert und ein Plasmid mit fehlerfreier Sequenz für den nächsten Klonierungsschritt verwendet. Für die Erstellung des Überexpressionsvektors *pPOsA1* mit *nptII* oder *hpt* als Selektionskassetten (*pPOsA1n* bzw. *pPOsA1h*) wurde eine neue *multiple cloning site* (MCS) entworfen (Tabelle 9). Diese enthält 11 ausgewählte Restriktionsschnittstellen, die im finalen Vektor jeweils nur einmal vorhanden sind. Die Restriktionsschnittstellen wurden wenn nötig durch zusätzliche Basenpaare voneinander getrennt, um einen optimalen Doppolverdau an zwei benachbarten Restriktionsschnittstellen zu gewährleisten (in Tabelle 9 grau markiert). Die gesamte MCS enthält kein Startcodon in der Translationsrichtung. Die MCS wurde zwischen dem *OsACT1*-Promotor und dem *nos*-Terminator kloniert (Abbildung 21, Schritt 2). Der resultierende Vektor wurde *pPOsA1h* genannt. Die MCS wurde zur Kontrolle mit dem Primer #1538 sequenziert. Es konnte dabei ein Plasmid mit korrekter Sequenz identifiziert werden. Die entstandene, leere Expressionskassette des Vektors besteht somit aus dem *OsACT1*-Promotor, der MCS und einem Nopaline-Synthase (*nos*) Poly-A-Terminator. Im nächsten Schritt wurde die *hpt*-Selektionskassette durch die *nptII*-Selektionskassette des Plasmids *pBSNNNEV* (Egener, Granada *et al.* 2002) ausgetauscht (Abbildung 21, Schritt 3). Der resultierende Vektor wurde *pPOsA1n* genannt.

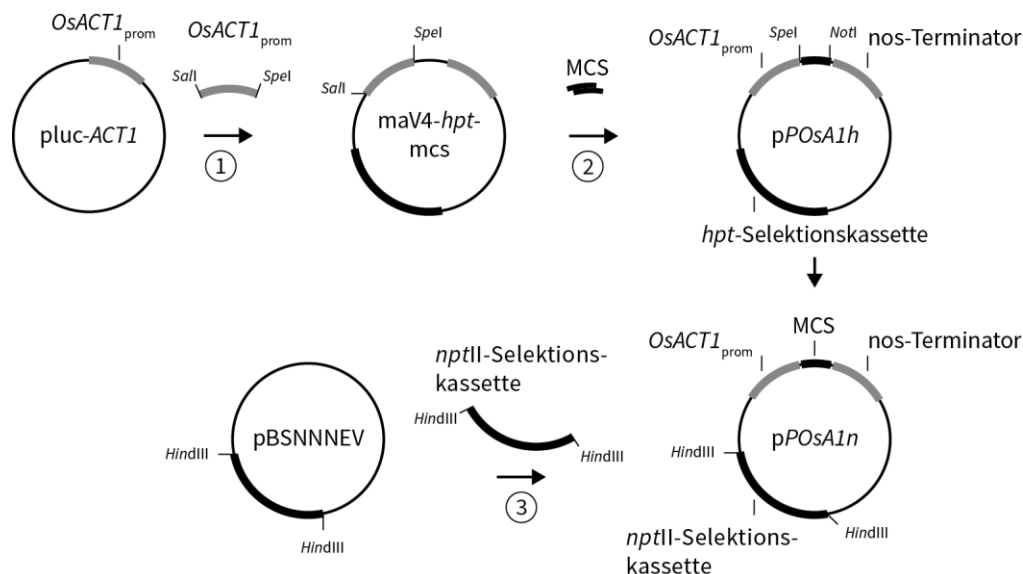


Abbildung 21: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Überexpressionsvektoren pPOsA1h und pPOsA1n

- 1) Amplifikation des *OsACT1*-Promotors mit den Primern #1431 und #1432 aus dem Vektor *pluc-Act1* (Horstmann, Huether *et al.* 2004) und Klonierung über *Sall* und *SpeI* in den Vektor *maV4-hpt-mcs*.
- 2) Zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide (#1559 und #1560) bilden hybridisiert die MCS mit *SpeI*- und *NotI*-kompatiblen Überhängen am 5'- bzw. am 3'-Ende. Die Klonierung erfolgte über *SpeI* und *NotI* in den Vektor *maV4-hpt-mcs*.
- 3) Austausch der Hygromycin-Resistenz-vermittelnden *hpt*-Selektionskassette durch die Geneticin-Resistenz-vermittelnde *nptII*-Selektionskassette über *HindIII*.

Tabelle 9: MCS der Überexpressionsvektoren pPOsA1n und pPOsA1h

Sequenz	1. Enzym			2. Enzym			Kompatible Enzyme
	Name	Alias	1. Überhang	Name	Alias	2. Überhang	
ACTAGT	<i>SpeI</i>	<i>BcuI</i>	5'-CTAG				<i>NheI, XbaI, XmaI</i>
GGTACC	<i>KpnI</i>		GTAC-3`	<i>Acc65I</i>		5'-GTAC	<i>BsrGI, AauI</i>
CCTGCAGG	<i>SbfI</i>	<i>SdaI</i>	TGCA-3`				
TGTACA	<i>BsrGI</i>	<i>AauI</i>	5'-GTAC				<i>Acc65I</i>
CAATTG	<i>MunI</i>	<i>MfeI</i>	5'-AATT				<i>EcoRI</i>
CCCGGG	<i>SmaI</i>		blunt	<i>XmaI</i>	<i>Cfr9I</i>	5'-CCGG	<i>AgeI, Kpn2I</i>
ACGCGT	<i>MluI</i>		5'-CGCG				<i>PauI, SgsI</i>
CGTCGACG	<i>SgrDI</i>		5'-TCGA	(<i>Sall</i>)		(5'-TCGA)	<i>Sall, XhoI</i>
GCGGCCGC	<i>NotI</i>		5'-GGCC				<i>EagI</i>

<i>Acc65I</i>			<i>XmaI</i>			<i>(Sall)</i>	
<i>SpeI</i>	<i>KpnI</i>	<i>SbfI</i>	<i>BsrGI</i>	<i>MunI</i>	<i>SmaI</i>	<i>MluI</i>	<i>SgrDI</i> <i>NotI</i>

ACTAGTGGTACCTACCTGCAGGATTGTACATTCAATTGATCCCGGGTACACGCGTAGTCGTCGACGTAGCGGCCGC

In der MCS-Sequenz sind zusätzliche Nukleotide zwischen den Restriktionsschnittstellen grau hervorgehoben. Das 1. und 2. Enzym erkennt jeweils die gleiche Restriktionsschnittstelle, generiert aber unterschiedliche Überhänge. Alias: Isoschizomere der Enzyme.

3.4.2 Klonierung der Überexpressionsvektoren *pPOsA1n-PpMIR171a* und *pPOsA1n-PpMIR171b*

Die Expression der Haarnadelstruktur von *AthMIR171a* ist ausreichend für die Bildung von reifer ath-miR171a *in vivo* (Parizotto, Dunoyer *et al.* 2004). Daher wurden als ppt-miR171a-codierende Sequenz ein 236 bp großes Fragment (MI0005688, miRBase-Annotation; Release 20) und als ppt-miR171b-codierende Sequenz ein 453 bp großes Fragment (MI0005689, miRBase-Annotation; Release 20) von genomischer Wt-DNA amplifiziert. Beide codieren die jeweiligen Haarnadelstrukturen. Die Fragmente wurden in *pPOsA1n* kloniert (Abbildung 22). Zur Überprüfung wurden die klonierten Fragmente mit dem Primer #1538 sequenziert. Die *in silico*-vorhergesagten Transkript-Sekundärstrukturen der klonierten Fragmente sind in Abbildung 23 dargestellt.

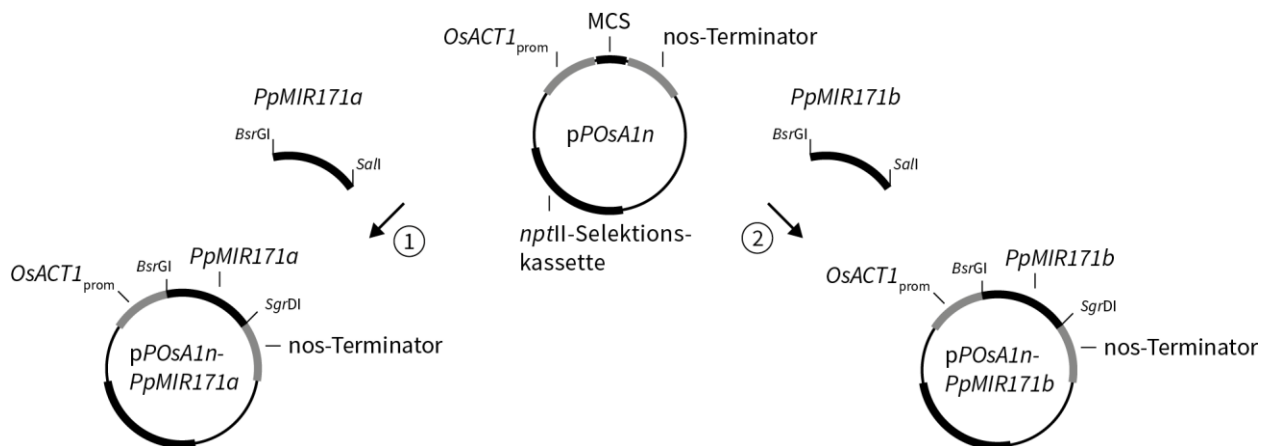


Abbildung 22: Klonierung der *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionsvektoren

- 1) Amplifikation der ppt-miR171a-Vorläufersequenz von gDNA mit den Primern #1574 und #1575 und Klonierung über *BsrGI* und *Sall* – kompatibel zu *SgrDI* – in *pPOsA1n*.
- 2) Amplifikation der ppt-miR171b-Vorläufersequenz von gDNA mit den Primern #1576 und #1577 und Klonierung über *BsrGI* und *Sall* in *pPOsA1n* – kompatibel zu *SgrDI* – in *pPOsA1n*.

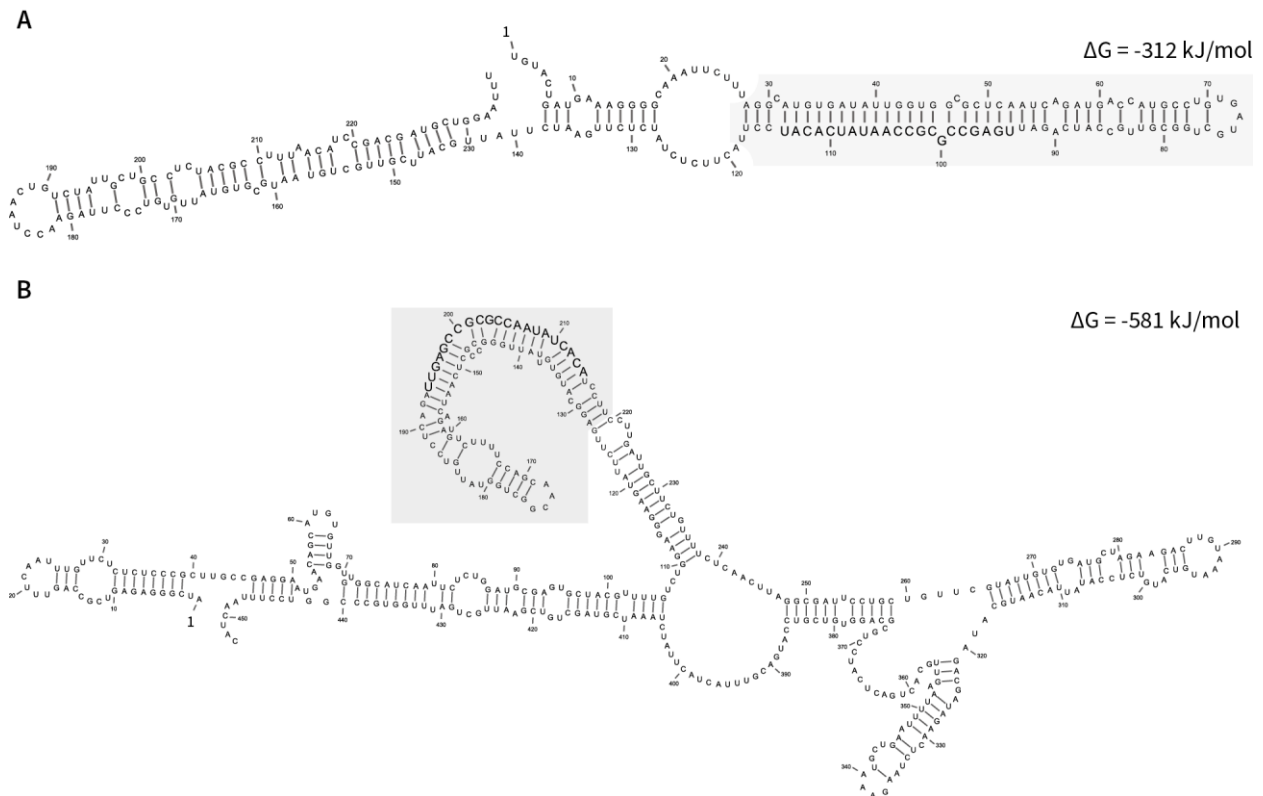


Abbildung 23: *In silico* Vorhersage der Transkript-Sekundärstrukturen der in *pPOsA1n* klonierten *PpMIR171*-Fragmente

A) RNA-Sekundärstruktur des klonierten *PpMIR171a*-Fragments.

B) RNA-Sekundärstruktur des klonierten *PpMIR171b*-Fragments.

Die Haarnadelstrukturen der miRNA-Vorläufer wurden jeweils in grau und die Sequenzen der reifen ppt-miR171a und ppt-miR171b in fett hervorgehoben (nach miRBase-Annotation; Release 20). Die minimale freie Energie der Sekundärstrukturen ist angegeben.

3.4.3 Etablierung von *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionslinien

Zur Generierung von *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionslinien wurden die Vektoren *pPOsA1n-PpMIR171a* und *pPOsA1n-PpMIR171b* mit *ScaI* geschnitten und in *P. patens* Wt transformiert.

Es konnten neun transgene Linien per PCR identifiziert werden, die das ppt-miR171a-Überexpressionskonstrukt enthalten (Abbildung 24, A und B). In einer dieser Linien, *OsACT1::PpMIR171a-1*, konnte mit einer ppt-miR171-Antisensesonde eine 36-fache Überexpression der ppt-miR171 im Vergleich zum Wt per Northern Blot nachgewiesen werden (Abbildung 24, C). Zudem konnten drei transgene Linien per PCR identifiziert werden, die das ppt-miR171b-Überexpressionskonstrukt enthalten (Abbildung 24, A und D). In allen drei Linien konnte eine Überexpression der ppt-miR171 nachgewiesen werden (Abbildung 24 E). Die Linien *OsACT1::PpMIR171a-1* und *-2* wiesen eine 8-fache bzw. 6-fache und die Linie *OsACT1::PpMIR171a-3* eine 16-fache Überexpression gegenüber dem Wt auf.

Sowohl in der *PpMIR171a*-, als auch in den *PpMIR171b*-Überexpressionslinien ist die Transkriptmenge von ungespaltenem *PpGRAS1* im Vergleich zum Wt deutlich reduziert (Abbildung 24, F). Dementspre-

chend haben auch *PpGRAS1*-Fragmente in der Größe des ppt-miR171 vermittelten 3'-Spaltprodukts aufgenommen. Das Verhältnis aus ungespaltener zu gespaltener *PpGRAS1*- bzw. *PpGRAS2*-Transkriptmenge kann als Maß für die Effizienz der ppt-miR171-vermittelten Spaltung herangezogen werden. Eine vermehrte Spaltung sollte zu einem kleineren Quotienten führen. Mit steigender ppt-miR171b-Menge in den *PpMIR171b*-Überexpressionslinien nimmt auch die ppt-miR171-vermittelte *PpGRAS1*-Spaltung zu. Dabei verringert sich der Quotient von 1,9 im Wt auf 0,7 bei 6-facher und auf 0,2 bzw. 0,3 bei 8 bis 16-facher ppt-miR171b-Überexpression. Durch eine höhere, 36-fache ppt-miR171-Überexpression lässt sich die *PpGRAS1*-Spaltung nicht weiter steigern. Das *PpGRAS2*-Transkript wird ebenso in *PpMIR171a*- und in *PpMIR171b*-Überexpressionslinien vermehrt gespalten (Abbildung 24, G). Aufgrund der Qualität des Blots ist das Verhältnis aus gespaltenem zu ungespaltenem Transkript nur für die *PpMIR171a*-Überexpressionslinie im Vergleich zum Wt angegeben.

Zusammengefasst können die pri-miRNAs beider *PpMIR171*-Gene, *PpMIR171a* und *PpMIR171b*, in funktionelle und reife miRNAs prozessiert werden, die sowohl *PpGRAS1*, als auch *PpGRAS2* spalten können. Die Spaltung von *PpGRAS1* erfolgt dabei bis zu einer Sättigung in Abhängigkeit der ppt-miR171-Expressionsstärke.

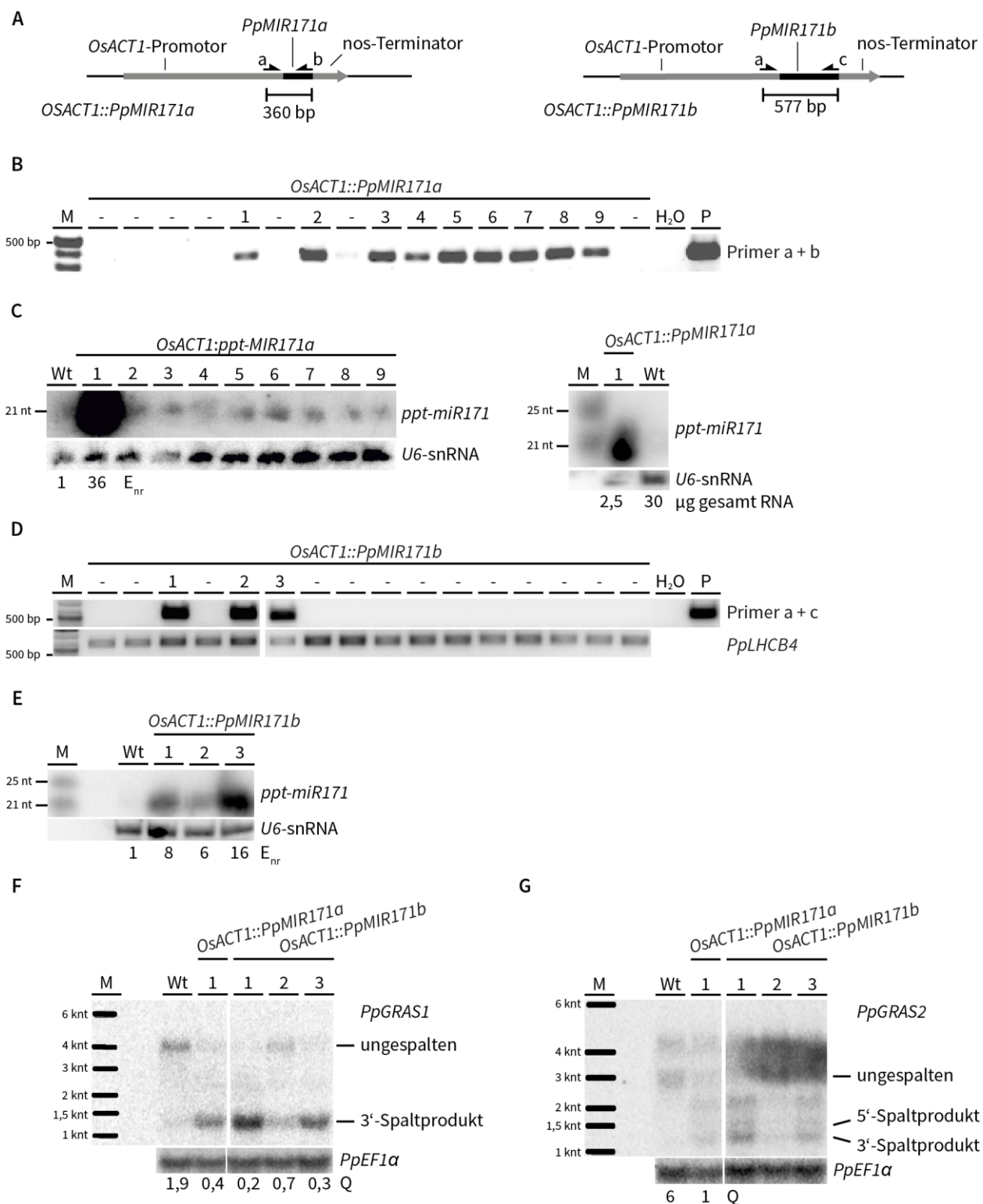


Abbildung 24: Identifizierung transgener *OsACT1::PpMIR171a* und *OsACT1::PpMIR171b*-Linien

A) Schematische Darstellung der genomischen Loci der *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionskonstrukte in *OsACT1::PpMIR171a* und *OsACT1::PpMIR171b*-Linien. a – c: Primerpositionen der PCRs in B) und D); die jeweiligen PCR-Produktgrößen sind angegeben.

B) PCR-Produkte der PCRs von gDNA zur Identifizierung von transgenen Linien, die das *PpMIR171a*-Überexpressionskonstrukt enthalten, mit dem Primerpaar a + b (#1538 und #1575). P: *OsACT1::PpMIR171a*-Plasmid als Positivkontrolle; M: DNA-Marker.

Abbildung 24; Identifizierung transgener *OsACT1::PpMIR171a* und *OsACT1::PpMIR171b*-Linien (Fortsetzung)

C) RNA-Blot zur Identifizierung der *PpMIR171a*-Überexpressionslinie und deren ppt-miR171-Expressionsstärke im Vergleich zum Wt. Für den linken Blot wurden 60 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Im rechten Blot ist *OsACT1::PpMIR171a-1* separat gezeigt mit geringeren Mengen an aufgetrennter Gesamt-RNA (in Mikrogramm angegeben). Für *OsACT1::PpMIR171a-1* wurde die Expressionsstärke der ppt-miR171 normalisiert zur *U6*-snRNA-Ladekontrolle und relativ zum Wt bestimmt (E_{nr}). M: RNA-Marker.

D) PCR-Produkte der PCRs zur Identifizierung von transgenen Linien, die das *PpMIR171b*-Überexpressionskonstrukt enthalten analog zu *OsACT1::PpMIR171a*-Linien mit dem Primerpaar a + c (#1538 und #1577). P: *OsACT1::PpMIR171b*-Plasmid als Positivkontrolle, *PpLHCB4*: gDNA-Positivkontrolle, M: DNA-Marker.

E) RNA-Blot zur Analyse der ppt-miR171-Expression in transgenen *OsACT1::PpMIR171b*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wt. Aufgetrennt sind jeweils 30 µg Gesamt-RNA. E_{nr} : Expressionsstärke der ppt-miR171 normalisiert zur *U6*-snRNA-Ladekontrolle und relativ zum Wt, M: RNA-Marker.

F) und **G)** Analyse der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Transkriptregulation in *PpMIR171*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wt mittels RNA-Blots. Die Sonden umfassen jeweils die ppt-miR171-Bindestelle in *PpGRAS1* und *PpGRAS2*. Die *PpGRAS2*-Sonde ist in ihrer Sequenz zu 80 % identisch mit zwei Spleißvarianten des *PpGRAS2*-Homologs (*Pp1s31_35V6.2*). Der Quotient (Q) gibt das Verhältnis aus ungespaltenem zu gespaltenem Transkript wieder. Aufgetrennt sind jeweils 20 µg Gesamt-RNA aus Protonema mit jungen Gametophoren. *PpEF1a*: RNA-Ladekontrolle, M: RNA-Marker.

3.4.4 Eine starke Überexpression der *PpMIR171*-Gene kann nach normaler**Entwicklung des Gametophyten die Bildung von Sporophyten blockieren**

Die Überexpression von *AthMIR171a* oder *AthMIR171c* in *A. thaliana* bewirkt pleiotrope Entwicklungsdefekte (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010). So stellen z.B. Apikalmeristeme ihr Wachstum ein und differenzieren aus. Im Gegensatz dazu zeigen bei *P. patens* die *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionslinien keine veränderte Protonemaentwicklung im Vergleich zum Wt (Abbildung 25, A und B). Die Bildung von Gametophoren in diesen Überexpressionslinien ist ebenso unverändert im Vergleich zum Wt (Abbildung 25, B und C). Die Bildung von Gametangien verläuft in den ppt-miR171-Überexpressionslinien normal (Abbildung 25, D). Allerdings konnten die zwei stärksten ppt-miR171-Überexpressionslinien *OsACT1::PpMIR171a-1* und *OsACT1::PpMIR171b-3* unter den Kulturbedingungen zur Sporophyteninduktion (15 °C, Kurztag, 20 µmol/(s m²)) keine Sporophyten ausbilden, während in den beiden Linien mit schwächerer ppt-miR171b-Überexpression und dem Wt Sporophyten gebildet werden konnten (Abbildung 25, E). Dabei wurden alle Linien für eine Selbstbefruchtung separat kultiviert. Die Linien *OsACT1::PpMIR171a-1* und *OsACT1::PpMIR171b-3* bildeten jedoch im Labor bei RT und Beleuchtungsverhältnissen der Wintermonate Dezember bis März normale Sporophyten aus (Abbildung 25, E mit Stern). Dabei wurden beide Linien *OsACT1::PpMIR171a-1* und *OsACT1::PpMIR171b-3* zusammen mit allen ppt-miR171-Überexpressionslinien und dem Wt kultiviert.

Die Überexpression beider ppt-miR171-Varianten wirkt sich nicht auf die Entwicklung des Gametophyten aus und verhindert die Sporophytenbildung nach einer Selbstbefruchtung nur bei starker Überexpression von *PpMIR171a* und *PpMIR171b* unter den Kulturbedingungen zur Sporophyteninduktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass starke ppt-miR171-Überexpressionslinien männlich steril sind und sich daher nicht selbst befruchten können.

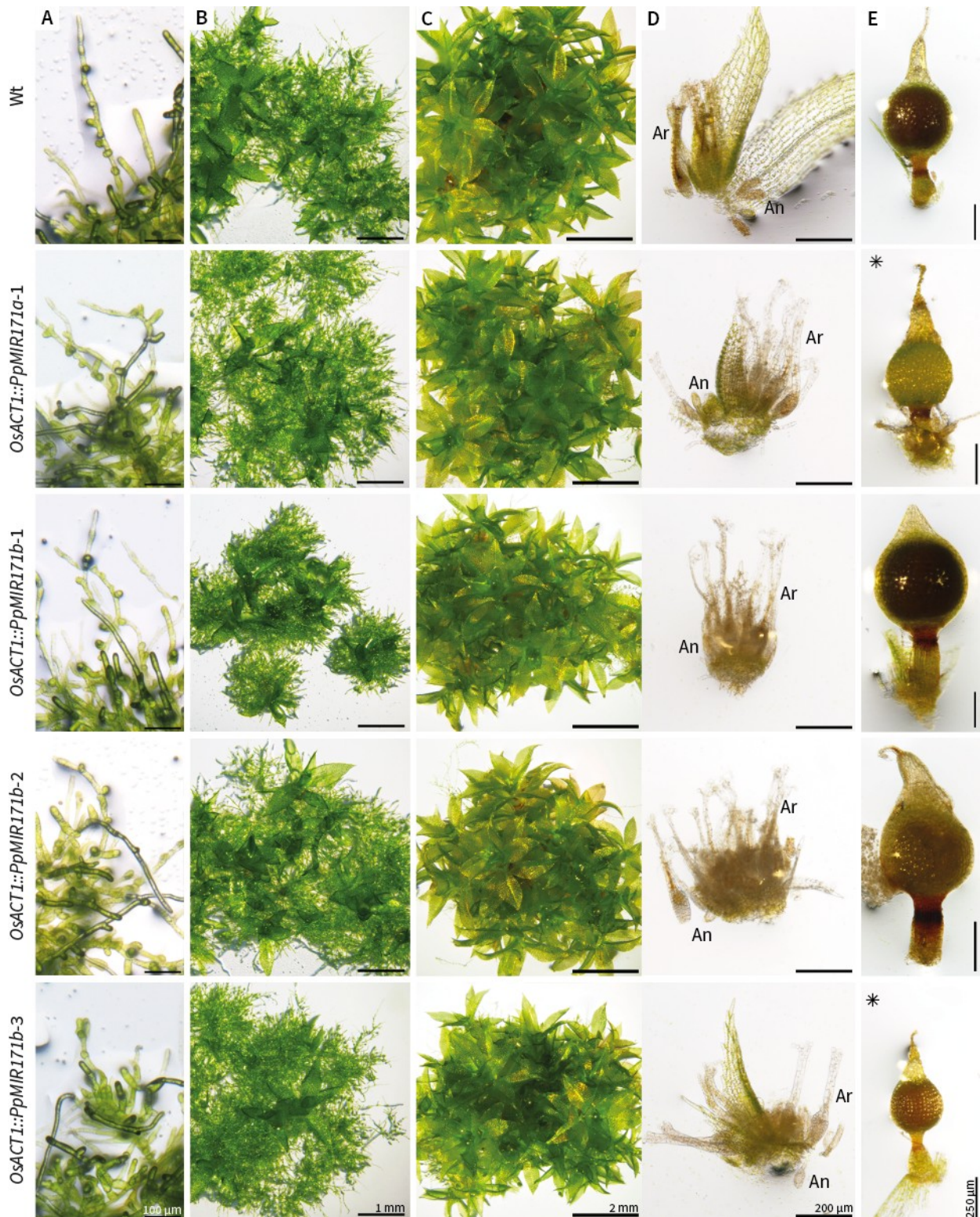


Abbildung 25: Phänotypische Charakterisierung des Gametophyten und Sporophyten von *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wt

A) Protonema nach 10 Tagen Kultivierung, B) Protonema mit jungen Gametophoren nach 20 Tagen Kultivierung. C) Ältere Gametophoren nach 36 Tagen Kultivierung. D) Gametangien; E) Sporophyten. Die *PpOsA1::PpMIR171a-1* und *PpOsA1::PpMIR171b-3* Überexpressionslinien bildeten getrennt kultiviert keine Sporophyten aus. Erst bei RT, Laborlicht mit Kurztagbedingungen und gemeinsamer Kultivierung mit dem Wt und allen *MIR171*-Überexpressionslinien entwickelten sich Sporophyten (mit Stern markiert). Die Längen der Größenbalken sind spaltenweise identisch.

3.5 Analyse von $\Delta PpGRAS1$ -Mutanten

In den zuvor untersuchten *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionslinien wird die Expression von *PpGRAS1* sowie von *PpGRAS2* herunterreguliert. Dabei wurden die Transkripte nicht vollständig gespalten, so dass noch ausreichend Proteine gebildet werden könnten, um die Funktion von PpGRAS1 bzw. PpGRAS2 aufrecht zu erhalten. PpGRAS1 gilt im Gegensatz zu PpGRAS2 als *P. patens*-Homolog der HAM-Proteine in *P. hybrida* und *A. thaliana* (AthSCL6-II/III/IV) (Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Die ursprüngliche bzw. evolutionär konservierte Funktion dieser Proteine wurde bisher noch nicht aufgeklärt. In Knockout-Mutanten, in denen *PpGRAS1* ausgeschaltet wurde ($\Delta PpGRAS1$) kann kein PpGRAS1-Protein mehr gebildet werden, während die PpGRAS2-Expression unbeeinflusst bleibt. Daher lässt sich anhand von $\Delta PpGRAS1$ -Linien die evolutionär konservierte Funktion der HAM-Proteine besser untersuchen als in von *ppt-miR171*-Überexpressionslinien. Folglich wurden $\Delta PpGRAS1$ -Linien generiert und deren Entwicklung auf eine evolutionär konservierte Funktion von PpGRAS1 hin untersucht. Dafür wurde die gesamte CDS von *PpGRAS1* durch homologe Rekombination mit einer Hygromycin-Resistenzkassette (*aph4*) ausgetauscht.

3.5.1 Klonierung des Knockout-Vektors pJET-*PpGRAS1*-KO

Um *PpGRAS1* auszuschalten, wurde eine *PpGRAS1*-Knockout-Kassette aus drei Fragmenten zusammengesetzt und in pJET1.2 kloniert (Abbildung 26). Das erste Fragment bildet die 958 bp große *PpGRAS1*-5'UTR, das zweite Fragment ist eine 2174 bp große, Hygromycinresistenz-vermittelnde *aph4*-Selektionskassette und das dritte Fragment ist die 904 bp große *PpGRAS1*-3'UTR des Vektors *pPGRAS1*-GUS. Die codierende Sequenz der *aph4*-Selektionskassette wurde zur Überprüfung mit den Primern #A10 und #A11 sequenziert und ein Vektor mit fehlerfreier CDS wurde zur Etablierung der *PpGRAS1*-Knockout-Linien eingesetzt.

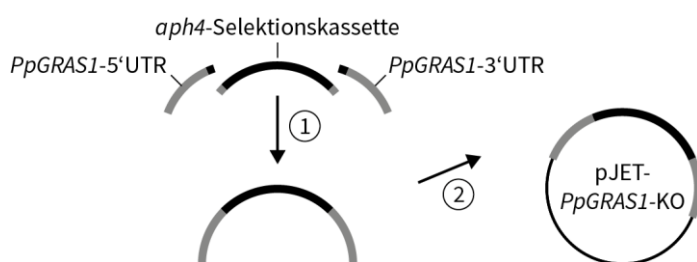


Abbildung 26: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Vektors pJET-*PpGRAS1*-KO

- 1) Tri-Template-PCR mit den Primern #1798 und #1801 von überlappenden Templates zur Generierung der Knockout-Kassette. Die *PpGRAS1*-5'UTR wurde mit den Primern #1798 und #1799 von dem Vektor pJET-*PpGRAS1*, die *aph4*-Selektionskassette mit den Primern #1802 und #1803 von dem Vektor pPGX8 (Kubo *et al.* 2013) und die *PpGRAS1*-3'UTR mit den Primern #1800 und #1801 von dem Vektor *pPpGRAS1*-GUS amplifiziert.
- 2) *Blunt end*-Klonierung des PCR-Produktes der Tri-Template-PCR in pJET1.2.

3.6 Etablierung von $\Delta PpGRAS1$ -Linien

Zur Generierung der $\Delta PpGRAS1$ -Linien wurde der Vektor pJET-*PpGRAS1*-KO mit *KpnI* und *NcoI* geschnitten und in *P. patens* Wt transformiert. Hygromycin-resistente Pflanzen wurden anschließend auf die Integration des Knockout-Konstruktes in den genomischen Locus von *PpGRAS1* hin untersucht.

Es konnten sechs transgene Linien isoliert werden, für die eine 5'-Integration des Resistenzgens am *PpGRAS1*-Locus per PCR nachgewiesen werden konnte (Abbildung 27, A).

Durch die Integration der *aph4*-Selektionskassette in *PpGRAS1* durch homologe Rekombination sollte die *PpGRAS1*-CDS verloren gehen und somit keine *PpGRAS1*-Transkripte mehr gebildet werden können.

Daher wurden die Linien mit einer 5'-Integration auch auf die Abwesenheit des Wt-Transkriptes per RT-PCR überprüft. Drei $\Delta PpGRAS1$ -Linien konnten identifiziert werden, für die sich im Gegensatz zum Wt kein *PpGRAS1*-Transkript mehr nachweisen lässt (Abbildung 27, B). Für diese Linien wurde anschließend die Anzahl der Integrationen der *aph4*-Selektionskassette mittels Southern Blot überprüft. In zwei Linien $\Delta PpGRAS1$ -1 und -2 konnte eine Einzelintegration nachgewiesen werden (Abbildung 27, D).

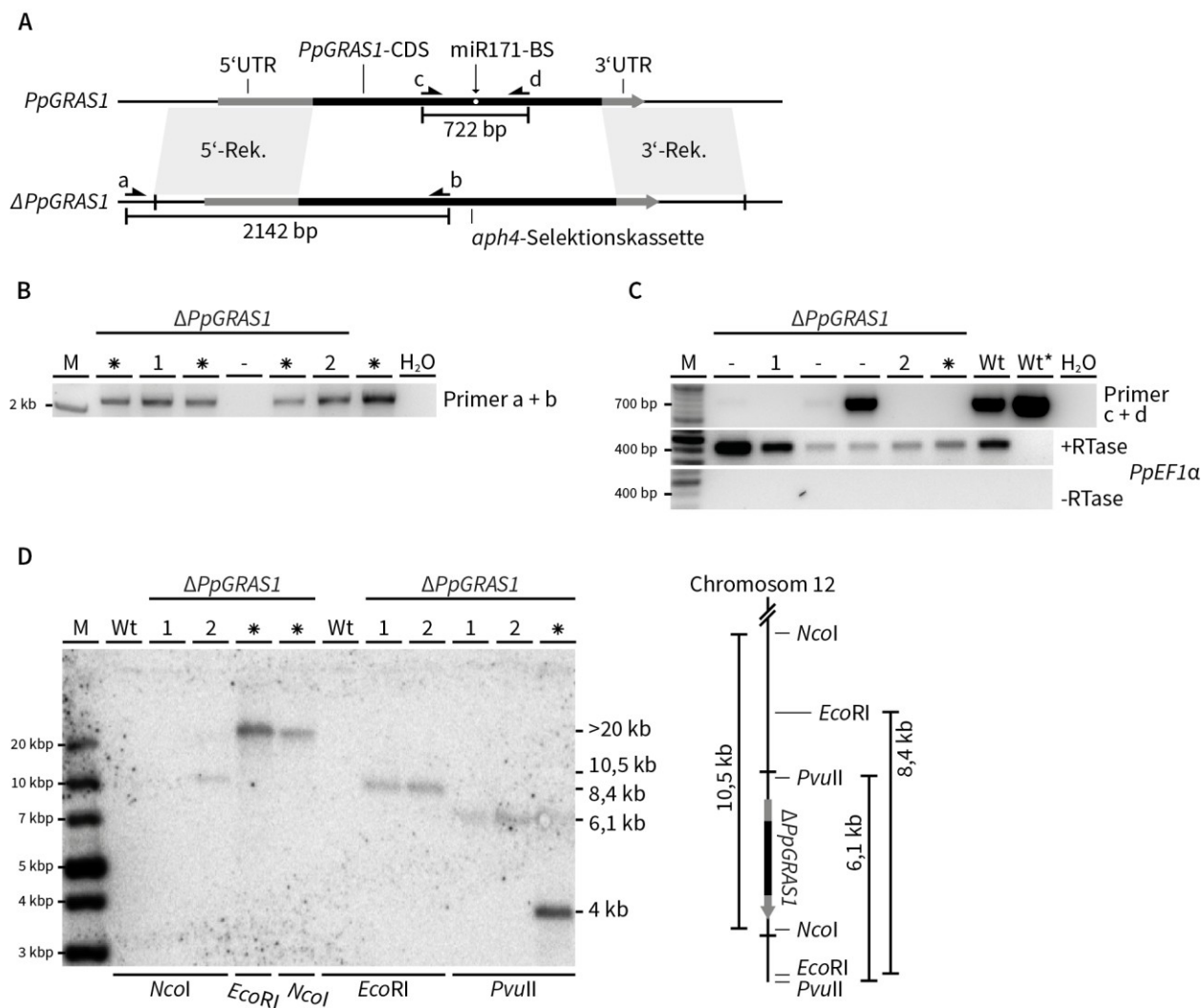


Abbildung 27: Identifizierung von $\Delta PpGRAS1$ -Linien

A) Schematische Darstellung der genomischen Loci von *PpGRAS1* im Wt und in $\Delta PpGRAS1$. Die flankierenden, homologen Rekombinationsbereiche der *aph4*-Selektionskassette (3'-Rek. und 3'-Rek.). a – c Primerpositionen zur Identifizierung von $\Delta PpGRAS1$ -Linien. Die Größen der korrespondierenden PCR-Produkte sind angegeben.

B) PCR zur Analyse der 5'-Integration des Knockout-Konstrukts in den genomischen *PpGRAS1*-Locus mit dem Primerpaar a + b (#1349 und #A10). Auf Linien, die mit einem Stern markiert sind, wird nicht weiter eingegangen. **C)** RT-PCR mit den Primern c + d (#1366 und #A5) zur Identifizierung von *PpGRAS1*-Knockout Linien. *PpEF1 α* : cDNA-Positivkontrolle, Wt*: Wt gDNA, +RTase: cDNA-Synthese mit Reverse Transkriptase, -RTase: Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase.

D) Links: Southern Blot mit einer *aph4*-spezifischen Sonde zur Identifizierung von Einzelintegrations-Mutanten. Aufgetrennt sind jeweils 2 μ g geschnittene gDNA. Das Signal des *NcoI*-Fragments der $\Delta PpGRAS1$ -Linie Nr. 1 liegt vermutlich unter der Detektionsgrenze. Rechts: schematische Darstellung des $\Delta PpGRAS1$ -Locus auf dem Chromosom 12 mit Positionen der Restriktionsschnittstellen, an denen die gDNA für den Southern Blot geschnitten wurde. Die resultierenden Fragmentgrößen sind angegeben.

