

Etablierung und Optimierung  
der synthetischen primär-microRNA Technik  
für funktionale Genomanalysen in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Sandra Niemeier**  
aus Enger

Bielefeld, im Februar 2010



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> -----	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> -----	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> -----	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> -----	<b>1</b>
<b>1.1 Nicht-kodierende RNAs</b> -----	<b>1</b>
1.1.1 Kleine regulatorische RNAs -----	2
1.1.2 <i>small</i> RNA-vermittelte Regulationsmechanismen-----	5
1.1.2.1 RNA-vermittelte Spaltung von RNA-----	5
1.1.2.2 Repression der Translation und mRNA-Deadenylierung-----	6
1.1.2.3 <i>small</i> RNA-vermittelte DNA-Methylierung -----	9
1.1.3 Komponenten der <i>small</i> RNA-Reaktionswege-----	10
1.1.3.1 Typ-III-Ribonukleasen -----	10
1.1.3.2 dsRNA-bindende Proteine (DRBs) -----	11
1.1.3.3 RNA-Methyltransferasen -----	12
1.1.3.4 Die Argonaut/Piwi Proteinfamilie -----	12
1.1.4 microRNAs in Pflanzen -----	14
1.1.4.1 Ursprung und Evolution -----	14
1.1.4.2 microRNA Biogenese -----	16
1.1.4.3 microRNA-Identifizierung -----	19
1.1.4.4 Vorhersage und Validierung von miRNA-Zielgenen-----	21
1.1.4.5 Funktionen von microRNAs in Pflanzen-----	24
1.1.5 RNA <i>silencing</i> in Pflanzen -----	27
<b>1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport</b> -----	<b>29</b>
1.2.1 Kernhülle und Kernporenkomplexe-----	29
1.2.2 Import und Export von Proteinen-----	30
1.2.3 Export von mRNA-----	31
1.2.4 Poly(A)-bindende Proteine -----	33
1.2.4.1 Struktur zytosolischer PABPs -----	33
1.2.4.2 Funktionen zytosolischer PABPs -----	34
1.2.4.3 Zytosolische PABPs in <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	36
<b>1.3 Das <i>Chalkonsynthase</i>-Gen</b> -----	<b>39</b>
<b>1.4 Ziele dieser Arbeit</b> -----	<b>41</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> -----	<b>42</b>
<b>2.1 Material</b> -----	<b>42</b>
2.1.1 Chemikalien -----	42
2.1.2 Nährmedien-----	42

2.1.2.1 Anzucht von Bakterien	42
2.1.2.2 Anzucht von Pflanzen	43
2.1.2.3 Anzucht von Hefe	43
2.1.3 Zellstämme und Plasmidvektoren	44
2.1.3.1 Bakterien- und Hefestämme	44
2.1.3.2 Plasmidvektoren	45
2.1.4 Pflanzenmaterial	45

## 2.2 Methoden ----- 46

2.2.1 Bioinformatische Methoden	46
2.2.1.1 Computergestütztes Design künstlicher microRNAs	46
2.2.1.2 Überprüfung und Auswahl von smRNA-Kandidaten	47
2.2.2 Präparation und Analyse von DNA	48
2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.2.2.2 Standard-PCR	48
2.2.2.3 <i>overlap extension</i> -PCR	49
2.2.2.4 Kolonie-PCR	50
2.2.2.5 Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Elution aus Agarosegelen	51
2.2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung	51
2.2.3 DNA-Klonierung und -Präparation	51
2.2.3.1 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	51
2.2.3.2 Restriktionsverdau von DNA	52
2.2.3.3 Dephosphorylierungsreaktion	53
2.2.3.4 <i>blunt-end</i> -Klonierungen	53
2.2.3.5 Ligation von DNA in Plasmidvektoren	53
2.2.3.6 Herstellung chemotransformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	54
2.2.3.7 Herstellung elektrotransformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
2.2.3.8 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
2.2.3.9 Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
2.2.3.10 DNA-Präparation im Minimalmaßstab	56
2.2.3.11 Ammoniumacetat-Fällung von Plasmid-DNA	57
2.2.3.12 Plasmid-DNA Präparation im Großmaßstab ( <i>Midiprep</i> )	57
2.2.3.13 Sequenzierung und Sequenzauswertung	57
2.2.4 Präparation und Analyse von RNA	57
2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Protoplasten und Pflanzenmaterial mit anschließender DNaseI-Behandlung	58
2.2.4.2 Reverse Transkription (RT)	58
2.2.4.3 Quantitative Echtzeit-RT-Polymerasekettenreaktion zur relativen Quantifizierung der Genexpression	58
2.2.4.4 <i>target</i> -Validierung durch RLM-5'RACE ( <i>RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends</i> )	60
2.2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und <i>Northern Blot</i>	62
2.2.5 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
2.2.5.1 Sterile Anzucht	64
2.2.5.2 Anzucht auf Erde	64
2.2.6 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
2.2.6.1 Herstellung chemotransformationskompetenter Agrobakterien	64
2.2.6.2. Transformation von Agrobakterien	65
2.2.6.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	65

2.2.6.4 Selektion transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	66
2.2.7 Methoden zur Metabolitenanalyse in <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
2.2.7.1 Saure methanolische Extraktion von Anthocyanen und photometrische Quantifizierung	66
2.2.7.2 Extraktion und Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC) von Flavonolen	67
2.2.7.3 Naturstoffreagenz A-Färbung von Arabidopsis-Keimlingen	68
2.2.8 <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur	68
2.2.8.1 Protoplastierung der <i>A. thaliana</i> Zellkultur	69
2.2.8.2 Transfektion der At7-Protoplasten und Protoplastenernte	69
2.2.9 Detektion von Protein-Interaktionen im <i>Yeast-2-Hybrid</i> System	70
2.2.9.1 Anzucht und Herstellung kompetenter Hefezellen	71
2.2.9.2 Transformation von Hefe	72
2.2.9.3 Interaktionstest von Proteinen auf Indikatorplatten	72
2.2.10 <i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung	73

### **3. ERGEBNISSE ----- 75**

#### **3.1 Etablierung der smiRNA-Technologie mit Hilfe bioinformatischer Werkzeuge am Beispiel des *Chalkonsynthase*-Gens----- 75**

3.1.1 Design und Auswahl der smiRNA(CHS) mit Hilfe von <i>RNAhybrid</i>	75
3.1.2 Analyse der Sekundärstruktur der pri-smiRNA(CHS) mit <i>RNAfold</i>	76
3.1.3 Experimentelle Validierung der smiRNA(CHS) und ihres Zielgens	77
3.1.3.1 <i>Northern Blot</i> -Analyse	78
3.1.3.2 Nachweis von <i>CHS</i> -Spaltungsprodukten in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Keimlingen	79
3.1.4 Phänotypische Analyse pri-smiRNA(CHS) exprimierender Pflanzen	80
3.1.4.1 Proanthocyanidine	80
3.1.4.2 Flavonolderivate	81
3.1.4.3 Stress-induzierte Anthocyane	83
3.1.5 Molekulare Analyse pri-smiRNA(CHS) exprimierender Pflanzen	84

#### **3.2 Konstruktion eines Vektors zur vereinfachten Klonierung synthetischer microRNA----- 87**

3.2.1 Vereinfachte Klonierungsstrategie zur Herstellung von pri-smiRNAs	87
3.2.2 Analyse pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierender Pflanzen	90

#### **3.3 Variationen der smiRNA(CHS) und ihre Analysen----- 91**

3.3.1 Auswahl und Design von smiRNA(CHS) Varianten	92
3.3.2 Phänotypische Analyse pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierender Pflanzen	94
3.3.3 Experimentelle Validierung der smiRNA(CHS) Varianten	96
3.3.4 Molekulare Analyse pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierender Pflanzen	97

#### **3.4 Multipler *knockdown* ausgewählter Poly(A)-bindender Proteine durch synthetische microRNAs----- 100**

3.4.1 Design von smiRNA(PABP)s mit Hilfe bioinformatischer Werkzeuge	100
3.4.1.1 Sequenzanalysen der <i>PABPC</i> -Familienmitglieder	101
3.4.1.2 Design dreier smiRNA(PABP)s mit Hilfe von <i>RNAhybrid</i>	104
3.4.2 Analyse smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen	106
3.4.2.1 Experimentelle Validierungen der smiRNA(PABP)-3 und ihrer Zielgene	106

3.4.2.2 Phänotypische Analyse pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen---	107
3.4.2.3 Molekulare Analyse pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen-----	116
3.4.2.4 Lokalisierung von Poly(A)-RNA in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen -----	119
3.4.3 Analyse pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierender Pflanzen -----	121
3.4.4 Analyse pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierender Pflanzen-----	122
3.4.5 Komplementierung von pri-smiRNA(PABP)-3 Mutanten durch smiRNA-resistente <i>PABP</i> -cDNAs -----	124
<b>4 DISKUSSION-----</b>	<b>130</b>
<b>4.1 Neue Techniken zur Regulierung der Genexpression in Pflanzen -----</b>	<b>130</b>
4.1.1 Design synthetischer microRNAs mit Hilfe von <i>RNAhybrid</i> -----	131
4.1.2 Optimierte Klonierungsstrategie für pri-smiRNAs -----	134
4.1.3 <i>knockdown</i> des <i>Chalkonsynthase</i> -Gens und Validierung des smiRNA „easy cloning“ Vektors -----	135
4.1.4 Auswirkungen von Fehlpaarungen und G:U-Paarungen in miRNA: <i>target</i> Hybridstrukturen-----	137
<b>4.2 Multipler <i>knockdown</i> Poly(A)-bindender Proteine und deren Einfluss auf den Export von mRNA-----</b>	<b>143</b>
4.2.1 Design synthetischer miRNAs für ausgewählte Mitglieder der <i>PABPC</i> -Familie in Arabidopsis-----	143
4.2.2 Entwicklungsdefekte in pri-smiRNA(PABP) exprimierenden Pflanzen -----	144
4.2.3 Der Einfluss von PABPCs auf den Kernexport von mRNA -----	148
<b>4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick -----</b>	<b>152</b>
<b>5 LITERATUR -----</b>	<b>155</b>
<b>6 PUBLIKATIONEN -----</b>	<b>177</b>
<b>7 ANHANG-----</b>	<b>178</b>
<b>8 ABKÜRZUNGEN -----</b>	<b>206</b>

## Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind eine Klasse kleiner, nicht kodierender RNAs in Eukaryoten, die die Regulation ihrer Zielgene (*targets*) durch Spaltung der Transkripte oder Inhibition der Translation auf post-transkriptioneller Ebene vermitteln. miRNAs werden aus größeren, strukturell definierten Primärtranskripten prozessiert und zeigen in Pflanzen hohe Komplementarität zu den Zielsequenzen ihrer *targets*. Diese Eigenschaften können ausgenutzt werden, um künstliche oder synthetische miRNAs (amiRNAs oder smiRNAs) für gewünschte Gene oder Genfamilien zu exprimieren und deren (simultanen) *knockdown* herbeizuführen.

In dieser Arbeit wurde das miRNA Vorhersageprogramm *RNAhybrid* genutzt, um das Design von smiRNAs zu optimieren. Es diente der hochspezifischen Vorhersage von *off-targets* für eine smiRNA und trug so zur Auswahl geeigneter smiRNA-Kandidaten bei. Eine weitere Optimierung der smiRNA-Technik bestand in der Generierung eines Vektors („easy-cloning“ Vektor, ECV), der die Klonierung eines smiRNA-Primärtranskriptes in einem Ein-Schritt-Verfahren erlaubte. Durch Insertion neuer Schnittstellen in das Primärtranskript der natürlichen *MIR159a* konnten die neuen smiRNA- und die komplementären smiRNA\*-Sequenzen auf vereinfachte und beschleunigte Weise eingefügt werden.