3.6.1 $\Delta PpGRAS1$ -Linien zeigen eine normale Entwicklung des Gametophyten und Sporophyten

Die Entwicklung des Gametophyten der Linien $\Delta PpGRAS1-1$ und -2 zeigt keine Veränderung im Vergleich zum Wt (Abbildung 28, A bis C). Beide $\Delta PpGRAS1$ -Linien bilden wie auch der Wt, unter den Kulturbedingungen zur Sporophyteninduktion, Sporophyten deren Sporen keimungsfähig sind (Abbildung 28, D).

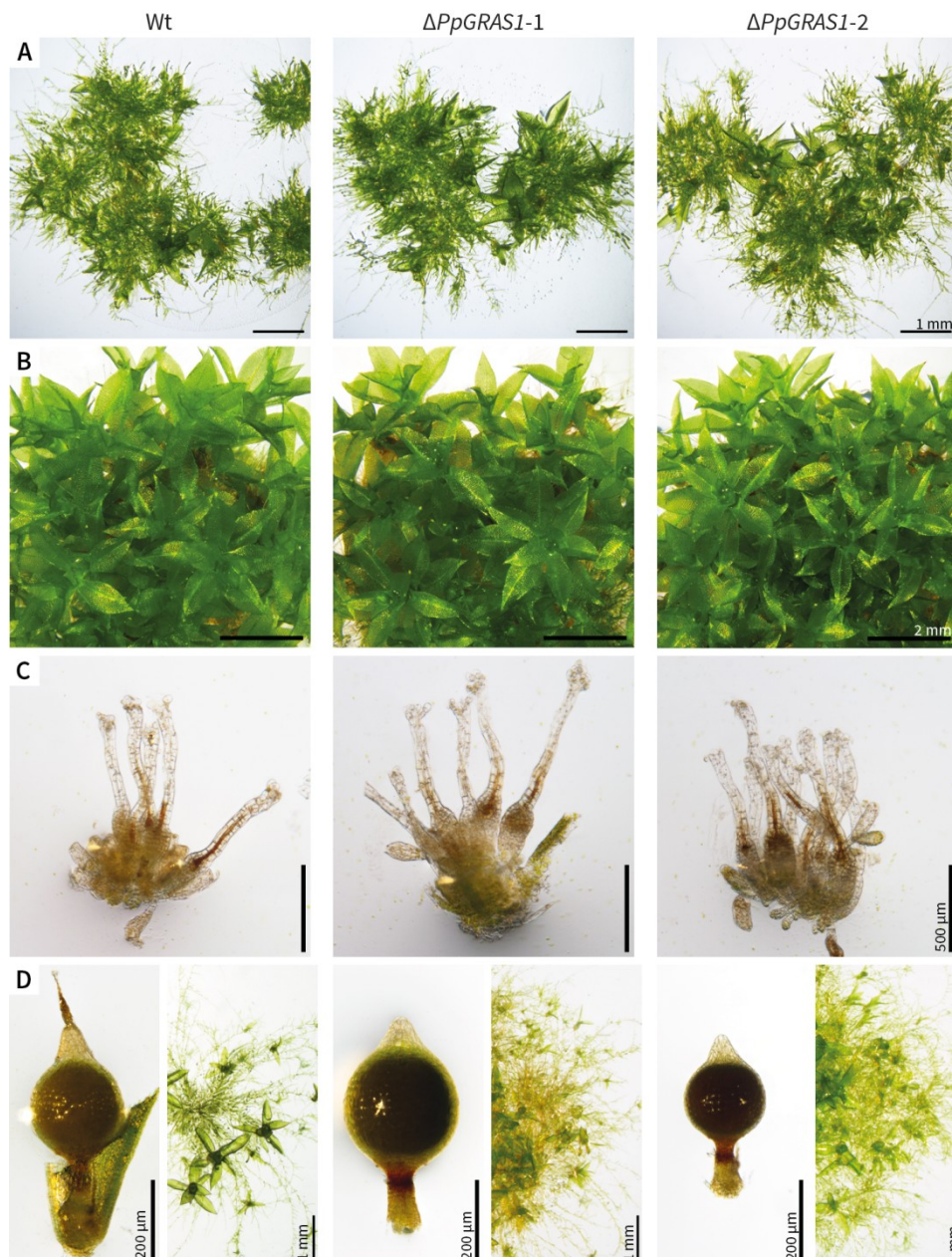


Abbildung 28: Phänotypische Analyse des Gametophyten und Sporophyten sowie der Sporenkeimung von $\Delta PpGRAS1$ -Linien im Vergleich zum Wt

A) Protonema mit jungen Gametophoren; B) Ältere Gametophoren; C) Gametangien und D) Sporophyten und jeweils rechts davon ausgekeimte Sporen; Kultivierungsdauer der Sporen: 34 d Wt bzw. 30 d $\Delta PpGRAS1$ -Linien. Die Längen der Größenbalken sind in A) bis C) zeilenweise identisch.

PpGRAS1 ist somit nicht für die Bildung des Gametophyten oder Sporophyten notwendig. Daher könnte die verminderte Expression von *PpGRAS2* durch eine starke ppt-miR171-Überexpression mit der Bildung von Sporophyten im Zusammenhang stehen.

3.7 Analyse der induzierbaren Überexpression von *PpmGRAS1* und *PpmGRAS1-DR*

$\Delta PpGRAS1$ -Linien geben Auskunft über die Funktionen, für die eine *PpGRAS1*-Expression essenziell notwendig ist. Da die vollständige Entfernung von *PpGRAS1* keinen ersichtlichen Effekt auf die Entwicklung von *P. patens* besitzt, könnte eine ektopische Überexpression von *PpGRAS1* Auskunft über die biologische Funktion geben.

Im Gegensatz zu einer konstitutiven Überexpression erlaubt ein induzierbares Überexpressionssystem die Expression von *PpGRAS1* zu beliebigen Zeitpunkten in der Entwicklung von *P. patens*. Zudem können etwaige negative Effekte einer *PpGRAS1*-Überexpression während der Regenerierung von transformierten Protoplasten verhindert werden. Daher wurde ein in *P. patens* bereits etabliertes β -Estradiol-induzierbares Expressionssystem gewählt. Dieses basiert auf dem Expressionssystem des PpGX8-Vektors (Kubo, Imai *et al.* 2013). Zwei Elemente bilden dieses Expressionssystem. Das erste Element ist der chimäre Transkriptionsfaktor XVE bestehend aus der LexA-DNA-Bindedomäne, der VP16-Transkriptions-Aktivierungsdomäne und einem Östrogenrezeptor. XVE steht unter der Kontrolle des ubiquitären und konstitutiven *PpGX8*-Promoters (Abbildung 29, A). Exprimiert bildet XVE Homodimäre im Zytoplasma, die nach Bindung von β -Estradiol, einem funktionellen Analogon des humanen Östrogens, zerfallen und in den Zellkern importiert werden. Das zweite Element sind acht Kopien des LexA-Operators vor dem Transkriptionsstart von CaMV35S (Position -46 bis +12), an dem die XVE-Monomere binden können und mittels der Transkriptions-Aktivierungsdomäne die Expression des zu untersuchenden Genes einleiten. Um zu gewährleisten, dass eine Überexpression von *PpGRAS1* durch die ppt-miR171-Aktivität nicht negativ beeinflusst wird, wurde wie bereits für die *PpmGRAS1*-GUS-Konstrukte eine *PpGRAS1*-CDS verwendet, die eine mutierte ppt-miR171-Bindestelle besitzt (Tabelle 7). Das resultierende Konstrukt wird im Folgenden als XVE>>*PpmGRAS1* abgekürzt. Es erlaubt die β -Estradiol-steuerbare und XVE-vermittelte Transaktivierung der *PpmGRAS1*-Expression.

In *A. thaliana* codieren die Zielgene der ath-miR171 (*AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV*) kernlokalisierte Transkriptionsfaktoren, die als Aktivatoren aber auch als Repressoren fungieren können (Wang, Mai *et al.* 2010; Ma, Hu *et al.* 2014). *PpGRAS1* ist ein potenzieller Transkriptionsfaktor und könnte daher ebenfalls als Aktivator oder Repressor die Transkription von nachgeschalteten Genen beeinflussen. Dies lässt sich durch den Vergleich einer Überexpression von *PpGRAS1* mit der eines Fusionsproteins aus *PpGRAS1* und einem dominanten Transkriptionsrepressor untersuchen. Agiert *PpGRAS1* als Aktivator, sollte die Überexpression des Fusionsproteins einen entgegengesetzten Effekt wie die Überexpression von *PpGRAS1* allein bewirken. Agiert *PpGRAS1* jedoch als Repressor, sollte die Überexpression des Fu-

sionsproteins den gleichen Effekt wie die Überexpression von PpGRAS1 allein bewirken. Daher wurde die codierende Sequenz der kurzen Transkriptions-Repressordomäne SRDX (LDLDLELRDFA) mit dem Stopcodon TAA (Hiratsu *et al.* 2003) anstelle des Stopcodons an die *PpmGRAS1*-CDS fusioniert und ebenfalls in das Expressionssystem pPGX8 kloniert. Das Konstrukt wird im Folgenden als XVE>>*PpmGRAS1*-DR abgekürzt.

Anhand von transgenen XVE>>*PpmGRAS1*-Linien und XVE>>*PpmGRAS1*-DR-Linien wurde die Funktion von PpGRAS1 bzw. PpGRAS1-DR in verschiedenen Entwicklungsstadien von *P. patens* untersucht.

3.7.1 Etablierung von induzierbaren XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1*-DR-Überexpressionslinien

Zur Generierung von induzierbaren *PpmGRAS1*- und *PpmGRAS1*-DR-Überexpressionslinien wurden die Vektoren pPGX8-*PpmGRAS1* und pPGX8-*PpmGRAS1*-DR (siehe Material- und Methodenteil Abschnitt 2.19.2) mit *MssI* geschnitten und in *P. patens* Wt transformiert.

Nach der Transformation von pPGX8-*PpmGRAS1* in *P. patens* konnte mittels PCR in sieben Linien das β -Estradiol-induzierbare System zur *PpmGRAS1*-Überexpression nachgewiesen werden (Abbildung 29, A und B). Um den Einfluss des konstitutiv exprimierten XVE zu berücksichtigen, wurde der pPGX8-Vektor ohne *PpmGRAS1*-CDS als Kontrolle ebenfalls transformiert. Es konnte eine transgene Linie isoliert werden, in der das Kontrollkonstrukt per PCR nachgewiesen werden konnte (Abbildung 29, A und C). Nach der Transformation von pPGX8-*PpmGRAS1*-DR in *P. patens* konnte zudem bei acht Linien das β -Estradiol-induzierbare System zur Expression des dominanten Repressors *PpmGRAS1*-DR nachgewiesen werden (Abbildung 29, A und D).

Anschließend wurde mittels *PpGRAS1*-spezifischen Sonden per Northern Blot überprüft, ob die XVE>>*PpmGRAS1* und XVE>>*PpmGRAS1*-DR enthaltenden Linien unter Zugabe von β -Estradiol eine verstärkte *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1*-DR-Expression im Vergleich zum Wt aufweisen. In vier von sieben XVE>>*PpmGRAS1* enthaltenden Linien konnte im Protonema 2 h nach Zugabe von β -Estradiol eine verstärkte *PpmGRAS1*-Expression im Vergleich zum Wt nachgewiesen werden (Abbildung 30, A). Zudem konnte in drei von acht XVE>>*PpmGRAS1*-DR enthaltenden Linien im Protonema eine verstärkte *PpmGRAS1*-DR-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 30 B). Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe von β -Estradiol im Wt und auch in der XVE-Vektorkontrolle keine verstärkte Expression von *PpGRAS1* (Abbildung 30, B).

Weiterhin wurde die Induzierbarkeit und der zeitliche Verlauf der *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1*-DR-Expressionsstärke nach β -Estradiol-Zugabe in den zuvor identifizierten XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1*-DR-Linien untersucht (Abbildung 30, C). Zwei XVE>>*PpmGRAS1*-DR-Linien (Nr. 1 und 2) zeigten bereits zwei Stunden nach β -Estradiolzugabe eine 15-fach bzw. 10-fach erhöhte Expressionsstärke im Vergleich zum uninduzierten Zustand. Diese blieb auch nach weiteren vier bzw. acht Stunden nahezu unverändert. Die Linie XVE>>*PpmGRAS1*-DR-3 zeigt eine insgesamt schwächere, aber

stetig zunehmende *PpmGRAS1*-Expression, die nach 8 h dem 7-fachen gegenüber dem uninduzierten Zustand entsprach. Nur die XVE>>*PpmGRAS1*-Linien-1 und -3 zeigten eine induzierbare und ansteigende *PpmGRAS1*-Expression.

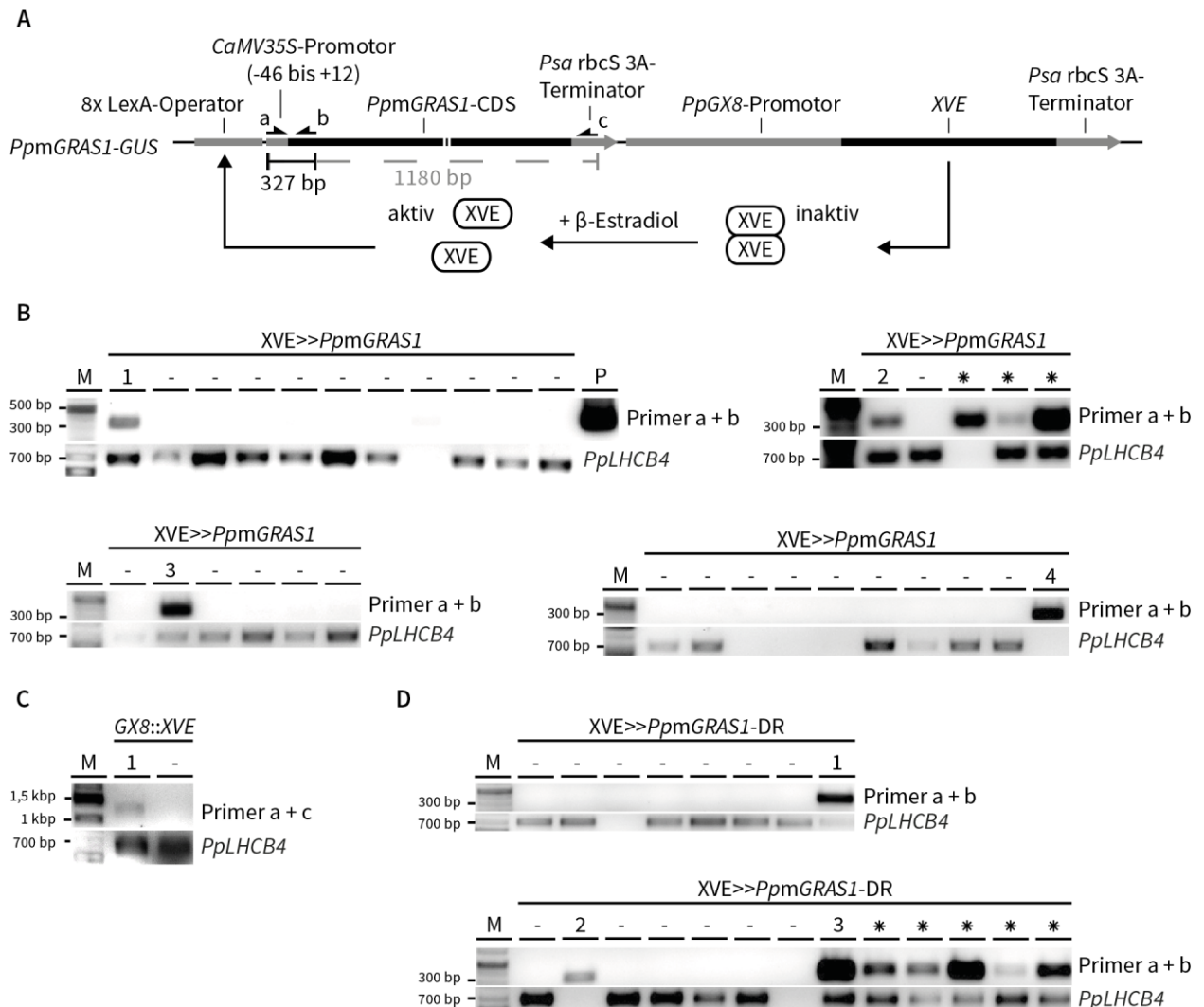


Abbildung 29: Identifizierung transgener XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien

A) Schematische Darstellung des induzierbaren Expressionskonstrukts *XVE>>PpmGRAS1*. Das *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Konstrukt unterscheidet sich von *XVE>>PpmGRAS1* nur durch die 36 bp große CDS des Transkriptions-Repressors SRDX, die an die *PpmGRAS1*-CDS fusioniert ist. Der Transkriptionsfaktor XVE bildet im Zytoplasma inaktive Homodimere, die nach Bindung von β -Estradiol in aktive Monomere zerfallen. Diese binden im Zellkern an den LexA-Operator und vermitteln die Expression von *PpmGRAS1*. a – c Primerpositionen der PCRs in B) bis D) die Größen der PCR-Produkte sind angegeben.

B) PCR von gDNA mit dem Primerpaar a + b (#1805 und #1334) zur Analyse der Integration des induzierbaren Expressionskonstrukts *XVE>>PpmGRAS1*. P: Plasmid Positivkontrolle.

C) PCR von gDNA mit dem Primerpaar a + c (#1805 und #1806) zur Identifizierung transgener XVE-Vektorkontrolllinien (*GX8::XVE*). Die XVE-Vektorkontrolle enthält anstelle der *PpmGRAS1*-CDS eine Gateway®-Rekombinationskassette daher ergibt sich ein PCR-Produkt von 1330 bp.

D) PCR von gDNA wie in B) zur Analyse der Integration des induzierbaren Expressionskonstrukts *XVE>>PpmGRAS1-DR*.

PpLHCB4: Positivkontrolle für gDNA (Primer #1696 und #1697). Auf mit einem Stern markierte Linien, wird im Folgenden nicht weiter eingegangen.

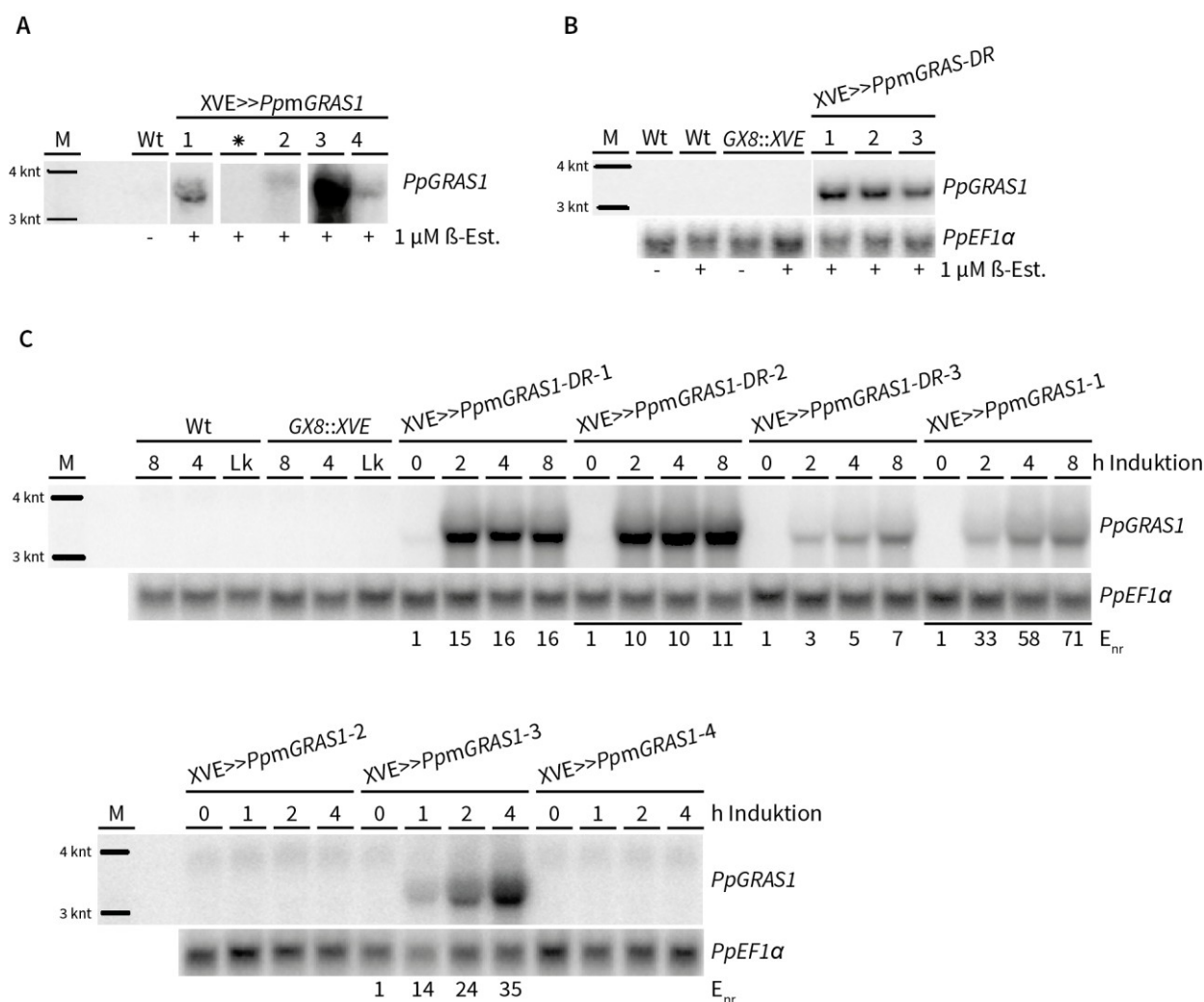


Abbildung 30: Identifizierung von β -Estradiol induzierbaren *PpmGRAS1*-Überexpressionslinien mittels *PpGRAS1*-spezifischen Sonden durch Northern Blots

A) Expression von *PpmGRAS1*-Transkripten im Protonema von XVE>>*PpmGRAS1*-Linien nach 2 h Behandlung mit 1 μ M β -Estradiol im Vergleich zur Expression im unbehandelten Wt. Aufgetrennt sind jeweils 5 μ g Gesamt-RNA. Die mit einem Stern markierte Linie weist keine verstärkte Expression auf.

B) Expression von *PpmGRAS1*-Transkripten im Protonema von XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien nach 2 h Behandlung mit 1 μ M β -Estradiol im Vergleich zur Expression im Wt bzw. der XVE-Vektorkontrolle unbehandelt und nach 2 h Behandlung mit 1 μ M β -Estradiol. Aufgetrennt sind jeweils 8 μ g Gesamt-RNA.

C) Zeitreihen zur Untersuchung der *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1-DR*-Transkriptmengen im Verlauf der β -Estradiol-Induktion der XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien sowie der XVE>>*PpmGRAS1*-Linien im Vergleich zum Wt und der XVE-Vektorkontrolle (GX8::XVE). Die Dauer der Behandlung des Protonemagewebes mit 1 μ M β -Estradiol ist in Stunden angegeben (oben). Die Expressionsstärke der induzierten Transkripte (E_{nr}) ist normalisiert zur *PpEF1 α* -Transkriptmenge und relativ zum Zeitpunkt 0 h (unbehandelt) für jede transgene Linie angegeben (unten). Aufgetrennt sind jeweils 8 μ g Gesamt-RNA.

PpEF1 α : RNA-Ladekontrolle; M: RNA-Marker.

In beiden Linien konnte eine zunehmende Expressionsstärke nachgewiesen werden, die bei XVE>>*PpmGRAS1-1* nach 8 h bis auf das 71-fache gegenüber dem uninduzierten Zustand anstieg bzw. bei XVE>>*PpmGRAS1-3* nach 4 h bis auf das 35-fache. Die β -Estradiol Behandlung und eine Behandlung mit dem β -Estradiol-Lösungsmittel DMSO als Kontrolle (LK) führten zu keiner verstärkten *PpGRAS1*-Expression im Wt oder der XVE-Vektorkontrolle.

Zusammengefasst konnten drei XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien mit stabiler Induzierbarkeit identifiziert werden, von denen zwei bereits 2 h nach der β -Estradiol Induktion ein Maximum an *PpmGRAS1-DR*-Induzierbarkeit erreichten. Zudem konnten zwei XVE>>*PpmGRAS1*-Linien mit stabiler Induzierbarkeit identifiziert werden, die innerhalb von 4 h bzw. 8 h noch kein Maximum an *PpmGRAS1*-Induktion erreichten.

3.7.2 *PpmGRAS1*- oder *PpmGRAS1-DR*-Überexpression blockiert reversibel das Protonemawachstum und hat einen unterschiedlichen Effekt auf den Pigmentgehalt

Die Auswirkung einer ektopischen *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1-DR*-Überexpression auf die Entwicklung des Gametophyten wurde zuerst anhand von Protonema untersucht. Für eine anhaltende Induktion von *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1-DR* wurde das Protonemagewebe für 35 Tage auf β -Estradiol-haltigem Medium (1 μ M β -Estradiol) kultiviert und als Kontrolle parallel auf unbehandeltem Medium. Dafür wurden gleiche Mengen von Protonema aus Flüssigkulturen des Wt, der XVE-Vektorkontrolle (*GX8::XVE*) und der induzierbaren XVE>>*PpmGRAS1*-Linien Nr. 1 und 3 bzw. der induzierbaren XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien mit der stärksten Expression (Nr. 1 und 2) zusammen kultiviert. Anschließend wurden die induzierten Kulturen mit den unbehandelten Kontrollen und untereinander verglichen.

Die XVE>>*PpmGRAS1*-Linien entwickelten ebenso wie die XVE-Vektorkontrolle auf unbehandeltem Medium keine vom Wt abweichenden Gametophyten (Abbildung 31, A). Weder der Wt noch die XVE-Vektorkontrolle zeigten Veränderungen der Gametophyten auf β -Estradiol-haltigem Medium im Vergleich zum Wachstum auf unbehandeltem Medium (Abbildung 31, A und B). Im Gegensatz dazu färbte sich das Protonema der XVE>>*PpmGRAS1*-Linien auf β -Estradiol haltigem Medium braun und sie stellten das Wachstum ein (Abbildung 31, B).

Die XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien entwickelten ebenfalls auf normalen Medium keine vom Wt abweichende Gametophyten (Abbildung 31, A und C). Auf β -Estradiol-haltigem Medium stellte das Protonema der XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien, wie auch das der XVE>>*PpmGRAS1*-Linien, bis auf wenige Filamente das Wachstum nahezu vollständig ein (Abbildung 31, D). Im Gegensatz zu der Braunfärbung der induzierten XVE>>*PpmGRAS1*-Linien sind hier die XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien weiterhin unverändert grün. Die Gesamtübersicht aller Kolonien auf β -Estradiol haltigem Medium (Abbildung 31, E) zeigt, dass nur

wenige Protonemafilamente der induzierten XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien Zellteilungen durchführen konnten.

Zusammengefasst führt die von ppt-miR171 unbeeinflusste, ektopische Überexpression von *PpGRAS1* zu einem Wachstumsstillstand im Protonema und zu einem sichtbar veränderten Pigmentgehalt in den Chloroplasten, die jedoch nicht ausbleichen. Die zusätzliche Fusion von *PpGRAS1* mit einer Transkriptions-Repressordomäne SRDX führte im Vergleich zu induzierten XVE>>*PpmGRAS1*-Linien kaum zu einer Veränderung der Zellteilungsrate. Der Pigmentgehalt in den Chloroplasten induzierter XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien unterscheidet sich hingegen optisch nicht vom Wt. Dies deutet auf eine duale Funktion von *PpGRAS1* hin, wobei eine Funktion die Zellteilung betrifft und die andere den Pigmentstoffwechsel. Der gegenteilige Effekt der Überexpression von *PpmGRAS1-DR* im Vergleich zur Überexpression von *PpmGRAS1* auf den Pigmentgehalt deutet auf eine Funktion von *PpGRAS1* als Aktivator hin.

Sowohl die XVE>>*PpmGRAS1*-Linien als auch die XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien bildeten auf β -Estradiol haltigem Medium keine Gametophoren. Um dennoch die Auswirkung einer *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1-DR*-Überexpression auf die Entwicklung von Gametophoren zu untersuchen, wurden XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien sowie die XVE-Vektorkontrolle und der Wt zunächst auf normalem Medium bis zur Bildung von jungen Gametophoren kultiviert. Anschließend wurden die Gametophoren zweimal im Abstand von vier Tagen mit 1 μ M bzw. 2 μ M β -Estradiol induziert und zwölf Tage nach der ersten Induktion untersucht.

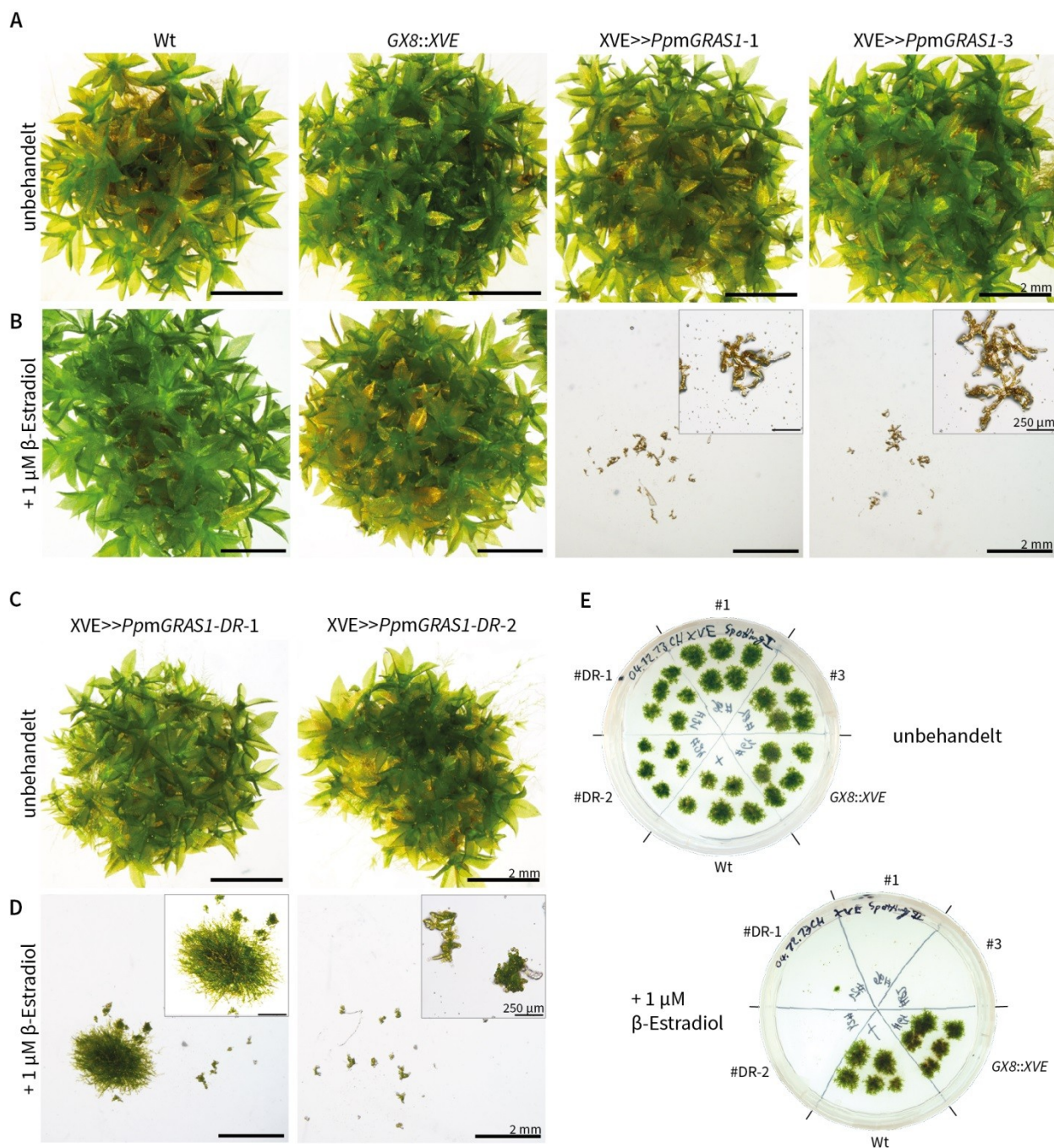


Abbildung 31: Entwicklungspänotyp der *XVE>>PpmGRAS1*- bzw. *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien, der *XVE*-Vektorkontrolle und des *Wt* auf Induktions-Medium im Vergleich zu normalem Medium

- A) *Wt*, *XVE*-Kontrolle und die *XVE>>PpmGRAS1*-Linien Nr. 1 und 3 nach 35 Tagen auf normalem KNOP-Medium.
 B) *Wt*, *XVE*-Kontrolle und die *XVE>>PpmGRAS1*-Linien Nr. 1 und 3 nach 35 Tagen auf KNOP-Medium mit 1 µM β-Estradiol. Von den *XVE>>PpmGRAS1*-Linien Nr. 1 und 3 sind jeweils Ausschnitte vergrößert dargestellt.
 C) *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien Nr. 1 und 2 nach 35 Tagen auf normalem KNOP-Medium.
 D) *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien Nr. 1 und 2 nach 35 Tagen auf KNOP-Medium mit 1 µM β-Estradiol. Von den *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien Nr. 1 und 2 sind jeweils Ausschnitte vergrößert dargestellt.
 E) Gesamtübersicht der zusammen kultivierten *XVE>>PpmGRAS1*-Linien Nr. 1 und 3 (#1 und #3), der *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien Nr. 1 und 2 (#DR-1 und #DR-2) und dem *Wt* bzw. der *XVE*-Vektorkontrolle *GX8::XVE*. Es wurden jeweils gleiche Mengen an Protonemagewebe aus Flüssigkulturen für 35 Tage auf normalem KNOP-Medium (unbehandelt) und parallel auf 1 µM β-Estradiol-haltigem Medium kultiviert. Die Längen der Größenbalken sind in A) bis D) zeilenweise identisch.

Die Gametophoren von induzierten XVE>>PpmGRAS1-Kolonien weisen an ihrer Basis eine leichte Braunfärbung im Vergleich zum Wt und der XVE-Vektorkontrolle auf (Abbildung 32, A, B und D). Zudem sind die Gametophoren kleiner als die des Wt oder der XVE-Vektorkontrolle und zeigen ein apikal verbreitertes Cauloid, das sich unter Induktion gebildet hat (Abbildung 32, B und D). Bereits ausgebildete Phylloide der XVE>>PpmGRAS1-Gametophoren sind durch die Induktion unbeeinflusst (Abbildung 32, B), während die Anlagen für neue Phylloide zwar gebildet werden, diese aber nicht vollständig auswachsen (Abbildung 32, C).

Im Gegensatz dazu zeigen die Gametophoren von induzierten XVE>>PpmGRAS1-DR-Kolonien keine Braunfärbung, sind aber im Vergleich zum Wt und der XVE-Vektorkontrolle ebenfalls verkürzt (Abbildung 32, A und D). Bereits ausgebildete Phylloide sind ebenfalls durch die Induktion unbeeinflusst, aber Anlagen für neue Phylloide werden nicht mehr gebildet (Abbildung 32 B und C). Weiterhin kommt es zu einem Wachstumsstillstand des Cauloids.

Zusammengefasst führt die von ppt-miR171 unbeeinflusste, ektopische Überexpression von PpmGRAS1 in Gametophoren zu Entwicklungsstörungen. Während neue Phylloide weiterhin gebildet werden, diese aber nicht auswachsen, verbreitert sich das Cauloid. Im Gegensatz zur Braunfärbung durch die Überexpression von PpmGRAS1 im Protonema findet im Gametophoren keine optisch wahrnehmbare Veränderung des Pigmentgehalts der Phylloide statt. Lediglich im basalen Abschnitt der Cauloide wird eine wahrnehmbare Braunfärbung ausgelöst. Die Überexpression von PpmGRAS1-DR mit der Repressordomäne SRDX führt zu keiner Verbreiterung des Cauloids, sondern zu einem Zellteilungsstopp im gesamten apikalen Bereich des Cauloids. Dies weist auf eine unterschiedliche Funktion von PpGRAS1 im Cauloid und Phylloid hin.

Um zu untersuchen, ob der Phänotyp der XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien auf β -Estradiol-haltigem Medium reversibel ist, wurden Protonemafilamente beider XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien nach 51 Tagen Kultivierung auf β -Estradiol-haltigem Medium auf normales Medium umgesetzt und weiterkultiviert. Nach 17 Tagen auf normalen Medium bildeten sowohl die XVE>>PpmGRAS1- als auch die XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien wieder neues und grünes Protonema im Vergleich zum Ausgangsgewebe (Abbildung 33, A und B). Nach 40 Tagen auf normalem Medium bildeten die XVE>>PpmGRAS1-Linien bereits ausgewachsene Kolonien mit normalen Gametophoren, während die XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien vornehmlich Protonema mit vereinzelt, ersten Gametophoren ausbildeten (Abbildung 33, C).

Zusammengefasst sind die Auswirkungen der ektopischen Überexpression von PpmGRAS1 selbst über einen längeren Zeitraum hinweg nicht letal, sondern vollständig reversibel. Im Gegensatz dazu sind die Auswirkungen der Überexpression von PpmGRAS1 mit der fusionierten Repressordomäne SRDX (PpmGRAS1-DR) nicht vollständig reversibel. Das Protonema setzt die Zellteilung fort, bildet aber nur wenige Gametophoren.

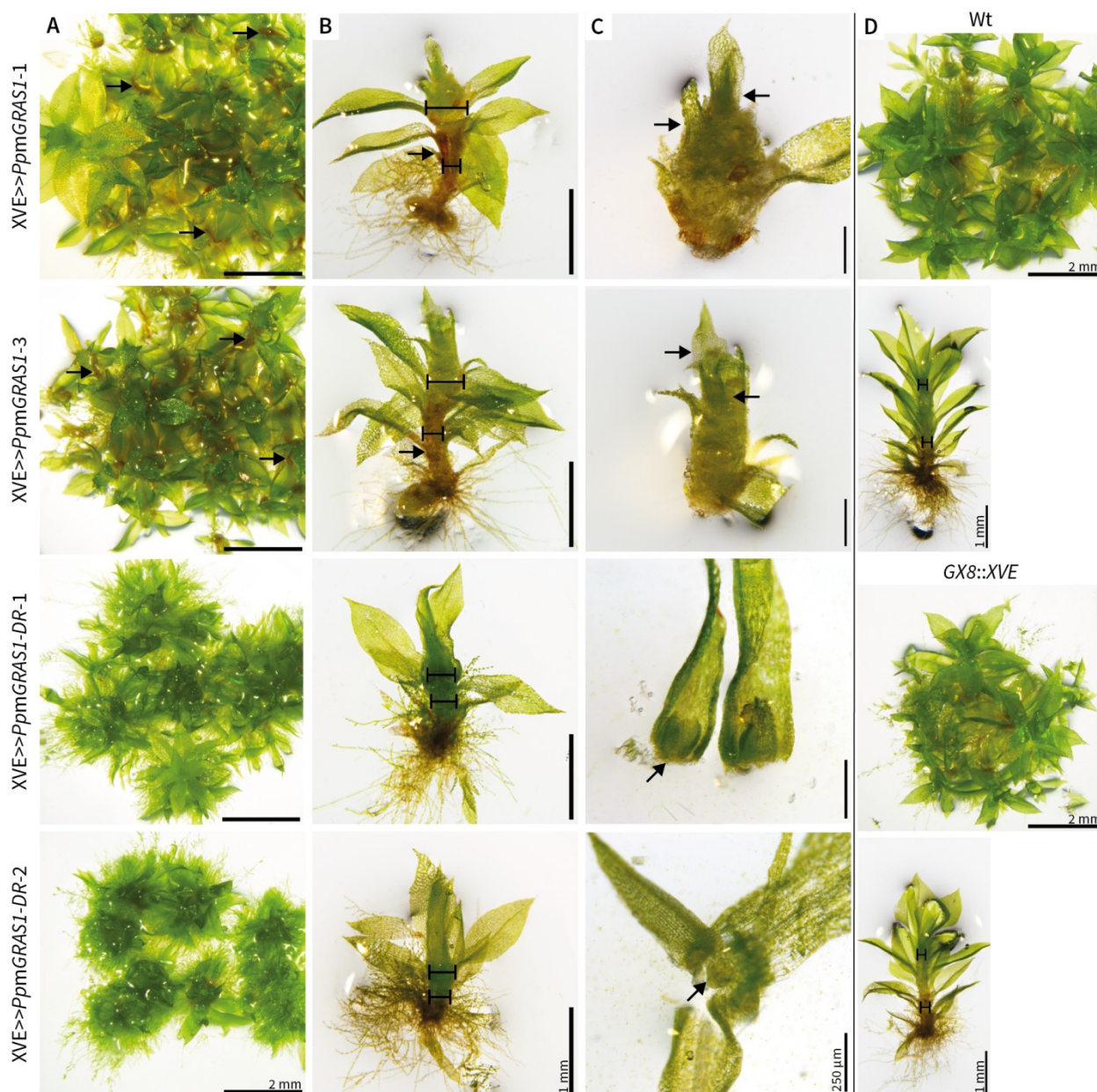


Abbildung 32: Entwicklung von β -Estradiol-behandelten Gametophoren der XVE>>PpmGRAS1- sowie der XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien im Vergleich zur XVE-Vektorkontrolle und dem Wt

A) Übersicht von 35 Tage alten Kolonien der XVE-Vektorkontrolle, der XVE>>PpmGRAS1- sowie der XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien 12 Tage nach der ersten β -Estradiol-Applikation ($1 \mu\text{M}$). Die Pfeile deuten auf Stellen mit braunem Gewebe in den Kolonien der XVE>>PpmGRAS1-Linien. Die XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien weisen hingegen keine Braunfärbung auf und sind intensiv grün.