Für die Validierung des Ansatzes wurde eine smiRNA für das *Chalkonsynthase*-Gen (*CHS*) in *Arabidopsis* entworfen. Die pri-smiRNA(*CHS*) wurde auf konventionelle Art sowie mit Hilfe des ECV-Ansatzes generiert und in *Arabidopsis* exprimiert.

Einige transgene Pflanzen zeigten starke phänotypische Auffälligkeiten. Sekundärmetabolite wie Proanthocyanidine, Anthocyane und Flavonole, zu deren Produktion die *CHS* in Pflanzen katalysiert, waren in den verschiedenen untersuchten Linien unterschiedlich stark reduziert. Einige Linien ähnelten eher dem Wildtypphänotyp, andere erreichten fast die phänotypischen Ausprägungen, die für *chs* Mutanten beobachtet werden. In diesen Linien waren die stärkste Reduktion der Flavonoide und der *CHS*-Transkriptmengen zu beobachten, was negativ mit der Expressionsstärke des smiRNA(*CHS*) *precursors* korrelierte. Der ECV-Ansatz war ebenso effektiv wie die konventionelle Strategie. Ein vorhergesagtes *off-target* für die smiRNA(*CHS*), das durch andere Mittel nicht gefunden wurde, konnte anhand von Expressionsstudien bestätigt werden. Die Transkriptmenge dieses Gens war in den untersuchten Linien reduziert, erreichte aber nicht das geringe Niveau wie die *CHS*-Transkripte in den gleichen Linien.

Um das Design von smiRNAs weiterhin zu optimieren wurden verschiedene Varianten der smiRNA(*CHS*) in Pflanzen exprimiert. Diese bildeten Hybridstrukturen mit der Zielsequenz aus, die sich entweder durch einzelne Fehlpaarungen oder einen gesteigerten Anteil an G:U-Paarungen auszeichneten. So sollte untersucht werden,

welche Veränderungen toleriert werden können, damit die Regulierung des Zielgens noch gewährleistet war und welche strukturellen Eigenschaften zur Vermeidung von *off-targets* beitragen können. Molekulare und phänotypische Analysen der verschiedenen transgenen Linien zeigten eine Reduzierung der *CHS*-Transkriptmenge sowie resultierende Phänotypen in Pflanzen, die die smiRNA(*CHS*) mit einer Fehlpaarung im 5'-Bereich der smiRNA exprimierten. Doch die hohe Effektivität der perfekt gepaarten smiRNA(*CHS*) wurde nicht erreicht. Für die übrigen Varianten wurde nur ein begrenzter *silencing* Effekt beobachtet.

Die optimierte smiRNA-Technik wurde weiterhin für den multiplen *knockdown* von Genen angewandt, die für eine kleine Familie von Poly(A)-bindenden Proteinen (*PABPCs*) in *Arabidopsis* kodieren. Drei verschiedene smiRNAs wurden generiert und in Pflanzen exprimiert, die jeweils unterschiedliche Kombinationen der *PABPC*-Gene zum *target* hatten. Die stärksten Phänotypen zeigten Pflanzen, in denen fünf Gene gleichzeitig herunterreguliert waren. Sie waren deutlich kleiner als Wildtyppflanzen und in ihrem Wachstum verzögert. Rosettenblätter waren auffallend gewellt, Infloreszenzen verkürzt und die Pflanzen blühten später als Wildtypen. Transgene Linien, in denen nur drei *PABPC*-Gene durch smiRNAs reguliert wurden, zeigten sehr milde Phänotypen oder glichen Wildtyppflanzen, so dass auf redundante Funktionen der einzelnen Familienmitgliedern geschlossen werden kann.

Untersuchungen zur Lokalisierung von Poly(A)-RNA in Pflanzen mit drastischen phänotypischen Effekten zeigten, dass mRNA hier verstärkt im Zellkern akkumulierte. Gleiches wurde für Wildtyppflanzen beobachtet, die mit Leptomycin B behandelt wurden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die *PABPCs* in direkter oder indirekter Weise am Export von mRNPs beteiligt sind, höchstwahrscheinlich über den Exportin1-vermittelten Transportweg.



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: sRNA-vermittelte Regulationsmechanismen.....	8
Abb. 1.2: Modell zur miRNA-Biogenese in Pflanzen.....	18
Abb. 1.3: Funktionen von microRNAs in Pflanzen.....	26
Abb. 1.4: Hypothetisches und vereinfachtes Modell für den Kernexport von mRNA.	33
Abb. 1.5: Der strukturelle Aufbau zytosolischer PABPs.....	34
Abb. 1.6: Die Rolle von zytosolischen Poly(A)-bindenden Proteinen während der Initiation der Translation.....	36
Abb. 1.7: Vereinfachte Darstellung eines Zweiges des Flavonoidbiosyntheseweges.	39
Abb. 2.1: Prinzip der <i>overlap extension</i> -PCR.....	50
Abb. 3.1: Sekundärstruktur von pri-smiRNA(CHS) im Vergleich zu pri-miRNA159a.	77
Abb. 3.2: <i>Northern Blot</i> und Nachweis der smiRNA(CHS).....	79
Abb. 3.3: Validierung der smiRNA(CHS)-vermittelten Spaltungsaktivität durch RLM-5'RACE.....	80
Abb. 3.4: Proanthocyanidine in Samenschalen pri-smiRNA(CHS) exprimierender Pflanzen.....	81
Abb. 3.5: Flavonolderivate in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen.....	82
Abb. 3.6: Anthocyane in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen.....	84
Abb. 3.7: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(CHS) und dem Zielgen <i>CHS</i> in pri- smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen.....	86
Abb. 3.8: Expressionsanalyse eines putativen smiRNA(CHS) <i>off-targets</i> .....	87
Abb. 3.9: Klonierungsstrategien für synthetische pri-miRNAs.....	88
Abb. 3.10: Sekundärstruktur des pri-smiRNA „easy cloning“ Vektors (ECV).....	89
Abb. 3.11: Proanthocyanidine in Samenschalen pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierender Pflanzen.....	90
Abb. 3.12: Anthocyane in pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierenden Pflanzen.....	91
Abb. 3.13: Sekundärstruktur von pri-smiRNA(CHS)-Var1.....	93
Abb. 3.14: Proanthocyanidine in Samenschalen pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimierender Pflanzen.....	94
Abb. 3.15: Anthocyane in pri-smiRNA(CHS)-Var1-4 exprimierenden Pflanzen.....	95
Abb. 3.16: <i>Northern Blot</i> und Nachweis der smiRNA(CHS) Varianten.....	96
Abb. 3.17: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(CHS)-Var1 und dem Zielgen <i>CHS</i> .	98
Abb. 3.18: Expressionsanalyse der pre-smiRNA(CHS) Varianten 2, 3 und 4.....	99
Abb. 3.19: Phylogenetischer Stammbaum der PABPC Proteinfamilie und Auswahl von Mitgliedern als Ziele für smiRNAs.....	101
Abb. 3.20: Multiples Sequenzalignment aller PABPCs aus Arabidopsis.....	102
Abb. 3.21: Multiples Sequenzalignment der <i>PABPCs</i> aus Arabidopsis auf DNA-Ebene.....	103
Abb. 3.22: Nachweis von smiRNA(PABP)-3 und Validierung zweier Zielgene.....	107

Abb. 3.23: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 34 Tagen.....	108
Abb. 3.24: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 49 Tagen.....	109
Abb. 3.25: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 49 Tagen im Vergleich zum Wildtyp.....	109
Abb. 3.26: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 60 Tagen.....	110
Abb. 3.27: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 76 Tagen.....	111
Abb. 3.28: Übersicht über pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Kurztag.....	112
Abb. 3.29: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Kurztag im Alter von 111 Tagen.....	113
Abb. 3.30: Durchmesser der Rosetten pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen.....	114
Abb. 3.31: Blühbeginn pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen.....	115
Abb. 3.32: Infloreszenzen, Wurzeln und Blätter pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen.....	116
Abb. 3.33: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(PABP)-3 und ihrer Zielgene.....	118
Abb. 3.34: <i>In situ</i> Hybridisierung pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen.....	120
Abb. 3.35: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(PABP)-1 und ihrer Zielgene.....	122
Abb. 3.36: pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierende Pflanzen im Langtag.....	123
Abb. 3.37: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(PABP)-3cac und dem Zielgen <i>PAB4</i> .....	124
Abb. 3.38: Mutationen der smiRNA(PABP)-3 Bindestellen in <i>PAB2</i> und <i>PAB3</i> cDNAs	125
Abb. 3.39: Interaktionsanalyse von <i>PAB2</i> und <i>PAB3</i> smiRNA-Bindestellenmutanten mit CID11 im Y2H-System.....	127
Abb. 3.40: Sieben Wochen alte pri-smiRNA(NUP192) exprimierende Pflanzen im Kurztag.....	129
Abb. 4.1: Alignment der <i>PABPC</i> -Sequenzen innerhalb der smiRNA(PABP)-1 Bindestelle.....	147
Abb. 4.2: Hypothetisches Modell für den Kernexport von mRNA in Arabidopsis.....	151

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Antibiotikakonzentrationen.....	43
Tab. 2.2: Zellstämme.....	44
Tab. 2.3: Plasmidvektoren.....	45
Tab. 2.4: Verwendete T-DNA Insertionslinien.....	45
Tab. 2.5: Hergestellte bzw. untersuchte überexprimierende Linien.....	46
Tab. 2.6: Parameter für die smiRNA-Zielgenvorhersage mit <i>RNAhybrid</i> .....	47
Tab. 2.7: PCR-Profil für eine Standard-Reaktion.....	49
Tab. 2.8: Profil für Quantifizierungsreaktion im Rotor-Gene™ 6000.....	60
Tab. 3.1: Zusammenfassung des <i>RNAhybrid</i> Ergebnisses für smiRNA(CHS).....	76
Tab. 3.2: Zusammenfassung der <i>RNAhybrid</i> Ergebnisse für smiRNA(CHS)- Var1, -Var2, -Var3 und -Var4.....	92
Tab. 3.3: Zusammenfassung des <i>RNAhybrid</i> Ergebnisses für smiRNA(PABP)-1.....	104
Tab. 3.4: Zusammenfassung des <i>RNAhybrid</i> Ergebnisses für smiRNA(PABP)-3.....	105
Tab. 3.5: Zusammenfassung des <i>RNAhybrid</i> Ergebnisses für smiRNA(PABP)-3cac..	105

# 1 Einleitung

## 1.1 Nicht-kodierende RNAs

Bis in die 80er Jahre hinein wurde die Auffassung vertreten, dass DNA den zentralen Speicher der Erbinformation einer Zelle darstellt und RNA als Überträger oder Übersetzer dieser Information in Proteine fungiert. Einzig die Proteine waren diesem so genannten zentralen Dogma der Biologie zufolge für die Bewerkstelligung der unterschiedlichsten Regulations- und Stoffwechselprozesse verantwortlich. Bis zu diesem Zeitpunkt waren lediglich drei RNA-Klassen bekannt: *messenger*-RNA (mRNA), *transfer*-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA), die allesamt in die Proteinbiosynthese involviert sind. Mit der Entdeckung einer Klasse von katalytisch aktiven, nicht Proteinkodierenden RNAs (ncRNA) in den frühen 80er Jahren jedoch musste dieser Standpunkt aufgegeben werden. Die Arbeitsgruppe um Thomas Cech erforschte den *Splicing*-Mechanismus in *Tetrahymena thermophila* und fand dabei eine RNA, die in der 26S-rRNA kodierenden Region lag und selbst Spaltungs-Aktivität zeigte indem sich dieses Intron selbst mit Hilfe seiner katalytischen Fähigkeit aus dem Transkript entfernen konnte (Kruger et al., 1982). Dabei lag keine Beteiligung von Protein-Komponenten vor. Dieser Mechanismus wurde später als autokatalytisches *Splicing* bekannt, und diese RNA stellt das erste entdeckte Ribozym dar. Nur kurze Zeit später wurde eine ganz ähnliche Eigenschaft für die RNA-Komponente des RNase P-Komplexes in Bakterien identifiziert, der in die Reifung von prä-tRNAs eingebunden ist (Guerrier-Takada et al., 1983). Cech und Altman erhielten für diese Entdeckung im Jahr 1989 den Nobelpreis für Chemie. In diesem Zusammenhang wurde schließlich nur wenig später die „RNA-Welt“ Hypothese aufgestellt, die besagt, dass zu Beginn des Lebens möglicherweise nur RNA existiert habe, da sie sowohl die Fähigkeit zur Speicherung, Übertragung und Vervielfältigung genetischer Informationen habe als auch katalytische Eigenschaften besitze (Gilbert, 1986). DNA sei demzufolge erst später aufgrund ihrer höheren Stabilität zum Träger der Erbinformation geworden, und auch Proteine hätten sich erst später etablieren können, da sie gegenüber RNA eine höhere Beständigkeit aufwiesen und in Form von Enzymen effizienter die Katalyse von Reaktionen vermitteln konnten. Diese Hypothese wurde untermauert als bekannt wurde, dass die katalytischen Zentren des Ribosoms von RNA und nicht wie vorher angenommen von Proteinen gebildet werden (Cech, 2000).