B) Einzelne Gametophoren aus den Kolonien in A) entnommen. Die Pfeile deuten auf braunes Gewebe in den Gametophoren. Die Maßbalken geben die Breite des Cauloids an; XVE>>PpmGRAS1-1: $513 \mu\text{m}$ oben und $231 \mu\text{m}$ unten, XVE>>PpmGRAS1-3: $453 \mu\text{m}$ oben und $261 \mu\text{m}$ unten, XVE>>PpmGRAS1-DR-1: $351 \mu\text{m}$ oben und $322 \mu\text{m}$ unten, XVE>>PpmGRAS1-DR-2: $332 \mu\text{m}$ und $269 \mu\text{m}$.

C) Freipräparierte apikale Cauloide der Gametophoren aus B). Die XVE>>PpmGRAS1-Linien bilden neue Phylloide, die nicht vollständig auswachsen (mit Pfeilen markiert). Die XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien bilden keine neuen Phylloide und stellen das apikale Wachstum ein (der Pfeil markiert den apikalen Bereich des Cauloids). Für die Linie XVE>>PpmGRAS1-DR-2 ist der apikale Bereich in der Aufsicht gezeigt.

D) Kolonien und Gametophoren des Wt und der XVE-Vektorkontrolle. Die Maßbalken geben die Breite des Cauloids an; Wt: $247 \mu\text{m}$ oben und $256 \mu\text{m}$ unten, GX8::XVE: $235 \mu\text{m}$ oben und $255 \mu\text{m}$ unten.

Die Längenangaben der Größenbalken sind in A) bis C) spaltenweise identisch.

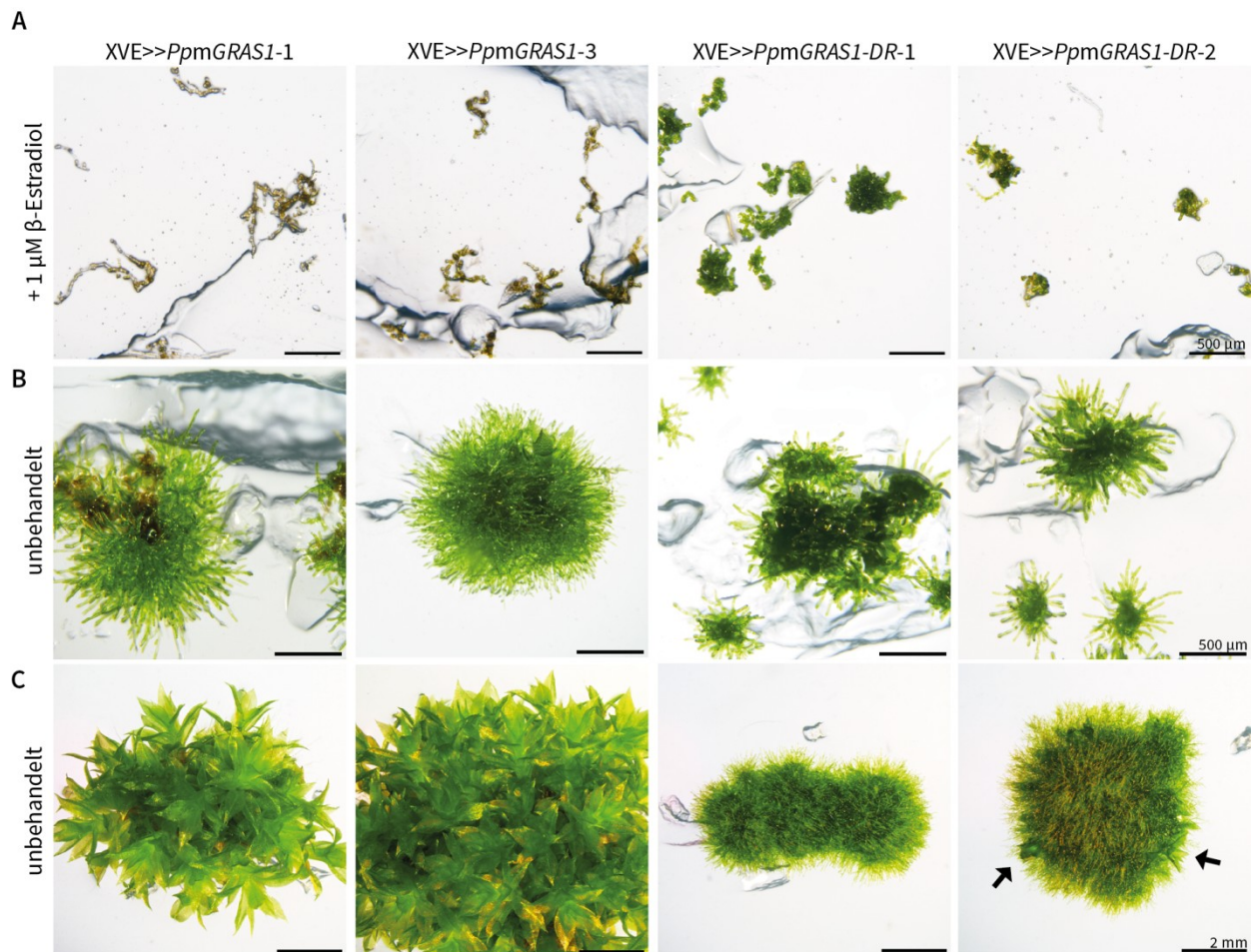


Abbildung 33: Entwicklung von β -Estradiol-behandeltem Protonemagewebe von XVE>>PpmGRAS1- sowie der XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien nach Transfer auf normales KNOP-Medium

A) Protonema-Gewebe nach 70 Tagen auf $1 \mu\text{M}$ β -Estradiol-haltigem KNOP-Medium.

B) Protonema-Gewebe nach 51 Tagen auf $1 \mu\text{M}$ β -Estradiol-haltigem KNOP-Medium und anschließend 17 Tagen auf normalem KNOP-Medium.

C) Protonemagewebe nach weiteren 23 Tagen auf normalem KNOP-Medium. Die Pfeile markieren junge Gametophoren.

Die Längen der Größenbalken sind in A) bis C) zeilenweise identisch.

3.8 Transkriptomanalyse von XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien und einer PptMIR171b-Überexpressionslinie

Die ektopische Überexpression von *PpmGRAS1* und *PpmGRAS1-DR* führt zu drastischen Veränderungen im Protonema und in den Gametophoren, die sich in ihrer Art und Ausprägung teilweise überlappen. *PpGRAS1* gilt als potenzieller Transkriptionsfaktor und die Braunfärbung des Protonemas bei einer *PpmGRAS1*-Überexpression wird durch die Fusion der Transkriptionsrepressor-Domäne SRDX aufgehoben. Daher kann man annehmen, dass die ektopische Überexpression von *PpmGRAS1* bzw. von *PpmGRAS1-DR* direkt die Expression von nachgeschalteten Genen beeinflusst und dadurch die auffälligen Phänotypen verursacht werden. Um untersuchen zu können, welche Veränderungen der Genexpres-

sion durch die ektopische *PpmGRAS1*- und *PpmGRAS1-DR*-Überexpression verursacht werden, wurden die Transkriptome von unbehandelten XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien und von β -Estradiol-induzierten Linien zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt nach der β -Estradiol-Induktion mittels RNA-Seq untersucht. Als Kontrollen wurde das Transkriptom der XVE-Vektorkontrolle unter Standardbedingungen und unter Induktion durch β -Estradiol analysiert. Die ppt-miR171 steuert durch negative Regulation die Expression von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* im Wt und somit indirekt auch deren nachgeschalteten Gene (Axtell, Snyder *et al.* 2007; Fattash, Voss *et al.* 2007). Diese lassen sich durch den Vergleich von Transkriptomen einer ppt-miR171-Überexpressionslinie mit dem einer unbehandelten XVE-Vektorkontrolle oder unbehandelten XVE>>*PpmGRAS1*-Linie identifizieren. Daher wurde das Transkriptom einer ppt-miR171-Überexpressionslinie ebenfalls mittels RNA-Seq untersucht.

Da für die Linien XVE>>*PpmGRAS1*-1 und -3 bereits eine induzierbare und dann stetig ansteigende *PpmGRAS1*-Expression nachgewiesen wurde (Abbildung 30, C), wurden diese Linien als biologisches Duplikat für die Transkriptomanalyse ausgewählt. Zur Transkriptomanalyse der XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien wurden die Linien Nr. 1 und 2 als biologisches Duplikat ausgewählt, da diese gegenüber der Linie Nr. 3 eine vergleichbare *PpmGRAS1-DR*-Überexpression aufweisen (Abbildung 30, C). Beide XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien wiesen bereits 2 h nach der β -Estradiol-Induktion eine nahezu gesättigte Überexpression auf. Um einen frühen Zeitpunkt mit einer ungesättigten Überexpression zu ermitteln, wurden RNA-Proben 0,5 h bzw. 1 h nach der Induktion entnommen. Für einen späteren Zeitpunkt wurden RNA-Proben 8 h nach der Induktion entnommen. Für die Transkriptomanalyse der ppt-miR171-Überexpressionslinie wurde die Linie *OsACT1::PpMIR171b-2* ausgewählt, die eine sechsfache ppt-miR171-Menge im Vergleich zum Wt aufweist. Die RNA-Proben wurden anschließend auf die *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1-DR*-Überexpression hin untersucht (Abbildung 34).

Für die Transkriptomanalyse der XVE>>*PpmGRAS1*-Linien wurden RNA-Proben von den Zeitpunkten 0 h (unbehandelt) sowie 1 h und 8 h nach der Induktion verwendet (Abbildung 34). Für die Transkriptomanalyse der XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien hingegen wurden RNA-Proben der Zeitpunkte 0 h (unbehandelt), 0,5 h und 8 h nach der Induktion verwendet, da die Überexpression 0,5 h nach der Induktion im Gegensatz zu 1 h nach der Induktion noch nicht gesättigt ist (Abbildung 34).

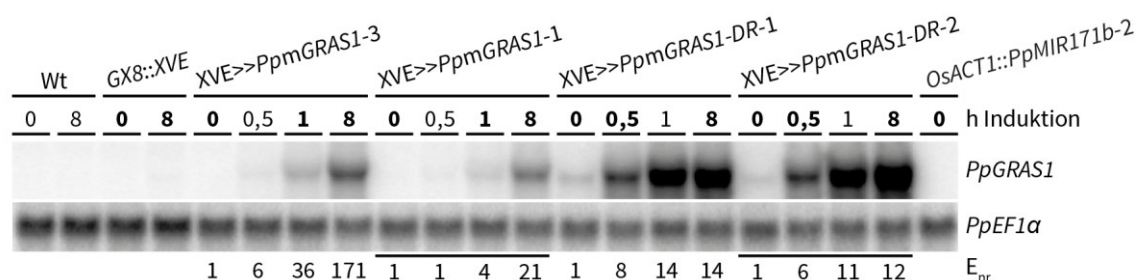


Abbildung 34: Überprüfung der *PpmGRAS1*- und *PpmGRAS1-DR*-Expression in RNA-Proben zur Transkriptomanalyse.

Zeitreihen zur Untersuchung der *PpmGRAS1*- bzw. *PpmGRAS1-DR*-Transkriptmengen im Verlauf der β -Estradiol-Induktion der *XVE>>PpmGRAS1*-Linien Nr. 1 und 3 sowie der *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien Nr. 1 und 2 im Vergleich zum Wt, der *XVE*-Vektorkontrolle und der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie. Die Dauer der Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ β -Estradiol ist in Stunden angegeben. Die Expressionsstärke der induzierten Transkripte (E_{nr}) ist normalisiert zur *PpEF1 α* -Transkriptmenge und relativ zum Zeitpunkt 0 h (unbehandelt) für jede transgene Linie angegeben. Aufgetrennt sind jeweils $8 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA. Die RNA-Proben, die zur Transkriptomanalyse verwendet wurden, sind fett markiert.

3.8.1 Mehr als 70 % der *P. patens*-Reads können eindeutig einem Transkript zugeordnet werden

Für die Transkriptomanalysen wurden cDNA-Bibliotheken anhand von Poly-A angereicherter Gesamt-RNA-Proben erstellt. Die Gesamt-RNAs bestehen aus im gleichen Verhältnis zusammengefassten RNA-Proben der drei Replikate, die von den transgenen Linien zu den verschiedenen Zeitpunkten und Behandlungen gewonnen wurden. Die cDNA-Bibliotheken wurden mit einem vollständig degenerierten Primergemisch erstellt. Bei der Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken kann daher die gesamte Länge von Poly-A-Transkripten durch mehrere cDNA-Sequenzen (Reads) abgedeckt werden. Die Expressionsstärke eines Gens kann durch die Anzahl der Reads, die dem Transkript des Gens zugeordnet werden können, bestimmt werden. Die Zuordnung von Reads zu einer Referenzsequenz wird als Read-Mapping bezeichnet. Das Read-Mapping der durch die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken gewonnenen Reads, wurde mit einem Referenztranskriptom für *P. patens* durchgeführt. Dieses wurde aus bekannten mRNA-Sequenzen (Genomannotation Version 1.6 (Zimmer, Lang *et al.* 2013)) und miRNA-Vorläufersequenzen (miRBase-Annotation; Release 20) von *P. patens* zusammengestellt.

Insgesamt konnten für alle *P. patens*-Proben mehr als 860 Millionen Reads mit einer durchschnittlichen Länge von 50 nt gewonnen werden. Von diesen Reads konnten 16 % keinem Transkript des *P. patens*-Referenztranskriptoms während des Read-Mappings zugeordnet werden. Da lediglich 22 % der Transkripte des verwendeten Referenztranskriptoms eine 5'UTR- oder 3'UTR-Sequenz besitzen (Zimmer, Lang *et al.* 2013), dürfte ein Großteil dieser nicht zuordenbaren Reads von UTR-Sequenzen abstammen. Da dies alle sequenzierten Proben gleichermaßen betrifft, haben diese Sequenzen keinen Einfluss auf die weitere Transkriptomanalyse. Weitere 77 % der Reads konnten eindeutig nur einem Transkript, 5 % der

Reads je zwei Transkripten und 1 % der Reads je drei Transkripten zugeordnet werden. Reads die in gleicher Qualität zu mehreren Transkripten passten wurden anteilig, nach zu den Transkripten bereits eindeutig zugeordneten Reads gewichtet, zugeteilt.

Eine Übersicht der gewonnenen RNA-Seq-Daten und der Ergebnisse des Read-Mappings ist in Tabelle 10 aufgeführt. Demnach entfallen auf eine Probe durchschnittlich 7 ± 1 % der gesamten Reads. Weiterhin konnten in einer Probe durchschnittlich 77 ± 1 % der Reads eindeutig einem einzigen Transkript des Referenztranskriptoms zugeordnet werden. Die Qualität der gewonnenen Transkriptomdaten ist somit unter den Proben vergleichbar.

Tabelle 10: Übersicht der RNA-Seq-Daten und Read-Mapping der *P. patens*-Proben

RNA-Probe (3 Replikate vereint)	Reads pro Probe	Gesamtanteil [%]	Anteil pro Treffer im Referenztranskriptom [%]				
			0	1	2	3	Summe
<i>GX8::XVE</i> 0 h	46268112	5,4	16	77	5	1	100
<i>PpmGRAS1-1</i> 0 h	56407135	6,6	14	78	5	2	100
<i>PpmGRAS1-3</i> 0 h	49144159	5,7	19	74	5	1	100
<i>PpmGRAS1-DR-1</i> 0 h	63897639	7,4	17	77	5	1	100
<i>PpmGRAS1-DR-2</i> 0 h	52152861	6,1	17	77	5	1	100
<i>PpmGRAS1-1</i> 1 h	57701789	6,7	14	79	5	1	100
<i>PpmGRAS1-3</i> 1 h	48714422	5,7	14	79	5	1	100
<i>PpmGRAS1-DR-1</i> 0,5 h	50997360	5,9	18	76	5	1	100
<i>PpmGRAS1-DR-2</i> 0,5 h	82576520	9,6	17	77	4	1	100
<i>PpmGRAS1-1</i> 8 h	62460825	7,3	15	79	5	1	100
<i>PpmGRAS1-3</i> 8 h	53590091	6,2	15	78	5	1	100
<i>PpmGRAS1-DR-1</i> 8 h	61028878	7,1	19	75	5	1	100
<i>PpmGRAS1-DR-2</i> 8 h	56557012	6,6	16	78	5	1	100
<i>GX8::XVE</i> 8 h	68845911	8,0	18	76	5	1	100
<i>OsACT1::PpMIR171b-2</i> 0 h	49990382	5,8	15	78	5	1	100
Summe/Durchschnitt*	860333096	100	16*	77*	5*	1*	

3.8.2 β -Estradiol-induzierte *XVE*>>*PpmGRAS1*- und *XVE*>>*PpmGRAS1-DR*-Linien unterscheiden sich in der Genexpression von unbehandelten Linien

Um die Varianz der Genexpression zwischen den Duplikaten der unbehandelten und induzierten *XVE*>>*PpmGRAS1*- und *XVE*>>*PpmGRAS1-DR*-Linien bzw. der unbehandelten und induzierten Vektorkontrolle sowie der *PpMIR171b-2*-Überexpressionslinie zu untersuchen, wurde anhand der normalisierten RPKM-Werte eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Ein schematischer Ablauf der Transkriptomdatenauswertung für *P. patens* ist im Anhang Abb. 2 dargestellt. Die ersten beiden Hauptkomponenten sind zusammen für 49 % der Varianz in der Genexpression der untersuchten Proben verantwortlich (Abbildung 35). Dabei trennt die erste Hauptkomponente die Proben hauptsächlich nach der Dauer der β -Estradiol-Induktion auf, während die zweite Hauptkomponente die *XVE*>>*PpmGRAS1*-

Proben von den XVE>>PpmGRAS1-DR-Proben trennt. Die Duplikate der unbehandelten und induzierten XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Proben fallen jeweils zusammen. Die zweite Hauptkomponente trennt die PpMIR171b-Überexpressionslinie nicht von der unbehandelten Vektorkontrolle. Zusammengefasst verursacht die β -Estradiol-Induktion eine Veränderung der Genexpression in den XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien, die sich von der Genexpression der β -Estradiol-behandelten Vektorkontrolle unterscheidet. Allerdings verursacht die Überexpression der ppt-miR171b keine Veränderung der Genexpression, die in den ersten beiden Hauptkomponenten abgebildet wird.

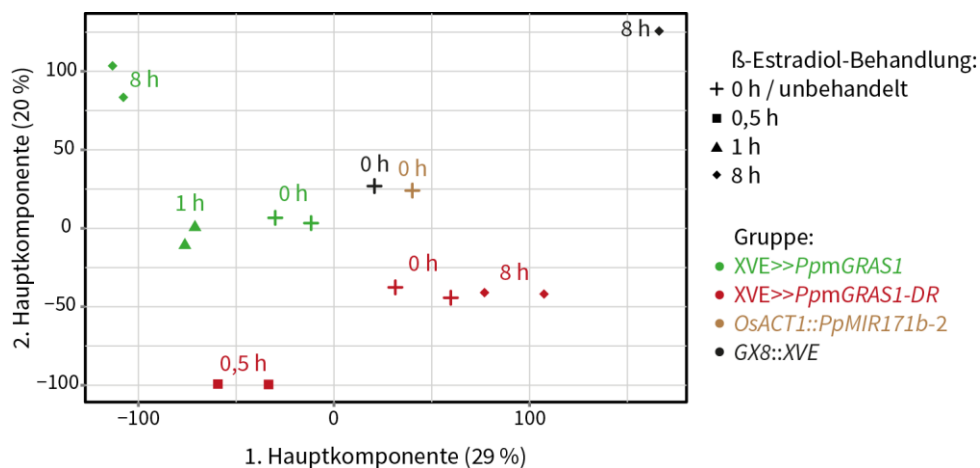


Abbildung 35: Hauptkomponentenanalyse der Varianz der Genexpression in den *P. patens*-Transkriptomdaten

Für die XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Gruppe sind jeweils beide biologischen Duplikate dargestellt.

3.8.3 β -Estradiol-Behandlung und anschließende Aktivierung von XVE in der XVE-Vektorkontrolle bewirken eine veränderte Genexpression

In den Transkriptomen der unbehandelten und induzierten XVE>>PpmGRAS1- und XVE>>PpmGRAS1-DR-Linien wurden Transkripte des konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktors XVE mit durchschnittlich 230 RPKM nachgewiesen. Im Vergleich hierzu wurde der Translations-Elongationsfaktor PpEF1 α mit durchschnittlich 130 RPKM nachgewiesen. In den Transkriptomen der unbehandelten XVE-Vektorkontrolle (GX8::XVE) wurden die XVE-Transkripte unbehandelt mit 730 RPKM und nach der β -Estradiol-Behandlung mit 5260 RPKM nachgewiesen. Worauf dieser β -Estradiol verursachte Anstieg der XVE-Transkriptmenge in der XVE-Vektorkontrolle beruht, ist unklar. Allerdings dürfte sich dadurch der Einfluss von aktivierten XVE-Proteinen im Zellkern auf die Genexpression verstärken. Tatsächlich führten bereits die β -Estradiol-Behandlung der XVE-Vektorkontrolle und die damit verbundene Aktivierung des chimären Transkriptionsfaktors XVE, zu einer Veränderung in der Genexpression. Um zu untersuchen, welche Gene dabei differentiell exprimiert werden, wurden die Transkriptomdaten der β -Estradiol-behandelten XVE-Vektorkontrolle mit einer unbehandelten XVE-Kontrollgruppe verglichen.

Da sich die Transkriptmenge von *PpGRAS1* in unbehandelten XVE>>*PpmGRAS1*-Linien nicht von der unbehandelten XVE-Vektorkontrolle unterscheidet (*fold change* (FC) < 2, $q > 0,1$), wurden die Transkriptomdaten der unbehandelten XVE>>*PpmGRAS1*-Linien mit denen der unbehandelten Vektorkontrolle als XVE-Kontrollgruppe zusammengefasst.

Der Vergleich der induzierten Vektorkontrolle mit der XVE-Kontrollgruppe erfolgte durch eine digitale Genexpressionsanalyse (DGE-Analyse). Durch die DGE-Analyse werden die Veränderungen der Genexpression als *fold change* (FC) berechnet und mittels einem Exact-Test nach Robinson and Smyth (2008) statistisch überprüft. Da während der DGE-Analyse für jedes Gen des Datensatzes ein Exact-Test durchgeführt wurde, wurden die p-Werte der Tests anhand der *false discovery rate* (FDR) korrigiert und die korrigierten p-Werte (q-Werte) für die Bestimmung von differentiell exprimierten Genen herangezogen (Siehe Material- und Methodenteil Abschnitt 0). Von insgesamt 22 454 nachgewiesenen Genen (mind. fünf Reads in einer Probe) zeigten 848 Gene eine differentielle Expression ($|FC| > 2$ und $q < 0,001$) in der β -Estradiol-behandelten XVE-Vektorkontrolle (Abbildung 36, A). Dieses Set von Genen, deren Expression sich bereits durch β -Estradiol- oder aktivem XVE beeinflussen lässt, konnte nun bei der Auswertung der Transkriptomanalysen von induzierten XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Proben herausgefiltert werden.

3.8.4 Die primären Transkripte von *PpMIR171a* werden im *Protonema* effizient prozessiert

In einem nächsten Schritt wurde die Expression der primären Transkripte von *PpMIR171a* und *PpMIR171b* in den verschiedenen Proben untersucht und die *PpMIR171b*-Überexpression in der *OsACT1::PpMIR171b-2*-Linie nochmals überprüft. In allen XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Proben, sowie allen Proben der XVE-Vektorkontrolle, wurden die primären Transkripte von *PpMIR171a* und *PpMIR171b* mit weniger als fünf Reads nachgewiesen. Bei der Analyse der Expressionsdomänen von *PpMIR171a* und *PpMIR171b* wurde bereits eine deutliche Aktivität des *PpMIR171a*-Promotors im Promotorgewebe nachgewiesen (Abbildung 11, A). Für die Transkriptomanalysen wurde Gesamt-RNA aus *Protonemagewebe* verwendet. Allerdings lassen sich die primären Transkripte weder von *PpMIR171b* noch von *PpMIR171a*, dessen Promotor im *Protonema* aktiv ist, kaum nachweisen. In der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie hingegen wurde das primäre *PpMIR171a*-Transkript nur mit einem Read detektiert, während das primäre *PpMIR171b*-Transkript mit 362 Reads detektiert wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass die primären Transkripte von *PpMIR171a* bei natürlicher Expressionsstärke sofort zur reifen *ppt-miR171a* prozessiert werden und erst bei stärkerer Transkriptionsrate akkumulieren.

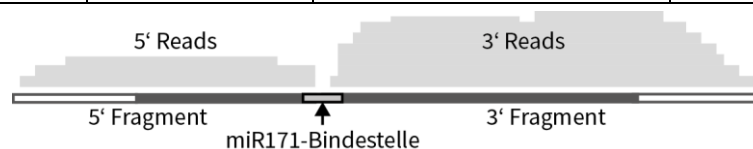
3.8.5 Die *PpMIR171b*-Überexpressionslinie akkumuliert 3'-Spaltprodukte von *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*

Weiterhin wurde die Expression von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* in der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie anhand der Transkriptomdaten untersucht und mit den anderen sequenzierten Proben verglichen. Die cDNA-Bibliotheken für die Transkriptomanalysen wurden von poly-A-angereicherten RNA-Proben angefertigt. Da die 5'-Spaltprodukte von miRNA-gespaltenen mRNAs, wie z.B. *PpGRAS1* oder *PpGRAS2*, keinen Poly-A-Schwanz besitzen, werden sie nicht angereichert und können somit nicht sequenziert werden. Die 3'-Spaltprodukte hingegen besitzen einen poly-A-Schwanz. Daher lässt sich über das Verhältnis der 3'-Fragment-Reads zu 5'-Fragment-Reads der Anteil von gespaltenen miRNA-Zieltranskripten bestimmen. In der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie waren wie zu erwarten die Verhältnisse der 3'-Fragment-Reads zu 5'-Fragment-Reads von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* mit 37,4 bzw. 9,4 deutlich größer als in den XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Proben sowie den Proben der XVE-Vektorkontrolle, welche Verhältnisse kleiner als zwei aufwiesen (vergleiche Tabelle 11). Folglich wurden in der *PpMIR171b-2*-Überexpressionslinie beide ppt-miR171-Zieltranskripte vermehrt gespalten.

Die DGE-Analyse der Transkriptomdaten der *PpMIR171b-2*-Überexpressionslinie im Vergleich zur XVE-Kontrollgruppe ergab 146 differentiell exprimierte Gene (Abbildung 36, B). Die Zieltranskripte der ppt-miR171 zeigten dabei scheinbar keine Veränderung in der Transkriptmenge. Dies lag daran, dass eine Zunahme der 3'-Fragment-Reads die Abnahme der 5'-Fragment-Reads von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* ausglich und daher die Summe der Reads unverändert blieb. Dies stimmte auch mit der Analyse der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Transkripte in den *PpMIR171a*- und *PpMIR171b*-Überexpressionslinien mittels Northern Blot überein, die eine deutliche Akkumulation von 3'-Spaltprodukten zeigte (Abbildung 24, F und G). Es stehen somit in der *PpMIR171b-2*-Überexpressionslinie weniger ungespaltene Transkripte von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* für eine Proteinbiosynthese zur Verfügung als im Wt oder den Linien der XVE-Vektorkontrollgruppe. Die differentielle Expression der 146 Gene in der *PpMIR171b-2*-Überexpressionslinie, die mit der reduzierten Genexpression von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* einhergeht, bewirkte keine vom Wt abweichende Entwicklung des Gametophyten oder Sporophyten (siehe Abbildung 25).

Tabelle 11: Normalisierte Verhältnisse der 3'-Fragment-Reads zu 5'-Fragment-Reads der ppt-miR171-Zielgene und schematische Darstellung der Read-Verteilung

Genotyp	β -Estradiol-Behandlung	normalisiertes Verhältnis 3'-Reads/5'-Reads	
		<i>PpGRAS1</i>	<i>PpGRAS2</i>
<i>GX8::XVE</i>	0 h	1,9	1,9
	1 h	1,6	1,6
<i>XVE>>PpmGRAS1</i>	0 h	1,5	1,7
	1 h	1,1	1,7
	8 h	1,2	1,9
<i>XVE>>PpmGRAS1-DR</i>	0 h	1,2	1,3
	0,5 h	1,2	1,6
	8 h	1,3	1,4
<i>OsACT1::PpMIR171b</i>	0 h	37,4	9,4



Die Anzahl der 3'- und 5'-Fragment-Reads wurde anhand der 3'- und 5'-Fragmentlängen normalisiert. Für die *XVE>>PpmGRAS1*- und *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien sind die Mittelwerte der biologischen Duplikate angegeben.

3.8.6 *XVE>>PpmGRAS1*- und *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien zeigen eine frühe und eine späte Antwort der Genexpression nach β -Estradiol-Induktion

Im Gegensatz zur Reduzierung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Expression in den ppt-miR171-Überexpressionslinien hat die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* allein bereits gravierende Auswirkungen auf die Entwicklung des Gametophyten. Der Wachstumsstopp des Protonemas sowie die Veränderungen des Pigmentgehalts dürften daher mit weitreichenderen Veränderungen in der Genexpression einhergehen als die der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie im Vergleich zur XVE-Kontrollgruppe. Die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1-DR* im Protonema unterscheidet sich von der induzierten *PpmGRAS1*-Überexpression vor allem durch einen sichtlich normalen Pigmentgehalt. Dieser Unterschied sollte sich auch in der Genexpression widerspiegeln.

Die β -Estradiol-induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* führte nach einer Stunde zu einer 12,5-fach erhöhten *PpGRAS1*-Transkriptmenge, die nach weiteren 7 h Induktion nochmals um das 3-fache zunahm. Dabei stieg die *PpGRAS1*-Transkriptmenge von durchschnittlich 22 RPKM auf letztlich 928 RPKM an. Im Vergleich hierzu wurde die Transkriptmenge des konstitutiv exprimierten α Tubulin 1-Gens (*Pp1s70_210V6.1*) mit durchschnittlich 236 RPKM nachgewiesen. Ebenso führte die β -Estradiol-induzierte Überexpression von *PpmGRAS1-DR* nach einer halben Stunde zu einer 18,4-fachen *PpGRAS1-DR*-Transkriptmenge, die nach weiteren 7,5 h um ein 2-faches weiter zunahm. Nach 8 h konnte *PpGRAS1-DR* mit durchschnittlich 5325 RPKM nachgewiesen werden.

Für die Identifizierung von früh bzw. erst später differentiell exprimierten Genen in den β -Estradiol-induzierten *XVE>>PpmGRAS1*- und *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien wurden die Transkriptomdaten der biologischen Duplikate eines Zeitpunktes jeweils als Gruppen zusammengefasst und diese mittels DGE-Analyse verglichen. Von 21 671 in den *XVE>>PpmGRAS1*-Proben nachgewiesenen Genen wurden nach 1 h β -Estradiolinduktion bereits 1213 Gene differentiell exprimiert (Abbildung 36, C, links). Nach weiteren 7 h Induktion wurden 2820 Gene als differentiell exprimiert identifiziert (Abbildung 36, C, rechts). Mit zunehmender Induktionsdauer und *PpmGRAS1*-Expressionsstärke steigt also auch die Anzahl der differentiell exprimierten Gene. Von den früh differentiell exprimierten Genen veränderten 558 Gene auch später ihre Expressionsstärke, während die Expressionsstärke der verbleibenden 655 Gene trotz steigender *PpmGRAS1*-Expression unverändert blieb.

In den *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Proben konnten 22 059 Gene nachgewiesen werden. Nach 0,5 h β -Estradiolinduktion wurden 1316 Gene differentiell exprimiert (Abbildung 36, D, links). Nach weiteren 7,5 h Induktion wurden 2308 Gene als differentiell exprimiert identifiziert (Abbildung 36, D, rechts). Davon waren insgesamt 977 Gene bereits zuvor, also früh, differentiell exprimiert. Auch hier nimmt mit zunehmender Induktionsdauer und *PpmGRAS1-DR*-Expressionsstärke die Anzahl an differentiell exprimierten Genen zu.

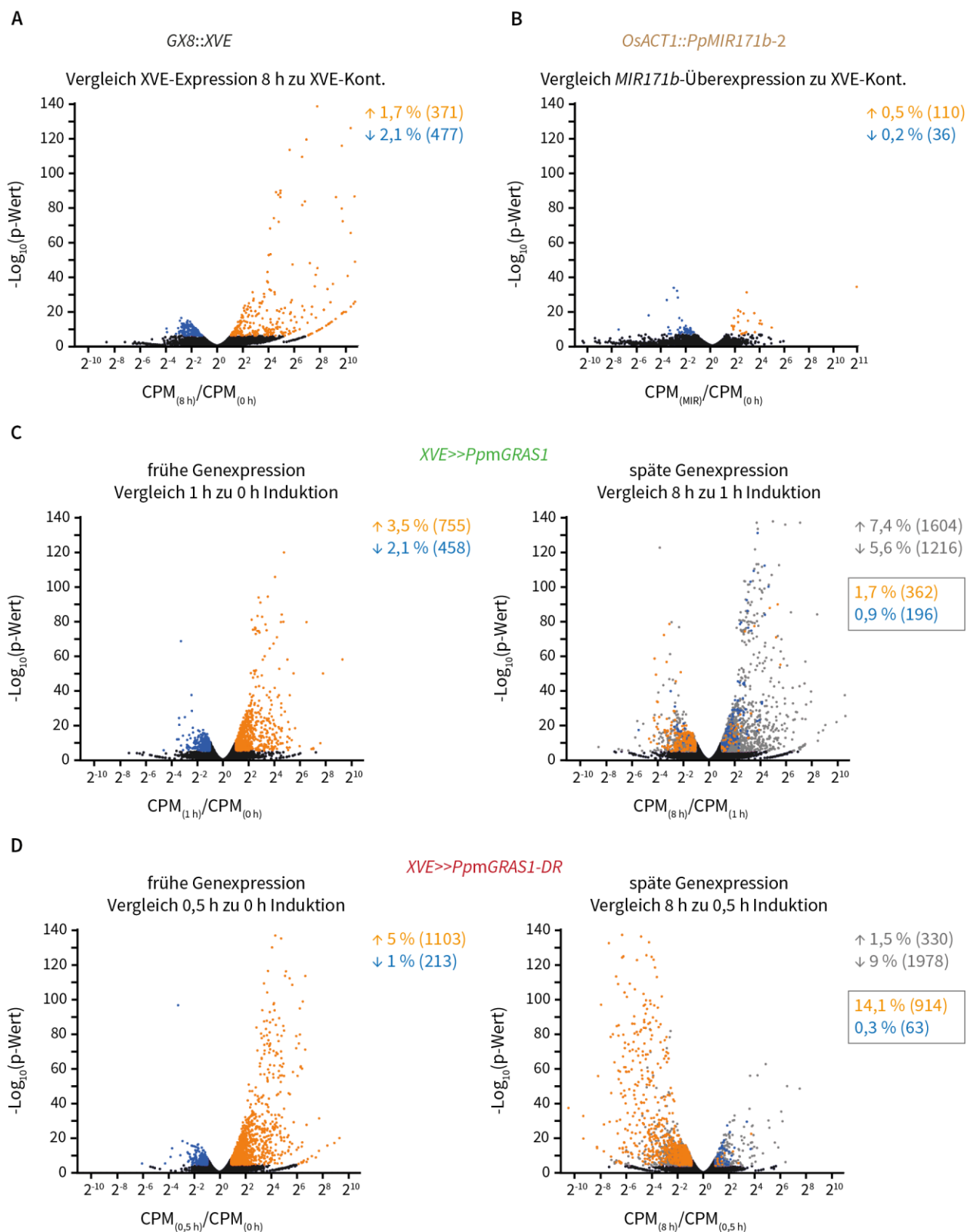


Abbildung 36: Differenzielle Genexpression in der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie und nach β -Estradiolinduktion von *XVE>>PpmGRAS1*- und *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien sowie β -Estradiolbehandlung der *XVE*-Vektorkontrolle

Differenzielle Genexpressionsanalyse durch das in CLC-Genomics implementierte Programm EdgeR. Die p-Werte des Exact-Tests (Robinson and Smyth 2008) sind aufgetragen gegen die Veränderung der Expressionsstärke (CPM_1/CPM_2); CPM: *counts per million* (Fortsetzung nächste Seite).

Abbildung 36: Differentielle Genexpression in der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie und nach β -Estradiolinduktion von XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien sowie β -Estradiolbehandlung der XVE-Vektorkontrolle (Fortsetzung)

Angegeben ist jeweils der Anteil und die Anzahl an Genen, die früh signifikant mehr als zweifach schwächer exprimiert sind (in blau) und an Genen, die früh signifikant mehr als zweifach stärker exprimiert sind (in orange). Signifikanzniveau FDR korrigiert mit $q < 0,001$.

A) Die 8 h induzierte XVE-Vektorkontrolle (*GX8::XVE*) im Vergleich zur Genexpression der XVE-Kontrollgruppe (XVE-Kont.) bestehend aus zusammengefassten Daten der uninduzierten XVE>>*PpmGRAS1*-Linien und der unbehandelten XVE-Vektorkontrolle.

B) *PpMIR171b*-Überexpressionslinie im Vergleich zur Genexpression der XVE-Kontrollgruppe.

C) Die XVE>>*PpmGRAS1*-Linien nach 1 h β -Estradiol-Induktion (links) und nach weiteren 7 h β -Estradiol-Induktion (rechts). Angegeben sind der Anteil und die Anzahl an Genen, die spät differentiell exprimiert sind (in grau) sowie in der Box der Anteil und die Anzahl von Genen, die zuvor bereits mehr als zweifach schwächer (in blau) bzw. zweifach stärker (in orange) exprimiert waren. Signifikanzniveau FDR korrigiert mit $q < 0,001$.

D) Die XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien nach 0,5 h β -Estradiol-Induktion (links) und nach weiteren 7,5 h β -Estradiol-Induktion (rechts). Angaben wie in C).

3.8.7 Clusteranalyse der *P. patens* Transkriptomdaten

Durch eine Clusteranalyse können Gene mit ähnlichem Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Proben zusammengefasst werden. Dies ermöglicht auch die Identifizierung von koregulierten Genen. Um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, die in den untersuchten *P. patens*-Transkriptomen koreguliert sind, wurden hierarchische Clusteranalysen von früh und von spät differentiell regulierten Genen durchgeführt. In einem vorangehenden Filterschritt wurden dafür nur die Gene ausgewählt, die durch die β -Estradiol-Behandlung der XVE-Vektorkontrolle keine Veränderung in der Genexpression aufwiesen ($|FC| < 2$ und $q > 0,1$). Anschließend wurden davon alle Gene zu einem Datensatz zusammengefasst, die in den XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien bereits früh nach der β -Estradiol-Induktion eine differentielle Expression aufwiesen ($|FC| > 2$ und $q < 0,1$). Ebenso wurden alle Gene zu einem Datensatz zusammengefasst, die erst spät nach der β -Estradiol-Induktion eine differentielle Expression aufwiesen, sofern sie nicht bereits früh eine differentielle Expression aufwiesen. Diese beiden Datensätze wurden zuerst nach den RPKM-Werten der einzelnen Gene hierarchisch geclustert und anschließend nach den RPKM-Werten der einzelnen Proben. Ein schematischen Ablauf der *P. patens* Transkriptomdatenauswertung mit der hierarchischen Clusteranalyse ist im Anhang Abb. 2 mittig dargestellt. Zur Visualisierung der Expressionsstärken der Gene in den geclusterten Datensätzen wurden Heat-maps anhand Mittelwert-zentrierter RPKM-Werte generiert. Um Informationen über die Funktionen der geclusterten Gene zu gewinnen, wurden daraufhin funktionelle und deskriptive Gen-Annotationen sowie Vorhersagen zur zellulären Lokalisation der Proteine durchgeführt. Zusätzlich wurden die geclusterten Gene auf Transkriptionsfaktoren hin durchsucht. Aufgrund ihrer Größe sind die geclusterten Datensätze zusammen mit den Heat-maps und den Gen-Annotationen als Tabellen im digitalen Anhang dieser Arbeit aufgeführt (Daten-CD, Excel Tabelle 1 und 2). Die Tabelle der früh differentiell exprimierten Gene enthält auch eine Liste von Genen, die die durch *PpMIR171b*-Überexpression differentiell exprimierten Gene aufführt, sofern sie nicht bereits in den Heat-maps enthalten sind.

3.8.8 Die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* im Protonema reduziert die Transkriptmengen von Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate

In *A. thaliana* sind die ath-miR171-Zielgene unter anderem an der Regulierung der Chlorophyllbiosynthese beteiligt. AthSCL6-II bindet als Repressor direkt an den Promotor des Protochlorophyllid-Reduktasegens *AthPORC* (Ma, Hu *et al.* 2014). *P. patens* besitzt zwei Gene, die für Protochlorophyllid-Reduktasen codieren: Pp1s108_171V6.1 und Pp1s146_112V6.1 – im folgenden *PpPOR1* (Pp1s108_171V6.1) und *PpPOR2* (Pp1s146_112V6.1) genannt. Der gegenteilige Effekt auf den Pigmentstoffwechsel bei einer induzierten Überexpression von *PpmGRAS1* und *PpmGRAS1-DR* als konstitutiver Repressor legt nahe, dass *PpGRAS1* ebenfalls an der Regulierung der Chlorophyllbiosynthese beteiligt sein könnte. Daher wurden die geclusterten Datensätze nach Genen mit Bezug zur Chlorophyllbiosynthese bzw. Photosynthese durchsucht. Es konnten vier Gene identifiziert werden, die nach 8 h induzierter Überexpression von *PpmGRAS1*, nicht aber von *PpmGRAS1-DR*, signifikant herunterreguliert werden und für Enzyme der Chlorophyllbiosynthese codieren (Abbildung 37, A und B). Zwei dieser Enzyme, die Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase und die Uroporphyrinogen-Decarboxylase (Abbildung 37, B Nr. 3 und 7), katalysieren Reaktionsschritte der Häm- und Chlorophyllbiosynthese ausgehend von Glutamat. Erst ab dem Zwischenprodukt Protoporphyrin IX teilt sich der Reaktionsweg in Chlorophyll- und Hämbiosynthese auf (Abbildung 37, B). Nach dieser Verzweigung sind die Gene, die für die Magnesium-Protoporphyrin-IX-Methyltransferase bzw. die Chlorophyllsynthetase codieren, herunterreguliert (Abbildung 37, B Nr. 11 und 14). Zwei weitere Gene, die für Homologe der Proteine LIGHT-HARVESTING LIKE 3 (Lil3) und GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) aus *A. thaliana* codieren, sind ebenfalls an der Chlorophyllbiosynthese beteiligt und wurden nach der induzierten Überexpression von *PpmGRAS1*, nicht aber von *PpmGRAS1-DR*, als späte Gene herunterreguliert. In *A. thaliana* stabilisiert Lil3 die Geranylgeranyl-Reduktase, ein Enzym das den Phytylrest für die Chlorophyll-a-Biosynthese bereitstellt (Tanaka *et al.* 2010). Weiterhin stabilisiert und aktiviert GUN4 in *A. thaliana* die Mg-Chelatase (Adhikari *et al.* 2011) (Abbildung 37, B Nr. 10). Beide Enzyme fördern somit die Chlorophyllbiosynthese. Von den beiden Protochlorophyllid-Reduktasegenen *PpPOR1* und *PpPOR2* (Abbildung 37, B, Reaktionsschritt Nr. 13) wurde nach der induzierten Überexpression von *PpmGRAS1* nur die Transkriptmenge von *PpPOR1* nach 8 h Induktion um das 3,6 fache herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wurden die Transkriptmengen von sowohl *PpPOR1* als auch *PpPOR2* nach der induzierten Überexpression von *PpmGRAS1-DR* um das 2,4 bzw. 3,4-fache spät hochreguliert. Allerdings sind beide Gene, *PpPOR1* sowie *PpPOR2*, in der β -Estradiol-behandelten XVE-Vektorkontrolle negativ beeinflusst. Daher ist nicht auszuschließen, dass der aktive Transkriptionsfaktor XVE oder β -Estradiol selbst einen Einfluss auf die Transkriptmengen beider Gene hat.

Einhergehend mit den herunterregulierten Transkriptmengen von Chlorophyllbiosyntheseenen wird auch eine größere Gruppe an Genen, die für Proteine der Photosysteme I und II sowie den Lichtsammelkomplexen I und II codieren, nach der induzierten Überexpression von *PpmGRAS1*, nicht aber von *PpmGRAS1-DR*, als späte Gene herunterreguliert (Abbildung 37, A).

Zusammengefasst bewirkt die β -Estradiol-induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* nach 8 h eine Reduzierung in den Transkriptmengen von Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate. Dies könnte bei Dauerinduktion von *PpmGRAS1* zu einem Chlorophyllmangel und einem Abbau der vorhandenen Photosysteme führen, der letztlich zu der beobachteten Braunfärbung der Chloroplasten im Protonema führt (Abbildung 31, B). Im Gegensatz dazu bewirkt die β -Estradiol induzierte Überexpression von *PpmGRAS1-DR* keine Reduktion oder Steigerung der Transkriptmengen von Genen der Chlorophyllbiosynthese oder der Photosyntheseapparate. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass β -Estradiol induzierte *PpmGRAS1-DR*-Linien keine Braunfärbung aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die C-terminale Fusion von PpGRAS1 mit der dominanten Repressordomäne SRDX die Senkung der Transkriptmengen der Chlorophyllbiosynthese- und Photosyntheseenen verhindert.

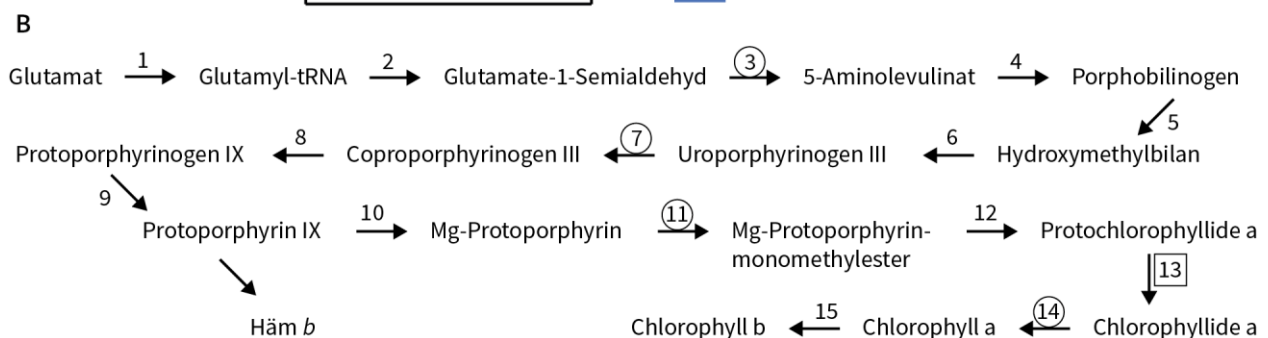
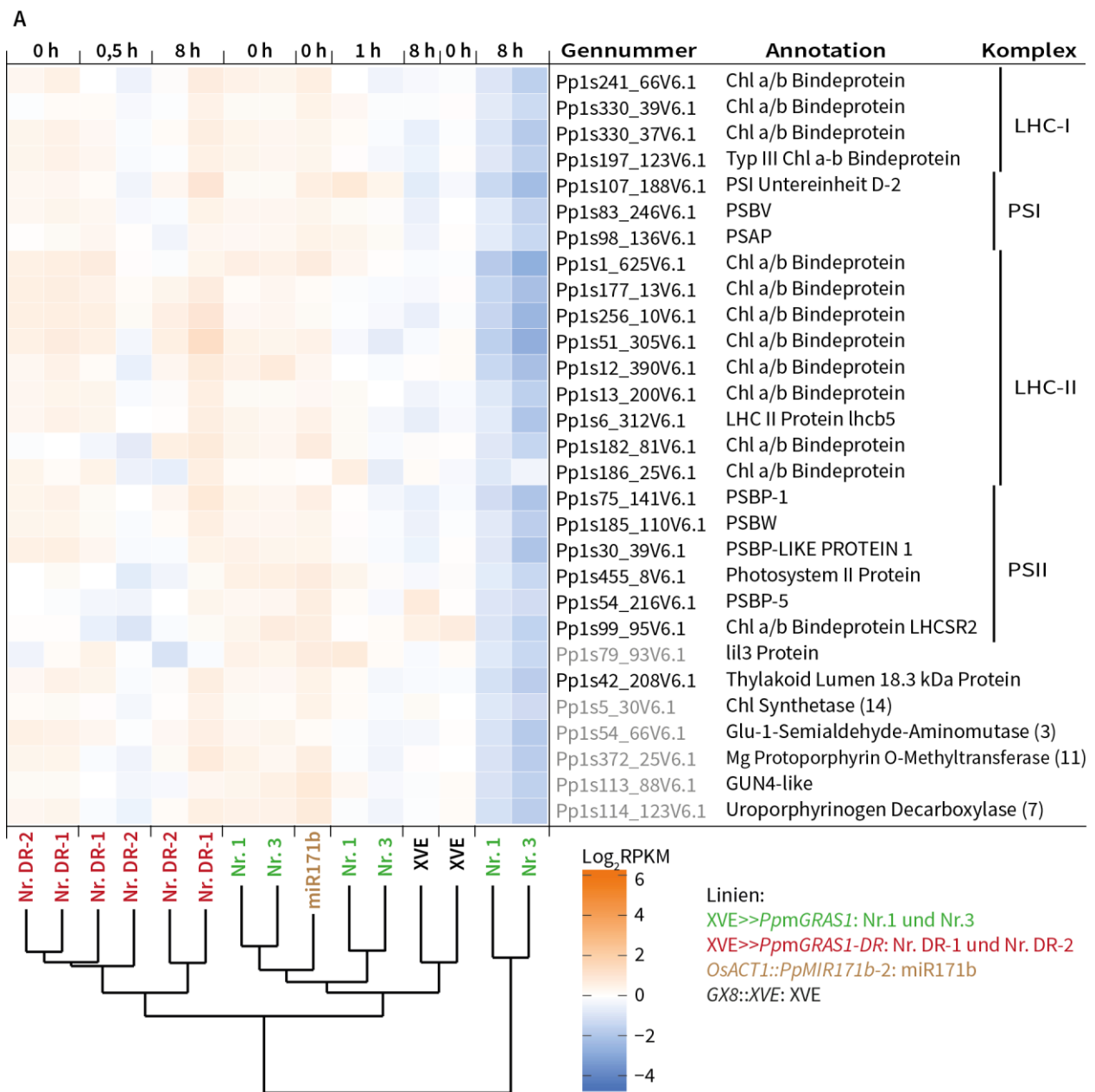


Abbildung 37: Heat-map und Annotationen von differenziell exprimierten Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate in *P. patens*

A) Auszug der Heat-map der früh differenziell exprimierten Gene (Daten-CD, Excel Tabelle 1) mit Bezug zur Photosynthese. Die reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads (RPKM-Werte) jedes Gens sind auf ihren Mittelwert zentriert (weiß/0) und als Logarithmus zur Basis 2 wiedergegeben. Die Heat-map ist nach den RPKM-Werten der einzelnen Proben hierarchisch geclustert. Die Dauer der β -Estradiol-Behandlung ist oben angegeben; 0 h entspricht unbehandelt (siehe Fortsetzung).

Abbildung 37: Heat-map und Annotationen von differentiell exprimierten Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate in *P. patens* (Fortsetzung)

A) (Fortsetzung) Gene, die an der Chlorophyll-Biosynthese beteiligt sind, sind grau hervorgehoben. Die Nummern geben die katalysierten Reaktionsschritte in B) an. LHC-I: *Light Harvesting Complex I*, LHC-II: *Light Harvesting Complex II*, PSI: Photosystem I, PSII: Photosystem II.

B) Der Biosyntheseweg von Chlorophyll a und b besteht aus 15 Reaktionsschritten, die von verschiedenen Enzymen katalysiert werden (Michal 1999). Die umkreisten Nummern geben Reaktionsschritte mit Enzymen an, die eine differentielle Genexpression in A) zeigen. Der 13. Reaktionsschritt wird von der Protochlorophyllid-Reduktase (POR) katalysiert.

3.9 Induzierbare Überexpression *AthmSCL6-II* und *AthmSCL6-III*

Auch wenn bereits erste, den ath-miR171-Zielgenen regulatorisch nachgeschaltete Gene in *A. thaliana* identifiziert wurden (Ma, Hu *et al.* 2014; Xue, Zhao *et al.* 2014; Zhou, Liu *et al.* 2014), ist das gesamte regulatorische Netzwerk noch nicht vollständig aufgeklärt. Da bereits die korrekte Funktion von *AthSCL6-II* oder *AthSCL6-III*, nicht aber die von *AthSCL6-IV* zur Aufrechterhaltung des Sprossmeristems genügt (Schulze, Schafer *et al.* 2010), können beispielsweise die daran beteiligten Gene durch eine *AthSCL6-II* oder *AthSCL6-III*-Überexpression beeinflusst und untersucht werden. Auch hier könnten durch ein induzierbares Überexpressionssystem Gene identifiziert werden, deren Expression sich bereits unmittelbar oder erst später nach einer *AthSCL6-II* bzw. *AthSCL6-III*-Überexpression verändern. Zudem könnte ein Vergleich solcher Gene Auskunft über die Spezifität der *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* nachgeschalteten Gene geben.

Daher wurden wie bereits für die ppt-miR171-Zielgene induzierbare Überexpressionslinien für *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* erzeugt, die durch mutierte ath-miR171-Bindestellen gegenüber der ath-miR171-resistent sind (GVG>>*AthmSCL6-II* und GVG>>*AthmSCL6-III*). Als Expressionssystem wurde das in *A. thaliana* bereits etablierte Dexamethason-induzierbare System basierend auf dem Vektor pTA7002 verwendet (Aoyama *et al.* 1997). Im Gegensatz zu dem β -Estradiol-induzierbaren Expressionssystem für *P. patens* besteht hier der chimäre Transkriptionsfaktor GVG aus der GAL4 DNA-Bindedomäne, der VP16-Transkriptions-Aktivierungsdomäne und einem Glucocorticoid-Rezeptor. Wie auch der chimäre Transkriptionsfaktor XVE, wird GVG konstitutiv exprimiert und bildet Homodimere im Zytoplasma. Nach Zugabe von Dexamethason (DEX), das als synthetisches Funktionsanalogon an den Glucocorticoid-Rezeptor bindet, zerfallen die GVG-Homodimere und GVG wird in den Zellkern importiert. Dort binden die GVG-Monomere mit der GAL4 DNA-Bindedomäne an sechs Kopien der GAL4-Aktivierungssequenz (GAL4-AS), die sich vor einer kurzen Sequenz des *CaMV35S*-Promotors (Position -46 bis +1) befinden und aktiviert die Expression des dahinterliegenden Gens. Um den Einfluss des konstitutiv exprimierten GVG zu berücksichtigen, wurde die T-DNA des pTA7002-Vektors ohne kodierende Sequenz als Kontrolle ebenfalls transformiert.

3.9.1 Klonierung der Vektoren pTA7002-*AthmSCL6-II* und pTA7002-*AthmSCL6-III*

In zwei Schritten wurden jeweils zwei Fragmente von *AthSCL6-II*- und *AthSCL6-III*-cDNA amplifiziert und nacheinander in pJET1.2 zusammengefügt (Abbildung 38, Schritt 1 und 2). Die PCR-Fragmente überlappen sich dabei in der miR171-Bindestelle. Die sich im Bereich der miR171-Bindestelle überlappenden Primer wurden so entworfen, dass stille Punktmutationen die *ath*-miR171-Bindestellen verändern und eine neue *PauI*-Restriktionsschnittstelle generieren. Diese wurde zum Zusammenfügen der einzelnen Fragmente verwendet. In der Tabelle 12 sind die Punktmutationen und Restriktionsschnittstellen aufgeführt. Die entstandenen Plasmide wurden pJET-*AthmSCL6-II* und pJET-*AthmSCL6-III* genannt. Zur Überprüfung wurden die klonierten Fragmente mit den Primern #514 und #515 sequenziert und Plasmide mit fehlerfreier Sequenz im nächsten Schritt verwendet.

Im dritten Schritt wurden *AthmSCL6-II* aus pJET-*AthmSCL6-II* und *AthmSCL6-III* aus pJET-*AthmSCL6-III* jeweils in pTA7002 kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden pTA7002-*AthmSCL6-II* und pTA7002-*AthmSCL6-III* genannt.

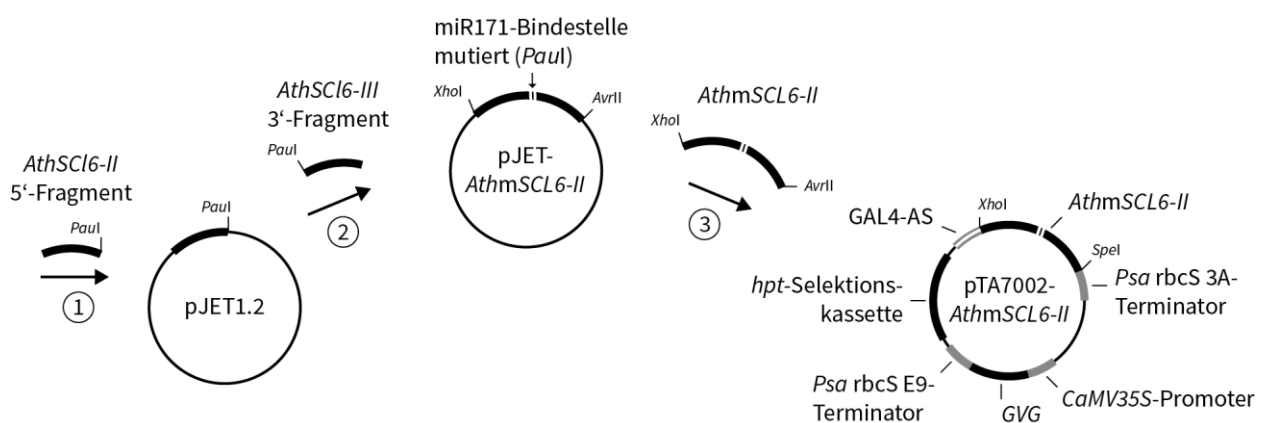


Abbildung 38: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pTA7002-*AthmSCL6-II* und pTA7002-*AthmSCL6-III* beispielhaft gezeigt für *AthmSCL6-II*

- 1) Amplifikation des *AthSCL6-II* 5'-Fragments mit den Primern #1417 und #1421 von *A. thaliana* Wt-cDNA und *blunt end*-Klonierung in pJET1.2
- 2) Amplifikation des *AthSCL6-II* 3'-Fragments mit den Primern #1419 und #1424 von *A. thaliana* Wt-cDNA und Klonierung hinter das *AthSCL6-II* 5'-Fragment über *Paul* und *blunt end* in pJET1.2.
- 3) Klonierung von *AthmSCL6-II* mit *XhoI* und *AvrII* (*SpeI* kompatibel) in pTA7002.

Die Klonierung von pTA7002-*AthmSCL6-III* erfolgte analog zu pTA7002-*AthmSCL6-II*. Das *AthmSCL6-III* 5'-Fragment wurde mit den Primern #1421 und #1422 und das 3'-Fragments mit den Primern #1423 und #1424 amplifiziert. Die Klonierung von *AthmSCL6-III* in pTA7002 erfolgte über *XhoI* und *SpeI*.

Psa rbcS 3A/E9-Terminator: Terminatoren der Gene, die für die kleinen Untereinheiten 3A und E9 der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase in *Pisum sativum* codieren.

Tabelle 12: DNA- und mRNA-Sequenzvergleiche der natürlichen und mutierten ath-miRNA171a/b-Bindestellen in *AthSCL6-II/III* und *AthmSCL6-II/III* je mit codierten Aminosäuresequenzen

<i>AthSCL6-II/AthmSCL6-II</i>	
Aminosäuresequenz	G I L A R L N H
<i>AthSCL6-II</i> DNA	5' AGGGATATTGGCGCGGCTCAATCA 3'
<i>AthmSCL6-II</i> DNA (mutiert mit <i>PauI</i> -Restriktionsschnittstelle)	5' AGGAATTCTAGCGCGCTTAAACCA 3'
Aminosäuresequenz	G I L A R L N H
<i>AthmSCL6-II</i> mRNA (mutiert)	5' AGGAAUUCUAGCGCGCUAAAACCA 3'
	X XX X X:X X
ath-miR171a	3' CUAUAACCGCGCCGAGUUAGU 5'
<i>AthSCL6-II</i> mRNA	5' AGGGAUUAUUGGCGCGCUCAAUCA 3'
	X X :
ath-miR171b/c	3' GCACUAUAACCGUGCCGAGUU 5'
	X XX XX X : X:X
<i>AthmSCL6-II</i> mRNA (mutiert)	5' AGGAAUUCUAGCGCGCUAAAACCA 3'
Aminosäuresequenz	G I L A R L N H
<i>AthSCL6-III/AthmSCL6-III</i>	
Aminosäuresequenz	G I L A R L N H
<i>AthSCL6-III</i> DNA	5' AGGGATATTGGCGCGGCTCAATCA 3'
<i>AthmSCL6-III</i> DNA (mutiert mit <i>PauI</i> -Restriktionsschnittstelle)	5' AGGAATTCTAGCGCGCTTAAACCA 3'
Aminosäuresequenz	G I L A R L N H
<i>AthmSCL6-III</i> mRNA (mutiert)	5' AGGAAUUCUAGCGCGCUAAAACCA 3'
	X XX X X:X X
ath-miR171a	3' CUAUAACCGCGCCGAGUUAGU 5'
<i>AthSCL6-III</i> mRNA	5' AGGGAUUAUUGGCGCGCUCAAUCA 3'
	X X :
ath-miR171b/c	3' GCACUAUAACCGUGCCGAGUU 5'
	X XX XX X : X:X
<i>AthmSCL6-III</i> mRNA (mutiert)	5' AGGAAUUCUAGCGCGCUAAAACCA 3'
Aminosäuresequenz	G I L A R L N H

Ausgetauschte Basen in der ath-miR171-Bindestelle sind fett hervorgehoben. **X**: Fehlpaarung; |: Basenpaarung; :: G-U-Basenpaarung. In grau: *PauI*-Restriktionsschnittstellen.

3.9.2 Etablierung von induzierbaren GVG>>*AthmSCL6-II*- und GVG>>*AthmSCL6-III*-Überexpressionslinien

Zur Generierung von induzierbaren *AthmSCL6-II*- und *AthmSCL6-III*-Überexpressionslinien wurden die Vektoren pTA7002-*AthmSCL6-II* und pTA7002-*AthmSCL6-III* durch Agrobakterium-vermittelte Transformation in *A. thaliana* Wt-Pflanzen (Ökotyp Columbia) transformiert. Anschließend wurden anhand der Antibiotikaresistenz homozygote Pflanzen für beide Konstrukte, GVG>>*AthmSCL6-II*- und GVG>>*AthmSCL6-III*, selektiert (siehe Material- und Methodenteil Abschnitt 2.3.1). Es konnten jeweils zwei unabhängige und homozygote GVG>>*AthmSCL6-II*-Linien und drei unabhängige und homozygote GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien etabliert werden. Diese fünf Linien wurden mittels Northern Blot auf eine DEX-induzierbare Expression von *AthmSCL6-II* bzw. *AthmSCL6-III* untersucht. Sowohl die GVG>>*AthmSCL6-II*, als auch die GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien zeigten im Rosettenstadium eine deutlich verstärkte *AthmSCL6-II* bzw. *AthmSCL6-III*-Expression nach 4 h DEX-Induktion (Abbildung 39, A). Die *AthSCL6-II*-spezifische Sonde konnte nach der 1. Hybridisierung der Membran nicht vollständig entfernt werden und zeigte daher ein Restsignal in der 2. Hybridisierung. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der *AthmSCL6-II*-Induktion in den beiden GVG>>*AthmSCL6-II*-Linien ergab eine nach 2 h maximale und 5-fache *AthmSCL6-II*-Expressionsstärke der ersten Linie, während die zweite Linie erst nach 4 h DEX-Induktion eine verstärkte *AthmSCL6-II*-Expressionsstärke aufwies (Abbildung 39, B). Nach einer vierstündigen DEX-Behandlung des Wt zeigte sich eine leicht verstärkte *AthSCL6-II*-Expression. Die DEX-behandelte GVG-Vektorkontrolle (*CaMV35S::GVG*) zeigte keine verstärkte *AthSCL6-II*-Expression im Vergleich zum unbehandelten Wt. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der *AthmSCL6-III*-Induktion in den GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien ergab eine verstärkte *AthmSCL6-III*-Expression in den beiden ersten Linien, die für GVG>>*AthmSCL6-III*-1 nach 2 h mit der 5-fachen Expressionsstärke im Vergleich zum nicht-induzierten Zustand ein Maximum erreichte bzw. für GVG>>*AthmSCL6-III*-2 bereits nach 1 h mit einer 2-fachen Expressionsstärke (Abbildung 39, C). Die Linie GVG>>*AthmSCL6-III*-3 zeigte eine stetig zunehmende Expressionsstärke, die nach 4 h Stunden das 6-fache des nicht-induzierten Zustands erreicht.

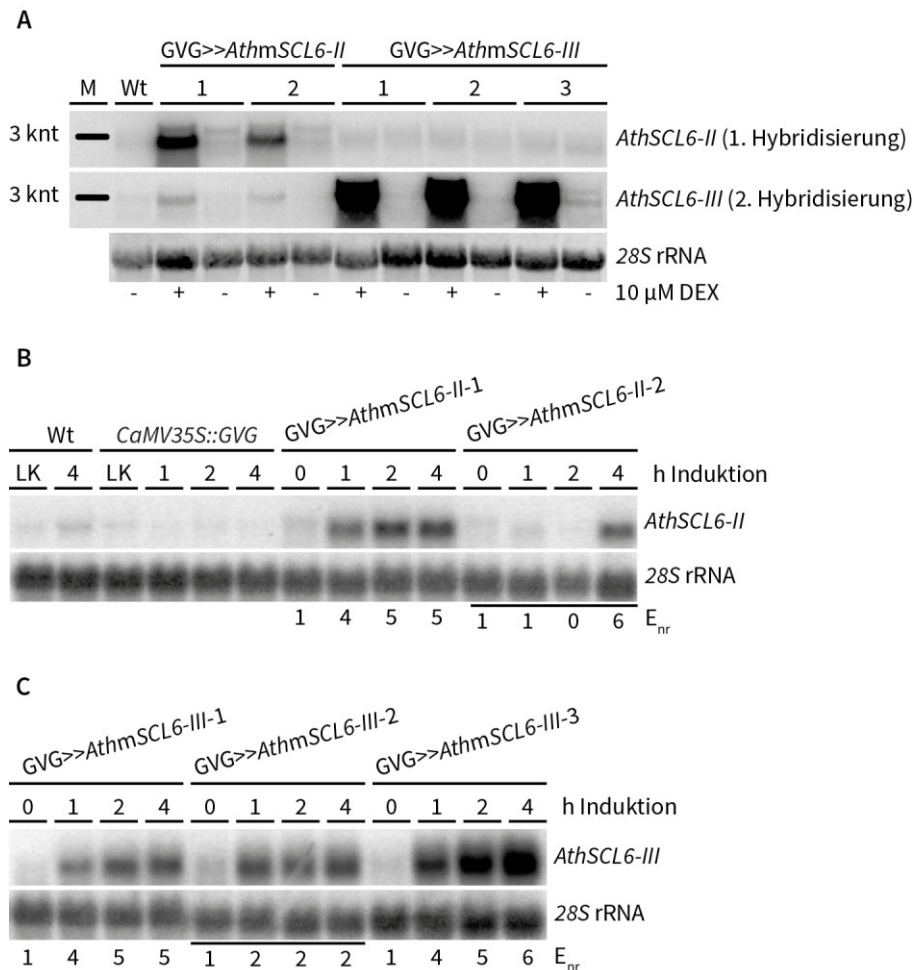


Abbildung 39: Identifizierung von DEX-induzierbaren *AthmSCL6-II*- und *AthmSCL6-III*-Überexpressionslinien mittels *AthSCL6-II*- bzw. *AthSCL6-III*-spezifischen Sonden durch Northern Blots

A) Analyse der *AthmSCL6-II*- bzw. *AthmSCL6-III*-Transkripte in den transgenen Linien GVG>>*AthmSCL6-II* Nr. 1 und 2 bzw. GVG>>*AthmSCL6-III* Nr. 1, 2 und 3 (Rosettenstadium) jeweils unbehandelt und nach 4 h DEX-Behandlung (10 µM) im Vergleich zum unbehandelten Wt. Aufgetrennt sind jeweils 13 µg Gesamt-RNA.

B) Zeitreihen zur Untersuchung der *AthmSCL6-II*-Expression in 10 Tage alten Keimlingen der Linien GVG>>*AthmSCL6-II* Nr. 1 und 2 und der GVG-Vektorkontrolle (*CaMV35S::GVG*) im Verlauf der DEX-Induktion (10 µM) im Vergleich zum Wt. Die Expressionsstärke der induzierten Transkripte ist normalisiert zur 28S rRNA-Transkriptmenge (E_{nr}) und relativ zum Zeitpunkt 0 h (unbehandelt) für jede transgene Linie angegeben (unten). Aufgetrennt sind jeweils 5 µg Gesamt-RNA. LK: Lösemittelkontrolle, 4 h Behandlungsdauer.

C) Zeitreihe wie in B) zur Untersuchung der *AthmSCL6-III*-Expression in 10 Tage alten Keimlingen der Linien GVG>>*AthmSCL6-II* Nr. 1, 2 und 3.

3.10 Transkriptomanalyse von GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien und *AthMIR171a*-Überexpressionslinien

Im Gegensatz zu *AthSCL6-II*, für das *AthPORC* bereits als direkt nachgeschaltetes Zielgen identifiziert wurde (Ma, Hu *et al.* 2014), sind für *AthSCL6-III* weniger Informationen insbesondere über direkte Zielgene bekannt, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von *AthSCL6-III* allein ausreicht, um den Phänotyp der *AthscL6-II/III/IV*-Nullmutanten zu komplementieren (Zhou, Liu *et al.* 2014). Die beiden *AthmSCL6-III*-Linien Nr. 1 und Nr. 2 weisen im Vergleich zu den *AthmSCL6-II*-Linien eine

stabile und relativ ähnliche Expressionsdynamik auf. Daher wurden die zwei unabhängigen transgenen *AthmSCL6-III*-Linien Nr. 1 und Nr. 2 für die Transkriptomanalyse als biologisches Duplikat ausgewählt. *ATHMIR171a*-Überexpressionslinien weisen eine reduzierte Expression von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* auf und ähneln im Phänotyp den *AthscL6-II/III/IV*-Nullmutanten (Schulze, Schafer *et al.* 2010). So könnte der Vergleich des Transkriptoms von *AthMIR171a*-Überexpressionslinien mit dem von induzierten *AthmSCL6-III*-Linien auch dazu beitragen, Gene mit gegenläufiger Expression zu identifizieren, die dem Phänotyp von *AthMIR171a*-Überexpressionslinien zugrunde liegen. Daher wurde das Transkriptom von *AthMIR171a*-Überexpressionslinien, die reduzierten Transkriptmengen von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* aufwiesen (N. V. Fedoroff; Pennsylvania State University, USA; persönliche Kommunikation), ebenfalls untersucht.

Es wurden wie zuvor für *P. patens* RNA-Proben 0,5 h bzw. 1 h nach der DEX-Induktion als frühe Zeitpunkte gewonnen und 8 h nach der DEX-Induktion als spätem Zeitpunkt. Die RNA-Proben wurden erneut auf *AthmSCL6-III*-Überexpression hin untersucht und mit dem Wt bzw. der GVG-Vektorkontrolle verglichen (Abbildung 40). Zudem wurde eine RNA-Probe aus drei *AthMIR171a*-Überexpressionslinien (Siehe Abschnitt 2.1.1) auf die *AthSCL6-III*-Transkriptmenge hin untersucht. Eine 8-stündige β -Estradiolbehandlung des Wt oder der GVG-Vektorkontrolle führte zu keinem Anstieg der *AthSCL6-III*-Transkriptmenge. Die Transkriptmenge von *AthmSCL6-III* in den uninduzierten GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien war im Vergleich zum Wt ebenfalls unverändert. Im Gegensatz dazu zeigten die *AthMIR171a*-Überexpressionslinien kein *AthSCL6-III*-Signal im Vergleich zum Wt. Die DEX-Induktion beider GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien führte mit zunehmender Induktionsdauer zu einer schrittweisen Zunahme der *AthmSCL6-III*-Transkriptmengen. Für die Transkriptomanalyse wurden die RNA-Proben der unbehandelten Linien sowie die nach 1 h und 8 h DEX-Induktion gewonnenen RNA-Proben zusammen mit den RNA-Proben der unbehandelten und DEX-behandelten GVG-Vektorkontrolle und der *AthMIR171a*-Überexpression untersucht.

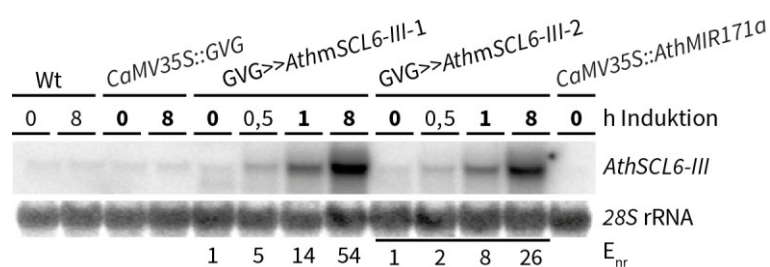


Abbildung 40: Überprüfung der *AthmSCL6-III*-Expression in RNA-Proben zur Transkriptomanalyse.

Zeitreihen zur Untersuchung der *AthmSCL6-III*-Transkriptmengen im Verlauf der DEX-Induktion der GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien Nr. 1 und 2 im Vergleich zum Wt, der GVG-Vektorkontrolle und der *AthMIR171a*-Überexpressionslinie. Die Dauer der Behandlung mit 10 μ M DEX ist in Stunden angegeben (oben). Die Expressionsstärke der induzierten Transkripte (E_{nr}) ist normalisiert zur 28S rRNA-Transkriptmenge und relativ zum Zeitpunkt 0 h (unbehandelt) für jede transgene Linie angegeben (unten). Aufgetrennt sind jeweils 8 μ g Gesamt-RNA. Die RNA-Proben, die zur Transkriptomanalyse verwendet wurden, sind fett markiert.

3.10.1 Mehr als 90 % der *A. thaliana*-Reads können eindeutig einem Transkript zugeordnet werden

Für alle *A. thaliana*-Proben konnten insgesamt mehr als 480 Millionen Reads mit einer durchschnittlichen Länge von 50 nt gewonnen werden. Lediglich 4 % der Reads konnten keinem Transkript des *A. thaliana*-Referenztranskriptoms (TAIR10, www.arabidopsis.org) durch das Read-Mapping zugeordnet werden. Ein Anteil von 92 % konnte eindeutig einem Transkript zugeordnet werden und ein weiterer Anteil von 4 % konnte zwei verschiedenen Transkripten zugeordnet werden. Die RNA-Seq-Daten und die Ergebnisse des Read-Mappings sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Auf eine Probe entfallen durchschnittlich 11 ± 1 % der Reads und in einer Probe konnten durchschnittlich $91,5 \pm 0,9$ % der Reads eindeutig einem Transkript des Referenztranskriptoms zugeordnet werden. Die Qualität der *A. thaliana*-Transkriptomdaten ist somit ebenso zwischen den Proben vergleichbar wie die der *P. patens*-Transkriptomdaten. Wie zu erwarten konnten auch mehr Reads eindeutig einem Transkript zugeordnet werden, da bei *A. thaliana* von mehr Transkripten die vollständigen 5'- und 3'-UTR-Sequenzen bekannt sind.

Tabelle 13: Übersicht der RNA-Seq-Daten und des Read-Mappings der *A. thaliana*-Proben

RNA-Probe (3 Replikate vereint)	Reads pro Probe	Gesamtanteil [%]	Anteil pro Treffer im Referenztranskriptom [%]			
			0	1	2	Summe
<i>CaMV35S::GVG</i> 0 h	42137850	8,7	4	92	3	100
<i>AthmSCL6-III-1</i> 0 h	57551070	11,9	4	92	3	100
<i>AthmSCL6-III-2</i> 0 h	66291332	13,7	4	92	3	100
<i>AthmSCL6-III-1</i> 1 h	52922865	10,9	5	90	5	100
<i>AthmSCL6-III-2</i> 1 h	44767991	9,2	5	90	4	100
<i>AthmSCL6-III-1</i> 8 h	60132477	12,4	5	91	4	100
<i>AthmSCL6-III-2</i> 8 h	52739077	10,9	4	92	4	100
<i>CaMV35S::GVG</i> 8 h	54753656	11,3	4	92	3	100
<i>AthMIR171a</i>	53259947	11,0	4	92	4	100
Summe/Durchschnitt*	484556265	100	4*	92*	4*	

3.10.2 DEX-induzierte GVG>>*AthmSCL6*-Linien unterscheiden sich in der Genexpression von unbehandelten Linien

Die Varianz der Genexpression zwischen den unbehandelten und induzierten Linien der GVG-Vektorkontrolle und der GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien wurde durch eine Hauptkomponentenanalyse untersucht. Diese Analyse umfasste auch die *AthMIR171a*-Überexpressionslinie. Die ersten beiden Hauptkomponenten erklärten zusammen bereits 66 % der Varianz in der Genexpression (Abbildung 41). Dabei trennte die erste Hauptkomponente die Proben, die für 1 h induziert wurden, von den übrigen. Die zweite Hauptkomponente trennte die Proben, die 8 h mit DEX behandelt wurden von den übrigen Proben. Die Duplikate der unbehandelten bzw. behandelten GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien fielen dabei stets zusammen. Beide Hauptkomponenten trennten die *AthMIR171a*-Überexpressionslinie nicht von den unbehandelten GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien. Zusammengefasst verursachte die DEX-Induktion bereits nach 1 h eine Veränderung in der Genexpression der GVG>>*AthmSCL6-III*-Linien, die sich von der veränderten Genexpression nach 8 h DEX-Induktion deutlich unterscheidet. Letztere deckte sich zu einem großen Teil mit der veränderten Genexpression der DEX-behandelten GVG-Vektorkontrolle. Dies weist auf einen transienten Effekt auf die Genexpression hin, der durch die DEX-induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* verursacht wurde. Diesem folgen vermutlich Nebeneffekte des DEX-induzierbaren Expressionssystems.

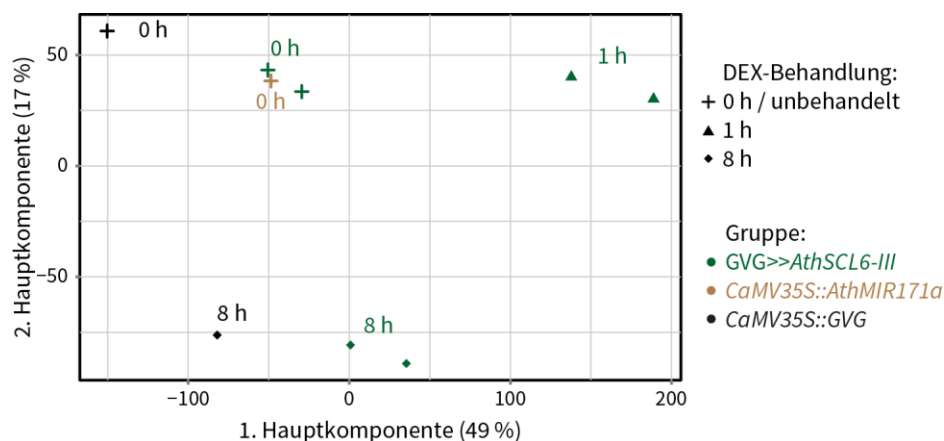


Abbildung 41: Hauptkomponentenanalyse der Varianz der Genexpressionsstärken der *A. thaliana*-Sequenzdaten

Für die *AthmSCL6-III*-Gruppe sind jeweils beide biologischen Duplikate dargestellt.

3.10.3 DEX-Behandlung und Aktivierung von GVG in der GVG-Vektorkontrolle bewirkt eine veränderte Genexpression

In allen *A. thaliana*-Transkriptomdaten, mit Ausnahme der *AthMIR171a*-Überexpression, wurden Transkripte des chimären Transkriptionsfaktors *GVG* mit durchschnittlich 283 RPKM nachgewiesen. Zum Vergleich, der Translations-Elongationsfaktor *AthEF1a* wurde mit durchschnittlich 324 RPKM nachgewiesen. Zunächst wurde untersucht, welche Gene durch die DEX-Behandlung und der damit verbundenen Aktivierung des Transkriptionsfaktors *GVG* differentiell exprimiert werden. Dafür wurde mit den Transkriptomdaten der für 8 h DEX-behandelten *GVG*-Vektorkontrolle eine DGE-Analyse durchgeführt und mit einer *GVG*-Kontrollgruppe (*AthmSCL6-III* Nr. 1 und 2 sowie *CaMV35S::GVG* – jeweils unbehandelt) verglichen, analog zur XVE-Kontrollgruppe bei *P. patens*. Von insgesamt 23 127 nachgewiesenen Genen (mindestens 5 Reads in einer Probe) zeigten 285 Gene eine differentielle Expression ($|FC| > 2$ und $q < 0,0005$) in der DEX-behandelten Vektorkontrolle (Abbildung 42, A). Diese von DEX oder aktivem *GVG* beeinflussten Gene können nun bei der Analyse von differentiell exprimierten Genen in DEX induzierten *AthmSCL6-III*-Linien herausgefiltert werden.