In den darauf folgenden Jahren wurden fortlaufend weitere Klassen von ncRNAs entdeckt, die die unterschiedlichsten Funktionen in den Zellen übernehmen und vor allem in RNA-vermittelte Regulationsmechanismen involviert sind.

### 1.1.1 Kleine regulatorische RNAs

Eine besondere Gruppe von ncRNAs bilden die *small* RNAs (sRNAs). Sie sind definiert durch eine Länge von 19-30 Nukleotiden (nt) in ihrer biologisch aktiven Form und die Assoziierung mit Proteinen der Argonaut-Familie. Durch das Binden an ihre RNA-Zielsequenz durch mehr oder weniger stark ausgeprägte komplementäre Basenpaarung führen sie unter Mithilfe der Argonaut-Proteine zumeist eine reduzierte Expression ihrer Zielgene (*targets*) über unterschiedliche Mechanismen herbei.

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1993 in tierischen Zellen (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) wurde eine große, stetig wachsende Anzahl verschiedener Klassen in Tieren, Pflanzen, Pilzen, Protisten und Viren identifiziert (Reinhart et al., 2002; Lim et al., 2003; Pfeffer et al., 2004; Hinas et al., 2007; Lin et al., 2009). Basierend auf Unterschieden in ihrem Ursprung, ihrer Biogenese und Wirkungsweise werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt. Die bedeutendsten und am besten charakterisierten unter ihnen sind microRNAs (miRNAs), *small-interfering* RNAs (siRNAs) und Piwi-interagierende RNAs (piRNAs) (Aravin et al., 2001 und 2003; Sunkar und Zhu, 2007).

Die Gemeinsamkeit dieser drei RNA-Klassen liegt nicht nur in ihrer geringen Größe (20-25 nt für miRNAs, 21-24 nt für siRNAs und 24-30 nt für piRNAs), sondern auch in ihrer Funktion als hochspezifische Vermittler für die hemmenden Wirkmechanismen von Ribonukleoproteinkomplexen, die Proteine aus der Argonaut-Piwi Superfamilie enthalten. Die kleine regulatorische RNA führt den Proteinkomplex basierend auf Watson-Crick Basenpaarung zu ihrer Zielsequenz, woraufhin das Argonaut- oder Piwi-Protein die Expression des Zielgens hauptsächlich entweder durch Hydrolyse der mRNA oder Unterdrückung der Translation (zusammengefasst als *post-transcriptional gene silencing*, PTGS), oder durch Chromatinmodifizierungen des Locus, der das *target* kodiert, hemmt (*transcriptional gene silencing*, TGS). Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Zielgene von sRNAs in Einzelfällen durch die Interaktion mit Argonaut-Proteinen aktiviert werden können (Vasudevan et al., 2007). Weiterhin haben die Mitglieder dieser drei Klassen häufig die 2'-O-Methylierung ihres 3'-Endes gemeinsam, allerdings liegen diesbezüglich auch Abweichungen zwischen den verschiedenen Spezies vor.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den drei Klassen kleiner RNAs liegt in den Eigenschaften der Moleküle, aus denen sie hervorgehen: Während nur eine definierte miRNA aus einer größeren RNA-Haarnadelstruktur entsteht, werden üblicherweise viele siRNAs mit Hilfe von Dicer Proteinen aus langen, doppelsträngigen RNAs prozessiert.

Diese sind in einigen Fällen die Produkte von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Pak und Fire, 2007; Sijen et al., 2007). piRNAs hingegen entstehen aus kaum charakterisierten, vermutlich einzelsträngigen *precursor*-Molekülen, Dicer-Proteine oder RNA-abhängige RNA-Polymerasen sind an ihrer Reifung nicht beteiligt (Vagin et al., 2006). Weiterhin unterscheiden sich die Klassen aufgrund der Funktionen, die sie in den verschiedenen Organismen ausführen. piRNAs wurden bislang nur in Vertebraten und Invertebraten, und dabei nur in Zellen der Keimbahn entdeckt (Aravin et al., 2001 und 2003). In Säugern wurden sie nur in Spermatozyten und Spermatiden identifiziert (Aravin et al., 2006), in Invertebraten wurden sie auch in der weiblichen Keimbahn gefunden (Das et al., 2008). Meist zeigen sie nachweislich mehr oder weniger stark ausgeprägte Komplementarität zu Transposonsequenzen. Sie dirigieren Piwi-Proteine zu den mRNAs ihrer Ziel-Transposons und regulieren diese häufig post-transkriptionell durch einen Spaltungsvorgang. Andere piRNAs führen vermutlich die Methylierung von Transposon-DNA herbei (Aravin et al., 2008).

siRNAs werden aufgrund abstammungsspezifischer und funktionaler Eigenschaften in verschiedene Untergruppen unterteilt. Besonders in Pflanzen zeigen sie eine große Vielfalt bezüglich ihrer Biogenese und Funktionen. Man unterscheidet endogene (Sunkar und Zhu, 2007; Ghildiyal und Zamore, 2009) und exogene siRNAs (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001). Letztere kommen in Tieren, Pilzen, Protisten sowie Pflanzen vor und werden aus transgener oder viraler RNA prozessiert. Sie leiten einen natürlichen Abwehrmechanismus gegen die eindringende virale RNA ein, indem sie deren Degradierung herbeiführen. Dieser Mechanismus wurde auch unter den Begriffen RNA-Interferenz (RNAi) und *gene silencing* bekannt, in Pilzen spricht man von Quelling (Cogoni et al., 1996). Die Bedeutung exogener siRNAs wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass die meisten pflanzlichen Viren Gene zur Unterdrückung der siRNA-Antwort kodieren (Wang und Metzloff, 2005).

Die ersten endogenen siRNAs wurden in Pflanzen und *C. elegans* gefunden (Hamilton et al., 2002; Ambros et al., 2003). Nachdem sie kürzlich auch in Fliegen und Säugern identifiziert wurden (Ghildiyal et al., 2008; Tam et al., 2008) wird angenommen, dass sie in allen höheren Eukaryoten vorkommen. Zu ihnen gehören *trans-acting* siRNAs (tasiRNAs), die Gene regulieren, die nicht ihren eigenen Ursprungs-Loci, den TAS-Genen entsprechen. Interessanterweise interagiert ihr Biogeneseweg mit dem miRNA-vermittelten Regulationsweg: Die Transkripte von TAS-Genen sind in Arabidopsis selbst die Ziele von miRNAs (Vazquez et al., 2004; Yoshikawa et al., 2005). Sie werden an definierten Positionen gespalten und anschließend mittels einer RNA-abhängigen RNA Polymerase (RDR) in doppelsträngige RNA überführt. Eine Ribonuklease prozessiert diese RNA ausgehend von der miRNA-induzierten Spaltungsposition in tasiRNAs, welche im Anschluss ihre Zielgene posttranskriptionell durch Spaltung der Transkripte regulieren. Zu den Zielgenen gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren, die in die Antwort auf Auxinstimuli oder bei der Regulation der Entwicklung von Pflanzen involviert sind (Williams et al., 2005). *natural antisense transcript-derived* siRNAs (natsiRNAs)

werden hingegen als Antwort auf Stress in Pflanzen produziert (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006). Sie werden aus einem Paar konvergent transkribierter RNAs gebildet. Üblicherweise wird eines dieser Transkripte konstitutiv exprimiert, während die dazu komplementäre RNA nur transkribiert wird, wenn die Pflanze umweltbedingtem Stress ausgesetzt ist. Unterschiedlich lange nat-siRNAs werden produziert, die die Spaltung einer der Ursprungs-mRNAs vermitteln und daraufhin auch die Produktion von 21 nt langen, sekundären siRNAs herbeiführen können, um die *silencing*-Antwort zu verstärken (Borsani et al., 2005). Die dritte Klasse endogener siRNAs in Pflanzen, *cis-acting* siRNAs (casiRNAs), stammt aus Transposons, repetitiven Elementen oder STRs (*short tandem repeats*) und umfassen den Hauptanteil endogener siRNAs (Xie et al., 2004). Sie fördern die Bildung von Heterochromatin durch die Vermittlung von DNA-Methylierung und Modifizierung von Histonen am Locus ihres Ursprungs (Zilberman et al., 2003; Chan et al., 2004).

miRNAs wurden zum ersten Mal in *C. elegans* beschrieben (Lee et al., 1993; Lee und Ambros, 2001) und bald darauf auch in Pflanzen entdeckt (Reinhart et al., 2002). Sie vermitteln die post-transkriptionelle Regulierung endogener, nicht verwandter mRNAs und sind wesentliche Bestandteile der regulatorischen Netzwerke eukaryotischer Zellen (Bartel, 2004). Besonders in Pflanzen regulieren miRNAs ihre Zielgene aufgrund des hohen Grades an Komplementarität zur Bindestelle mit großer Spezifität, in Tieren hingegen ist die Komplementarität meist weniger stark ausgeprägt und eine miRNA kann viele, auch weniger nah verwandte Zielgene haben. Man geht davon aus, dass 20-30 % der Protein-kodierenden Gene in Tieren durch miRNAs reguliert werden (Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005). Hier sind sie in eine Reihe verschiedenster Vorgänge involviert wie Zelldifferenzierung und -Teilung, Embryonalentwicklung, Apoptose und Onkogenese (Ambros et al., 2003; Carrington und Ambros, 2003; Chen, 2005). In Pflanzen regulieren miRNAs häufig Transkriptionsfaktoren und üben Funktionen in Entwicklungsprozessen wie der Organentwicklung aus oder spielen eine Rolle in der Regulierung von Hormon-Signalwegen und der Antwort auf biotischen oder abiotischen Stress (Mallory et al., 2004a; Mallory et al., 2005; Sunkar und Zhu, 2004).

Zunächst wurde angenommen, dass die siRNA-, miRNA- und piRNA-Wege klar voneinander abgegrenzt werden können und unabhängig voneinander verlaufen. Mit ihrer detaillierten Aufklärung wird jedoch immer deutlicher, dass sie miteinander interagieren und teilweise voneinander abhängen. Sie konkurrieren um Substrate und Effektor-Proteine, teilen diese miteinander und regulieren sich gegenseitig. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit werden zunächst die siRNA-vermittelten Regulationsmechanismen eingehender vorgestellt, gefolgt von einer Übersicht über die verschiedenen Komponenten der siRNA-Reaktionswege.

## 1.1.2 *small* RNA-vermittelte Regulationsmechanismen

### 1.1.2.1 RNA-vermittelte Spaltung von RNA

Die sRNA-vermittelte Spaltung von mRNA ist der am besten untersuchte Mechanismus zur Regulierung der Genexpression durch sRNAs. In diesem Fall lenken die kleinen RNAs den *RNA-induced silencing complex* (RISC), einen regulatorischen Multiproteinkomplex, in den sie eingelagert sind, zu ihren Ziel-RNAs und die Argonaut-Komponente des Komplexes führt zum Lösen einer einzelnen Phosphodiesterbindung innerhalb der sRNA-Bindestelle (Abb. 1.1 A). Die gespaltenen Fragmente werden freigegeben und der mit der sRNA beladene Komplex kann eine weitere Ziel-RNA erkennen und ihre Spaltung herbeiführen. Die gespaltenen mRNA-Fragmente haben nun jeweils ein ungeschütztes Ende, das hohe Anfälligkeit für 5'- oder 3'-Exonukleasen zeigt (Orban und Izaurrealde, 2005). Dieser Mechanismus wird beobachtet, wenn sehr hohe oder perfekte Komplementarität zwischen der regulierenden sRNA und ihren Ziel-RNAs vorliegt. Dies ist überwiegend der Fall für pflanzliche miRNAs und ihre Ziel-mRNAs (Rhoades et al., 2002), gleiches gilt jedoch auch für andere Klassen kleiner RNAs in Pflanzen wie tasi-RNAs und natsiRNAs (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004; Borsani et al., 2005). Durch die Reduzierung der Ziel-mRNAs stehen weniger Moleküle für die Translation zur Verfügung und die Konzentration an reifem Protein, für das das regulierte Gen kodiert, wird entsprechend verringert (Palatnik et al., 2003; Achard et al., 2004; Schwab et al., 2005). Die resultierenden Spaltungsprodukte können durch *Northern Blot* oder 5'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) Experimente nachgewiesen werden (Jones-Rhoades und Bartel, 2004; Llave et al., 2002a; Mallory et al., 2005; Palatnik et al., 2003; Xie et al., 2003). 5'RACE-Experimente zeigten, dass die Spaltung der Ziel-RNA gewöhnlich an definierter Position stattfindet. Im Fall von miRNA-vermittelter Spaltung wird die Ziel-mRNA zwischen den Nukleotiden gespalten, die mit den miRNA-Nukleotiden von Position zehn und elf paaren (Elbashir et al., 2001; Hutvagner und Zamore, 2002; Llave et al., 2002a). Die zur Spaltung der Ziel-RNA benötigte Endonuklease-Aktivität wird in Arabidopsis durch die PIWI-Domänen verschiedener Argonaut-Proteine in Abhängigkeit von der beteiligten sRNA-Klasse vermittelt (Baumberger und Baulcombe, 2005).

Dieser Mechanismus ist jedoch nicht auf Pflanzen beschränkt. Auch in Tieren und Viren konnten Zielgene von miRNAs identifiziert werden, die durch Spaltung ihrer mRNA reguliert werden. In diesen Fällen liegt zumeist ein für diese Organismen ungewöhnlich hoher Grad an Komplementarität zwischen miRNA und Bindestelle vor (Pfeffer et al., 2004; Yekta et al., 2004).



### 1.1.2.2 Repression der Translation und mRNA-Deadenylierung

Der möglicherweise umstrittenste Aspekt bezüglich der Funktionen von siRNAs und miRNAs ist der Mechanismus, durch den sie die Translation hemmen (Abb. 1.1 B). Bislang gibt es Hinweise darauf, dass hier nicht nur ein Mechanismus greift, sondern dass es vielmehr verschiedene Schritte vor oder während der Translation gibt, die durch sRNAs und RISCs beeinflusst werden können (Filipowicz et al., 2008; Wu und Belasco, 2008). Am besten untersucht ist die Repression der Translation am Beispiel tierischer miRNAs. Im Gegensatz zu Pflanzen ist in Tieren die Komplementarität in der Hybridstruktur zwischen miRNAs und ihren Ziel-mRNAs in der Regel auf das 5'-Ende beschränkt, auf die so genannte Kernregion des Hybrids. Das 3'-Ende der miRNA zeigt vergleichsweise schwache Komplementarität zur Bindestelle (Lewis et al., 2003; Brennecke et al., 2005; Xie et al., 2005). Gleiches gilt auch für siRNAs und ihre Zielsequenzen in Tieren. Außerdem liegen meist gleich mehrere Bindestellen für eine miRNA in der 3'UTR der Ziel-mRNA, wohingegen in Pflanzen meist nur eine Bindestelle pro miRNA in der kodierenden Region der mRNA zu finden ist. Es wird vermutet, dass die Ausprägung der Komplementarität sowie die Lage der Bindestellen die entscheidenden Faktoren für die Einleitung des letztendlich ausgeführten Regulationsmechanismus sind (Yekta et al., 2004).

Zum genauen Mechanismus der translationalen Repression wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Man unterscheidet zwischen Schritten, die während der Initiation der Translation greifen, und solchen, die nach der Initiation durchgeführt werden. Kiriakidou et al. (2007) fanden heraus, dass die Repression der Translation mit der Cap-Bindungsaffinität vom sRNA-bindenden Protein Ago korreliert. Möglicherweise schirmt Ago durch die Bindung an die Cap-Struktur diese in einer Art Konkurrenzkampf vom Initiationsfaktor eIF4E ab, so dass es nicht zur Anlagerung weiterer wichtiger Faktoren für den Start der Translation kommen kann. Chendrimada et al. (2007) schlugen hingegen vor, dass die Initiation der Translation erst nach Erkennung der Cap-Struktur durch den Initiationsfaktor eIF4E behindert wird. Sie erhielten Hinweise aus Experimenten mit menschlichen Zellen, dass durch die Anwesenheit von RISC die Assoziation der kleinen und großen ribosomalen Untereinheiten behindert wird. Jedoch liegen auch Anhaltspunkte vor, die dafür sprechen, dass die Translation erst nach ihrer Initiation reprimiert wird. Dafür sprechen Untersuchungen, die zeigen, dass miRNAs eine Verlangsamung der Elongation des wachsenden Polypeptids durch die Ribosomen vermitteln, was möglicherweise auch mit einer frühzeitigen Beendigung der Translation einhergeht. Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass es noch während der Translation unter dem Einfluss von miRNA und RISC zum Abbau des Polypeptids kommt (Olsen und Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002; Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006).

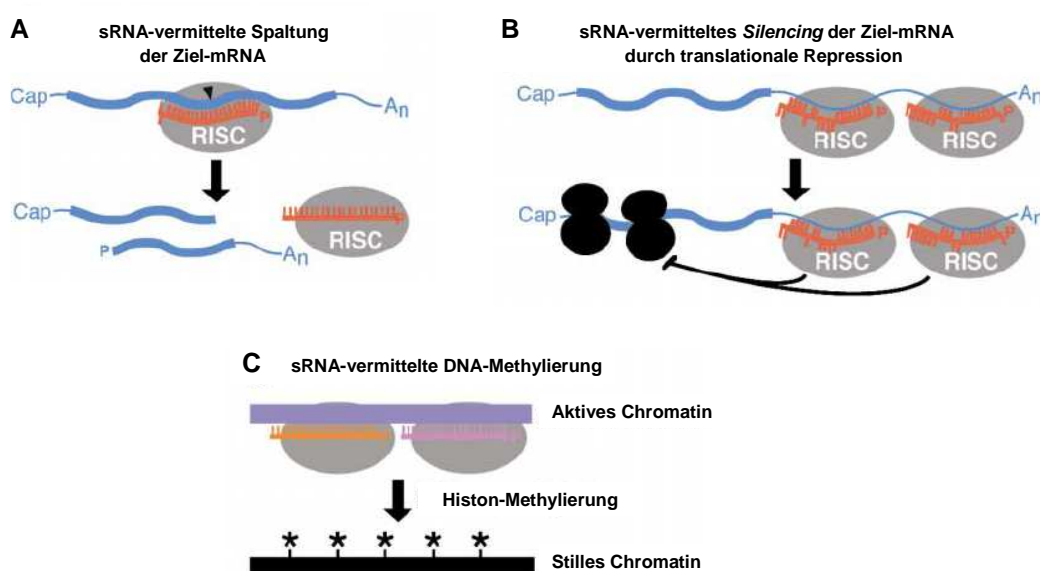
Ein großer Teil von mRNAs, die der Translationsmaschinerie nicht zur Verfügung stehen sollen, inklusive solcher, die durch miRNAs reguliert werden, wurden konzentriert in so

genannten *processing bodies* (*p-bodies*) gefunden (Eystathioy et al., 2002; Liu et al., 2005). Diese Aggregate, die groß genug sind, um durch Immunofluoreszenzmikroskopie detektiert werden zu können, enthielten außerdem einen hohen Anteil an miRNAs, RISC-assoziierten Proteinen und RNA degradierenden Proteinen (Ingelfinger et al., 2002; van Dijk et al., 2002; Sen und Blau, 2005). Vermutlich liegt die Funktion der *p-bodies* darin, ungenutzte oder unerwünschte mRNAs von der Translationsmaschinerie fernzuhalten und abzubauen oder solange zu speichern, bis sie für die Translation benötigt werden (Liu et al., 2005; Sen und Blau, 2005). Da allerdings die Eliminierung von *p-bodies* nicht das Ausmaß an translationaler Repression durch sRNAs beeinflusst, ist davon auszugehen, dass die Lokalisierung von mRNA in diesen Körperchen eher die Konsequenz der Repression darstellt, als ihre Ursache zu sein (Chu und Rana, 2006; Eulalio et al., 2007a).

Zusätzlich zur beschriebenen Repression der Translation scheint allerdings auch die Destabilisierung der Transkripte eine wichtige Rolle in der Regulierung der Zielgene zu spielen (Wu et al., 2006; Giraldez et al., 2006, Behm-Ansmant et al., 2006). Es wird vermutet, dass miRNAs zusammen mit Ago und anderen, unbekanntenen Faktoren an die 3'-UTR der mRNA binden und die Deadenylierung des Transkriptes auslösen, was zunächst das Auflösen der Cap-Struktur herbeiführt und schließlich die mRNA-Degradierung nach sich zieht (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007b). Diese könnte entweder über das Exosom oder über die Exonuklease XRN1 durchgeführt werden (Parker und Song, 2004) und die Beteiligung von *p-bodies* beinhalten (Eulalio et al., 2007c; Parker und Sheth, 2007). Es ist jedoch völlig unklar, wodurch festgelegt wird, ob eine mRNA den Weg der Repression, der Degradierung oder einer Kombination aus beiden geht (Behm-Ansmant et al., 2006).

Für Pflanzen wurden nur wenige Fälle dokumentiert, in denen eine miRNA ihr Zielgen durch Repression der Translation reguliert. *APETALA2* (*AP2*) besitzt eine Bindestelle für miR172, die innerhalb der kodierenden Region lokalisiert ist und nahezu perfekte Komplementarität zur miRNA zeigt. AP2 und AP2-like Proteine werden für die Ausbildung der Blütenorganidentität benötigt. Die Überexpression von miR172 führte zur Abwesenheit von AP2 und AP2-like Proteinen und es kam zu ähnlichen Phänotypen, wie sie für *ap2* Mutanten beobachtet werden. Die Pflanzen begannen früher zu blühen und zeigten Störungen in der Ausbildung spezifischer Blütenorgane. Zwar konnten AP2-Spaltungsprodukte durch 5'RACE identifiziert werden, jedoch wurden diese nicht in RNA Northern Blots nachgewiesen. Die gewebespezifische Expression von *MIR172* in den Blütenwirteln wurde durch *in situ* Hybridisierungen gezeigt, wo der starke Einfluss der miRNA-Expression auf die Verminderung des AP2 Proteingehalts, nicht aber auf die Transkriptmenge bestätigt wurde. Die Autoren schlossen, dass die translationale Repression neben der mRNA-Spaltung in starkem Maße zur Regulierung von AP2 beiträgt (Aukerman und Sakai, 2003; Chen, 2004).