3.10.4 Die primären Transkripte von *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c* werden effizient prozessiert

In den Transkriptomdaten der induzierbaren *AthmSCL6-III*-Linien und der *GVG*-Vektorkontrolle wurden primäre *AthMIR171*-Transkripte stets mit weniger als 11 Reads nachgewiesen. Durch Analysen mit Transkriptionsreportern wurde bereits gezeigt, dass *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c* in *A. thaliana* Keimlingen transkribiert werden (Wang, Mai *et al.* 2010). Dies legt nahe, dass die primären Transkripte von *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c* direkt weiterprozessiert werden, so dass nur geringste Mengen von primären Transkripten nachgewiesen wurden. Solch eine effiziente Prozessierung der primären Transkripte konnte zuvor auch für *PpMIR171a* beobachtet werden (Absatz 3.8.4). In transgenen *A. thaliana*-Linien, die *ath-miR171* resistente Varianten von *AthSCL6-II*, *Ath-SCL6-III* oder *AthSCL6-IV* konstitutiv überexprimierten, wurde eine größere Menge an reifer *ath-miR171* nachgewiesen als im Wt (Xue, Zhao *et al.* 2014). Dies könnte auch für induzierte *GVG*>>*AthmSCL6-III*-Linien zutreffen, da die primären Transkripte der *AthMIR171*-Gene ebenfalls effizient weiter prozessiert werden und somit nicht akkumulieren.

3.10.5 *AthMIR171a*-Überexpression verursacht eine Akkumulation der 3'-Spaltprodukte von *AthSCL6-II*, *Ath-SCL6-III* und *AthSCL6-IV*

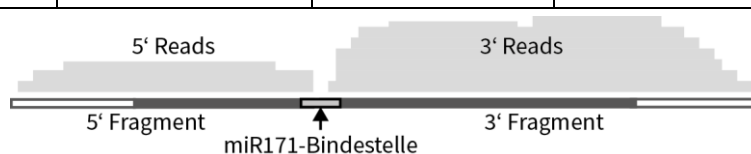
In der Probe der *AthMIR171a*-Überexpression wurden die primären Transkripte von *AthMIR171b* bzw. *AthMIR171c* ebenfalls mit weniger als 11 Reads nachgewiesen, während das primäre *AthMIR171a*-Transkript mit 9009 Reads nachgewiesen wurde. Die Überexpression von *AthMIR171a* bewirkte somit,

wie zuvor die Überexpression von *PpMIR171b* in *P. patens*, eine Akkumulation der primären Transkripte. Die Überexpression der *AthMIR171a* bewirkte eine verstärkte Spaltung von *AthSCL6-II*-, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV*-Transkripten, die mit einer Zunahme der Verhältnisse der 3'-Fragmentreads zu 5'-Fragmentreads einherging (Tabelle 14). In Wt-Keimlingen wird das *ath-miR171**-Zielgen *AthSUVH8* aufgrund der posttranskriptionellen Regulation durch die *ath-miR171** nur im Apikalmeristem und in den Blattspitzen exprimiert (Manavella, Koenig *et al.* 2013). Allerdings wurden die 5'-Fragment- und 3'-Fragmentreads von *AthSUVH8* nur mit maximal 4 Reads in allen Proben detektiert. Die Überexpression von *AthMIR171a* in 10 Tage alten Keimlingen bewirkte somit eine Reduzierung der drei *ath-miR171*-Zielgene, insbesondere von *AthSCL6-II*. Ob die Expression von *AthSUVH8* im Apikalmeristem oder den Blattspitzen ebenfalls durch die Überexpression von *AthMIR171a* reduziert wurde, konnte aufgrund der geringen Anzahl an Reads nicht bestimmt werden.

Die DGE-Analyse der *AthMIR171a*-Überexpressionslinie im Vergleich zur GVG-Kontrollgruppe ergab 103 differentiell exprimierte Gene (Abbildung 42, B). Im Vergleich zur β -Estradiol-behandelten GVG-Vektorkontrolle mit 285 differentiell exprimierten Genen, hat die *AthMIR171a*-Überexpression und die damit verbundene Reduzierung der Transkriptmengen von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* nur einen geringen Effekt auf die Genexpression.

Tabelle 14: Normalisierte Verhältnisse der 3'-Fragmentreads zu 5'-Fragmentreads der *ath-miR171*-Zielgene und schematische Darstellung der Read-Verteilung

Genotyp	DEX-Behandlung	normalisiertes Verhältnis 3' Reads/5' Reads		
		<i>AthSCL6-II</i>	<i>AthSCL6-III</i>	<i>AthSCL6-IV</i>
<i>CaMV35S::GVG</i>	0 h	2,0	2,1	1,6
	8 h	2,3	1,9	1,3
<i>GVG>>AthmSCL6-III</i>	0 h	3,0	2,1	1,7
	1 h	3,0	1,2	1,5
	8 h	3,5	1,2	1,4
<i>35S::AthMIR171a</i>	0 h	19,6	7,8	6,3



Die Anzahl der 3'- und 5'-Fragmentreads wurden anhand der 3'- und 5'-Fragmentlängen normalisiert. Für *GVG>>AthmSCL6-III* sind die Mittelwerte der biologischen Duplikate angegeben. Für das *ath-miR171**-Zielgen *AthSUVH8* konnte aufgrund der geringen Anzahl an Reads kein Verhältnis berechnet werden.

3.10.6 Die DEX-induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* bewirkt eine frühe und eine späte Antwort in der Genexpression

Die DEX-induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* führte zu einer 21-fachen Transkriptmenge nach 1 h, die sich nach weiteren 7 h Induktion verdoppelte. Die Transkriptmenge von *AthmSCL6-III* stieg dabei von durchschnittlich 50 RPKM auf 2106 RPKM an. Zum Vergleich: die Transkriptmenge des alpha Tubulin 4 Gens (AT1G04820.1) wurde mit durchschnittlich 450 RPKM nachgewiesen. Durch die Überexpression von *AthmSCL6-III* sinkt das Verhältnis der 3'-Fragmentreads zu 5'-Fragmentreads von unbehandelt 2,1 auf 1,2 nach 1 h und 8 h DEX-Induktion (Tabelle 14).

Um früh differentiell exprimierte Gene in den DEX-induzierten *AthmSCL6-III*-Linien zu untersuchen, wurden die Transkriptomdaten des Unbehandelten mit denen des 1 h DEX-induzierten biologischen Duplikats (*AthmSCL6-III-1* und 2) mittels einer DGE-Analyse verglichen. Von insgesamt 23 181 nachgewiesenen Genen zeigten 1218 Gene eine differentielle Expression (Abbildung 42, C). Der Vergleich der Transkriptomdaten nach 1 h DEX-Induktion mit denen nach 8 h DEX-Induktion zeigte spät differentiell exprimierte Gene. Hierbei ergab die DGE-Analyse 1057 differentiell exprimierte Gene, von denen 617 bereits früh differentiell exprimiert wurden (Abbildung 42, D). Somit reagierten 601 Gene, etwa die Hälfte der früh differentiell exprimierten Gene, innerhalb der ersten Stunde nach der Induktion und bleiben danach trotz steigender *AthmSCL6*-Transkriptmenge unverändert. Die andere Hälfte der früh differentiell exprimierten Gene hingegen änderte bei steigender *AthmSCL6*-Transkriptmenge nochmals ihre Transkriptmenge. Eine Gruppe von 440 Genen veränderte die Transkriptmengen erst nach einer 8-stündigen DEX-Induktion bzw. bei hoher *AthmSCL6*-Transkriptmenge. Die DEX-induzierte *AthmSCL6-III*-Überexpression bewirkte daher eine frühe Veränderung in der Genexpression, die von einer späten Veränderung in der Genexpression ergänzt wurde.

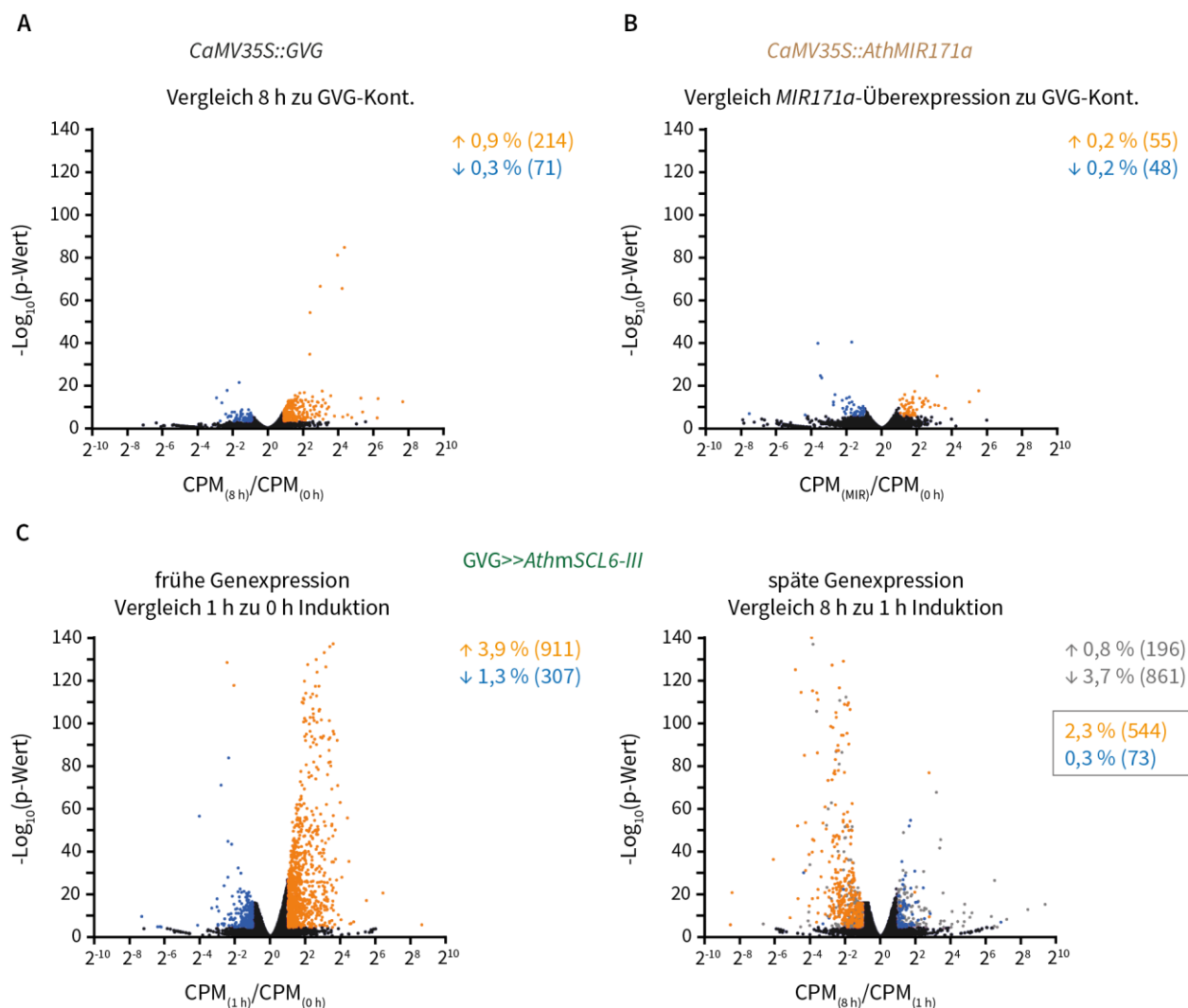


Abbildung 42: Differentielle Genexpression nach DEX-induzierter *AthmSCL6-III*-Überexpression und DEX-Behandlung der GVG-Vektorkontrolle sowie bei *AthMIR171a*-Überexpression

Differentielle Genexpressionsanalyse durch das in CLC-Genomics implementierte Programm Edge R. Die p-Werte des Exact-Tests (Robinson and Smyth 2008) sind aufgetragen gegen die Veränderung der Expressionsstärke (CPM_1/CPM_2); CPM: *counts per million*. Angegeben ist jeweils der Anteil und die Anzahl an Genen, die früh signifikant mehr als zweifach schwächer exprimiert sind (in blau) und an Genen, die früh signifikant mehr als zweifach stärker exprimiert sind (in orange). Signifikanzniveau FDR korrigiert mit $q < 0,001$.

A) Vergleich der Genexpression in der 8 h DEX-behandelten *CaMV35S::GVG*-Linie zur GVG-Kontrollgruppe (GVG-Kont.) bestehend aus der unbehandelten GVG-Vektorkontrolle und den unbehandelten *AthmSCL6-III*-Linien Nr. 1 und 2.

B) Vergleich der Genexpression der *CaMV35S::AthMIR171a*-Linie zur GVG-Kontrollgruppe.

C) Links: Vergleich der Genexpression in *GVG>>AthmSCL6-III*-Linien nach 1 h DEX-Induktion (1 h) zur Genexpression der unbehandelten *GVG>>AthmSCL6-III*-Linien (0 h). Rechts: Vergleich der Genexpression in *GVG>>AthmSCL6-III*-Linien nach 8 h DEX-Induktion (8 h) zur Genexpression in *GVG>>AthmSCL6-III*-Linien nach 1 h DEX-Induktion (1 h). Angegeben sind der Anteil und die Anzahl an Genen, die spät differentiell exprimiert sind (in grau) sowie in der Box der Anteil und die Anzahl von Genen, die zuvor bereits mehr als zweifach schwächer (in blau) bzw. zweifach stärker (in orange) exprimiert waren. Signifikanzniveau FDR korrigiert mit $q < 0,001$.

3.10.7 Clusteranalyse der *A. thaliana* Transkriptomdaten

Die Clusteranalyse der für *A. thaliana* gewonnenen Transkriptomdaten erfolgte analog zur Clusteranalyse der Genexpression von *P. patens*. Im ersten Filterschritt wurden ebenfalls nur Gene ausgewählt, die keine Veränderung in der Genexpression der DEX-behandelten GVG-Vektorkontrolle aufwiesen ($|FC| < 2$ und $q > 0,1$). Davon wurden alle Gene zu einem Datensatz zusammengefasst, die in den induzierten *AthmSCL6-III*-Linien früh bzw. spät eine differentielle Expression aufweisen ($|FC| > 2$ und $q < 0,1$). Letztere wurden ebenfalls nur berücksichtigt, sofern sie nicht bereits früh differentiell exprimiert wurden. Anschließend wurden für beide Datensätze anhand von Mittelwert-zentrierter RPKM-Werten Heat-maps generiert.

Zuletzt wurden die funktionellen und deskriptiven Annotationen analysiert, um Informationen über die biologischen Funktionen der differentiell exprimierten Gene zu erhalten. Diese wurden durch Vorhersagen zur zellulären Lokalisierung der Proteine und Untersuchungen auf Transkriptionsfaktoren ergänzt. Die geclusterten Datensätze sind zusammen mit den Heat-maps und den Gen-Annotationen als Tabellen im digitalen Anhang der Arbeit aufgeführt (Daten-CD, Excel Tabelle 3 und 4). Die Tabelle der früh differentiell exprimierten Gene enthält auch eine Liste von Genen, die durch eine *AthMIR171a*-Überexpression differentiell exprimierten Gene aufführt, sofern sie nicht bereits in den Heat-maps enthalten sind.

3.10.8 Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* in Keimlingen erhöht die Transkriptmengen von plastidär-codierten Genen der Photosynthese

Die Regulation der Chlorophyllbiosynthese durch *AthSCL6-II* als Repressor der Transkription von *AthPORC* (Ma, Hu *et al.* 2014) wirft die Frage auf, ob *AthSCL6-III* in Redundanz mit *AthSCL6-II* die Transkription von *AthPORC*, regulieren kann. Möglicherweise wird die Chlorophyllbiosynthese von *AthSCL6-III* auch an anderer Stelle reguliert. Zudem passen *AthscL6-II/III/IV*-Nullmutanten ihre Photosyntheseleistung an Starklicht langsamer an als der Wt, während *ath-miR171*-resistente *AthSCL6-II*-Überexpressionslinien sich schneller anpassen können (Ma, Hu *et al.* 2014). Daher wurden die Annotationen der nach der induzierten Überexpression von *AthmSCL6-III* früh bzw. spät differentiell exprimierten Gene nach Genen durchsucht, die an der Chlorophyllbiosynthese bzw. der Photosynthese beteiligt sind. Es wurden hierbei keine Gene gefunden, die für Enzyme der Chlorophyllbiosynthese codieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass *AthmSCL6-III* nicht wie *AthSCL6-II* die Transkription von *AthPORC* reguliert. Allerdings bewirkt die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III*, nach 1 h Induktion, eine Zunahme der Transkriptmengen von plastidär-codierten Genen, die vornehmlich für Proteine des Photosystem II codieren (Abbildung 43). Diese umfassen unter anderem auch die Gene der Proteine D1 und D2 (PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER PROTEIN A (PSBA) und PSBD), die als Heterodimer den Kern des Reaktionszentrums des Photosystem II bilden sowie die Gene der Proteine CP43 und CP47 (PSBB und

PSBC), die die beiden Untereinheiten der inneren Antennen bilden. Die Transkriptmengen der Gene, die Proteine des Sauerstoff produzierenden Reaktionszentrums des Photosystem II codieren, waren allerdings unverändert. Darüber hinaus nahmen auch die Transkriptmengen von zwei Genen zu, die für das Apoprotein von Cytochrom *f* und für die Untereinheit Cytochrom *b6* des Cytochrom *b6f*-Komplexes codieren (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER A und B; PETA und PETB).

Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* bewirkte somit keine Veränderung in der Transkription von Genen der Chlorophyllbiosynthese sondern führte auch zu einer Zunahme von plastidär-codierten Genen des Photosystem II und Cytochrom *b6f*-Komplexes.

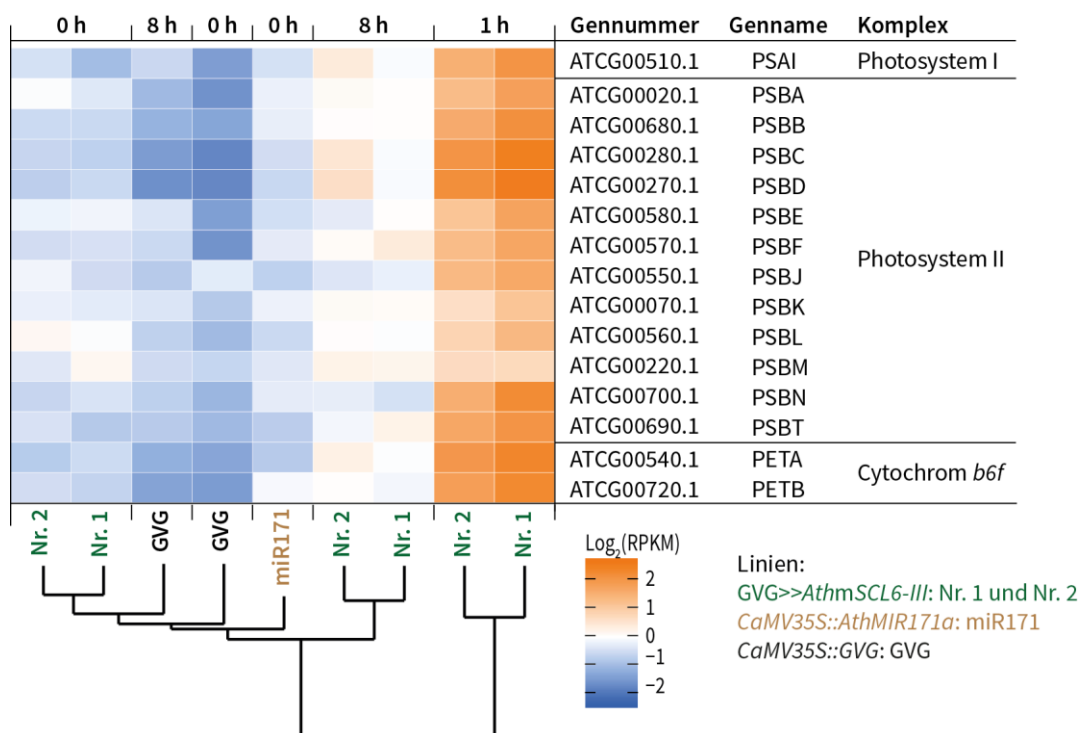


Abbildung 43: Heat-map und Annotationen von differenziell exprimierten und plastidär-codierten Photosynthesegenen in *A. thaliana*

Auszug der Heat-map der früh differenziell exprimierten Gene (Daten-CD, Excel Tabelle 3) mit Bezug zur Photosynthese. Die RPKM-Werte jedes Gene sind auf ihren Mittelwert zentriert (weiß/0) und als Logarithmus zur Basis 2 wiedergegeben. Die Heat-map ist nach den RPKM-Werten der einzelnen Proben hierarchisch geclustert. Die Dauer der DEX-Behandlung ist oben angegeben; 0 h entspricht unbehandelt.

3.10.9 Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* beeinflusst die Transkriptmengen von Genen, die an der Entwicklung und der Meristemregulation beteiligt sind

Die *ath-miR171*-Zielgene sind auch an der Regulation der Entwicklung von *A. thaliana* und insbesondere an der Steuerung von Meristemen beteiligt. Die apikalen Sprossmeristeme von *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten und *AthMIR171*-Überexpressionslinien stellen vorzeitig das Wachstum ein und die Ausbildung von Seitenzweigen ist im Vergleich zum Wt stark reduziert (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu bewirkt die Überexpression von *ath-miR171*-resistentem *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* oder *AthSCL6-IV* eine verstärkte Ausbildung von Seitenzweigen im Vergleich zum Wt (Wang, Mai *et al.* 2010). Darüber hinaus weisen *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten eine stark verkürzte primäre Wurzel auf (Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Daher wurden die früh bzw. spät durch die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* differentiell exprimierte Gene anhand der analysierten Gen-Annotationen nach Genen mit Bezug zur Entwicklung bzw. Meristemregulation hin untersucht. Dabei wurden acht Gene gefunden, die bereits nach 1 h und auch nach 8 h induzierter Überexpression von *AthmSCL6-III* reduzierte Transkriptmengen aufwiesen und für Transkriptionsfaktoren codieren, die an der Entwicklung bzw. der Meristembildung beteiligt sind (Abbildung 44). *AINTEGUMENTA-like 7 (AIL7)* ist an der Erhaltung des Spößmeristems sowie an der Regulation der Phyllothaxis beteiligt (Mudunkothge *et al.* 2012). *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 2 (ATHB2)* ist an der apikalen Embryonalentwicklung und der Aktivität des Sprossmeristems beteiligt (Turchi *et al.* 2013). *POUND-FOOLISH (PNF)* interagiert mit *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* und ist ebenfalls an der Erhaltung des Sprossmeristems beteiligt (Ung *et al.* 2011). Das *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN GENE 1 (ATH1)* ist an der Ausbildung der Abgrenzung des Stängels von vegetativen und reproduktiven Organen beteiligt und interagiert ebenfalls mit *STM* (Gomez-Mena *et al.* 2008). Der *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS 3 (RAX3)* reguliert zusammen mit *RAX1* und *RAX2* die Bildung von Seitenmeristemen (Muller *et al.* 2006). *CONSTANS-LIKE 7 (COL7)* ist an der Regulation der Anzahl von Seitenzweigen beteiligt und die Überexpression von *COL7* bewirkt einen stark verzweigten Habitus im Vergleich zum Wt (Wang *et al.* 2013a). *CONSTANS (CO)* ist einer der Schlüsselfaktoren in der Steuerung der Blütezeit (Yoo *et al.* 2005). *SPL3* fördert den Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum hin und ist ebenso wie *CONSTANS* an der Festlegung der Blütezeit beteiligt (Lal *et al.* 2011).

Weiterhin wurden drei Gene durch die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* differentiell exprimiert, die für kurze Peptide der *CLAVATA3/ESR-RELATED (CLE)* Familie codieren. Zwei der differentiell exprimierten *CLE*-Gene, die für *CLE13* und *CLE14* codieren, wurden hochreguliert, während ein Gen, das für *CLE21* codiert, herunterreguliert wurde (Abbildung 44). Drei weitere Gene, die für *CLE-like (CLEL)* Proteine codieren, werden bereits nach 1 h induzierter Überexpression von *AthmSCL6-III* differentiell exprimiert (Abbildung 44). *CLEL6* wurde hochreguliert, während *CLEL7* und *CLEL9* herunterreguliert

wurden. Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* verändert somit die Transkriptmengen von Genen, die für Transkriptionsfaktoren aber auch für Signalpeptide codieren, die an der Regulation von Apikalmeristemen und Lateralmeristemen beteiligt sind.

3.10.10 Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* in Keimlingen beeinflusst die Transkriptmengen von Genen der Trichombildung

Einer der pleiotropen Entwicklungsphänotypen von *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten betrifft die Trichombildung. So weisen *ath-miR171*-resistente *AthSCL6-II*- und *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wt mehr Trichome am Stängel auf, während *AthMIR171*-Überexpressionslinien weniger und *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten keine Trichome am Stängel bilden (Xue, Zhao *et al.* 2014). Dies hängt damit zusammen, dass die Genprodukte aller drei *ath-miR171*-Zielgene *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* mit zwei Transkriptionsfaktoren der SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Familie interagieren: SPL2 und SPL9 (Xue, Zhao *et al.* 2014). Dabei reprimiert die Bindung von *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* oder *AthSCL6-IV* an SPL9 die Transkription von TRIPTYCHON (TRY) und TRIHOMELESS1 (TCL1), zwei Repressoren der Trichombildung. Daher wurden die geclusterten Gene, die nach der induzierten Überexpression von *AthmSCL6-III* differentiell exprimiert sind, nach Genen durchsucht, die an der Trichombildung beteiligt sind.

Die Transkriptmengen von drei Genen, die für die SPL-Transkriptionsfaktoren SPL3, SPL9 und SPL15 codieren, wurden bereits nach einer Stunde induzierter Überexpression von *AthmSCL6-III* reduziert (Abbildung 44). Einer dieser Transkriptionsfaktoren, SPL9, besitzt neben der Regulation der Trichombildung auch eine redundante Funktion zusammen mit seinem ähnlichsten Homolog SPL15 in der Sprossentwicklung und der Erhaltung der Apikaldominanz (Schwarz *et al.* 2008). So weisen *spl9/spl15*-Nullmutanten mehr Seitenzweige auf als der Wt.

Des Weiteren sind die Transkriptmengen von vier Genen (*GL1*, *EGL3*, *ETC1* und *ETC2*), die für Transkriptionsfaktoren des Trichom-Initiationskomplexes codieren, reduziert (Abbildung 44). So blockiert z.B. ENHANCER OF GLABRA 3 (*EGL3*) zusammen mit *GLABRA 3* (*GL3*) die Trichombildung durch die Interaktion mit ENHANCER OF TRY AND CPC 1 (*ETC1*), *ETC2* sowie TRY und TCL1 (Kalve *et al.* 2014). Werden allerdings *ETC1* und *ETC2* gegen *GLABRA1* (*GL1*) ausgetauscht, leitet die Interaktion von *GL1* mit *GL3/EGL3* die Bildung von Trichomen ein. Zusammengefasst reduziert die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* die Transkriptmengen von mehreren Faktoren des Trichom-Initiationskomplexes. Zudem wurden auch die Transkriptmengen der Gene von SPL9 und seinem nächsten Homolog SPL15 reduziert. Beide interagieren mit *AthSCL6-III*, um die Expression von zwei weiteren Faktoren des Trichom-Initiationskomplexes (TRY und TCL1) zu reprimieren.

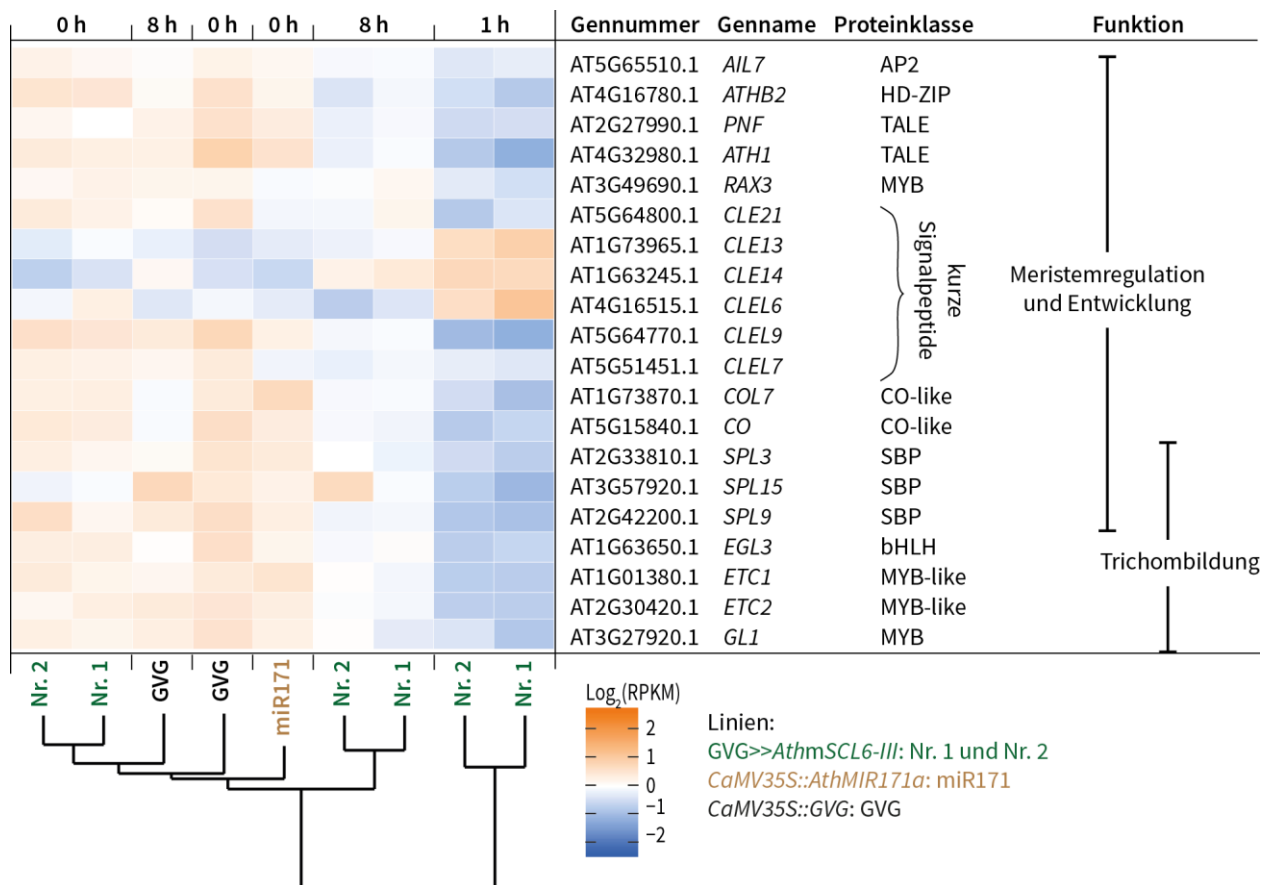


Abbildung 44: Heat-map und Annotationen von differentiell exprimierten Genen, die an der Meristemregulation und Entwicklung sowie der Trichombildung in *A. thaliana* beteiligt sind

Auszug der Heat-map der früh differentiell exprimierten Gene (Daten-CD, Excel Tabelle 3) mit Bezug zur Meristemregulation und Trichombildung. Die RPKM-Werte jedes Gens sind auf ihren Mittelwert zentriert (weiß/0) und als Logarithmus zur Basis 2 wiedergegeben. Die Heat-map ist nach den RPKM-Werten der einzelnen Proben hierarchisch geclustert. Die Dauer der DEX-Behandlung ist oben angegeben; 0 h entspricht unbehandelt.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des miR171-Regulationsweges in *P. patens*

4.1.1 Die Expressionsdomänen von *PpMIR171a* und *PpMIR171b*

In allen drei untersuchten *PpMIR171a*_{prom}::*GUS*-Linien stimmt das Muster der GUS-Aktivität überein (Abbildung 11 und Abbildung 12, A). Daher kann durch die nachgewiesene GUS-Aktivität auf eine Expression der *PpMIR171a* in allen zellteilungsaktiven und sich entwickelnden Geweben des Gametophyten, wie z. B. jungen Antheridien und Archegonien geschlossen werden. In ausdifferenzierten Zellen der Phylloide und des Cauloids, sowie in älteren Antheridien bzw. Archegonien wird *PpMIR171a* nicht mehr exprimiert. Da in den Sporophyten der *PpMIR171a*_{prom}::*GUS*-Linien keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist die Expression von *PpMIR171a* Gametophyten-spezifisch.

Die untersuchten *PpMIR171b*_{prom}::*GUS*-Linien zeigten kein konsistentes Muster der GUS-Aktivität. Daher lässt sich die Expressionsdomäne von *PpMIR171b* nicht mit Sicherheit bestimmen. Sollte die GUS-Aktivität in der Linie *PpMIR171b*_{prom}::*GUS*-1 tatsächlich das Expressionsmuster von *PpMIR171b* widerspiegeln, ist die ppt-miR171a die vorherrschende miR171-Variante im Gametophyten. *PpMIR171b* wird dann aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse (Abbildung 11 und Abbildung 12, B) am stärksten in der Seta weniger junger Sporophyten exprimiert und überlappt sich demnach mit der Expressionsdomäne von *PpMIR171a* nur im apikalen Bereich älterer Gametophoren sowie junger Gametangien. Eine miR171-vermittelte Regulation von *PpGRAS1* bzw. *PpGRAS2* könnte daher für ausdifferenziertes bzw. zellteilungsinaktives Gewebe nicht nötig sein.

4.1.2 Die Expressionsdomänen der ppt-miR171-Zielgene

Durch eine Analyse der Transkriptmengen von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* mittels DNA-Microarrays konnte nachgewiesen werden, dass beide ppt-miR171-Zielgene sowohl im Protonema, als auch in Gametophoren exprimiert werden (Strotbek 2010). Hierbei wurde in Gametophoren eine größere Transkriptmenge von *PpGRAS1* als im Protonema nachgewiesen, während *PpGRAS2* in beiden Geweben ähnlich stark exprimiert ist. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse der XVE-Vektorkontrolle und uninduzierter XVE>>*PpmGRAS1*- und XVE>>*PpmGRAS1-DR*-Linien überein. Diese zeigten, dass *PpGRAS1* und *PpGRAS2* im Protonema exprimiert sind und dort jeweils zu einem Teil ppt-miR171-vermittelt gespalten werden (Tabelle 11). Nach der ppt-miR171-vermittelten Spaltung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Transkripte akkumulierten die 3'-Spaltprodukte stärker im Vergleich zu den 5'-Spaltprodukten. Dies konnte auch bei der Untersuchung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Transkripte im Wt mittels RNA-Blots für *PpGRAS1* nachgewiesen werden (Abbildung 24, F und G).

Die Expressionsdomäne von *PpGRAS1* konnte anhand von *PpGRAS1-GUS*-Linien nicht aufgeklärt werden, da während der Klonierung ein Teil der GUS-CDS deletiert worden war. Die *PpmGRAS1-GUS*-Linien,

anhand derer die Expression von ppt-miR171 resistentem PpGRAS1 untersucht werden sollte, basierte auf demselben Ausgangskonstrukt (Abbildung 14). Sie enthalten somit ebenfalls eine funktionslose und verkürzte GUS-CDS, die auch hier eine Aufklärung der Expressionsdomäne verhinderte.

Für die Untersuchung der *PpGRAS2*-Expression konnten *PpGRAS2-GUS*-Linien und *PpmGRAS2-GUS*-Linien etabliert werden (Abbildung 15 und Abbildung 17). In allen drei untersuchten *PpGRAS2-GUS*-Linien ist die nachgewiesene GUS-Aktivität in achselständigen Haaren im apikalen Bereich älterer Gametophoren konsistent (Abbildung 18). In zwei von drei Linien wurde zudem eine übereinstimmende GUS-Aktivität auch in Rhizoiden und im Apex junger Gametophoren nachgewiesen. Erstaunlicherweise wurde nur in einer *PpGRAS2-GUS*-Linie auch GUS-Aktivität im Protonema nachgewiesen, obwohl *PpGRAS2*-Transkripte im Protonema sowohl durch die Transkriptomanalyse als auch mittels DNA-Microarrays nachgewiesen wurden. *PpGRAS2* wird daher in achselständigen Haaren im Apex von älteren Gametophoren exprimiert und möglicherweise auch im Apex jüngerer Gametophoren sowie in Rhizoiden. Darüber hinaus ist eine Expression von *PpGRAS2* im Protonema nicht auszuschließen. In *PpmGRAS2-GUS*-Linien beruht die GUS-Aktivität auf ppt-miR171 resistenten *PpmGRAS2-GUS*-Transkripten. Daher wäre hier ein vergrößerter Bereich der GUS-Aktivität zu erwarten, sofern die ppt-miR171 die Expression von *PpGRAS2-GUS* räumlich begrenzt. Eine Voraussetzung dafür ist, dass sich die Expressionsdomäne von *PpMIR171a* oder *PpMIR171b* mit der von *PpGRAS2-GUS* überlappen. Tatsächlich wird *PpMIR171a* in Rhizoiden und im Apex junger und älterer Gametophoren, aber auch im Protonema exprimiert. Zudem könnte möglicherweise *PpMIR171b* im Apex älterer Gametophoren exprimiert werden. Dennoch konnte in beiden *PpmGRAS2-GUS*-Linien kein vergrößerter Bereich mit GUS-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 18). Auch hier zeigte sich wie zuvor bei *PpGRAS2-GUS*-Linien eine GUS-Aktivität in den Rhizoiden und bei einer Linie auch im Apex von Gametophoren. In Gametangien der *PpmGRAS2-GUS-1*-Linie konnte keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden und bis auf ein Antheridium ist dies auch für die *PpmGRAS2-GUS-2*-Linie der Fall (Abbildung 19). Möglicherweise wird *PpGRAS2* nur zu bestimmten und kurzen Entwicklungsphasen der Antheridien transkribiert. *PpMIR171a* hingegen wird, den gewonnenen Ergebnissen nach, in Antheridien exprimiert. Dies könnte auch der Grund sein, warum GUS-Aktivität in einem Antheridium einer *PpmGRAS2-GUS*-Linie, nicht aber in *PpGRAS2-GUS*-Linien nachgewiesen werden konnte. Werden in Antheridien die *PpGRAS2-GUS*-Transkripte vollständig ppt-miR171a-vermittelt gespalten, kann keine GUS-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Die *PpmGRAS2-GUS*-Transkripte hingegen können aufgrund der mutierten ppt-miR171-Bindestelle nicht mehr gespalten werden, wodurch hier ein Nachweis der GUS-Aktivität möglich wird.

In *PpGRAS2-GUS*-Linien konnte eine GUS-Aktivität in der Seta eines jungen Sporophyten nachgewiesen werden und in *PpmGRAS2-GUS*-Linien in der Seta eines älteren Sporophyten (Abbildung 19). Eine GUS-Aktivität konnte sonst in keinem weiteren Sporophyten nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass *PpGRAS2* in der Seta von Sporophyten exprimiert werden kann. Interessanterweise konnte GUS-Aktivität auch in der Seta zweier Sporophyten der *PpMIR171b_{prom}::GUS*-Linie Nr. 1 nachgewiesen werden

(Abbildung 12, B). Falls in der Seta von Sporophyten *PpGRAS2* transkribiert und *PpMIR171b* exprimiert wird, dürfte eine vollständige, ppt-miR171b-vermittelte Spaltung der *PpGRAS2*-Transkripte nicht stattfinden. Sonst könnte in der *PpGRAS2-GUS*-Linie keine GUS-Aktivität in der Seta eines jungen Sporophyten nachgewiesen werden. Der Grund, warum nur in wenigen Sporophyten eine Transkription von *PpGRAS2* bzw. von *PpMIR171b* nachgewiesen werden konnte, ist unklar.

Die Expressionsdomäne von *PpGRAS2* wird daher räumlich, bis auf die Ausnahme der Antheridien, nicht durch die Aktivität der ppt-miR171 begrenzt. Eine Regulation der Expressionsstärke von *PpGRAS2* durch die ppt-miR171 ist jedoch hier nicht auszuschließen. In diesem Fall wäre in den Bereichen, in denen die ppt-miR171 die Expression von *PpGRAS2* reduziert, bei *PpmGRAS2-GUS*-Linien eine stärkere GUS-Aktivität als bei *PpGRAS2-GUS*-Linien zu erwarten. Da die GUS-Färbungen jedoch stets über Nacht inkubiert wurden, ist das GUS-Signal gesättigt und lässt sich somit nicht quantitativ auswerten.