Gandikota et al. (2007) erhielten ähnliche Ergebnisse für miR156/157, jedoch liegt ihre Bindestelle in der 3'-UTR der mRNA von *SPL3*. Spaltungsprodukte konnten nachgewiesen werden, jedoch scheint auch hier die Repression der Translation in hohem Maße zur Regulierung von *SPL3* beizutragen. Nur kurze Zeit später lieferten Brodersen et al. (2008) Hinweise darauf, dass die siRNA- und miRNA-vermittelte Repression der Translation in Pflanzen einen generellen Mechanismus darstellt, der möglicherweise permanent zusätzlich zur Spaltung der Ziel-RNAs stattfindet. Die Autoren vermuten, dass perfekte Komplementarität zwischen siRNA/miRNA und Zielsequenz die Hemmung der Translation nicht ausschließt, sondern dass dadurch vielmehr erst die Spaltung der mRNA ermöglicht werden kann (Brodersen et al., 2008).



### Abb. 1.1: sRNA-vermittelte Regulationsmechanismen

*Small RNAs* (sRNAs) regulieren ihre Zielgene über verschiedene Mechanismen, entweder posttranskriptionell (A, B) und/oder schon vor der Transkription (C).

(A) Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt mit Hilfe der Argonaut-Komponente des *RNA-induced silencing complex* (RISC) durch das Lösen einer Phosphodiesterbindung an definierter Position und kommt überwiegend in Pflanzen vor. Die resultierenden Spaltungsprodukte werden durch 5'- oder 3'-Exonukleasen abgebaut. (B) Die Hemmung der Translation von sRNA-Zielgenen ist der bevorzugte Mechanismus in tierischen Zellen, wo meist schwächere Komplementarität zwischen sRNA und Ziel-mRNA vorliegt, doch auch in Pflanzen wird diese Form der Regulation beobachtet. Noch ist der genaue Ablauf während der Inhibition der Translation nicht vollständig verstanden, jedoch existieren verschiedene Hypothesen, die besagen, dass dieser Mechanismus entweder während oder nach der Initiation der Translation greift. Diese Form der Regulation führt zu einer Reduzierung des Proteingehaltes, jedoch nicht zu einer veränderten mRNA-Menge. (C) sRNAs vermitteln die Methylierung von homologer DNA oder Histonen und überführen so aktives Chromatin in inaktives. Häufig ist *AGO4* an diesem Mechanismus beteiligt. (modifiziert nach Bartel, 2004)

### 1.1.2.3 *small* RNA-vermittelte DNA-Methylierung

Ein dritter sRNA-vermittelter Regulationsmechanismus fällt unter das TGS, da er die Genexpression auf Ebene der Transkription beeinflusst (Abb. 1.1 C). Hier vermitteln kleine regulatorische RNAs die Methylierung homologer DNA-Abschnitte, die zudem häufig mit der Modifizierung von Histonen des entsprechenden Chromatins verbunden ist und zur Stilllegung des entsprechenden Locus führt. Dieser Mechanismus wurde in verschiedenen Organismen überwiegend in Bezug auf die Regulierung von *repeats* und Transposons beobachtet (Gendrel und Colot, 2005). Zum ersten Mal wurde dieses Phänomen für transformierte Tabak-Pflanzen dokumentiert. Diese Pflanzen wiesen einen unterdrückten Transgen-Phänotyp auf, der mit der Methylierung des Transgen-Promotors zusammenhing (Matzke et al., 1989). Später konnten Lippman et al. (2003) zeigen, dass Mitglieder der Arabidopsis Argonaut Proteinfamilie, im Besonderen *AGO4*, eine wichtige Rolle während der RNA-abhängigen DNA-Methylierung von Promotoren und Transposons und ihrer Stilllegung spielen. Schließlich wurden *cas*iRNAs, wie diese Untergruppe von siRNAs in Pflanzen später benannt wurde, als zweites wichtiges Element dieses Mechanismus identifiziert (Llave et al., 2002b; Zilberman et al., 2003; Xie et al., 2004). Das RNA-vermittelte TGS ist eine lang andauernde Form der Geninaktivierung, da vererbare, epigenetische Modifizierungen beteiligt sind.

Anhand eines Beispiels konnte in Arabidopsis gezeigt werden, dass auch miRNAs die Methylierung von DNA beeinflussen können (Bao et al., 2004). Dominante Mutationen innerhalb der Bindestellen von miR166 in den mRNAs von *PHABULOSA* (*PHB*) und *PHAVOLUTA* (*PHV*) führten zu verminderter oder gänzlich aufgehobener Spaltung der mRNAs durch die miRNA, was durch eine anormale Blattentwicklung deutlich wurde. Bao et al. (2004) beobachteten allerdings auch, dass es zu reduzierter DNA-Methylierung innerhalb der kodierenden Regionen der mutierten Allele im Vergleich zum Wildtyp kam. Da sich die miR166 Bindestellen in den *PHB* und *PHV* mRNAs über die Grenze von zwei Exons erstrecken, ist davon auszugehen, dass die miRNA mit gesplicerter mRNA, und nicht mit genomischer oder ungesplicerter mRNA interagiert. Außerdem ist in heterozygoten *phb* Pflanzen nur das mutierte Allel von der reduzierten Methylierung betroffen. Dies bedeutet, dass miR166 mRNA mit *PHB* und *PHV* mRNAs interagiert und ihre Spaltung herbeiführt, zusätzlich rekrutiert sie möglicherweise aber auch Faktoren, die Chromatinmodifizierungen herbeiführen und beide Loci durch DNA-Methylierung stilllegen (Bao et al., 2004; Mallory et al., 2004b).

### 1.1.3 Komponenten der *small* RNA-Reaktionswege

In zahlreichen Untersuchungen wurde versucht, die Einzelheiten der verschiedenen sRNA-Biogenesewege und Reaktionswege aufzudecken. In jeden dieser Wege sind aufgrund spezifischer Eigenschaften der verschiedenen *precursor*-Strukturen und Prozessierungsmechanismen unterschiedliche Mitglieder aus Proteinfamilien involviert, was ein weiteres Kriterium für die Klassifizierung der sRNAs bildet (Farazi et al., 2008). In Arabidopsis sind Proteinfamilien wie DCL (Dicer-like), DRB (*dsRNA-binding protein*) und Argonaut (AGO) hoch konserviert, und auch RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) und RNA-Methyltransferasen spielen eine wichtige Rolle (Vazquez, 2006). Obwohl die einzelnen Familienmitglieder sehr spezifische Funktionen in den verschiedenen sRNA-Wegen innehaben, scheint doch eine gewisse Redundanz innerhalb der Familien vorzuliegen. In den folgenden Abschnitten werden die Proteinfamilien, die in *small* RNA-Reaktionswege involviert sind, mit besonderem Fokus auf ihr Vorkommen in Arabidopsis eingehender vorgestellt.

#### 1.1.3.1 Typ-III-Ribonukleasen

Die Prozessierung von doppelsträngiger RNA zu siRNAs sowie pri- und pre-miRNAs zu miRNAs wird in allen Organismen von Typ-III-Ribonukleasen (RNase III) bewerkstelligt. Diese Enzyme mit einer Größe zwischen 1500 und 2200 Aminosäuren (AA) enthalten typischerweise zwei RNase-Domänen sowie ein einzelnes dsRNA-Bindungsmotiv (Tomari und Zamore, 2005). In Tieren wurden zwei unterschiedliche RNase III Unterfamilien beschrieben, die Drosha und Dicer benannt wurden (Denli et al., 2004). Mitglieder der Dicer-Unterfamilie zeichnen sich durch eine zusätzliche N-terminal gelegene Helikase-Domäne sowie eine PAZ-Domäne aus, wobei letztere vermutlich für die spezifische Bindung der Proteine an einzelsträngige Enden eines sRNA-Duplex verantwortlich ist. Während in Organismen wie *C. elegans* und *H. sapiens* jeweils nur ein Dicer-Enzym vorkommt, welches für die Erzeugung von siRNAs oder miRNAs verantwortlich ist, wurden diese Funktionen in anderen Lebewesen auf verschiedene Proteine verteilt. In Pflanzen wird die Biogenese von sRNAs durch vier verschiedene Dicer-Enzyme ausgeführt, Mitglieder der Drosha-Unterfamilie kommen in pflanzlichen Genomen nicht vor. Die vier in Arabidopsis identifizierten DICER-LIKE (DCL) Proteine üben ihre Funktionen in unterschiedlichen sRNA-Biogenesewegen aus, haben aber auch teilweise überlappende Aufgaben (Gascioli et al., 2005). DCL1 ist das für die miRNA-Biogenese wesentliche Enzym, es ist verantwortlich für beide Prozessierungsschritte von der pri-miRNA über die pre-miRNA zum miRNA:miRNA\*-Duplex (Kurihara und Watanabe, 2004). Beide Schritte finden in Pflanzen anders als in Tieren im Zellkern statt (Papp et al., 2003; Park et al., 2005). In Tieren werden die zwei Prozessierungsschritte nacheinander von Dicer und Drosha vorgenommen (Lee et al., 2003). *dcl1* Pflanzen

zeigen stark vom Wildtyp abweichende Phänotypen, die im Einklang mit den Funktionen von miRNAs in der Entwicklung von Pflanzen sind (Golden et al., 2002). Die Stress-induzierten natsiRNAs werden überwiegend von DCL2 prozessiert, während DCL3 die Hauptkomponente in der Produktion von casiRNAs ist, die für Methylierung von DNA im Rahmen von TGS benötigt werden (Xie et al., 2004). DCL4 dagegen ist für die Prozessierung von tasiRNAs verantwortlich (Yoshikawa et al., 2005).

Den einzelnen DCL-Proteinen konnten zwar vorherrschende Funktionen in spezifischen Biogenesewegen zugewiesen werden, jedoch konnte auch gezeigt werden, dass funktionale Redundanz zwischen den Familienmitgliedern besteht. Henderson et al. (2006) untersuchten zum Beispiel *dcl2 dcl3 dcl4* Dreifachmutanten, in denen nicht-CpG-Methylierungen in drei untersuchten Loci starke Veränderungen aufwiesen, wohingegen diese in der *dcl3* Einfachmutante nur leicht betroffen waren. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass durch DCL2 und DCL4 generierte siRNAs zusätzlich Funktionen in der Methylierung von DNA ausüben.

#### 1.1.3.2 dsRNA-bindende Proteine (DRBs)

Typ-III-Ribonukleasen prozessieren sRNA-Vorstufen zu den biologisch aktiven Formen nicht allein, sondern benötigen einen Partner, der an die RNA binden kann, um ihre Spaltung an der erforderlichen Stelle zu vermitteln (Liu et al., 2003). Spezifische Proteine, die eine dsRNA-Bindedomäne besitzen (*dsRNA-binding domain-containing proteins*) assoziieren mit den Proteinen der Dicer- und Drosha-Unterfamilien, unterstützen die Substrat-Erkennung, das Laden der RNAs in den RNP-Komplex sowie die Stabilisierung der RNase-III-Enzyme (Farazi et al., 2008). In *D. melanogaster* bindet R2D2, der Partner vom siRNA-prozessierenden Dicer2, an das thermodynamisch stabilere siRNA/siRNA\*-Doppelstrangende, um die richtige Orientierung des Komplexes herbeizuführen, damit der funktionale RNA-Strang stabilisiert und der dazu komplementäre degradiert werden kann (Tomari et al., 2004). Des Weiteren interagiert in *D. melanogaster* und im Menschen Pasha (auch DGCR8 genannt) mit Drosha während der Prozessierung von pri-miRNAs zu pre-miRNAs (Landthaler et al., 2004). In Arabidopsis ist HYL1 (Hyponastic Leaves 1) aus der DRB (*dsRNA-binding protein*)-Familie der Interaktionspartner von DCL1 und wichtig für die Reifung von pri-miRNAs und die Akkumulierung reifer miRNAs (Vazquez et al., 2004; Han et al., 2004; Hiraguri et al., 2005; Kurihara et al., 2006). In *hyl1-2* Mutanten liegt eine verringerte Menge an pri-miR163 und miR163 im Vergleich zum Wildtyp vor und die Erkennung der korrekten Prozessierungsstelle in der pri-miR163 ist nicht mehr gewährleistet (Kurihara et al., 2006). Neben HYL1 existieren in Arabidopsis vier weitere DRBs (DRB2-5). Es gibt zwar bevorzugte Bindungen der einzelnen Mitglieder mit DCL-Proteinen, jedoch kommen auch schwache Interaktionen mit anderen Partnern vor. So konnte auch gezeigt werden, dass DCL1 neben der starken Wechselwirkung mit HYL1 *in vitro* auch mit DRB2 und DRB5

interagiert, und für DCL3 konnte eine schwache Bindung an HYL1, DRB2 und DRB5 nachgewiesen werden (Gascioli et al., 2005).

### 1.1.3.3 RNA-Methyltransferasen

Weitere Proteine, die an der Biogenese von sRNAs beteiligt sind, sind 2'-O-Methyltransferasen. Sie modifizieren RNA am 3'-Ende in Abhängigkeit vom Organismus, in dem sie vorkommen, und von der sRNA-Klasse, die prozessiert wird. Die 2'-O-Methylierung schützt sRNAs vor 3'-Exonukleasen und beeinflusst ihre Bindungsaffinität mit der PAZ-Domäne verschiedener Ago- oder Piwi-Proteine (Ma et al., 2004). In *D. melanogaster* methyliert Pimet/DmHen1 sRNAs, die an Ago2 oder eines der Piwi-Proteine gebunden sind (Horwich et al., 2007). miRNAs, die überwiegend mit Ago1 assoziiert sind, werden jedoch nicht methyliert. In Pflanzen werden vermutlich alle sRNA-Klassen durch die RNA-Methyltransferase HEN1 (Hua Enhancer 1) modifiziert (Yu et al., 2005; Yang et al., 2006). *hen1*-Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp mit verkleinerten Organen, einer veränderten Form der Rosettenblätter und reduzierter Fertilität (Chen et al., 2002).

### 1.1.3.4 Die Argonaut/Piwi Proteinfamilie

sRNAs aller Klassen assoziieren mit Proteinen aus der Ago/Piwi-Familie, um zusammen mit anderen Proteinen Effektor-Komplexe zu bilden, die verallgemeinert als *RNA-induced silencing complexes* bezeichnet werden. Mit Hilfe der eingelagerten RNAs werden die RISCs zu den Zielen (*targets*) der RNAs geleitet, welche als RNAs oder genomische DNA/Chromatin vorliegen, und regulieren diese durch Spaltung der mRNA, translationale Repression oder, im Fall von genomischen Zielen, Chromatin-Modifizierung (Hannon, 2002). Mitglieder der Ago/Piwi Proteinfamilie sind stark konserviert und konnten in allen Spezies identifiziert werden, in denen sRNA-Regulationswege vorkommen (Peters und Meister, 2007). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten werden diese Proteine in drei Klassen unterteilt: Die erste Klasse enthält alle Argonaut-Proteine, die nach ihrem Gründungsmitglied aus Arabidopsis benannt wurden. In der zweiten Klasse werden die Piwis zusammengefasst, die ihren Namen dem PIWI-Protein (*P-element-induced wimpy testis*) aus *D. melanogaster* zu verdanken haben, die dritte Klasse wird ausschließlich von *C. elegans* Proteinen gebildet.

Ago/Piwi Proteine sind etwa 90 kDa groß und zeichnen sich durch drei charakteristische Domänen aus (Parker und Barford, 2006). Die N-terminal gelegene PAZ-Domäne, die auch in Typ-III-Ribonukleasen vorkommt, ist etwa 100-200 AA lang und verdankt ihren Namen den Proteinen, in denen sie zuerst identifiziert wurde, Piwi, Argonaut und

Zwille/Pinhead (Yan et al., 2003). Sie erkennt das 3'-Ende kleiner doppelsträngiger RNAs mit zwei Nukleotide langen 3'-Überhängen, wie sie typisch für Dicer-Spaltungsprodukte sind, um diese in eine vorgeformte hydrophobe Tasche einzulagern. Es konnte gezeigt werden, dass sRNAs zunächst als Duplexe mit Ago/Piwi-Proteinen interagieren, die erst nach der Einlagerung getrennt werden. Der weniger stabil eingelagerte Strang, die „star“-RNA, wird daraufhin durch die Ago/Piwi-Proteine gespalten und aus dem Komplex entlassen (Miyoshi et al., 2005). Die etwa 150 AA lange MID-Domäne formt ebenfalls eine Tasche. Sie erkennt und bindet das 5'-Phosphatende des sRNA-Duplex (Chen et al., 2007). Die MID-Domänen einiger Ago-Proteine enthalten ein Sequenz-Motiv, das Ähnlichkeit zur m7G-Cap Bindedomäne des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors eIF4E aufweist. Dies deutet darauf hin, dass Ago/Piwi-Proteine an m7G-Cap Strukturen ihrer Zielgene binden und so deren Translationsinitiation kontrollieren (Kiriakidou et al., 2007). Die dritte konservierte Domäne innerhalb der Ago/Piwi-Proteine ist die 400-600 AA lange PIWI-Domäne, die in anderen Zusammenhängen auch als RNase H Domäne bekannt ist. Sie fungiert vermutlich als Doppelstrang-spezifische Endonuklease, die die Spaltung der Ziel-mRNAs von sRNAs durchführt. Die Ago/Piwi-Proteine zeigen jedoch Sequenzunterschiede bezüglich des aktiven Zentrums der PIWI-Domäne, so dass nicht alle Familienmitglieder die Fähigkeit zur Endonuklease-Aktivität besitzen (Till et al., 2007).

Vergleichbar mit den Dicer-Proteinen kommen auch von den Ago/Piwi-Proteinen mehrere Vertreter in verschiedenen Organismen vor. Arabidopsis verfügt über zehn konservierte AGO-Proteine (Carmell et al., 2002). AGO1 besitzt Endonuklease-Aktivität und ist für die Spaltung von mRNAs, die Ziele von miRNAs und siRNAs sind, zuständig (Vaucheret et al., 2004). Starke *ago1*-Mutanten zeigen Defekte in den Apikalmeristemen von Blattachsen und Wurzeln (Lynn et al., 1999). Man vermutet, dass AGO1 und AGO10 redundante Funktionen ausüben, da ähnliche Defekte in *ago10*-Mutanten auftreten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass AGO10 AGO1 in der miR165-vermittelten Regulierung von *PHABULOSA* (*PHB*) ersetzen kann (Kidner und Martienssen, 2004). Neben AGO1 und AGO10 besitzen AGO2, AGO3, AGO5 und AGO7 die Aminosäuremotive, die essentiell für die Spaltung von RNA sind (Baumberger und Baulcombe, 2005). Letzteres Protein, auch ZIPPY genannt, spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung von Entwicklungsprozessen, die von tasi-RNAs vermittelt werden (Adenot et al., 2006). AGO4 und AGO6 hingegen üben redundante Funktionen während der Anreicherung von casiRNAs und der Kontrolle von DNA-Methylierung und im TGS verschiedener Loci wie Transposons und repetitiver DNA-Sequenzen aus (Qi et al., 2006; Zheng et al., 2007).

Erst kürzlich konnte in Arabidopsis gezeigt werden, dass die Sortierung und Aufnahme von sRNAs in die verschiedenen AGO-Proteine stark vom 5'-terminalen Nukleotid der sRNA abhängig ist (Mi et al., 2008). So entwickelten sich im Falle von miRNAs überwiegend 5'-Enden mit einem Uridin (Mallory et al., 2004b), sowie eine bevorzugte Interaktion dieser miRNAs mit AGO1. Um miRNA\*s aus AGO1 auszuschließen, bedurfte



es der Evolution eines anderen 5'-terminalen Nukleotids in diesen Molekülen. Diese Art der Unterscheidung zwischen miRNA und miRNA\* scheint besonders wichtig zu sein, wenn die thermodynamische Regel nicht greift, die besagt, dass derjenige Strang in AGO1 eingebaut wird, der das weniger stabile 5'-Ende im Duplex aufweist. So ist im Fall des miR391/miR391\*-Duplex das 5'-Ende der miRNA thermodynamisch stabiler als das der miRNA\*, trotzdem ist es die miRNA, die in AGO1 aufgenommen wird, vermutlich, weil ihr 5'-Ende ein Uridin aufweist (Mi et al., 2008). miR391\* beginnt am 5'-Ende hingegen mit einem Adenin und interagiert mit AGO2-Komplexen. Dieser Mechanismus bietet vermutlich auch eine Möglichkeit, durch DCL1 entstandene Fehler bei der Prozessierung von miRNA/miRNA\*-Duplexen zu kompensieren. Falsch prozessierte miRNAs interagieren womöglich in geringerem Ausmaß mit AGO1, da sie nicht mit einem Uridin beginnen, was die Gefahr von möglichen *off-target*-Effekten minimieren kann (Mi et al., 2008). AGO2 und AGO4 Komplexe werden überwiegend mit sRNAs beladen, die am 5'-Terminus ein Adenin tragen, überraschenderweise interagiert jedoch nur eine geringe Anzahl dieser sRNAs mit beiden Vertretern der AGO-Proteine gleichermaßen. Hier scheint zusätzlich die Größe der sRNAs eine entscheidende Rolle zu spielen sowie ihre eigene und die Lokalisierung der AGOs in der Zelle. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass HYL1, welches zusammen mit DCL1 während der Prozessierung von miRNAs agiert, auch für die Auswahl des Stranges zum Beladen von AGO1 mit miRNAs eine wichtige Rolle spielt (Eamens et al., 2009).