4.1.3 Phänotypische Auswirkungen der *PpMIR171*-Überexpression und Deletion von *PpGRAS1*

Die Überexpression von *PpMIR171a* oder *PpMIR171b* unter der Kontrolle des starken *ACT1*-Promoters aus *O. sativa* bewirkt eine Reduzierung der *PpGRAS1*- und *PpGRAS2*-Transkriptmengen (Abbildung 24). Dies sollte letztlich zu einer geringeren Expression von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* führen. Sowohl die *PpMIR171a*-Überexpressionslinie als auch die *PpMIR171b*-Überexpressionslinien zeigten eine normale Entwicklung des Protonemas und der Gametophoren, aber auch der Gametangien (Abbildung 25, A bis D). Die *PpMIR171b*-Überexpressionslinien Nr. 1 und Nr. 2 wiesen eine etwa halb so große Menge an reifer ppt-miR171 auf verglichen zu den beiden verbleibenden *PpMIR171*-Überexpressionslinien *OsACT1::PpMIR171a-1* und *OsACT1::PpMIR171b-3* (Abbildung 24, C und E). Die *PpMIR171b*-Überexpressionslinien Nr. 1 und Nr. 2 bildeten wie auch der Wt bei Kulturbedingungen zur Sporophyteninduktion (Kurztag und konstant 15 °C) Sporophyten aus (Abbildung 25, E). Allerdings konnten die *PpMIR171*-Überexpressionslinien *OsACT1::PpMIR171a-1* und *OsACT1::PpMIR171b-3* unter den selben Bedingungen keine Sporophyten ausbilden. Erst bei Raumtemperatur und Labor- bzw. Tageslicht konnten diese Linien Sporophyten ausbilden. Dabei wurden sie zusammen mit anderen *PpMIR171*-Überexpressionslinien und dem Wt kultiviert. Erstaunlicherweise ist in den beiden *PpMIR171b*-Überexpressionslinien Nr. 1 und Nr. 3 zumindest die *PpGRAS1*-Transkriptmenge nahezu gleichermaßen reduziert (Abbildung 24, F), aber nur die *PpMIR171b*-Überexpressionslinie Nr. 3 bildete keine Sporophyten unter Kulturbedingungen zur Sporophyteninduktion aus. Während in *PpMIR171*-Überexpressionslinien die Transkriptmengen von beiden ppt-miR171-Zielgenen reduziert sind, wurde in $\Delta PpGRAS1$ -Linien nur das *PpGRAS1*-Gen durch eine Selektionskassette ersetzt, so dass kein *PpGRAS1*-Transkript mehr gebildet werden kann (Abbildung 27). Die untersuchten $\Delta PpGRAS1$ -Linien zeigten keine vom Wt abweichende Entwicklung auf (Abbildung 28). Beide $\Delta PpGRAS1$ -Linien bildeten Sporophyten aus, deren Sporen ebenso keimfähig waren wie die des Wt. *PpGRAS1* ist somit nicht essenziell für die

Entwicklung von *P. patens*. Daher liegt es nahe, dass die Reduzierung der *PpGRAS2*-Transkriptmenge die Bildung von Sporophyten unter Kulturbedingungen zur Sporophyteninduktion verhindert und dies eventuell in Verbindung mit der reduzierten *PpGRAS1*-Transkriptmenge geschieht. Möglicherweise sind die *PpMIR171a*-Überexpressionslinie Nr. 1 und die *PpMIR171b*-Überexpressionslinie Nr. 3 bei separater Kultivierung dadurch nicht mehr in der Lage, sich selbst zu befruchten. Dies könnte auf einem Funktionsverlust der Spermatozoide beruhen, was auch erklären könnte, warum diese Linien Sporophyten ausbilden, sobald sie zusammen mit dem Wt und anderen *PpMIR171*-Überexpressionslinien kultiviert werden, die sich selbst befruchten können. Die motilen Spermatozoide des Wt oder der anderen *PpMIR171*-Überexpressionslinien wären hierbei in der Lage, die Befruchtung der *PpMIR171a*-Überexpressionslinie Nr. 1 und der *PpMIR171b*-Überexpressionslinie Nr. 3 durchzuführen.

4.1.4 Die Entwicklung von *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien

Die Expression von ppt-miR171-resistentem *PpmGRAS1-GUS* oder *PpmGRAS2-GUS* unter der Kontrolle der natürlichen *PpGRAS1*- bzw. *PpGRAS2*-Promotoren sollte einer ppt-miR171-unbeeinflussten Expression von *PpGRAS1* bzw. *PpGRAS2* in *P. patens* entsprechen. Im Vergleich zum Wt zeigten die *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien eine normale Entwicklung des Protonemas und der Gametophoren (Abbildung 20, A und B). Die Entwicklung der Gametangien und des Sporophyten der *PpmGRAS1-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien weicht ebenfalls nicht vom Wt ab (Abbildung 20, C und Abbildung 19, B). Da die *PpGRAS2-GUS*- und *PpmGRAS2-GUS*-Linien keine veränderte Entwicklung im Vergleich zum Wt aufweisen, sollte das C-terminal fusionierte GUS-Protein keinen Einfluss auf die Entwicklung haben. Eine ppt-miR171-vermittelte Regulation der *PpGRAS1*- oder *PpGRAS2*-Expression kann daher für eine normale Entwicklung von *P. patens* unter den verwendeten Kulturbedingungen als nicht essenziell angesehen werden.

4.1.5 Folgen einer induzierten Überexpression von *PpmGRAS1* und *PpmGRAS1-DR*

Die induzierte Überexpression von ppt-miR171-resistentem *PpmGRAS1* bewirkte im Protonema im Vergleich zum Gametophoren einen gänzlich anderen Effekt. Die Gametophoren bildeten ein verbreitertes Cauloid mit verkleinerten Phylloiden und wiesen keine vollständige Braunfärbung auf (Abbildung 32). Das Protonema hingegen stellte die Zellteilung ein und verfärbte sich vollständig braun (Abbildung 31, B). Dies weist auf einen Pigmentabbau innerhalb der Zellen hin. Das Protonema war aufgrund der induzierten Überexpression von *PpmGRAS1* jedoch nicht vollständig abgestorben. Sobald das unter induzierenden Bedingungen kultivierte Protonema, selbst nach 51 Tagen, auf nicht induzierendes Nährmedium gesetzt wurde, regenerierten sich die Zellen und bildeten neues Protonema und später auch Gametophoren aus (Abbildung 33). Da sowohl der Wt, als auch die XVE-Vektorkontrolle auf induzierendem Nährmedium eine unveränderte Entwicklung zeigten, kann ein β -Estradiol-Effekt ausgeschlossen werden. Das bedeutet, dass die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* im Protonema auf reversible Weise die

Chloroplasten direkt z. B. durch einen veränderten Pigmentstoffwechsel oder indirekt z. B. durch oxidativen Stress negativ beeinflusst. Diese Annahme bestätigte sich durch die Transkriptomanalyse von Protonema uninduzierter und induzierter *PpmGRAS1*-Linien. Hierbei zeigte sich, dass nach 8 h Induktion die Transkriptmengen von mehreren Genen reduziert wurden, die für Enzyme der Chlorophyllbiosynthese codieren (Abbildung 37). Möglicherweise trifft dies auch für *PpPOR1* zu, da auch hier eine verringerte Transkriptmenge beobachtet wurde, wenngleich dies auch für die XVE-Vektorkontrolle der Fall war. Zudem wurden die Transkriptmengen von mehreren Genen reduziert, die für Chlorophyll-Bindeproteine codieren, die Bestandteile der Lichtsammelkomplexe der Photosysteme I und II sind, sowie von einigen Genen, die für Bestandteile der Photosysteme I und II codieren (Abbildung 37). Eine Überexpression von *PpmGRAS1* im Protonema könnte somit die gesamten Chlorophyllbiosynthese herunterregulieren. *PpGRAS1* ähnelt daher in seiner Funktion der von *AthSCL6-II*, welches die Chlorophyllbiosynthese durch direkte Repression der *AthPORC*-Transkription inhibiert (Ma, Hu *et al.* 2014). Die Reduktion der Chlorophyllbiosynthese in *P. patens* könnte sich auch auf den gesamten Pigmentstoffwechsel auswirken. Das Protonema könnte dabei nicht nur seine grüne Farbe, aufgrund eines geringeren Chlorophyllgehalts, verloren haben, sondern auch vermehrt rotbraune Pigmente, wie z.B. Carotinoide wie Xanthophylle, gebildet haben. Möglicherweise führt eine Akkumulation von Intermediaten der Chlorophyllbiosynthese oder die Reduktion der Chlorophyll-Menge auch zu einer verminderten Transkription der Gene, die für Chlorophyll-Bindeproteine codieren. Für *Chlamydomonas reinhardtii* konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Porphyrin-Intermediaten wie z.B. Mg-Protoporphyrin-monomethylester zu einer Reduktion der mRNA-Menge von *light-harvesting chlorophyll a/b-binding*-Proteinen führt (Johanningmeier *et al.* 1984). Beides könnte in der Folge zu einer reduzierten Photosyntheseleistung führen, zumal auch die Transkription einiger Proteine der Photosysteme I und II reduziert wurden (Abbildung 37). In Gametophoren, insbesondere in den Phylloiden wirkt sich die Überexpression von *PpmGRAS1* offenbar nicht auf die Chlorophyllbiosynthese aus, da hier die Phylloide und das apikale Cauloid weder braun gefärbt sind noch ihre Grünfärbung verloren haben. Dies zeigt, dass *PpGRAS1* in Gametophoren eine andere Rolle spielen könnte als im Protonema. In den *PpmGRAS1*-Überexpressionslinien hat die *PpmGRAS1*-Transkriptmenge bereits eine Stunde nach der Induktion um ein Vielfaches zugenommen (Abbildung 34). Daraufhin wurden die Transkriptmengen der Gene des Chlorophyllbiosyntheseweges und der Untereinheiten der Photosyntheseapparate nicht unmittelbar reduziert, sondern mit zeitlicher Verzögerung. Dies legt nahe, dass nicht alle dieser Gene direkt durch *PpGRAS1* reguliert werden, sondern möglicherweise indirekt über *PpGRAS1* nachgeschaltete Gene.

Die induzierte Expression von ppt-miR171 resistentem *PpmGRAS1-DR* ergibt nach der Translation ein *PpGRAS1*-Protein, das durch die Fusion mit der SRDX-Domäne als dominanter Transkriptionsrepressor fungiert. Transgene Linien, die *PpGRAS1* mit einem C-terminalen GUS-Proteinfragment exprimieren, unterschieden sich in der Entwicklung nicht vom Wt. Daher sollte die Fusion einer wesentlich kleineren SRDX-Domäne eine DNA-Bindung von *PpGRAS1* sterisch nicht behindern. Allerdings wiesen die

$\Delta PpGRAS1$ -Linien, die kein PpGRAS1-Protein mehr bilden können, ebenfalls keinen Unterschied in der Entwicklung zum Wt auf. Daher ist nicht auszuschließen, dass die C-terminale Fusion von GUS oder der SRDX-Domäne eine DNA-Bindung von PpGRAS1 stören könnte. Die induzierte Expression von *PpmGRAS1-DR* im Protonema bewirkt ebenso wie die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* bei den allermeisten Protonemafilamenten einen Zellteilungsstopp (Abbildung 31, D). Allerdings verhinderte die C-terminale Fusion der Transkriptionsrepressor-Domäne eine Reduktion der Transkriptmengen der Gene der Chlorophyllbiosynthese sowie des Photosyntheseapparates (Abbildung 37). In Folge dessen behielt das Protonema seine Grünfärbung (Abbildung 31, D). Funktionell unterscheidet sich somit PpGRAS1 als Repressor (PpGRAS1-DR) in *P. patens* von dem Repressor AthSCL6-II in *A. thaliana*. Während AthSCL6-II die Chlorophyllbiosynthese hemmt, ist dies für PpGRAS1-DR nicht der Fall.

Transkriptionsfaktoren bewirken entweder die Aktivierung oder die Reprimierung der Expression eines Gens (Latchman 2001). Daher könnte PpGRAS1 als potenzieller Transkriptionsfaktor entweder als Aktivator oder Repressor der Transkription von nachgeschalteten Genen agieren. Falls PpGRAS1 als Repressor der Chlorophyllbiosynthese agiert, sollte nach der Fusion der SRDX-Domäne eine induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* und *PpmGRAS1-DR* diesbezüglich einen ähnlichen Phänotyp hervorrufen. Da dies jedoch nicht der Fall ist, könnte PpGRAS1 hier als Aktivator agieren, der durch die Fusion der SRDX-Domäne zu einem dominanten Repressor wird (Abbildung 45, A). Dabei müsste PpGRAS1 im Protonema die Expression eines oder mehrerer Proteine aktivieren, die wiederum die Expression von Genen der Chlorophyllbiosynthese sowie der Photosyntheseapparate negativ regulieren. Alternativ könnte PpGRAS1 auch als Repressor agieren, der im Protonema die Expression der Chlorophyll- und Photosynthesegene reprimiert (Abbildung 45, B). Die Fusion der SRDX-Domäne könnte in diesem Fall die Funktion von PpGRAS1 als Repressor blockiert haben und daher die Expression der Chlorophyll- und Photosynthesegene unbeeinflusst lassen.

Da sowohl die Überexpression von *PpmGRAS1*, als auch von *PpmGRAS1-DR* im Protonema einen reversiblen Zellteilungsstopp bewirkt, könnte bei diesem Prozess PpGRAS1 als Repressor der Zellteilung fungieren. In diesem Fall würde PpGRAS1 mit der fusionierten SRDX-Domäne, ähnlich wie PpGRAS1 allein, negativ auf Zellteilung wirken. Dies lässt sich allerdings nicht mit der Möglichkeit in Einklang bringen, dass die Fusion der Repressordomäne an PpGRAS1 die Funktion von PpGRAS1 als Transkriptionsfaktor blockiert. Daher besitzt PpGRAS1 als Transkriptionsfaktor möglicherweise eine duale Funktion und kann verschiedene nachgeschaltete Gene entweder reprimieren oder aktivieren. Alternativ dazu könnte PpGRAS1 über Protein-Protein-Interaktion mit anderen Proteinen die Zellteilung im Protonema regulieren, während die Expression der Chlorophyll- und Photosynthesegene im Protonema durch PpGRAS1 als Transkriptionsfaktor reguliert wird. In *A. thaliana* besitzen die miR171-Zielgene solch eine duale Funktion. Sie haben die Eigenschaft auf Proteinebene z. B. mit dem Stammzellregulator WUS zu interagieren (Zhou, Liu *et al.* 2015) und direkt als Transkriptionsfaktor zu wirken. So wirkt z. B. AthSCL6-II als Repressor der *AthPORC*-Transkription (Ma, Hu *et al.* 2014).

In Gametophoren bewirkte die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* eine Verbreiterung des Cauloids, wobei neue Phylloide angelegt wurden, die aber nicht auswuchsen (Abbildung 32). Die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1-DR* bewirkte einen gegenteiligen Effekt. Hier stellte das Cauloid sein Wachstum vollständig ein und es wurden keine neuen Phylloide gebildet (Abbildung 32). Möglicherweise fördert die Überexpression von *PpmGRAS1* die Zellteilungsaktivität der Scheitelzelle oder von deren Tochterzellen, während die Überexpression von *PpmGRAS1-DR* diese hemmt (Abbildung 45, A). Auch hier könnte PpGRAS1 als aktivierender Transkriptionsfaktor in Erscheinung treten, der die Zellteilung der Scheitelzelle stimuliert. Die Umwandlung von PpGRAS1 zu einem Repressor durch die Fusion der SRDX-Domäne müsste dann die Zellteilungsaktivität der Scheitelzelle hemmen. Alternativ könnte die Hemmung der Zellteilungsaktivität der Scheitelzelle auch über einen Funktionsverlust von PpGRAS1 als Aktivator erklärt werden, der durch die Fusion der SRDX-Domäne verursacht wurde (Abbildung 45, B). Das Genom von *P. patens* codiert keine Orthologen zu den Genen der *WUS/CLV3*-Signalrückkopplungsschleife aus *A. thaliana* (Kofuji and Hasebe 2014). Daher sollten andere Proteine als potenzielle Protein-Protein-Interaktionspartner für PpGRAS1 in Frage kommen. In den hier durchgeführten Transkriptomanalysen können jedoch diesbezüglich keine Kandidaten identifiziert werden. Als potenzielle von PpGRAS1 als Transkriptionsfaktor regulierte Zielgene könnten auch AP2-Transkriptionsfaktoren in Frage kommen. Einige dieser Transkriptionsfaktoren sind essenzielle Proteine für die Bildung von Scheitelzellen in *P. patens* (Aoyama *et al.* 2012).

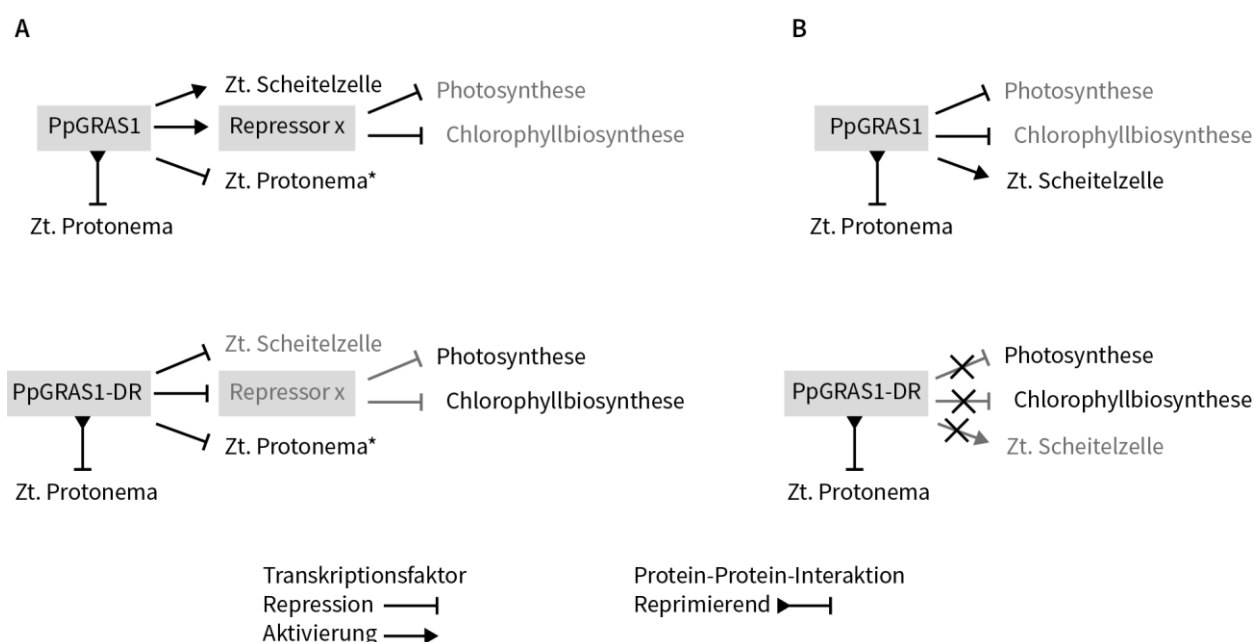


Abbildung 45: Modelle zur potenziellen Funktion von PpGRAS1 bzw. PpGRAS1-DR als Transkriptionsfaktoren
A) PpGRAS1 als Aktivator und PpGRAS1-DR als Repressor. Die duale Funktion mit PpGRAS1 als Repressor der Zellteilung (Zt.) des Protonemas ist mit einem Stern markiert. X: unbekannter Repressor.
B) Duale Funktion von PpGRAS1 als Transkriptionsfaktor und PpGRAS1-DR als defekter Transkriptionsfaktor.
 In grauer Schrift: reprimierte Proteine, Gene oder Prozesse sowie verminderte bzw. blockierte Funktionen.

4.2 Die Rolle des miR171-Regulationsweges in *A. thaliana*

4.2.1 Chlorophyllbiosynthese und Photosynthese

Eines der ath-miR171 Zielgene, *AthSCL6-II*, codiert für einen Transkriptionsfaktor, der direkt an den Promotor von *AthPORC* bindet und dessen Expression reprimiert (Ma, Hu *et al.* 2014). *AthPORC* ist eine von drei Protochlorophyllid-Reduktasen in *A. thaliana*, die einen späten Reaktionsschritt in der Chlorophyll-Biosynthese katalysieren (Abbildung 37, B). Eine ektopische Überexpression von ath-miR171-resistentem *AthSCL6-II* führte zu einem reduzierten Chlorophyllgehalt, während eine ektopische Überexpression von *AthMIR171c* den Chlorophyllgehalt erhöhte (Ma, Hu *et al.* 2014). Es konnte gezeigt werden, dass *AthSCL6-III* bezüglich der Ausbildung von Seitenzweigen redundant zu *AthSCL6-II* agiert (Wang, Mai *et al.* 2010). Diese Tatsache lässt vermuten, dass *AthSCL6-III* ebenfalls *AthPORC* regulieren könnte. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, denn die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* bewirkte in 10 Tage-alten Keimlingen keine Reduzierung oder Erhöhung der Transkriptmengen von Genen der Chlorophyllbiosynthese (Abschnitt 3.10.8). Daher ist es unwahrscheinlich, dass *AthSCL6-III* in Redundanz mit *AthSCL6-II* die Genexpression von *AthPORC* reguliert. Somit besitzen *AthSCL6-III* und *AthSCL6-II*, trotz ähnlicher Expressionsmuster und der funktionellen Redundanz als Transkriptionsfaktoren der Meristemregulation unterschiedliche Funktionen. Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* bewirkte innerhalb einer Stunde erhöhte Transkriptmengen von mehreren plastidären Genen, die hauptsächlich für Bestandteile des Photosystems II, aber auch für ein Protein des Photosystems I sowie für zwei Hauptbestandteile des Cytochrom *b6f*-Komplexes codieren (Abbildung 10). Es wurde postuliert, dass die ath-miR171-regulierten Zielgene bei der Anpassung an Lichtstress eine Rolle spielen und die Entwicklung der Chloroplasten hemmen (Ma, Hu *et al.* 2014). Möglicherweise geschieht dies auch durch die Aktivierung von Genen des Photosyntheseapparates in den Plastiden. Da *AthSCL6-III* eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern aufweist, müssten Kern-codierte Gene von *AthSCL6-III* reguliert werden, deren Genprodukte im nächsten Schritt in Chloroplasten die Transkription von Photosynthese genen aktivieren.

4.2.2 Erhaltung apikaler Meristeme

Eine der wesentlichen Funktionen der ath-miR171-regulierten Gene *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* ist die Aufrechterhaltung und Regulation von Spross- und Wurzelmeristemen (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Engstrom, Andersen *et al.* 2011). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* vermutlich über ihre N-terminalen Domänen mit WUSCHEL (WUS) aber auch WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) interagieren können (Zhou, Liu *et al.* 2015). WUS reguliert in einer Signalkopplungsschleife mit *CLAVATA3 (CLV3)* die Größe und Anzahl der Stammzellen im apikalen Sprossmeristem (Aichinger, Kornet *et al.* 2012), während WOX5 in ähnlicher Weise als Stammzellregulator im apikalen Wurzelmeristem agiert (Sarkar *et al.* 2007). Es konnte weiterhin gezeigt

werden, dass die Interaktion von AthSCL6-III mit WUS die Transkription von *TPL*, *GRP23* und *TCP9* aktiviert sowie von *TIP2;2* reprimiert (Zhou, Liu *et al.* 2015). Da sowohl *WUS* als auch *CLV3* nur in wenigen Zellen des Apikalmeristems exprimiert werden, sind die Transkriptmengen dieser beiden Gene in 10 Tage alten Keimlingen sehr gering. Daher konnte auch in keiner in dieser Arbeit durch RNA-Seq untersuchten RNA-Proben die Expression von *WUS* oder *CLV3* nachgewiesen werden. Dies ist sehr wahrscheinlich auch der Grund, warum für keines der erwähnten AthSCL6-III/WUS-nachgeschalteten Gene eine veränderte Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte.

Dennoch bewirkte die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* eine Reduzierung der Transkriptmenge von mehreren Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Meristemaktivität und dessen Aufrechterhaltung beteiligt sind (Abbildung 44).

Eines dieser Gene ist *AIL7*, das im Zentrum von apikalen Spross- und Infloreszenzmeristemen exprimiert ist und dort mit den Expressionsdomänen von *WUS* und *CLV3* überlappt (Mudunkothge and Krizek 2012). *AIL7* ist zusammen mit *AINTEGUMENTA (ANT)* und *AIL6* an der Aufrechterhaltung des Sprossmeristems beteiligt (Mudunkothge and Krizek 2012). Die *ant/ail6/ail7*-Nullmutanten stellen ebenso wie die *Athsc16-II/III*- und *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten nach der Bildung von mehreren Blättern die Aktivität des apikalen Sprossmeristems ein (Mudunkothge and Krizek 2012). In *Athsc16-II/III*- und *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten wurde im apikalen Sprossmeristem mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung die Expression von verschiedenen Genen, die an der Meristemfunktion beteiligt sind, untersucht (Schulze, Schafer *et al.* 2010). So wurde auch gezeigt, dass die Expressionsdomäne von *ANT* anders als im *Wt* glockenförmig basipetal erweitert ist und den gesamten zentralen Bereich des apikalen Sprossmeristems umfasst. Der Funktionsverlust von *AIL7* kann zudem teilweise den Phänotyp von *wus*- oder *stm*-Nullmutanten unterdrücken und es wurde postuliert, dass *AIL7* direkt oder indirekt die Signalküppelungsschleife von *WUS* und *CLV3* beeinflusst (Mudunkothge and Krizek 2012). In *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten ist die *CLV3*-Expressionsdomäne vergrößert und kann die gesamte *WUS*-Expressionsdomäne umfassen. Daher könnte AthSCL6-III möglicherweise auch die *WUS/CLV3*-abhängige Regulation des apikalen Sprossmeristems über eine Repression von *AIL7* beeinflussen. *AIL7* spielt zudem mit anderen AP2-Domäne-Transkriptionfaktoren eine Rolle in der Auxin-vermittelten Regulation der Phyllotaxis (Prasad *et al.* 2011). Da *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten ebenso wie *ath-miR171*-Überexpressionslinien unter anderem eine veränderte Phyllotaxis aufweisen (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010; Engstrom, Andersen *et al.* 2011), könnte die Repression von *AIL7* durch *AthSCL6-III* hierbei eine Rolle spielen.

Ein weiteres Gen, dessen Transkriptmenge nach der induzierten Überexpression von *AthmSCL6-III* reduziert ist, stellt *ATHB2* dar. Zusammen mit zwei weiteren Proteinen der Homeodomäne und Leucin-Zipper-Familie, *ATHB3* und *ATHB4*, ist *ATHB2* für die Aufrechterhaltung des apikalen Sprossmeristems notwendig und an der apikalen Embryonalentwicklung beteiligt (Turchi, Carabelli *et al.* 2013). Die *athb3/athb4*-Nullmutanten weisen im Keimlingsstadium Entwicklungsdefekte in den Kotyledonen sowie

dem Leitgewebe auf und nur wenige dieser Mutanten besitzen kein apikales Sprossmeristem mehr. Der zusätzliche Funktionsverlust von *ATHB2* in *athb3/athb4*-Nullmutanten führt allerdings zu einem Verlust aller apikalen Sprossmeristeme. Da die *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten keine veränderte Embryonalentwicklung aufweisen (Engstrom, Andersen *et al.* 2011), dürfte *ATHB2* eine untergeordnete Rolle in der Entstehung des Phänotyps der *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten spielen.

Die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* beeinflusste auch die Transkriptmengen mehrerer Gene, die für CLE- und CLE-like-Proteine codieren (Abbildung 44). So wurden die Transkriptmengen von *CLE13* und *CLE14* erhöht, während die von *CLE21* reduziert wurde. Zudem wurde die Transkriptmenge von *CLEL6* erhöht und von *CLEL7* sowie *CLEL9* reduziert. CLE-Proteine sind ähnlich wie CLAVATA3 (*CLV3*) Signalpeptide, die an spezifische Rezeptoren binden können (Strabala *et al.* 2006). Eine Überexpression von *CLE13* bewirkt einen ähnlich pleiotropen Phänotyp wie ihn auch *CLV3*-Überexpressionslinien aufweisen bis hin zu einem vollständigen Wachstumsstillstand des apikalen Sprossmeristems (Strabala, O'Donnell P *et al.* 2006). Eine Überexpression von *CLE14* bewirkt weiterhin einen Zellteilungsstopp im Wurzelmeristem (Meng *et al.* 2010). Darüber hinaus bewirkt die Überexpression von *CLE14* auch eine Reduzierung der Trichomanzahl der Rosettenblätter im Vergleich zum Wt (Meng *et al.* 2011). Die Phänotypen der *CLE13*- oder *CLE14*-Überexpression spiegeln teils den Phänotyp von *Athscl6-II/III/IV*-Nullmutanten wieder und deckt sich nicht mit dem von *ath-miR171*-resistenten *AthmSCL6-III*-Überexpressionslinien. Eine Überexpression von *CLE21* bewirkt einen zwergwüchsigen Habitus mit verzögerter Entwicklung im Vergleich zum Wt (Strabala, O'Donnell P *et al.* 2006). Eine reduzierte *CLE21*-Transkriptmenge ähnelt daher eher dem Phänotyp von *ath-miR171*-resistenten *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien.

CLE-like-Proteine, sind ebenfalls Signalpeptide, über deren Funktion noch nicht viel bekannt ist. Die Proteine *CLEL6*, *CLEL7* und *CLEL9* weisen eine subzelluläre Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum auf und werden daher vermutlich dem sekretorischen Weg zugeführt (Meng *et al.* 2012). Zudem bewirkt eine Überexpression von *CLEL6*, *CLEL7* oder *CLEL9* bei Keimlingen eine verlängerte primäre Wurzel mit einem verlängerten apikalen Wurzelmeristem im Vergleich zum Wt. Da die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* die *CLEL6*-Transkriptmenge erhöhte und die von *CLEL7* sowie *CLEL9* reduzierte, lassen sich auch hier die Transkriptmengen nicht mit dem Phänotyp von *ath-miR171*-resistenten *AthmSCL6-III*-Überexpressionslinien in Einklang bringen. Möglicherweise spielt hierbei die ektopisch Überexpression der CLE- bzw. CLE-like-Signalpeptide eine Rolle. Diese wurde stets durch den *CaMV35S*-Promoter kontrolliert. Dadurch könnten diese Signalpeptide auch in einem anderen zellulären Kontext als im Wt wirken und so die sich teils widersprechenden Phänotypen verursachen.

4.2.3 Ausbildung von Seitenzweigen und laterale Meristemhomöostase

Die ath-miR171-regulierten Gene sind redundant an der Ausbildung von Seitenzweigen beteiligt und *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten bilden kaum noch Seitenzweige aus (Schulze, Schafer *et al.* 2010; Wang, Mai *et al.* 2010). Mehrere Gene, die an der Regulation von Seitenmeristemen beteiligt sind, inklusive *STM*, *REVOLUTA (REV)* und *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* wurden in ath-miR171-Überexpressionslinien und *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten bereits mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht (Wang, Mai *et al.* 2010). Allerdings konnten dabei keine signifikanten Veränderungen in den Transkriptmengen festgestellt werden. Die Transkriptmengen von drei Genen, die für die Transkriptionsfaktoren *RAX3* und *COL7* sowie *ATH1* codieren, wurden infolge der induzierten *AthmSCL6-III*-Überexpression reduziert. *RAX3* wird in den Blattachsen exprimiert und reguliert dort zusammen mit *RAX1* und *RAX2* die Bildung von Seitenmeristemen (Muller, Schmitz *et al.* 2006). Die *rax2/rax3*-Nullmutanten weisen unter Kurztagbedingungen weniger Knospen in den Achseln von älteren Blättern des vegetativen Sprosses auf als der Wt, verlieren diesen Phänotyp aber unter Langtagbedingungen (Muller, Schmitz *et al.* 2006).

COL7 hingegen ist unter anderem an der Regulation der Anzahl von Seitenzweigen beteiligt und eine Überexpression von *COL7* erhöht im Vergleich zum Wt in der vegetativen Wachstumsphase die Anzahl an Seitenzweigen (Wang, Zhang *et al.* 2013a). Allerdings zeigten *col7*-Nullmutanten keine veränderte Anzahl an Seitenzweigen, was darauf hinweisen könnte, dass *COL7* in Redundanz mit anderen Faktoren die Ausbildung von vegetativen Seitenzweigen fördert. Wenngleich Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten, die durch *AthSCL6-III* negativ reguliert werden könnten, dürften diese nicht allein dem Phänotyp der *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten zugrunde liegen.

4.2.4 Übergang von juvenilem zu adultem vegetativen Stadium

Die Rosettenblätter von *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten oder ath-miR171c-Überexpressionslinien weisen eine veränderte Blattmorphologie auf. Sie sind schmaler, besitzen mehr Einkerbungen und weisen vergrößerte Epidermiszellen auf (Wang, Mai *et al.* 2010; Engstrom 2011). Dies deutet auf eine Beteiligung der ath-miR171-regulierten Gene (*AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV*) in der Regulation der Blattmorphologie hin. In Übereinstimmung damit bilden MIM171-Linien mit reduzierter ath-miR171-Menge sowie Überexpressionslinien, die eine ath-miR171-resistente Variante von *AthSCL6-II* oder auch von *AthSCL6-III* exprimieren, Rosettenblätter mit runden Blattspreiten aus, die in ihrer Form juvenilen Blättern ähneln (Todesco, Rubio-Somoza *et al.* 2010; Ma, Hu *et al.* 2014; Xue, Zhao *et al.* 2014).

Die Transkriptomanalyse von induzierten *AthmSCL6-III*-Linien zeigte auch eine Reduktion in den Transkriptmengen von drei Genen, die für Transkriptionsfaktoren der SPL-Familie codieren: *SPL3*, *SPL9* und *SPL15* (Abbildung 44). Zehn Mitglieder der SPL-Transkriptionsfaktoren, inklusive *SPL2*, *SPL3*, *SPL9* und *SPL15*, sind Zielgene der ath-miR156 – einer evolutionär konservierten miRNA (Wu, Park *et al.* 2009).

Vergleicht man den Phänotyp der MIM171-Linien oder der ath-miR171-resistenten *AthSCL6-III* mit dem der ath-miR156a-Überexpressionslinien, ähneln sich diese. Die ath-miR156a-Überexpressionslinien

bilden ausschließlich juvenile Rosettenblätter mit runden Blattspreiten aus (Wu *et al.* 2006). Dabei sollten die Transkriptmengen der ath-miR156-Zielgene *SPL3*, *SPL9* und *SPL15* in ath-miR156a-Überexpressionslinien in ähnlicher Weise reduziert sein, wie es für die induzierten *AthmSCL6-III*-Linien in dieser Arbeit festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu bilden MIM156-Linien mit reduzierter ath-miR156-Menge und somit mit erhöhten *SPL3*-, *SPL9*- und *SPL15*-Transkriptmengen nur wenige adulte Blätter aus, die in ihrer Form eher der von ath-miR171a-Überexpressionslinien ähneln (Todesco, Rubio-Somoza *et al.* 2010). Daher liegt es nahe, dass beide miRNAs (ath-miR171 und ath-miR156) und ihre Zielgene die Blattmorphologie beeinflussen.

Des Weiteren bilden *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten weniger Trichome an der Sprossachse aus als der Wt und weisen einen ähnlichen Phänotyp auf wie MIM156-Linien mit reduzierter ath-miR156-Menge (Yu *et al.* 2010; Xue, Zhao *et al.* 2014). Dementsprechend bilden Überexpressionslinien mit ath-miR171-resistenten *AthSCL6-II* oder *AthSCL6-III* unter der Kontrolle der natürlichen Promotoren mehr Trichome an der Sprossachse aus als der Wt – ähnlich wie ath-miR156f-Überexpressionslinien (Yu, Cai *et al.* 2010; Xue, Zhao *et al.* 2014). Dies bedeutet, dass die ath-miR171- und die ath-miR156-regulierten Zielgene auch die Trichombildung kontrollieren.

Die Blattmorphologie und die Trichomverteilung sind Indikatoren für die vegetativen und reproduktiven Lebensphasen von *A. thaliana*. Diese werden durch komplexe genetische Regelkreise gesteuert, in die Mitglieder der SPL-Proteinfamilie eingebunden sind (Telfer *et al.* 1997; Huijser *et al.* 2011).

Regulation der vegetativen Phase durch ath-miR171- und ath-miR156-regulierte Zielgene

In der vegetativen Phase reguliert *SPL9* zusammen mit *SPL15* den Übergang vom juvenilen zum adulten Stadium (Schwarz, Grande *et al.* 2008). Die *sp19/sp15*-Nullmutanten bilden anders als der Wt jedoch ähnlich den ath-miR156a-Überexpressionslinien mehr juvenile Rosettenblätter aus, unterscheiden sich aber später nicht in der Anzahl der Stängelblätter vom Wt (Schwarz, Grande *et al.* 2008). Vergleicht man den Phänotyp der ath-miR171-resistenten *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien mit dem der *sp19/sp15*-Nullmutanten, so ähneln sich diese. Da die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* eine Reduktion der *SPL9*- und *SPL15*-Transkriptmengen bewirkte, liegt es nahe, dass *AthSCL6-III* die Expression von *SPL9* und *SPL15* negativ reguliert. Interessanterweise wurde bereits eine Protein-Protein-Interaktion von *AthSCL6-II* und *AthSCL6-III* mit *SPL9* nachgewiesen, die die Expression mehrerer Gene, die für die Trichombildung verantwortlich sind, reguliert (Xue, Zhao *et al.* 2014). Möglicherweise werden *SPL9* und *SPL15* darüber hinaus auch auf transkriptioneller Ebene durch *AthSCL6-II* zumindest jedoch durch *AthSCL6-III* reguliert.

4.2.5 Phasenübergang von der vegetativen zur reproduktiven Wachstumsphase

Die ath-miR171-regulierten Gene sind unter anderem auch an der Festlegung des Blütezeitpunktes beteiligt. So blühen ath-miR171-Überexpressionslinien und *Athsc16-II/III/IV*-Nullmutanten unter Langtagbedingungen später als der Wt, während ath-miR171-resistente *AthSCL6-II*-Überexpressionslinien früher blühen (Xue, Zhao *et al.* 2014). Damit einhergehend wurde bei Ersteren auch eine geringere Expression von *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* nachgewiesen und bei Letzteren eine höhere Expression.

Tatsächlich reduzierte die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* die Transkriptmengen von mehreren Genen, die an dem Übergang des vegetativen vom reproduktiven Wachstum beteiligt sind (Abbildung 44). Diese umfassen die Gene der Transkriptionsfaktoren CO und PNF sowie der Transkriptionsfaktoren SPL3, SPL9 und SPL15 der SPL-Familie. Alle spielen eine zentrale Rolle in der Transition des vegetativen Sprossmeristems zu einem Infloreszenzmeristem sowie der Blühinduktion (Chen *et al.* 2010; Wang 2014).

In Blättern reguliert CO in Abhängigkeit von der Photoperiode die Transkription von FLOWERING LOCUS T (FT), dessen Protein als Blütenbildungssignal in das apikale Sprossmeristem gelangt (Abbildung 46) (Wang, Czech *et al.* 2009). Dort interagiert schließlich FT mit dem bZIP-Protein FD und leitet die Expression von SOC1 ein und somit die Umwandlung des Sprossmeristems in ein Infloreszenzmeristem (Yoo, Chung *et al.* 2005).

Unabhängig von diesem photoperiodisch regulierten Weg kann die Transkription von *SOC1* auch durch SPL9 direkt aktiviert werden (Wang, Czech *et al.* 2009). Der FT/FD-Komplex aktiviert im Sprossmeristem neben *SOC1* auch die Transkription von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5*, die ebenfalls Gene steuern, die die Ausbildung des Infloreszenzmeristems festlegen (Jung *et al.* 2012). *SOC1* wiederum kann ebenfalls die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* aktivieren. Für diese beiden FT/FD-Regulationswege sind *PNF* sowie *PENNYWISE*, zwei BEL1-like-Homöobox Genen notwendig deren molekulare Funktionen hierbei noch nicht geklärt sind (Lal, Pacis *et al.* 2011).

SPL3 wird in der gesamten Sprossspitze einschließlich dem apikalen Sprossmeristem und auswachsender Blattprimordien exprimiert, während *SPL9* in jungen und auswachsenden Blattprimordien sowie in sich ausbildenden Leitgefäßen exprimiert wird (Wang, Czech *et al.* 2009; Wu, Park *et al.* 2009). Die Expressionsdomänen von *SPL3* und *SPL9* überlappen sich also mit denen der ath-miR171-Zielgene. Nach einem Blühreiz nimmt im Sprossmeristem die Expressionsstärke von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* stark und von *SPL9* und *SPL15* weniger stark zu und transgene Linien, die eine ath-miR156-resistente Variante von *SPL3* überexprimieren, blühen früher als der Wt (Schmid *et al.* 2003; Wu and Poethig 2006). Die *spl9/spl15*-Nullmutanten hingegen blühen später und ath-miR156-Überexpressionslinien nochmals später als der Wt und weisen dabei verkürzte Infloreszenzen auf (Schwarz, Grande *et al.* 2008). In Übereinstimmung damit wurde auch eine direkte Aktivierung der Transkription von *SOC1* durch SPL9 nachgewiesen (Wang, Czech *et al.* 2009). Daher liegt es nahe, dass *AthSCL6-III* die Bildung des Infloreszenzmeristems über eine

Repression der Transkription von *SPL9/SPL15* und möglicherweise auch über *CO*, *PNF* und *SPL3* festlegen kann. Auf Proteinebene interagiert AthSCL6-II oder AthSCL6-III mit SPL9, um dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor zu blockieren. Die Zielgene von *ath-miR171* und *ath-miR156* sind daher in einem komplexen regulatorischen Netzwerk eingebunden, das interne Signale, wie das Alter der Pflanze, mit externen Umweltsignalen, wie der Photoperiode, integriert und daraufhin verschiedene Entwicklungsschritte einleiten kann (Abbildung 46).