#### 1.1.4 microRNAs in Pflanzen

##### 1.1.4.1 Ursprung und Evolution

Bislang wurden in der Datenbank miRbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org); Griffiths-Jones et al., 2006) fast 11000 identifizierte *MIR*-Gene mit stetig steigender Tendenz aufgenommen (Version 14, September 2009). Unter ihnen sind über 8600 aus Metazoen, über 1500 aus dem Pflanzenreich und über 170 aus Viren registriert. Der größte Anteil von miRNAs in Pflanzen wurde in den Modellorganismen *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa* und *Arabidopsis* identifiziert. Einige miRNA-Familien wie miR156, miR160, miR319 und miR390 sind nicht nur in den Reihen der Gefäßpflanzen hoch konserviert, sondern kommen auch in Moosen vor (Axtell et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass diese miRNAs vor mehr als 425 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind und die miRNA-Maschinerie zu dem Zeitpunkt bereits vorhanden war (Axtell und Bartel, 2005; Zhang et al., 2005). Auch die Beobachtung, dass diese oben genannten miRNAs in den verschiedensten Spezies Gene regulieren, die überwiegend für Transkriptionsfaktoren kodieren und in grundlegende Prozesse wie Meristembildung, Organpolarität, Zellteilung oder hormonelle Kontrolle eingebunden sind, unterstreicht letztere Vermutung (Garcia, 2008). Interessanterweise sind keine der miRNAs, die

kürzlich in der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* identifiziert wurden, in mehrzelligen Pflanzen konserviert (Molnar et al., 2007). Da vermutet wird, dass sich Pflanzen aus grünen Algen entwickelt haben, deutet diese Beobachtung darauf hin, dass die in Pflanzen konservierten miRNAs wichtig für Mehrzelligkeit und Besiedelung des Festlandes waren (Willmann und Poethig, 2007). Andere miRNA-Familien entwickelten sich höchstwahrscheinlich erst nach der Aufspaltung von Landpflanzen und Moosen, jedoch vor der Abzweigung von Monokotylen und Dikotylen vor etwa 125 Millionen Jahren (Adai et al., 2005). Der *inverted duplication* Hypothese zufolge sind *MIR*-Gene aus Duplikationen ihrer Zielgene, die in umgekehrter Orientierung neben dem ursprünglichen Zielgen inseriert wurden, entstanden (Allen et al., 2004). Nach ihrer Transkription konnten die Duplikate Haarnadelstrukturen ausbilden und zu siRNAs prozessiert werden, um Zielgene zu regulieren. Bei vorteilhaften Effekten dieses neuen Gens wurde es im Organismus etabliert und im Laufe der Zeit sammelten sich vermehrt Mutationen an, und die Unterschiede zum ursprünglichen Zielgen wurden mit Ausnahme der miRNA- und miRNA\*-Sequenz immer größer. Schließlich nahm die Haarnadelstruktur mehr und mehr die Form eines miRNA-*precursors* an, und miRNAs wurden produziert. Diese könnten sich gegenüber siRNAs als energetisch günstiger erwiesen haben, da sie die Kosten für *off-targets* und deren Regulierung reduzierten (Voinnet, 2009). Während relativ junge *MIR*-Gene noch erhebliche Sequenzähnlichkeit zu ihren Zielgenen, aus denen sie entstanden sind, zeigen, sind ältere, konservierte *MIR*-Gene nur noch in den Bereichen der miRNA und miRNA\* homolog zu ihren Zielgenen (Allen et al., 2004). Diese bereits oben angesprochenen älteren *MIR*-Gene sind im Allgemeinen stark exprimiert und wurden daher relativ schnell identifiziert. Häufig liegen sie in Form größerer Familien vor, die aus Duplikationen des Ursprungsgens oder kürzerer Segmente gefolgt von weiterer Divergenz und Spezifizierung hervorgegangen sind (Fahlgren et al., 2007). Zusammen mit den *MIR*-Genen wurden auch ihre Zielgene im Laufe der Entwicklung konserviert. Jüngere *MIR*-Gene sind hingegen meist schwächer exprimiert, sind nur als einzelne Gene vertreten und zwischen entfernt oder nah verwandten Spezies nicht konserviert (Zhang et al., 2006). Unter ihren Zielgenen sind zwar auch Gene für Transkriptionsfaktoren, überwiegend regulieren sie jedoch Gene, deren Funktionen weiter gestreut sind (Fahlgren et al., 2007). Verschiedene Studien in *Arabidopsis* haben gezeigt, dass nicht-konservierte miRNAs die konservierten miRNAs in ihrer Anzahl bei Weitem übertreffen, und man vermutet, dass weitere identifiziert werden. Die Anzahl der konservierten *MIR*-Gene hat hingegen vermutlich einen annähernd stabilen Wert erreicht (Fahlgren et al., 2007; Rajagopalan et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Verschiedene Meinungen existieren über die Entstehung und einen möglichen gemeinsamen Ursprung von miRNAs im Tier- und Pflanzenreich. Arteaga-Vazquez et al. (2006) identifizierten zwei miRNAs, miR854 und miR855, die sowohl in *Arabidopsis* als auch in verschiedenen Tieren, jedoch nicht in Pilzen vorkommen. Zwar wurden auch mögliche Familienmitglieder dieser miRNAs, deren Zielgene für im Zellkern lokalisierte

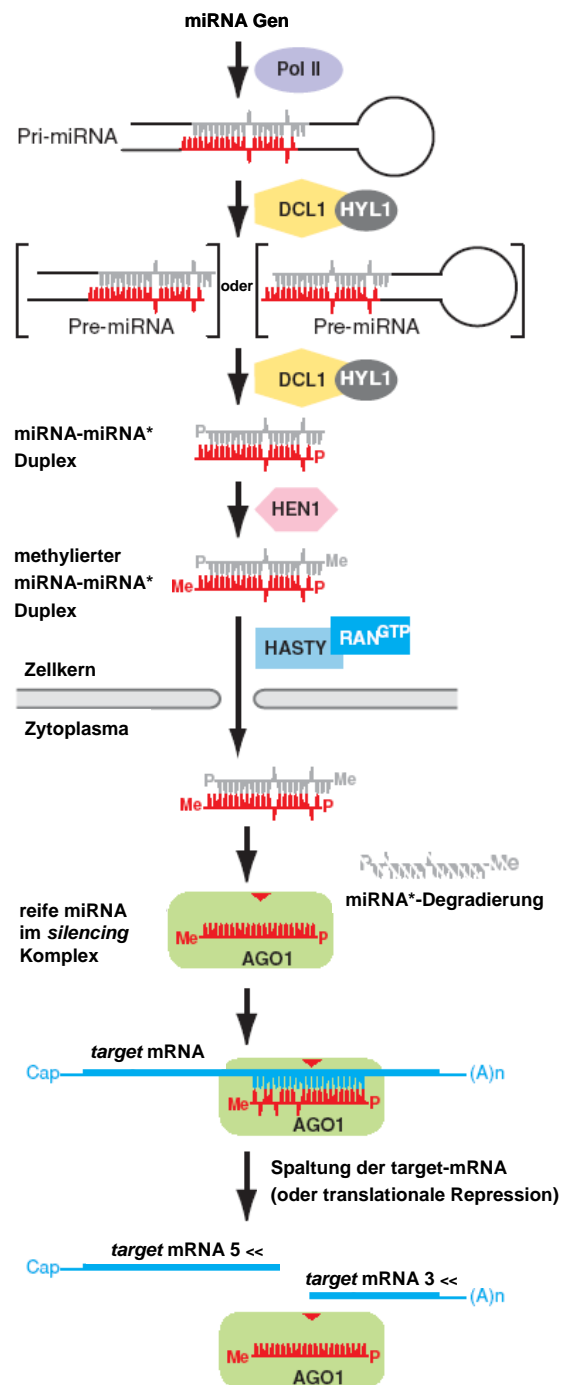
RNA-bindende Proteine kodieren, in Reis gefunden, über ihre Anwesenheit in anderen Arten ist aber nichts bekannt. Die Identifizierung dieser miRNAs sowie die Ähnlichkeiten zwischen Tieren und Pflanzen bezüglich ihrer regulatorischen, miRNA-vermittelten Mechanismen und Biogenesewege sowie die hohe Konservierung der involvierten Faktoren, deuten darauf hin, dass miRNAs nicht unabhängig voneinander in den beiden Reichen entstanden sind (Voinnet, 2009). Piriyaopongsa und Jordan (2008) argumentieren, dass einige pflanzliche miRNAs zu Zwecken der Abwehr aus Transposonelementen hervorgegangen sein könnten, wie es möglicherweise auch in Tieren der Fall war. Diese RNA-basierten Abwehrmechanismen gingen der Evolution der miRNA-Maschinerie wahrscheinlich voraus. Eine andere Annahme besagt, dass miRNAs im Tier- und im Pflanzenreich unabhängig voneinander entstanden sind. Hier wird argumentiert, dass es zu wenig Beispiele gemeinsamer miRNAs gebe und die Biogenesewege zu unterschiedlich seien. Weiterhin sprechen demnach das Fehlen von miRNAs in Schwämmen und Pilzen gegen den gemeinsamen Ursprung in Tieren und Pflanzen (Chen und Rajewsky, 2007).

#### 1.1.4.2 microRNA Biogenese

microRNAs entstehen aus Transkripten, die als *primary* miRNAs (pri-miRNAs) bezeichnet werden. Die meisten von ihnen werden durch die RNA Polymerase II (RNA Pol II) transkribiert (Lee et al., 2004; Cai et al., 2004) und daher durch Splicing, Polyadenylierung des 3'-Endes und *capping* am 5'-Ende posttranskriptionell modifiziert (Kurihara und Watanabe, 2004). In ihrer Größe können miRNA-Primärtranskripte von einigen hundert bis hin zu einigen tausend Nukleotiden variieren (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004; Parizotto et al., 2004). Die meisten *MIR*-Gene liegen in Regionen des Genoms, die nicht mit Protein-kodierenden Genen assoziiert sind. Oft liegen *MIR*-kodierende Loci weit voneinander entfernt, was darauf hindeutet, dass sie eigenständige Transkriptionseinheiten bilden. Andere *MIR*-Gene liegen gehäuft und nahe beieinander im Genom als Cluster vor und zeigen ähnliche Expressionsmuster, was bedeutet, dass sie vermutlich als polycistronische Transkripte exprimiert werden (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Gudetti et al., 2005). Während pflanzliche *MIR*-Gene überwiegend unter der Kontrolle ihrer eigenen Promotoren stehen, wird die Expression tierischer *MIR*-Gene in einigen Fällen von den Promotoren kontrolliert, die zum Protein-kodierenden Gen gehören, in dessen Intron-Bereichen sie liegen (Baskerville und Bartel, 2005). Auf die Transkription der *MIR*-Gene folgt die Reifung der Transkripte. In Pflanzen führt die Typ-III-Ribonuklease Dicer-like 1 (DCL1) an der pri-miRNA zunächst einen Prozessierungsschritt durch, der zur Bildung der *precursor* miRNA (pre-miRNA) führt (Kurihara und Watanabe, 2004; Abb. 1.2). Dieses Zwischenprodukt wird aufgrund seiner Form auch als Haarnadelstruktur (*hairpin*) bezeichnet. Daraufhin wird zeitnah ein weiterer Prozessierungsschritt durch DCL1 an der

pre-miRNA durchgeführt, der das andere Ende der reifen miRNA festlegt, und es kommt zur Ausbildung des so genannten miRNA:miRNA\*-Duplex, der an den 3'-Enden jeweils zwei Nukleotide lange Überhänge trägt (Park et al., 2002; Papp et al., 2003). Die miRNA\*-Moleküle entstammen dem komplementären Arm der pre-miRNA und paaren mehr oder weniger vollständig mit der miRNA-Sequenz (Reinhart et al., 2002). Beide Prozessierungsschritte finden im Zellkern statt (Papp et al., 2003; Xie et al., 2004; Park et al., 2005). Für das Erkennen und Schneiden der richtigen Stelle innerhalb der pri- und pre-miRNA scheint für DCL1 weniger die eigentliche miRNA-Sequenz wichtig zu sein als vielmehr die Sekundärstruktur der pri- bzw. pre-miRNA (Parizotto et al., 2004). Zusätzlich zu DCL1 ist das Protein Hyponastic Leaves 1 (HYL1) an diesen Schritten der miRNA-Reifung in Pflanzen beteiligt, vermutlich durch Hilfestellung bei der Substraterkennung durch DCL1 (Han et al., 2004; Vazquez et al., 2004; siehe auch 1.1.3.2). Nach der Bildung des miRNA:miRNA\*-Duplexes wird dieser durch das Protein Hua Enhancer 1 (HEN1), jeweils an den terminalen Nukleotiden des 3'-Endes methyliert (Yu et al., 2005) und dadurch vermutlich vor zelleigenen Abbauprozessen geschützt (Li et al., 2005; siehe 1.1.3.3). Unsicher ist, ob die miRNA nach der Methylierung als Duplex mit der miRNA\* oder einzeln vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert wird. Jedoch wurde gezeigt, dass der Transport durch HASTY (HST), dem pflanzlichen Ortholog zu Exportin-5, vermittelt wird (Bollmann et al., 2003). Da *hst*-Mutanten lebensfähig sind, wird vermutet, dass miRNAs auch ohne die Hilfe von HST den Weg ins Zytoplasma finden, oder dass ein weiterer Exportweg für miRNAs existiert. Im Zytoplasma wird die reife miRNA in den *RNA-induced silencing complex* eingebaut. Schließlich führt der Ribonukleoproteinkomplex seine Funktion aus, indem er die Expression des miRNA-Zielgens durch Spaltung der Ziel-mRNA, Repression der Translation oder Chromatinmethylierung reguliert (siehe 1.1.2).