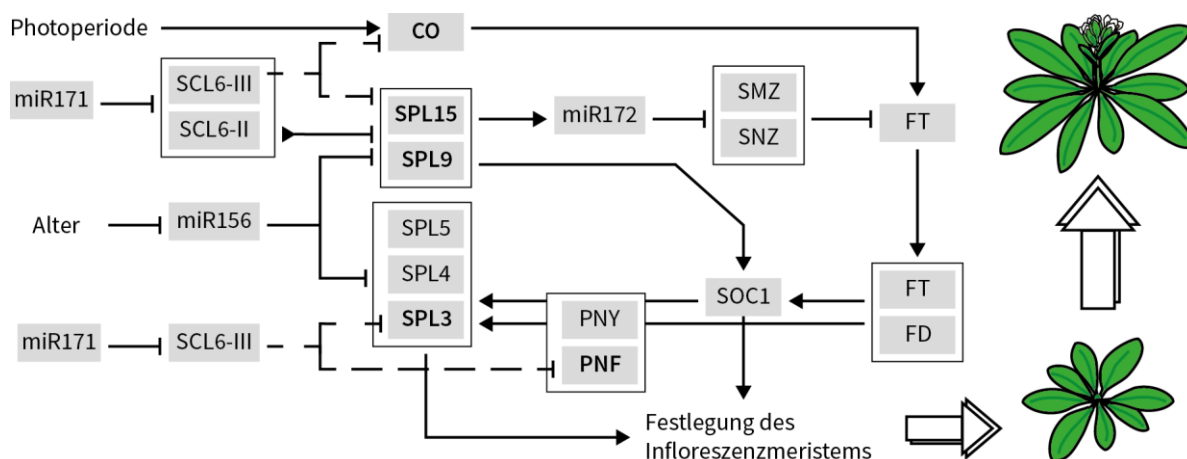


Abbildung 46: Modell zur Festlegung der reproduktiven Wachstumsphase durch Alter und Photoperiode

Neue Verknüpfungen als gestrichelte Linien: mögliche negative Regulation durch *AthSCL6-III*. Pfeile mit stumpfem Ende: reprimierender Einfluss, Pfeile mit spitzem Ende: aktivierender Einfluss. Dreieck am Anfang des Pfeiles: Einfluss durch Protein-Protein-Interaktion. SCHNARCHZAPFEN (SNZ), SCHLAFMUTZE (SMZ). Schema erweitert nach Chen, Zhang *et al.* (2010).

4.2.6 Die Rolle der *ath-miR171*- und *ath-miR156*-regulierten Zielgene in der reproduktiven Phase

Juvenile Rosettenblätter bilden stets auf der adaxialen Seite Trichome aus und erst adulte Rosettenblätter auch auf der abaxialen Seite (Telfer, Bollman *et al.* 1997). Die Bildung von Trichomen auf der abaxialen Seite von adulten Rosettenblättern kündigt auch den Übergang vom vegetativen hin zum reproduktiven Wachstum an (Wu, Park *et al.* 2009). In der Infloreszenz bilden lediglich die Tragblätter sowie in den Blüten gelegentlich die Kelchblätter wenige Trichome an der abaxialen Seite aus, während am Spross die Anzahl der Trichome von den basalen Internodien bis zu den apikalen Internodien hin abnimmt (Yu, Cai *et al.* 2010).

Die Interaktion von AthSCL6-III mit SPL9 verhindert die Aktivierung der Genexpression von *TRY* und *TCL1*, zwei Repressoren der Trichomineraktion (Xue, Zhao *et al.* 2014). Weiterhin bewirkt die Überexpression von *ath-miR171* resistentem *AthSCL6-III* auch eine Zunahme der Trichomanzahl in der Infloreszenz (Xue, Zhao *et al.* 2014). Allerdings wurde nach der induzierten Überexpression von *AthmSCL6-III* in 10 Tage alten Keimlingen keine zu erwartende Reduktion in den Transkriptmengen von *TRY* oder *TCL1* beobachtet. Möglicherweise wird in diesem Entwicklungsstadium die *TRY*- oder *TCL1*-Transkription

nicht in solch einem Ausmaß von *SPL9* gefördert, als dass eine gesteigerte Interaktion mit *AthSCL6-III* sich auf die *TRY*- oder *TCL1*-Transkriptmengen negativ auswirken könnte. Tatsächlich nimmt im Wt die Expression von *SPL9* und dadurch auch von *TRY* und *TCL1* mit jedem weiteren neuem Internodium in der Infloreszenz zu und einhergehend damit auch die Anzahl der Trichome ab (Yu, Cai *et al.* 2010).

Die induzierten Überexpression von *AthmSCL6-III* bewirkte vielmehr eine Reduktion in den Transkriptmengen von *ETC1* und *ETC2*, die für zwei weitere Repressoren der Trichominitiation codieren (Abbildung 44). Da *ath-miR171*-resistente *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien mehr Trichome ausbilden als der Wt, deckt sich die Reduzierung der *ETC1*- und *ETC2*-Transkriptmengen mit diesem Phänotyp. Daher kann davon ausgegangen werden, dass *AthSCL6-III* neben der Regulation der Genexpression von *TRY* und *TCL1* über die Interaktion mit *SPL9* möglicherweise auch die Transkription von weiteren Faktoren des Trichom-Initiationskomplexes beeinflusst (Abbildung 47).

Auf Proteinebene interagiert *AthSCL6-III* auch mit *SPL2* (Xue, Zhao *et al.* 2014), das zusammen mit *SPL3* – einem weiteren Transkriptionsfaktor der SPL-Familie – an der Bildung von Trichomen auf der abaxialen Seite von Tragblättern (*SPL2*) bzw. adulten Rosettenblättern (*SPL3*) beteiligt ist (Wu and Poethig 2006; Shikata *et al.* 2009). Interessanterweise wurde neben den Transkriptmengen von *SPL9* und *SPL15* auch die Transkriptmenge von *SPL3* nach der induzierten Überexpression von *AthmSCL6-III* reduziert (Abbildung 44). Daher könnte *AthSCL6-III* über *SPL2*, *SPL3* und *SPL9* die Trichombildung im Verlauf der Entwicklung von *A. thaliana* beeinflussen (Abbildung 47).

Allerdings reduzierte die induzierte Überexpression von *AthmSCL6-III* auch die Transkriptmengen von zwei Aktivatoren der Trichominitiation *GL1* und *EGL3* (Abbildung 44). Diese Reduktion von Aktivatoren der Trichominitiation deckt sich nicht mit einer verstärkten Bildung von Trichomen in *ath-miR171*-resistenten *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien. Möglicherweise spielen hierbei Rückkopplungsmechanismen, die eine zu starke Trichombildung verhindern, bereits eine Rolle.

4.2.7 Das Zusammenspiel der *ath-miR171*- und *ath-miR156*-Regulation

Die *ath-miR171*-Menge nimmt im Wt ausgehend vom untersten Internodium des Hauptsprosses bis zum obersten, blütentragenden Internodium hin zu (Xue, Zhao *et al.* 2014). Dementsprechend sollten auch die Transkriptmengen der *ath-miR171*-Zielgene in den obersten Internodien am geringsten sein. Dies bedeutet, dass in den obersten Internodien *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV* kaum exprimiert werden können. Bei einer ektopischen überexpression von *ath-miR171*-resistentem *AthSCL6-III* hingegen, wie es bei den induzierten *GVG>>AthmSCL6-III*-Linien der Fall ist, können die *AthmSCL6-III*-Transkripte nicht von der *ath-miR171* gespaltet werden, so dass auch in den obersten Internodien viel *AthSCL6-III* gebildet wird. Dadurch steht dort mehr *AthSCL6-III* zur Verfügung, dass die Transkription von *SPL9* sowie von *ETC1* und *ETC2* reduzieren könnte oder mit *SPL9* interagieren kann, um die Aktivierung der *TRY*- bzw. *TCL1*-Expression zu blockieren.

Die Expressionsstärke der ath-miR156 ist altersabhängig und nimmt mit zunehmendem Alter der Pflanze ab (Wu, Park *et al.* 2009). Im Gegenzug nimmt, insbesondere während des Übergangs der vegetativen zur reproduktiven Wachstumsphase, die Expressionsstärke der ath-miR156-Zielgene, wie z.B. *SPL3* oder *SPL9* und *SPL15*, zu (Wu and Poethig 2006; Schwarz, Grande *et al.* 2008). Daher werden in der vegetativen Wachstumsphase weniger SPL-Transkriptionsfaktoren exprimiert als in der reproduktiven Wachstumsphase. Somit wird im Wt bei letzteren auch zunehmend mehr *SPL9* exprimiert, dass die Expression von *TRY*- bzw. *TCL1* aktiviert und so die Trichomanzahl in den obersten Internodien zunehmend reduziert (Yu, Cai *et al.* 2010). Bei ath-miR171-resistenten *AthSCL6-III*-Überexpressionslinien hingegen wird *SPL9* von *AthSCL6-III* blockiert und darüberhinausgehend könnte *AthSCL6-III* auch die *SPL9*-Transkription hemmen. Daher bilden letztlich diese Linien, insbesondere in den obersten Internodien, auch mehr Trichome aus als der Wt (Xue, Zhao *et al.* 2014).

Die Expressionsstärken der ath-miR156 und ath-miR171 sind somit zueinander gegenläufig. Beide steuern dabei über ihre Zielgene im Verlauf verschiedener Entwicklungsphasen in einem komplexen Zusammenspiel neben der Blattform auch die Trichomverteilung (Abbildung 47).

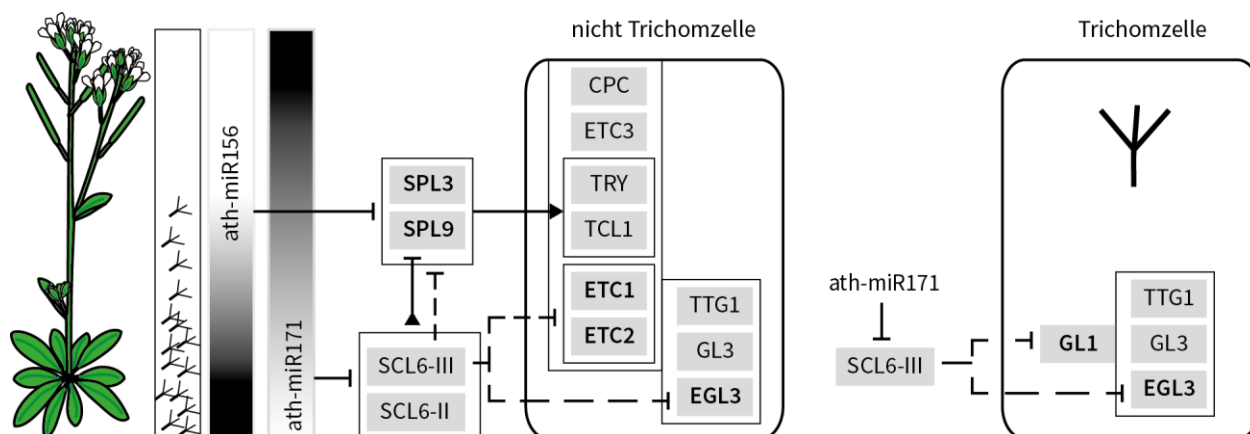


Abbildung 47: Erweitertes Modell der Regulation des Trichominitiationskomplexes

Die Menge an ath-miR156 und ath-miR171 in der Infloreszenz sind in Graustufen wiedergegeben (Weiß: keine miRNA und schwarz: viel miRNA). Neue Verknüpfungen als gestrichelte Linien: mögliche negative Regulation durch *AthSCL6-III*. Pfeile mit stumpfem Ende: reprimierender Einfluss, Pfeile mit spitzem Ende: aktivierender Einfluss. Dreieck am Anfang des Pfeiles: Einfluss durch Protein-Protein-Interaktion. Modell ergänzt nach (Kalve, De Vos *et al.* 2014).

4.3 Evolutionärer Aspekt des miR171-Regulationsweges

Während eine Deregulation der miR171 oder der Funktionsverlust eines der miR171-Zielgene in *A. thaliana* deutliche Auswirkungen auf die Entwicklung hat, ist dies für *P. patens* nicht der Fall. Selbst der Verlust eines der beiden ppt-miR171-Zielgene, *PpGRAS1*, bewirkte keinerlei Veränderung in der Entwicklung. Die Funktion von *PpGRAS1* ist nicht essenziell für *P. patens*. Allerdings hatte die ektopische Überexpression von ppt-miR171-resistentem *PpGRAS1* drastische Auswirkungen mit einem vollständi-

gen aber reversiblen Entwicklungsstopp. Die Expression von ppt-miR171-resistentem *PpGRAS1*, fusioniert mit einem GUS-CDS-Fragment, unter der Kontrolle des natürlichen *PpGRAS1*-Promotors zeigte dennoch keinen solchen drastischen Effekt. Möglicherweise könnte die ppt-miR171a die Folgen einer unkontrollierten Überexpression von *PpGRAS1*, z.B. im Protonema, verhindern. Die Rolle des ppt-miR171-Regulationswegs in *P. patens* lässt an dieser Stelle noch nicht abschließend klären.

Da der miR171-Regulationsweg in *P. patens* ebenso konserviert ist wie in *A. thaliana*, stellt sich die Frage nach dem Selektionsdruck, den dieser Regulationsweg in *P. patens* erhält. Im Gegensatz zu den kontrollierten Kulturbedingungen eines Labors sind Pflanzen in der Natur mit sich ständig wechselnden Umweltbedingungen konfrontiert. Möglicherweise besitzt *PpGRAS1* eine Funktion in der Optimierung der Photosynthese. Die Reprimierung von Genen der Chlorophyllbiosynthese und der Photosyntheseapparate durch die induzierte Überexpression von *PpmGRAS1* spricht dafür. Zudem kann aufgrund der hier gewonnenen Daten nicht ausgeschlossen werden, dass *PpGRAS1*, ähnlich wie *AthSCL6-II* in *A. thaliana*, die Transkription eines Protochlorophyllid-Reduktasegens z.B. *PpPOR1* reguliert. Eine durch *PpGRAS1* verbesserte Energieausbeute könnte somit ein Selektionsvorteil sein, der den nötigen Selektionsdruck zur Erhaltung von *PpGRAS1* aufbaut. Eine zu starke Expression von *PpGRAS1* beispielsweise im Protonema, aber auch im apikalen Gametophor, wirkt sich hingegen negativ aus. Möglicherweise könnte dies durch eine ppt-miR171-vermittelte Spaltung von *PpGRAS1* verhindert werden. Tatsächlich wird auch *PpMIR171a* in exakt den Geweben exprimiert, in denen sich eine Überexpression von *PpmGRAS1* negativ auswirkte. Somit erscheint es plausibel, dass erst das ausbalancierte Zusammenspiel von *PpGRAS1*- und *PpMIR171a*-Expression einen sicheren Selektionsvorteil ergibt. Diese Funktion ist auch in *A. thaliana* konserviert, wo *AthSCL6-II* die Chlorophyllbiosynthese und möglicherweise zusammen mit *AthSCL6-III* mehrere Photosynthese gene steuert. Vermutlich ist in Landpflanzen die Optimierung der Photosynthese die ursprüngliche Funktion der miR171 sowie ihrer Zielgene. Im Laufe der Evolution haben allerdings die miR171-Zielgene und somit auch die miR171 selbst neue Funktionen übernommen. Der modulare Aufbau der GRAS-Proteine dürfte hierbei eine zentrale Rolle spielen. Denn Funktionen wie z.B. die Meristemregulation in *A. thaliana* über WUS und WOX5 oder die Trichombildung über SPL-Transkriptionsfaktoren erfolgt stets über Interaktionen mit den N-terminalen Domänen der ath-miR171-Zielgene (Ma, Hu *et al.* 2014; Xue, Zhao *et al.* 2014; Zhou, Liu *et al.* 2015). Diese ist sehr variabel zwischen den verschiedenen Gruppen der Landpflanzen. Zudem bewirkte eine Überexpression der N-terminalen Domäne von *AthSCL6-II* gekoppelt an eine Kernlokalisationssequenz keine gelblichen und hellgrünen Blätter wie sie ath-miR171-resistente *AthSCL6-II*-Überexpressionslinien aufweisen (Xue, Zhao *et al.* 2014). Daraus kann geschlossen werden, dass die Regulation der Photosynthese durch die C-terminalen Domänen der miR171-Zielgene erfolgt. Im C-terminalen Teil der Zieltranskripte befindet sich auch die miR171-Bindestelle, was die Hypothese der Optimierung der Photosynthese als die ursprüngliche Funktion der miR171 und ihrer Zielgene weiter unterstützt.

4.4 Ausblick

Eine Untersuchung von *PpGRAS2*- und *PpGRAS1/PpGRAS2*-Knockout-Mutanten wird zeigen können, welche Rolle *PpGRAS2* in der Entwicklung von *P. patens* spielt. Hierbei wäre von Interesse, ob die Einzel- oder Doppelmutanten männlich-steril sind und welche Funktion *PpGRAS2* in der Bildung der Spermatozoiden besitzt. Weiterhin wird die Untersuchung der Auswirkungen von einer *PpGRAS2*-Überexpression aufzeigen können, ob *PpGRAS2* ebenso wie *PpGRAS1* Gene der Chlorophyllbiosynthese und der Photosynthese beeinflussen kann. Noch ist unbekannt, unter welchen Umweltbedingungen der ppt-miR171-Regulationsweg seine biologische Relevanz – eventuell in einer Optimierung der Photosynthese – haben könnte. Lichtstress wäre ein Faktor, der hierbei untersucht werden könnte. Nicht zuletzt könnte auch die Identifizierung potenzieller Proteininteraktionspartner von *PpGRAS1* und *PpGRAS2* Auskunft darüber geben, in welche Prozesse die ppt-miR171-Zielgene noch eingebunden sind und inwieweit diese evolutionär konserviert sind.

5 Zusammenfassung

Die kleine regulatorische RNA miR171 hemmt posttranskriptionell die Expression von Transkriptionsfaktoren mit GRAS-Domänen. In dem Laubmoos *Physcomitrella patens* wird die miR171 von zwei Genen, *PpMIR171a* und *PpMIR171b*, codiert und reguliert die Expression der GRAS-Transkriptionsfaktoren *PpGRAS1* und *PpGRAS2*. In *Arabidopsis thaliana* wird die miR171 von drei Genen, *AthMIR171a*, *AthMIR171b* und *AthMIR171c*, codiert und reguliert die Expression der GRAS-Transkriptionsfaktoren *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* und *AthSCL6-IV*. Die miR171-Genregulation ist in Landpflanzen konserviert jedoch ist die biologische Bedeutung der Konservierung unbekannt. Um diese aufzuklären wurden *P. patens* und *A. thaliana* untersucht. Hierbei wurde erstmals die räumliche Expression von *PpMIR171a*, *PpMIR171b* und *PpGRAS2* mittels Reportergenen aufgeklärt. Zudem wurden funktionelle Analysen der *PpMIR171*-Gene und von *PpGRAS1* mittels Transkriptomanalysen, Gen-Überexpressionen und -Knockouts durchgeführt. Es zeigte sich eine *PpMIR171*-Expression in allen zellteilungsaktiven Geweben. *PpGRAS2* hingegen wird in spezifischen Geweben des Gameto- und Sporophyten exprimiert. Die miR171 bestimmt nur in Antheridien das räumliche Expressionsmuster von *PpGRAS2*. Die Entwicklung von *P. patens* wird durch eine Deletion von *PpGRAS1* oder Blockierung der miR171-Regulation von *PpGRAS1* bzw. *PpGRAS2* nicht beeinflusst. Eine starke, ektopische Überexpression von *PpMIR171a* oder *PpMIR171b* verhindert jedoch eine Selbstbefruchtung und deutet auf eine Funktion der *P. patens* GRAS-Gene in der Bildung von Spermatozoiden hin. Eine induzierte Überexpression von *PpGRAS1* bewirkte im Protonema reversibel einen Entwicklungsstopp mit Braunfärbung sowie in Gametophoren ein verbreitetes Cauloid. Die Fusion einer Transkriptionsrepressordomäne an *PpGRAS1* (*PpGRAS1-DR*) bewirkte jedoch einen Zellteilungsstopp ohne Braunfärbung im Protonema und in Gametophoren ein Wachstumsstillstand. Transkriptomanalysen zeigten, dass *PpGRAS1* die Transkriptmengen von Genen der Chlorophyllbiosynthese sowie der Photosyntheseapparate indirekt reduziert, was für *PpGRAS1-DR* nicht der Fall ist. Auf molekularer Ebene wird für *PpGRAS1* eine Funktion als aktivierender Transkriptionsfaktor postuliert. Makroskopisch wird auf eine Rolle in der Regulation der Photosynthese und von Stammzellen geschlossen. In *A. thaliana* besitzen die miR171-Zielgene redundante Funktionen in der Meristemregulation und der Trichombildung. Eine in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse zeigte zudem, dass *AthSCL6-III* nicht wie *AthSCL6-II* die Transkription des Protochlorophyllid-Reduktasegens *Ath-PORC* inhibiert, sondern die Transkriptmengen plastidär-codierter Gene der Photosysteme I und II reduziert. Zudem könnte *AthSCL6-III* Gene beeinflussen, die an der Aktivität und Aufrechterhaltung von Meristemen und der Einleitung der reproduktiven Wachstumsphase beteiligt sind. Es wird postuliert, dass *AthSCL6-III* auch die Transkription mehrerer SPL-Transkriptionsfaktoren reguliert und so in einem Zusammenspiel aus miR156- und miR171-Genregulation die Blattmorphologie oder die Trichomverteilung bestimmt. Der miR171-Regulationsweg spielt somit in *P. patens* und *A. thaliana* auf unterschiedliche Art und Weise eine Rolle sowohl in der Photosynthese als auch der Meristemregulation.

6 Abstract

The small regulatory RNA miR171 post-transcriptionally inhibits the expression of GRAS-domain transcription factors. The moss *Physcomitrella patens* encodes two *MIR171*-genes, *PpMIR171a* and *PpMIR171b*. The *P. patens* miR171 regulates the expression of the GRAS transcription factors *PpGRAS1* and *PpGRAS2*. The flowering plant *Arabidopsis thaliana* encodes three *MIR171*-genes, *AthMIR171a*, *AthMIR171b* and *AthMIR171c*. Here, miR171 regulates the expression of GRAS-domain transcription factors *AthSCL6-II*, *AthSCL6-III* and *AthSCL6-IV*. The miR171 gene regulation circuit is conserved in land plants but the conserved biological function responsible for this conservation is unknown. To elucidate the reason for this conservation the focus was on *P. patens* and *A. thaliana*. In this work, the expression domains of *PpMIR171a*, *PpMIR171b* and *PpGRAS2* were investigated using reporter genes. Functional analysis of *PpMIR171*-genes and *PpGRAS1* were performed, including transcriptomics, targeted gene knockout and gene overexpression studies. The result revealed that *PpMIR171a* is specifically expressed in all *P. patens* meristematic tissues. The *PpGRAS2* is expressed in the apex and rhizoids of the gametophyte and in the seta of the sporophyte but is only spatially restricted by the miR171 in antheridia. Neither *PpGRAS1* knockout plants nor plants in which miR171-regulation of *PpGRAS1* or *PpGRAS2* was abolished show any phenotypical abnormalities. However, a strong and ectopic overexpression of *PpMIR171a* or *PpMIR171b* prevents self-fertilization and suggests that *P. patens* GRAS genes may function in the formation of spermatozoids. The induced overexpression of *PpGRAS1* caused brown colouring and developmental arrest at the protonema stage and a widened cauloid if induced in gametophores. These abnormalities are rescued by removing the inducer. The fusion of a transcriptional repressor domain to *PpGRAS1* (*PpGRAS1-DR*) caused an arrest in cell division in the protonema without any browning while in gametophores the growth of the cauloid stopped completely. A transcriptome analysis showed that *PpGRAS1* but not *PpGRAS1-DR* reduced the transcript number of genes involved in chlorophyll biosynthesis and photosystem I and II. On the molecular level, *PpGRAS1* is proposed to be an activating transcription factor. On the macroscopic level, it appears to have a function in stem cell regulation and photosynthesis. In *A. thaliana*, the target genes of miR171, like *AthSCL6-II* and *AthSCL6-III*, have redundant functions in the regulation of meristems and formation of trichomes. Transcriptome analysis showed that *AthSCL6-III* reduces the transcription of plastid-encoded genes of photosystem I and II. But unlike *AthSCL6-II* it was shown not to inhibit transcription of the protochlorophyllid reductase gene *AthPORC*. Additionally, *AthSCL6-III* may influence several genes involved in the regulation of meristem activity and maintenance and in the shift to reproductive growth. It is further postulated that *AthSCL6-III* is involved in regulating several SPL-transcription factors, thus taking part in the interaction of miR156- and miR171-regulation circuits (involved in leaf morphology or trichome distribution). In conclusion, the miR171-regulatory circuit plays different roles in *P. patens* and *A. thaliana* meristem regulation and photosynthesis.

7 Literaturverzeichnis

- Addo-Quaye C, Snyder JA, Park YB, *et al.* (2009). Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. *Rna* 15(12): 2112-2121. doi 10.1261/rna.1774909
- Adhikari ND, Froehlich JE, Strand DD, *et al.* (2011). GUN4-porphyrin complexes bind the ChH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23(4): 1449-1467. doi 10.1105/tpc.110.082503
- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, *et al.* (2012). Plant stem cell niches. *Annual review of plant biology* 63: 615-636. doi 10.1146/annurev-arplant-042811-105555
- Aoyama T and Chua NH (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 11(3): 605-612
- Aoyama T, Hiwatashi Y, Shigyo M, *et al.* (2012). AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 139(17): 3120-3129. doi 10.1242/dev.076091
- Arif MA, Fattash I, Khraiweh B, *et al.* (2011). *Physcomitrella patens* Small RNA Pathways. 139-173. doi 10.1007/978-3-642-19454-2_10
- Arif MA, Frank W and Khraiweh B (2013). Role of RNA Interference (RNAi) in the Moss *Physcomitrella patens*. *International journal of molecular sciences* 14(1): 1516-1540. doi 10.3390/ijms14011516
- Axtell MJ and Bartel DP (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant cell* 17(6): 1658-1673. doi 10.1105/tpc.105.032185
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, *et al.* (2006). A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127(3): 565-577. doi 10.1016/j.cell.2006.09.032
- Axtell MJ, Snyder JA and Bartel DP (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *The Plant cell* 19(6): 1750-1769. doi 10.1105/tpc.107.051706
- Bari A, Orazova S and Ivashchenko A (2013). miR156- and miR171-binding sites in the protein-coding sequences of several plant genes. *BioMed research international* 2013: 307145. doi 10.1155/2013/307145
- Baumberger N and Baulcombe DC (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(33): 11928-11933. doi 10.1073/pnas.0505461102
- Bolle C (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218(5): 683-692. doi 10.1007/s00425-004-1203-z
- Chen X (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual review of cell and developmental biology* 25: 21-44. doi 10.1146/annurev.cellbio.042308.113417
- Chen X, Zhang Z, Liu D, *et al.* (2010). SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. *Journal of integrative plant biology* 52(11): 946-951. doi 10.1111/j.1744-7909.2010.00987.x
- Cho SH, Coruh C and Axtell MJ (2012). miR156 and miR390 regulate tasiRNA accumulation and developmental timing in *Physcomitrella patens*. *The Plant cell* 24(12): 4837-4849. doi 10.1105/tpc.112.103176
- Chuck G, Candela H and Hake S (2009). Big impacts by small RNAs in plant development. *Current opinion in plant biology* 12(1): 81-86. doi 10.1016/j.pbi.2008.09.008
- Clough SJ and Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16(6): 735-743
- Couvreur TL, Franzke A, Al-Shehbaz IA, *et al.* (2010). Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). *Molecular biology and evolution* 27(1): 55-71. doi 10.1093/molbev/msp202
- Eamens AL, Smith NA, Curtin SJ, *et al.* (2009). The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *Rna* 15(12): 2219-2235. doi 10.1261/rna.1646909

- Egener T, Granado J, Guitton MC, *et al.* (2002). High frequency of phenotypic deviations in *Physcomitrella patens* plants transformed with a gene-disruption library. *BMC plant biology* 2: 6
- Engstrom EM (2011). Phylogenetic analysis of GRAS proteins from moss, lycophyte and vascular plant lineages reveals that GRAS genes arose and underwent substantial diversification in the ancestral lineage common to bryophytes and vascular plants. *Plant signaling & behavior* 6(6): 850-854
- Engstrom EM, Andersen CM, Gumulak-Smith J, *et al.* (2011). Arabidopsis homologs of the petunia hairy meristem gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy. *Plant physiology* 155(2): 735-750. doi 10.1104/pp.110.168757
- Fattash I, Voss B, Reski R, *et al.* (2007). Evidence for the rapid expansion of microRNA-mediated regulation in early land plant evolution. *BMC plant biology* 7: 13. doi 10.1186/1471-2229-7-13
- Floyd SK and Bowman JL (2007). The ancestral developmental tool kit of land plants. *Int J Plant Sci* 168(1): 1-35. doi 10.1086/509079
- Frank F, Hauver J, Sonenberg N, *et al.* (2012). Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *The EMBO journal* 31(17): 3588-3595. doi 10.1038/emboj.2012.204
- Gallagher KL and Benfey PN (2009). Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 57(5): 785-797. doi 10.1111/j.1365-313X.2008.03735.x
- Gomez-Mena C and Sablowski R (2008). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN GENE1 establishes the basal boundaries of shoot organs and controls stem growth. *The Plant cell* 20(8): 2059-2072. doi 10.1105/tpc.108.059188
- Graham LE, Cook ME and Busse JS (2000). The origin of plants: body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9): 4535-4540
- Han MH, Goud S, Song L, *et al.* (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(4): 1093-1098. doi 10.1073/pnas.0307969100
- Harrison CJ, Roeder AH, Meyerowitz EM, *et al.* (2009). Local cues and asymmetric cell divisions underpin body plan transitions in the moss *Physcomitrella patens*. *Current biology : CB* 19(6): 461-471. doi 10.1016/j.cub.2009.02.050
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, *et al.* (2006). A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. *Plant methods* 2: 19. doi 10.1186/1746-4811-2-19
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, *et al.* (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34(5): 733-739
- Horstmann V, Huether CM, Jost W, *et al.* (2004). Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC biotechnology* 4: 13. doi 10.1186/1472-6750-4-13
- Huang Y, Ji L, Huang Q, *et al.* (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* 461(7265): 823-827. doi 10.1038/nature08433
- Huijser P and Schmid M (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138(19): 4117-4129. doi 10.1242/dev.063511
- Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, *et al.* (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular cell* 39(2): 282-291. doi 10.1016/j.molcel.2010.05.014
- Iwakawa HO and Tomari Y (2013). Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Molecular cell* 52(4): 591-601. doi 10.1016/j.molcel.2013.10.033
- Iwata Y, Takahashi M, Fedoroff NV, *et al.* (2013). Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing. *Nucleic acids research* 41(19): 9129-9140. doi 10.1093/nar/gkt667

- Johanningmeier U and Howell SH (1984). Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein mRNA accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Possible involvement of chlorophyll synthesis precursors. *The Journal of biological chemistry* 259(21): 13541-13549
- Jones-Rhoades MW (2012). Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant molecular biology* 80(1): 3-16. doi 10.1007/s11103-011-9829-2
- Jung JH, Ju Y, Seo PJ, *et al.* (2012). The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 69(4): 577-588. doi 10.1111/j.1365-313X.2011.04813.x
- Kalve S, De Vos D and Beemster GT (2014). Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in plant science* 5: 362. doi 10.3389/fpls.2014.00362
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, *et al.* (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA unctio. *Developmental cell* 4(2): 205-217
- Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, *et al.* (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140(1): 111-122. doi 10.1016/j.cell.2009.12.023
- Kim S, Yang JY, Xu J, *et al.* (2008). Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs. *Plant & cell physiology* 49(11): 1634-1644. doi 10.1093/pcp/pcn146
- Kim YJ, Zheng B, Yu Y, *et al.* (2011). The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal* 30(5): 814-822. doi 10.1038/emboj.2011.3
- Kofuji R and Hasebe M (2014). Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Current opinion in plant biology* 17: 13-21. doi 10.1016/j.pbi.2013.10.007
- Kubo M, Imai A, Nishiyama T, *et al.* (2013). System for stable beta-estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella patens*. *PloS one* 8(9): e77356. doi 10.1371/journal.pone.0077356
- Kurihara Y and Watanabe Y (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(34): 12753-12758. doi 10.1073/pnas.0403115101
- Lal S, Pacis LB and Smith HM (2011). Regulation of the SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE genes/microRNA156 module by the homeodomain proteins PENNYWISE and POUND-FOOLISH in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 4(6): 1123-1132. doi 10.1093/mp/ssr041
- Latchman DS (2001). Transcription factors: bound to activate or repress. *Trends in biochemical sciences* 26(4): 211-213
- Lee MH, Kim B, Song SK, *et al.* (2008). Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* 67(6): 659-670. doi 10.1007/s11103-008-9345-1
- Li J, Yang Z, Yu B, *et al.* (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Current biology : CB* 15(16): 1501-1507. doi 10.1016/j.cub.2005.07.029
- Liu Q, Wang F and Axtell MJ (2014). Analysis of Complementarity Requirements for Plant MicroRNA Targeting Using a *Nicotiana benthamiana* Quantitative Transient Assay. *The Plant cell* 26(2): 741-753. doi 10.1105/tpc.113.120972
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, *et al.* (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297(5589): 2053-2056. doi 10.1126/science.1076311
- Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, *et al.* (2006). SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO reports* 7(10): 1052-1058. doi 10.1038/sj.embor.7400806
- Ma Z, Hu X, Cai W, *et al.* (2014). *Arabidopsis* miR171-targeted scarecrow-like proteins bind to GT cis-elements and mediate gibberellin-regulated chlorophyll biosynthesis under light conditions. *PLoS genetics* 10(8): e1004519. doi 10.1371/journal.pgen.1004519
- Manavella PA, Koenig D, Rubio-Somoza I, *et al.* (2013). Tissue-specific silencing of *Arabidopsis* SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 by miR171a. *Plant physiology* 161(2): 805-812. doi 10.1104/pp.112.207068
- Megraw M, Baev V, Rusinov V, *et al.* (2006). MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *Rna* 12(9): 1612-1619. doi 10.1261/rna.130506
- Menand B, Calder G and Dolan L (2007). Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of experimental botany* 58(7): 1843-1849. doi 10.1093/jxb/erm047

- Meng L, Buchanan BB, Feldman LJ, *et al.* (2012). CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth and lateral root development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(5): 1760-1765. doi 10.1073/pnas.1119864109
- Meng L and Feldman LJ (2010). CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of Arabidopsis. *Planta* 232(5): 1061-1074. doi 10.1007/s00425-010-1236-4
- Meng L and Feldman LJ (2011). CLE genes may act in a variety of tissues/cells and involve other signaling cascades in addition to CLV3-WUS-like pathways. *Plant signaling & behavior* 6(1): 105-108
- Mi S, Cai T, Hu Y, *et al.* (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133(1): 116-127. doi 10.1016/j.cell.2008.02.034
- Michal G (ed) (1999) *Biochemical pathways*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- Miyashima S, Honda M, Hashimoto K, *et al.* (2013). A comprehensive expression analysis of the Arabidopsis MICRORNA165/6 gene family during embryogenesis reveals a conserved role in meristem specification and a non-cell-autonomous function. *Plant & cell physiology* 54(3): 375-384. doi 10.1093/pcp/pcs188
- Mudunkothge JS and Krizek BA (2012). Three Arabidopsis AIL/PLT genes act in combination to regulate shoot apical meristem function. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 71(1): 108-121. doi 10.1111/j.1365-313X.2012.04975.x
- Muller D, Schmitz G and Theres K (2006). Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in Arabidopsis. *The Plant cell* 18(3): 586-597. doi 10.1105/tpc.105.038745
- Muren E, Nilsson A, Ulfstedt M, *et al.* (2009). Rescue and characterization of episomally replicating DNA from the moss *Physcomitrella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(46): 19444-19449. doi 10.1073/pnas.0908037106
- Nag A, King S and Jack T (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(52): 22534-22539. doi 10.1073/pnas.0908718106
- Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, *et al.* (2007). Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic acids research* 35(8): e60. doi 10.1093/nar/gkm112
- Pall GS and Hamilton AJ (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature protocols* 3(6): 1077-1084. doi 10.1038/nprot.2008.67
- Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, *et al.* (2004). In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes & development* 18(18): 2237-2242. doi 10.1101/gad.307804
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, *et al.* (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(10): 3691-3696. doi 10.1073/pnas.0405570102
- Park W, Li J, Song R, *et al.* (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current biology : CB* 12(17): 1484-1495
- Pires ND and Dolan L (2012). Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367(1588): 508-518. doi 10.1098/rstb.2011.0252
- Poulsen C, Vaucheret H and Brodersen P (2013). Lessons on RNA silencing mechanisms in plants from eukaryotic argonaute structures. *The Plant cell* 25(1): 22-37. doi 10.1105/tpc.112.105643
- Prasad K, Grigg SP, Barkoulas M, *et al.* (2011). Arabidopsis PLETHORA transcription factors control phyllotaxis. *Current biology : CB* 21(13): 1123-1128. doi 10.1016/j.cub.2011.05.009
- Prigge MJ and Bezanilla M (2010). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137(21): 3535-3543. doi 10.1242/dev.049023
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, *et al.* (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18(1): 111-119
- Ramachandran V and Chen X (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 321(5895): 1490-1492. doi 10.1126/science.1163728

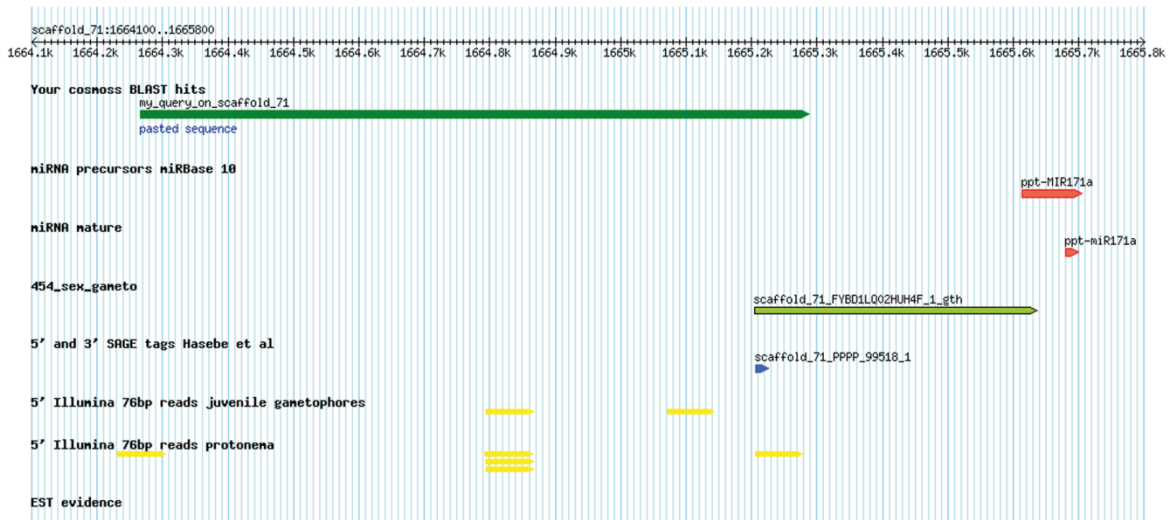
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, *et al.* (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development* 16(13): 1616-1626. doi 10.1101/gad.1004402
- Ren G, Xie M, Dou Y, *et al.* (2012). Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(31): 12817-12821. doi 10.1073/pnas.1204915109
- Richards DE, Peng J and Harberd NP (2000). Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22(6): 573-577. doi 10.1002/(SICI)1521-1878(200006)22:6<573::AID-BIES10>3.0.CO;2-H
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1): 139-140. doi 10.1093/bioinformatics/btp616
- Robinson MD and Smyth GK (2008). Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9(2): 321-332. doi 10.1093/biostatistics/kxm030
- Rogers K and Chen X (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* 25(7): 2383-2399. doi 10.1105/tpc.113.113159
- Saidi Y, Finka A, Chakhporanian M, *et al.* (2005). Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant molecular biology* 59(5): 697-711. doi 10.1007/s11103-005-0889-z
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, *et al.* (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446(7137): 811-814. doi 10.1038/nature05703
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, *et al.* (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in plant science* 7(11): 487-491
- Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, *et al.* (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130(24): 6001-6012. doi 10.1242/dev.00842
- Schulze S, Schafer BN, Parizotto EA, *et al.* (2010). LOST MERISTEMS genes regulate cell differentiation of central zone descendants in *Arabidopsis* shoot meristems. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 64(4): 668-678. doi 10.1111/j.1365-313X.2010.04359.x
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, *et al.* (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 67(1-2): 183-195. doi 10.1007/s11103-008-9310-z
- Seumel GI (2008) MikroRNAs und ihre Zielgene: Untersuchungen zu miR160 und miR534 in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität
- Shikata M, Koyama T, Mitsuda N, *et al.* (2009). *Arabidopsis* SBP-box genes SPL10, SPL11 and SPL2 control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. *Plant & cell physiology* 50(12): 2133-2145. doi 10.1093/pcp/pcp148
- Song L, Axtell MJ and Fedoroff NV (2010). RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Current biology : CB* 20(1): 37-41. doi 10.1016/j.cub.2009.10.076
- Souret FF, Kastenmayer JP and Green PJ (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular cell* 15(2): 173-183. doi 10.1016/j.molcel.2004.06.006
- Strabala TJ, O'Donnell P J, Smit AM, *et al.* (2006). Gain-of-function phenotypes of many CLAVATA3/ESR genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. *Plant physiology* 140(4): 1331-1344. doi 10.1104/pp.105.075515
- Strotbek C (2010) Genregulation durch miRNAs in *Physcomitrella patens*: Analyse der miR171 und miR904. Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität
- Strotbek C, Krinninger S and Frank W (2013). The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *The International journal of developmental biology* 57(6-8): 553-564. doi 10.1387/ijdb.130189wf
- Stuurman J, Jaggi F and Kuhlemeier C (2002). Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & development* 16(17): 2213-2218. doi 10.1101/gad.230702
- Sun X, Xue B, Jones WT, *et al.* (2011). A functionally required unfoldome from the plant kingdom: intrinsically disordered N-terminal domains of GRAS proteins are involved in molecular

- recognition during plant development. *Plant molecular biology* 77(3): 205-223. doi 10.1007/s11103-011-9803-z
- Sunkar R and Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant cell* 16(8): 2001-2019. doi 10.1105/tpc.104.022830
- Tanaka R, Rothbart M, Oka S, *et al.* (2010). LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(38): 16721-16725. doi 10.1073/pnas.1004699107
- Taylor RS, Tarver JE, Hiscock SJ, *et al.* (2014). Evolutionary history of plant microRNAs. *Trends in plant science* 19(3): 175-182. doi 10.1016/j.tplants.2013.11.008
- Tedder P, Zubko E, Westhead DR, *et al.* (2009). Small RNA analysis in *Petunia hybrida* identifies unusual tissue-specific expression patterns of conserved miRNAs and of a 24mer RNA. *Rna* 15(6): 1012-1020. doi 10.1261/rna.1517209
- Telfer A, Bollman KM and Poethig RS (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124(3): 645-654
- Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, *et al.* (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* 6(7): e1001031. doi 10.1371/journal.pgen.1001031
- Turchi L, Carabelli M, Ruzza V, *et al.* (2013). *Arabidopsis* HD-Zip II transcription factors control apical embryo development and meristem function. *Development* 140(10): 2118-2129. doi 10.1242/dev.092833
- Ung N, Lal S and Smith HM (2011). The role of PENNYWISE and POUND-FOOLISH in the maintenance of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 156(2): 605-614. doi 10.1104/pp.110.171462
- Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, *et al.* (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development* 18(10): 1187-1197. doi 10.1101/gad.1201404
- Vazquez F, Gascioli V, Crete P, *et al.* (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current biology* : CB 14(4): 346-351. doi 10.1016/j.cub.2004.01.035
- Voinnet O (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136(4): 669-687. doi 10.1016/j.cell.2009.01.046
- von Stackelberg M, Rensing SA and Reski R (2006). Identification of genic moss SSR markers and a comparative analysis of twenty-four algal and plant gene indices reveal species-specific rather than group-specific characteristics of microsatellites. *BMC plant biology* 6: 9. doi 10.1186/1471-2229-6-9
- Wang H, Zhang Z, Li H, *et al.* (2013a). CONSTANS-LIKE 7 regulates branching and shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 64(4): 1017-1024. doi 10.1093/jxb/ers376
- Wang JW (2014). Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *Journal of experimental botany* 65(17): 4723-4730. doi 10.1093/jxb/eru246
- Wang JW, Czech B and Weigel D (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138(4): 738-749. doi 10.1016/j.cell.2009.06.014
- Wang L, Mai YX, Zhang YC, *et al.* (2010). MicroRNA171c-targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV genes regulate shoot branching in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 3(5): 794-806. doi 10.1093/mp/ssq042
- Wang L, Song X, Gu L, *et al.* (2013b). NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 25(2): 715-727. doi 10.1105/tpc.112.105882
- Williams L, Grigg SP, Xie M, *et al.* (2005). Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* 132(16): 3657-3668. doi 10.1242/dev.01942
- Wu G, Park MY, Conway SR, *et al.* (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138(4): 750-759. doi 10.1016/j.cell.2009.06.031

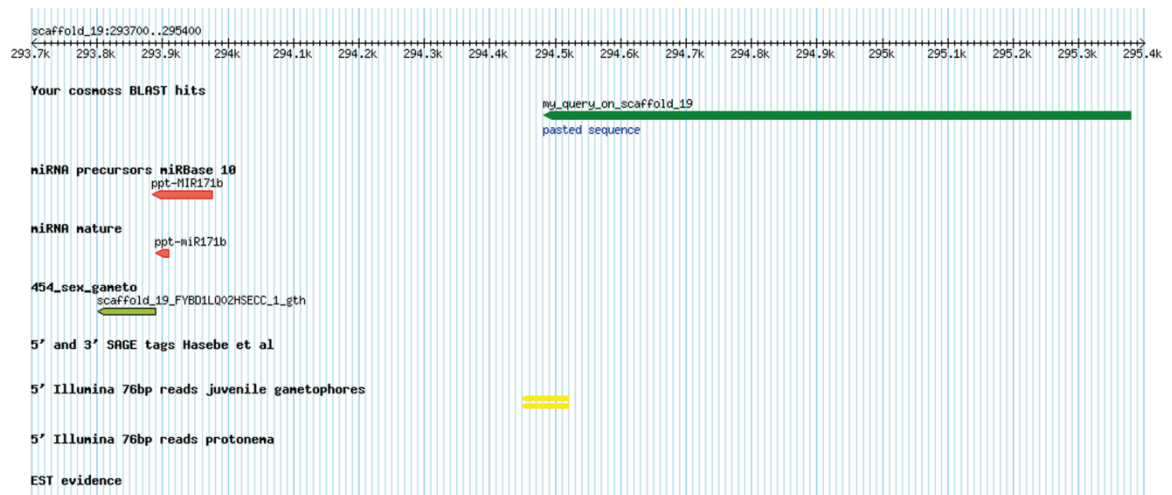
- Wu G and Poethig RS (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133(18): 3539-3547. doi 10.1242/dev.02521
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, *et al.* (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant physiology* 138(4): 2145-2154. doi 10.1104/pp.105.062943
- Xue XY, Zhao B, Chao LM, *et al.* (2014). Interaction between two timing microRNAs controls trichome distribution in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 10(4): e1004266. doi 10.1371/journal.pgen.1004266
- Yang L, Liu Z, Lu F, *et al.* (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47(6): 841-850. doi 10.1111/j.1365-313X.2006.02835.x
- Yoo SK, Chung KS, Kim J, *et al.* (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 139(2): 770-778. doi 10.1104/pp.105.066928
- Yu N, Cai WJ, Wang S, *et al.* (2010). Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 22(7): 2322-2335. doi 10.1105/tpc.109.072579
- Zhai J and Meyers BC (2012). Deep sequencing from hen1 mutants to identify small RNA 3' modifications. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 77: 213-219. doi 10.1101/sqb.2013.77.014779
- Zhang B, Pan X, Cannon CH, *et al.* (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46(2): 243-259. doi 10.1111/j.1365-313X.2006.02697.x
- Zhang H, Zhao X, Li J, *et al.* (2014). MicroRNA408 Is Critical for the HY5-SPL7 Gene Network That Mediates the Coordinated Response to Light and Copper. *The Plant cell* 26(12): 4933-4953. doi 10.1105/tpc.114.127340
- Zhou X, Ruan J, Wang G, *et al.* (2007). Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS computational biology* 3(3): e37. doi 10.1371/journal.pcbi.0030037
- Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, *et al.* (2014). Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature*. doi 10.1038/nature13853
- Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, *et al.* (2015). Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature* 517(7534): 377-380. doi 10.1038/nature13853
- Zhu H, Zhou Y, Castillo-Gonzalez C, *et al.* (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like1. *Nature structural & molecular biology* 20(9): 1106-1115. doi 10.1038/nsmb.2646
- Zimmer AD, Lang D, Buchta K, *et al.* (2013). Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC genomics* 14: 498. doi 10.1186/1471-2164-14-498

8 Anhang

A

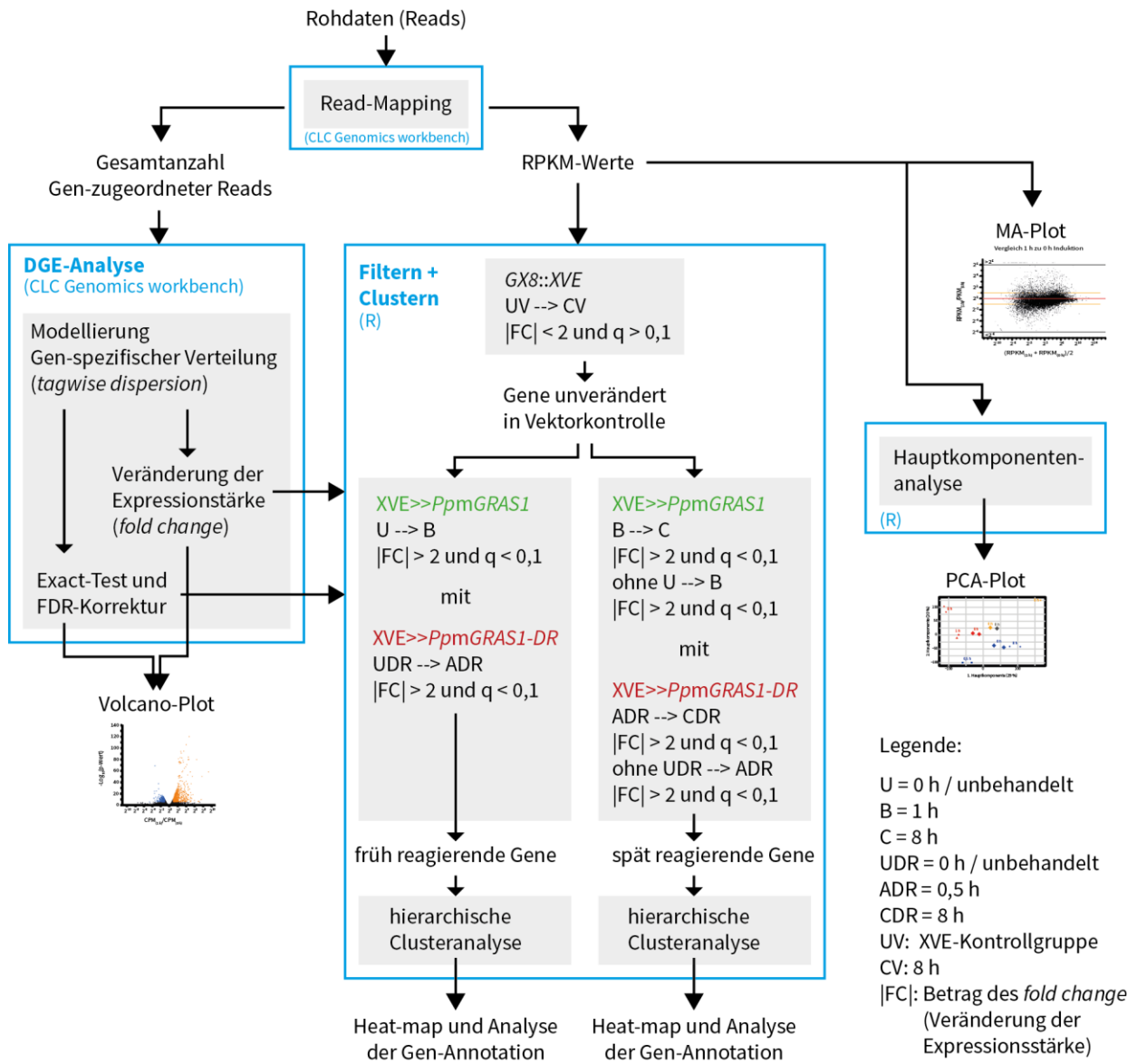


B

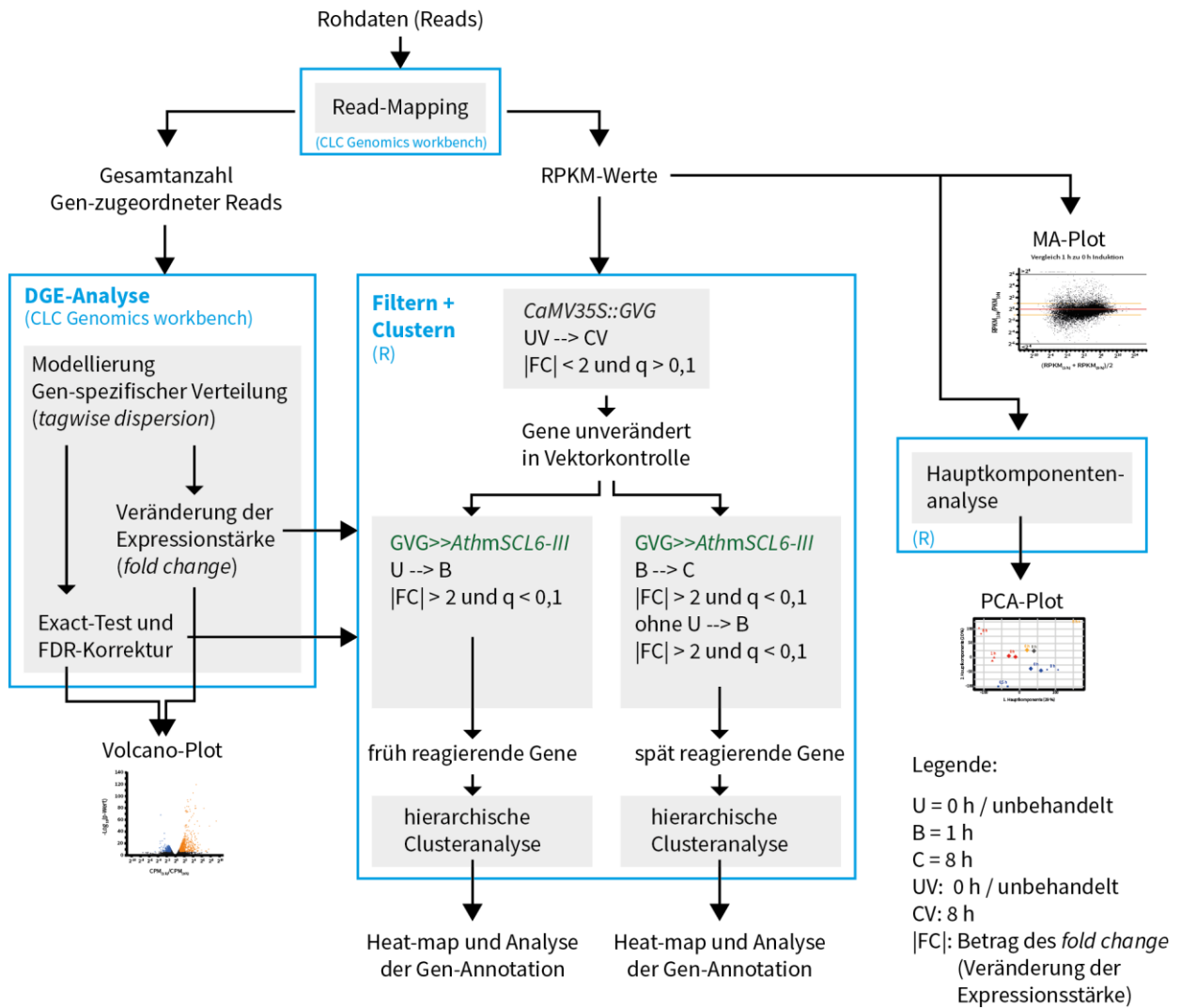
Anhang Abb. 1: Promotorenbereiche der *PpMIR171*-Gene im *P. patens* Genome Browser Version 1.2

Gelb: 5'-Prime Illumina Reads, Hellgrün: *expressed sequence tags* (ESTs), Rot: pre-miRNA (oben) und reife miRNA (unten), Dunkelgrün: klonierte Promotorbereiche.

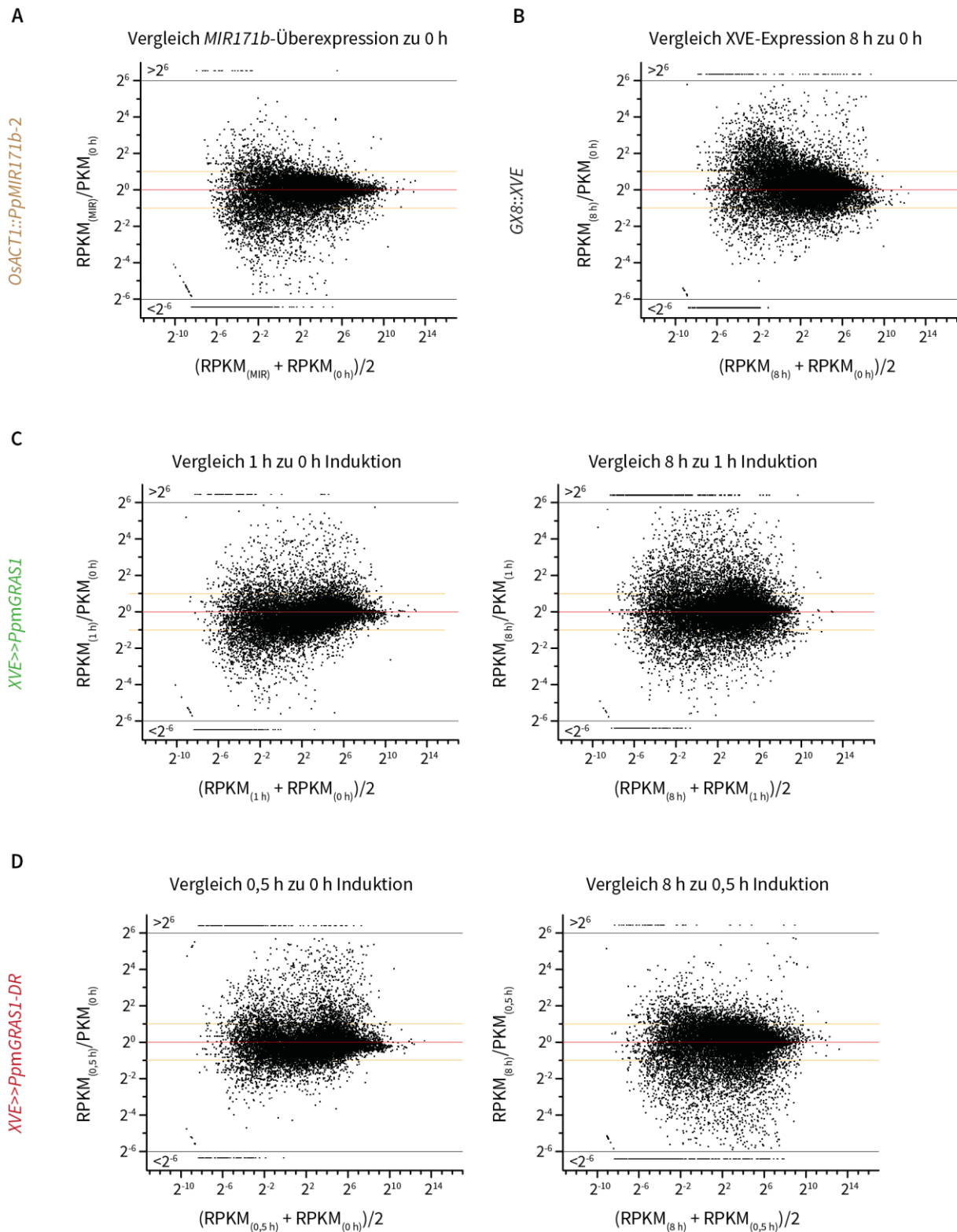
A) Genomischer Locus von *PpMIR171a*. **B)** Genomischer Locus von *PpMIR171b*.



Anhang Abb. 2: Schematischer Ablauf der Transkriptomdatenauswertung für *P. patens*



Anhang Abb. 3: Schematischer Ablauf der Transkriptomdatenauswertung für *A. thaliana*



Anhang Abb. 4: Vergleichende Expressionsanalyse der *P. patens* Transkriptomdaten im MA-Plot

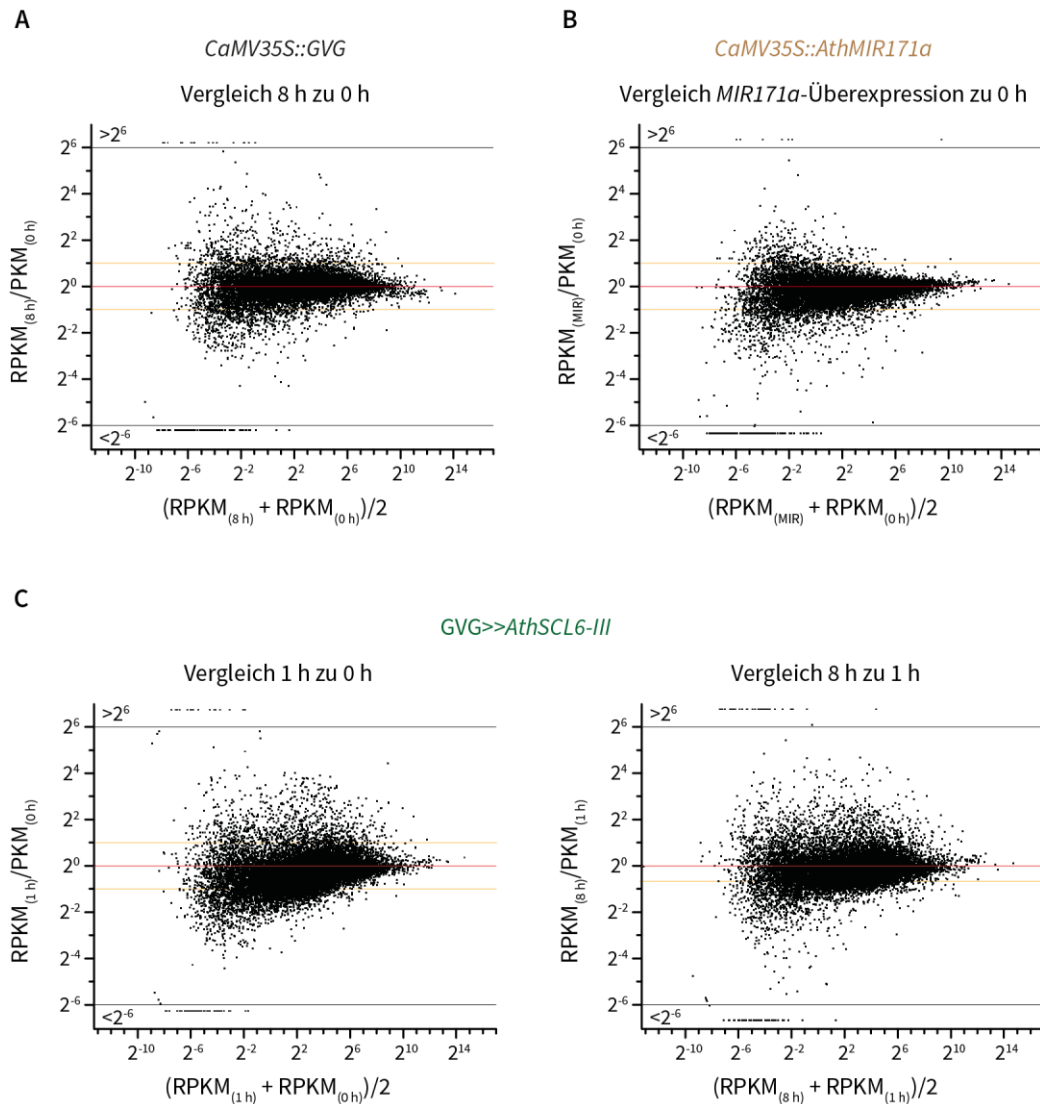
Die Veränderung der Expressionsstärke aufgetragen gegen die durchschnittliche Expressionsstärke jeweils anhand der normalisierter RPKM-Werte (MA-Plot). Die horizontale rote Linie markiert keine Veränderung, die orangefarbenen Linien eine 2-fache Veränderung. Veränderungen größer als 2^6 bzw. kleiner als 2^{-6} sind zusammengefasst dargestellt (siehe Fortsetzung).

Anhang Abb. 4: Vergleichende Expressionsanalyse der *P. patens* Transkriptomdaten im MA-Plot (Fortsetzung)

A) Die Genexpression der *PpMIR171b-2*-Überexpressionslinie (links) und der 8 h induzierten Vektorkontrolle *GX8::XVE* (rechts) jeweils im Vergleich zur Genexpression der 0 h-Kontrollgruppe bestehend aus zusammengefassten Daten der uninduzierten *XVE>>PpmGRAS1*-Gruppe und der unbehandelten Vektorkontrolle *GX8::XVE*.

B) Genexpression der *XVE>>PpmGRAS1*-Linien nach 1 h β -Estradiol-Induktion (links) und nach weiteren 7 h β -Estradiol-Induktion (rechts).

C) Genexpression der *XVE>>PpmGRAS1-DR*-Linien nach 0,5 h β -Estradiol-Induktion (links) und nach weiteren 7,5 h β -Estradiol-Induktion (rechts).



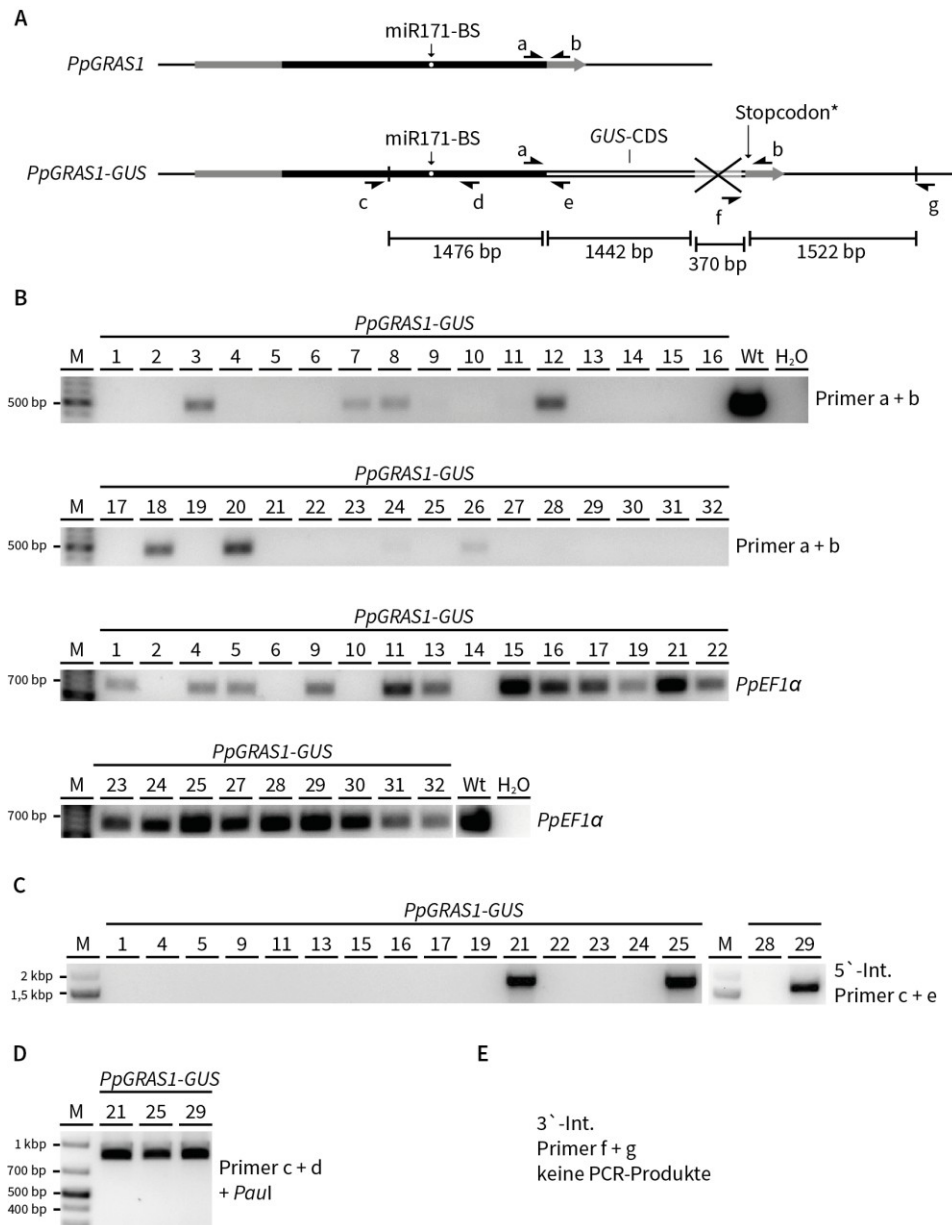
Anhang Abb. 5: Vergleichende Expressionsanalyse der *A. thaliana* Transkriptomdaten im MA-Plot

Die Veränderung der Transkriptmengen aufgetragen gegen die durchschnittliche Transkriptmenge jeweils anhand der normalisierter RPKM-Werte (MA-Plot). Die horizontale rote Linie markiert keine Veränderung, die orangefarbenen Linien eine 2-fache Veränderung. Veränderungen größer als 2^6 bzw. kleiner als 2^{-6} sind zusammengefasst dargestellt.

A) Vergleich der Genexpression in der 8 h DEX-behandelten *CaMV35S::GVG*-Linie zur *GVG*-Kontrollgruppe bestehend aus der unbehandelten *GVG*-Vektorkontrolle und den unbehandelten *AthmSCL6-III*-Linien.

B) Vergleich der Genexpression der *CaMV35S::AthMIR171a*-Linie zur *GVG*-Kontrollgruppe.

C) Links: Vergleich der Genexpression in *GVG>>AthSCL6-III*-Linien nach 1 h DEX-Induktion (1 h) zur Genexpression der unbehandelten *GVG>>AthSCL6-III*-Linien (0 h). Rechts: Vergleich der Genexpression in *GVG>>AthSCL6-III*-Linien nach 8 h DEX-Induktion (8 h) zur Genexpression in *GVG>>AthSCL6-III*-Linien nach 1 h DEX-Induktion (1 h).



Anhang Abb. 6: Identifizierung transgener *PpGRAS1-GUS*-Fusionslinien

A) Übersicht über die genomischen Loci von *PpGRAS1* (Wt) und *PpGRAS1-GUS*. Angegeben sind die Größen der *GUS*-CDS mit fehlendem Fragment und der flankierenden homologen Regionen, über die die *GUS*-CDS anstelle des *PpGRAS1*-Stopcodons eingeführt wurde. (*)Stopcodon des neuen OLR. a–g: Primerpositionen zur Identifizierung von *PpGRAS1-GUS*-Linien. Schwarz: CDS; Grau: 5'UTR und 3'UTR.

B) PCR von gDNA mit den Primern a + b (#1358 und #A3), die die *GUS*-Integrationsstelle am 3'-Ende der *PpGRAS1*-CDS umfassen.

C) Nachweis der 5'-Integration (5'-Int.) des *GUS*-Fusionskonstruktes in *PpGRAS1* per PCR von gDNA mit den Primern c + e (#1750 und #A17).

D) Nachweis der unveränderten ppt-miR171-Bindestelle in *PpGRAS1-GUS* durch *Paul*-Kontrollverdau von PCR-Produkten mit den Primern c + d (#1750 und #A5).

E) Der Nachweis der 3'-Integration (3'-Int. des *GUS*-Fusionskonstruktes in *PpGRAS1* per PCR von gDNA mit den Primern f + g (#A16 und #A18) ergab keine PCR-Produkte.

M: DNA-Größenmarker.

Anhang Tab. 1: Primer und Oligonukleotide

# Nummer	Primername	Sequenz in 5' --> 3'
A3	Ph14-3`UTR-rev	AGAGAGCGTCATTTTATAGCTTAGCC
A4	Ph18-before-GUS	TGCGATCTGAAGTCGCTGAA
A5	Ph14-171site-rev	TGTCAACCTAACCGTGGGAACCGCCTTT
A8	18SrRNA-U1	GTACTGTGAAACTGCGAATGGCT
A9	18SrRNA-L1	AGCTGATGACTCGCGCTTACTAGG
A10	aph4-CDS-int-rev	TGTTGGCGACCTCGTATTGG
A11	aph4-CDS-int-for	GAGTTCAGCGAGAGCCTGACC
A16	GUS-forward-high-Ta	GAAGTCGGCGGCTTTTCTGCT
A17	GUS-rev-high-Ta	CCCACAGGCCGTCGAGTTTTT
A18	Ph14-3int-revN1	ACACATGTGATATATGAAAGCCAAGT
A20	Ph14-3int-forN	TGCCCCACTCCCTCACTCAT
B52	PpEF1a_f	AGCGTGGTATCACAATTGAC
B53	PpEF1a_r	GATCGCTCGATCATGTTATC
M13	M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13	M13-reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
1	pptmiR171a-probe	ATGTGATATTGGCGGGCTCA
514	pJET1 Forward	GCCTGAACACCATATCCATCC
515	pJET1 Reverse	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC
1024	Saidi-GUS_84vorProm-f	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAG
1334	Ph143602-5RACE.2	CTGGCTGTGCAAACAGCATATTGTCTG
1349	Ph143602_RT_for5	GGGTTTGAAGCAAGGACAGGAGAGAGG
1358	Ph143602_N3`RACE	CCAGCAGCGCTTCTCTGAGGCT
1362	P143602.XmaJI_fo	TCGAggatccTCAGCAGATCCACGAGGACG
1364	P189182.XmaJI_fo	TCGAggatccTCAGCCCCCAAGCGCTTG
1366	Ph143602-seq-rev	TGTCTTGGAATGCAGGGAGGATGTC
1367	Ph189182_seq_for	ATCGTTATCCCTCTCCAGCCCCTTG
1368	Ph189182_seq_rev	CCATTTCCAACCAGCAGATGGACCT
1369	P143602.ApaI_r.2	TCGAgggcccGGCCAAGGGCAAAGGGAGA
1370	P189182.ApaI_r.2	TCGAgggcccGTGCGAGATGGTTAGTGCAC
1371	P189182.XmaJI_f2	CTGAcctaggGCAGGCAGTCGATCTCAGCA
1372	P143602.XmaJI_f2	TCGAcctaggTCAGCAGATCCACGAGGACG

# Nummer	Primername	Sequenz in 5' --> 3'
1411	P143602.SgrDIfor	TcgtcgacgGGGCCAAGGGCAAAGGGAGA
1412	P143602.Paul.rev	AAgcgcgcTAGAATCGCTTTAGCCATCTCT
1413	P189182.XmaJI_f2	CTGAcctaggGCAGGCAGTCGATCTCAGCA
1414	P189182.Hpal.for	TgttaacTCGACTGAATGCGATGCTGGTTCCT
1415	P189182.Hpal.rev	AgttaacACTACGTGTGCCAGGTCCATCTG
1416	P143602.XmaJI_f2	TCGAcctaggTCAGCAGATCCACGAGGACG
1417	At2g45160Xhol.fo	GctcgagCTCTCTTCTTTTGTGTCTTTCTGTTCTG
1418	At2g45160Paul.re	AAgcgcgcTAGAATTCCTTGCGCGAGAACGGTGTGGTC
1419	At2g45160Paul.fo	TAgcgcgcTTAAACCACCATCTCAACACTAGTAGTAACC
1420	At2g45160AvrII.r	GcctaggCCTAAAAAACATATCTCTTTAAC
1421	At3g60630Xhol.fo	GctcgagAAAAGAGAGCATTTTTTATGAAG
1422	At3g60630Paul.re	AgcgcgcTAGAATTCCTTGCGCGAGAACGGGATT
1423	At3g60630Paul.fo	AgcgcgcTTAAACCACAACCTTAACAACAACAACGA
1424	At2g45160SpeI.re	GactagtAACATAAGGAGATTATATATATA
1435	P143602.PauI.fo2	TAgcgcgcTTAAATCAGCACATCTCCCAT
1538	pPOsA1_for	TCCCTCAGCATTTGTTTCATCGGTA
1538	pPOsA1_for	TCCCTCAGCATTTGTTTCATCGGTA
1559	ss+mcs.oligo:SpeI.NotI	CTAGTGGTACCTACCTGCAGGATTGTACATTCAATTGATCCCGGGTA CACGCGTAGTCGTGACGTAGC
1560	ss-mcs.oligo:SpeI.NotI	GGCCGCTACGTCGACGACTACGCGGTACCCGGGATCAATTGAATGT ACAATCCTGCAGGTAGGTACCA
1574	miR171a_BsrGIfor	TCTGTACATGTACTGATGAAAGGGGCAAAT
1575	miR171a_Sallrev	TCGTCGACAAATTCAGCATCGTCGGATGT
1576	miR171b_BsrGIfor	TCTGTACAATCGGGAGAGTCGCCAGTTT
1577	miR171b_Sallrev	TCGTCGACGTAGTTAAAGGACCGGGCACCA
1578	Ph14CDS-SacI_for	TAAGAGCTCTCATTTGCCGAGTACCGCTTC
1579	Ph14CDS_EagI_rev	TACCGCCGGACCATGCAGATCCACGAGGACGC
1580	Ph14_3`UTR_Nsilf	TGAATGCATTTGATAGTTTAATGTAGGTGC
1581	Ph14_3`UTR_KpnI.r	TATGGTACCATCAAAGTTTCCTTGTTGCAT
1582	Ph18CDS-SacI_for	GGCGAGCTCGCCACGGAGTTAC
1583	Ph18CDS_EagI_rev	TACCGCCGGACCATGCAGATCCACGAGGACGC
1584	Ph18_3`UTR_Nsilf	TGAATGCATTTGATAGTTTAATGTAGGTGC

# Nummer	Primername	Sequenz in 5' --> 3'
1585	Ph18_3`UTR_Kpnlr	TATGGTACCCCAGCACCGAATAGGAAACAGC
1586	Ph14/18GUS_Eaglf	GTCCGGCCGGTAGAAACCCCAACCCGTG
1587	Ph14/18GUS_Nsilr	TAGATGCATTCATTGTTTGCCTCCCTGCTG
1602	GUS-rev	CTGCCAGTTCAGTTCGTTG
1622	pro-miR171aNotlf	ATGCGGCCGCTGTGACTGCACAGGAACACGA
1623	pro-miR171aSallr	TATAGTCGACCTAGGCTGGGCAACCCTAAG
1624	pro-miR171bNotlf	TAGCGGCCGCTGTGCAAAGAGTGTGTGGTTGTG
1625	pro-miR171bSallr	ATAGTCGACTCGTGGAGGCACGCAATTAAGTC
1690	SCL6II-probe-for	GGGAGGGGGTGTGGTTTATC
1691	SCL6II-probe-rev	AGGGAAAACGGGTTGATGAAGA
1692	SCL6IIIprobe-for	ATTTCAAGGGAAGGGGTTCTG
1693	SCL6IIIprobe-rev	CTGGTCGATGATTACCGCTGAC
1747	Ph143602CDSfor	CACCATGGTGATCACTGCAGGAAG
1748	Ph143602CDSrev	CGTCCTCGTGGATCTGCTGA
1749	Ph14CDSfusion-re	CTGCGTCCTCGTGGATCTGC
1750	5`inser.GUSPh14f	CCCTGCGTATCACCACCAAG
1751	3`inser.GUSPh14r	CCACATTAAGCCAACGTACTGGA
1753	5`inser.GUSPh18f	TGGGCAGGAGAATCTGGTCA
1754	3`inser.GUSPh18r	ATCTGAGCCCGCAGATCCTC
1798	Ph14_5`rec.for	AgctcttcGGCCAAGGGCAAAGGGAGA
1799	Ph14_5`rec.rev	ATCCTGCTACCTGTTGGCAG
1800	Ph14_3`rec.for	TTGATAGTTTAATGTAGGTG
1801	Ph14_3`rec.rev	AgctcttcCATACTGACTAGCAACATAA
1802	Ph14-aph4TTPCR-f	CCAACAGGTAGCAGGATAGGCTTTTCTCGACT
1803	Ph14-aph4TTPCRnr	GCACCTACATTAACCTATCAATACACTCGACAGTTTTGA
1805	pPGX8_m35S-5'seq	GGAGAGGACACGCTGAAGCTAG
1806	pPGX8_r1	CATCCTGTTACGACCATGCTT

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Frank, der mich während meiner Zeit als Doktorand in Freiburg und München bestens betreut und begleitet hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit schlicht nicht zustande gekommen. Ich wünsche Ihm allzeit viel Erfolg.

Hoch lebe die AG Frank!

Herzlich Dank an meine Münchner Kollegen Dr. Asif Arif, Stefan Kirchner, Stefan Krininger, Hossein Beheshti, Sebastian Pfeilmeier und Raphaela Schloßnikel. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit im Labor und den herrlich schwarzen Humor!

Auch bei meinen ehemaligen Kollegen der Freiburger Arbeitsgruppe sowie bei Herrn Prof. Dr. Ralf Reski möchte ich mich für die wunderbare Zeit am Schwarzwald bedanken. Hierbei möchte ich mich bei Timo Lorenz, Manuel Hofmann, Stefanie Rösch, Desirée Gütle und Zoé Blank für Ihre Mitarbeit am Projekt bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich weiterhin bei Beate Vieth für Ihre Unterstützung beim Filtern der Transkriptomdaten und der Erstellung der Heat-maps.

Darüber hinaus ein herzliches Dankeschön an Dr. Anna Beike und Dr. Mark Bruno für Ihre Korrekturen, Tipps und Ratschläge sowie ihr stets „offenes Ohr“.

Zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner großen Familie für die wunderbaren Feste und den Rückhalt, den sie mir während meiner Arbeit schenkte.

Lebenslauf

Dipl.-Biol. Christoph Strotbek

- seit 04.2012 Doktorand der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
04.2012 – 03.2014 als Wissenschaftlicher Mitarbeiter
- 07.2010 – 03.2012 Doktorand der Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
07.2010 – 03.2012 als Wissenschaftlicher Mitarbeiter
- 10.2006 – 07.2010 Hauptstudium Diplom Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
08.07.2010 Diplom
- 10.2004 – 09.2006 Grundstudium Diplom Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
04.09.2006 Vordiplom
- 09.2003 – 06.2004 Zivildienst, Diakonie Klinikum, Stuttgart
- 1994 – 2003 Salier-Gymnasium, Waiblingen
25.06.2003 Abitur