Die miRNA-Biogenese in Tieren unterscheidet sich zu der in Pflanzen hauptsächlich durch die Proteine, die die wichtigsten Prozessierungsschritte ausführen und deren Lokalisierung. Das RNase III Enzym Drosha führt zur Freisetzung der pre-miRNA aus der pri-miRNA (Lee et al., 2003), für Drosha liegt in Pflanzen kein Homolog vor. Weiterhin wird die pre-miRNA in Tieren von Dicer erkannt, das sie weiter zum miRNA:miRNA\*-Duplex prozessiert (Grishok et al., 2001; Du und Zamore, 2005). Dieser zweite Schritt findet allerdings, anders als in Pflanzen, im Zytoplasma statt (Yi et al., 2003).



**Abb. 1.2: Modell zur miRNA-Biogenese in Pflanzen**

Nach der Transkription des pflanzlichen *MIR*-Gens wird die pri-miRNA durch Dicer-like 1 (DCL1), unterstützt von HYL1 (Hyponastic Leaves 1) und anderen Faktoren über die pre-miRNA (in Klammern) zum miRNA:miRNA\* Duplex prozessiert. Die 3'-Enden des Duplex werden vermutlich noch im Zellkern durch Hua Enhancer 1 (HEN1) methyliert. Nach dem Transport des Duplex durch HASTY (HST) ins Zytoplasma werden miRNA und miRNA\* vermutlich durch eine Helikase getrennt und die miRNA\* wird abgebaut. Die reife miRNA wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) aufgenommen, der zumeist AGO1 als katalytisches Protein enthält, und die Spaltung der Ziel-mRNA wird vollzogen. (modifiziert nach Jones-Rhoades et al., 2006)

#### 1.1.4.3 microRNA-Identifizierung

Seit der Entdeckung der ersten miRNAs *lin-4* und *let-7* in *C. elegans* und der Identifizierung homologer Gene in den Genomen von Mensch und Fliege erhärtete sich die Vermutung, dass die miRNA-vermittelte Regulation von Genen einen generellen Mechanismus in Eukaryoten darstellen könnte (Reinhart et al., 2000). Daraufhin konnte diese Klasse von kleinen regulatorischen RNAs relativ bald in verschiedenen Organismen wie Tieren, Pflanzen, Pilzen, Protisten und Viren identifiziert werden (Lim et al., 2003; Reinhart et al., 2002; Lin et al., 2009; Hinas et al., 2007, Pfeffer et al., 2004) und auch heute noch kommen stetig neue Mitglieder hinzu. Dementsprechend wurden im Laufe der Zeit verschiedene Ansätze für die Identifizierung von miRNAs entwickelt, die sich ihre spezifischen Charakteristika zunutze machen und sowohl molekularbiologische als auch bioinformatische Methoden beinhalten.

Obwohl die ersten miRNAs in Tieren mittels eines *forward genetic screens* identifiziert wurden (Lee et al., 1993), wurden mit Hilfe dieser zeitaufwendigen Methode zunächst keine pflanzlichen miRNA-Familien entdeckt. Vermutlich ist dafür zum einen die relativ geringe Größe der *MIR*-Gene verantwortlich, die relativ wenig Angriffsfläche für Mutagenese bietet. Zum anderen stellte sich schnell heraus, dass fast alle pflanzlichen miRNAs durch Genfamilien codiert werden und Familienmitglieder vermutlich redundante Funktionen ausüben, so dass dem Verlust eines miRNA-Locus entgegengewirkt werden kann (Jones-Rhoades et al., 2006). Schließlich wurde allerdings neben *MIR-JAW/MIR319* (Palatnik et al., 2003) auch *MIR164c* von Baker et al. (2005) auf diesem Weg entdeckt. Hier lag die Insertion eines Transposons etwa 160 bp aufwärts des *precursors* vor, was zu einem Blütenphänotyp mit zusätzlichen Kronblättern führte.

Einer der ersten und noch heute am meisten genutzte Ansatz zur Identifizierung von miRNAs ist die Klonierung und Sequenzierung kleiner RNAs mit traditionellen molekularbiologischen Techniken. Dieses Vorgehen wurde zunächst für die Identifizierung tierischer miRNAs angewendet (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001) und kurz darauf von verschiedenen Gruppen genutzt, um auch pflanzliche miRNAs ausfindig zu machen (Llave et al., 2002b; Mette et al., 2002; Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Sunkar und Zhu, 2004; Sunkar et al., 2005). Dabei werden zunächst kleine RNAs aus biologischen Proben isoliert, diese werden mit Oligonukleotidadaptoren ligiert und einer Reversen Transkription unterzogen. Anschließend wird die erhaltene cDNA mittels PCR und spezifischer Adaptor-Oligonukleotide amplifiziert, kloniert und sequenziert. Auf diese Weise werden neben miRNAs jedoch auch endogene siRNAs und kleine Abbauprodukte kloniert, die die Identifizierung von miRNAs und ihre Klassifizierung erschweren. Außerdem ist diese Methode eher für miRNAs mit hoher Expressionsstärke geeignet. Schwach exprimierte, gewebespezifische oder induzierte miRNAs werden mit geringer Wahrscheinlichkeit oder

gar nicht kloniert. Neuartige Hochdurchsatz-Sequenziermethoden wie 454-Pyrosequenzierung ermöglichen jedoch durch die Generierung von hunderttausenden individueller Sequenzen pro Gewebe eine höhere und gezieltere Ausbeute verschiedenster kleiner RNAs (Lu et al., 2005; Lu et al., 2006; Fahlgren et al., 2007).

Ein anderer Ansatz bietet die Möglichkeit zur Identifizierung von *MIR*-Genen über *expressed sequence tags* (ESTs). Hier können Homologe von bereits bekannten miRNAs aus gut untersuchten Modellorganismen im gleichen Genom oder im Genom anderer Spezies identifiziert werden, da miRNAs und ihre Zielgene zwischen verwandten Arten oft hoch konserviert sind (Zhang et al., 2006). Nicht-konservierte miRNAs können mit diesem Ansatz jedoch nicht identifiziert werden.

Aufgrund der bereits erwähnten Grenzen zur Identifizierung neuer miRNAs durch experimentelle Methoden wurden ergänzend verschiedene bioinformatische Ansätze entwickelt. Auch hier besteht die Möglichkeit, Homologe von bereits bekannten *MIR*-Genen sowohl im gleichen Genom als auch in den Genomen verwandter Arten zu suchen. Diese Vorgehensweise wurde zunächst sehr erfolgreich in Bezug auf tierische *MIR*-Gene genutzt (Pasquinelli et al., 2000; Lau et al., 2001; Lee und Ambros, 2001; Lagos-Quintana et al., 2002), und sehr bald konnten auch Jones-Rhoades und Bartel (2004) homologe *MIR*-Gene in *Arabidopsis* und *Oryza sativa* identifizieren. DeZulian et al. (2006) entwickelten mit *microHARVESTER* erstmalig ein Programm zur Vorhersage homologer miRNA-Kandidaten in Pflanzen, das frei über das Internet zu nutzen ist. Eine weitaus größere Herausforderung besteht darin, gänzlich neue *MIR*-Gene zu finden. Dies wurde zunächst für *MIR*-Gene in Vertebraten, Nematoden und Fliegen durch die Verwendung von Algorithmen erreicht, die nach konservierten Sequenzen und Sekundärstrukturen zwischen den Spezies suchen, um charakteristische Muster von miRNAs ausfindig zu machen (Lai et al., 2003; Lim et al., 2003). Mit Hilfe dieser Methoden wurde eine große Anzahl potentieller tierischer miRNAs entdeckt, von denen einige auch experimentell bestätigt werden konnten, was für *in silico* vorhergesagte *MIR*-Gene unerlässlich ist. Dennoch konnten diese Methoden aufgrund der längeren und heterogeneren Sekundärstrukturen der *precursor* nicht direkt für die Suche nach pflanzlichen miRNAs eingesetzt werden. Verschiedene Gruppen haben jedoch Algorithmen entwickelt, die besser auf die Eigenschaften pflanzlicher miRNAs und ihrer *precursor* abgestimmt sind (A dai et al., 2005; Bonnet et al., 2004; Jones-Rhoades und Bartel, 2004; Wang et al., 2004). Hier ist die Konservierung von Sekundärstrukturen der *precursor* ebenfalls ein wichtiges Kriterium, jedoch gelten für sie weniger stringente Bedingungen. Einige dieser Ansätze profitierten auch von der hohen Komplementarität zwischen den miRNA-Sequenzen und ihren Bindestellen. Sie setzen voraus, dass ein miRNA-Kandidat Komplementarität zu konservierten mRNA-Sequenzabschnitten zeigt (A dai et al., 2005; Jones-Rhoades und Bartel, 2004). Durch Einbeziehung dieses Kriteriums konnte die Anzahl falsch positiver Kandidaten minimiert werden. Wang et al. (2004) suchten in intergenischen Regionen nach Sequenzen, die Haarnadelstrukturen ausbilden können. Zusätzlich wurden Parameter definiert, die die Charakteristika bereits

bekannter miRNAs einbezogen, wie den GC-Gehalt der reifen miRNA, die Länge der *precursor* und die mindestens 90 %ige Ähnlichkeit der miRNA-Sequenz zu einem miRNA-Kandidaten aus *Oryza sativa*. Dieser Ansatz führte zur Vorhersage von 83 neuen miRNA-Kandidaten, von denen einige durch *Northern Blot* Experimente bestätigt werden konnten und zur Etablierung von acht neuen miRNA-Familien in Arabidopsis beitrugen.

#### 1.1.4.4 Vorhersage und Validierung von miRNA-Zielgenen

Pflanzliche miRNAs zeigen im Gegensatz zu tierischen miRNAs in der Regel hohe Komplementarität zu kurzen Sequenzbereichen in ihren Zielgenen. Diese Eigenschaft erlaubte schon kurz nach der Entdeckung von miRNAs in Pflanzen zuverlässige Vorhersagen der Gene, die von miRNAs reguliert werden (Rhoades et al., 2002; Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Dugas und Bartel, 2004; Jones-Rhoades und Bartel, 2004; Adai et al., 2005). Durch die geringere Komplementarität tierischer miRNAs zu ihren Zielgenen stellte hier die Entwicklung zuverlässiger Vorhersagemethoden eine größere Herausforderung dar. Anfangs wurden viele falsch positive Zielgene vorausgesagt und der Großteil der bisher bekannten miRNA *targets* wurde in Tieren vergleichsweise spät identifiziert (Xie et al., 2005; Brennecke et al., 2005; Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005). Es wurden verschiedene Algorithmen entwickelt, die die besonderen Hybridisierungseigenschaften zwischen miRNAs und ihren Zielsequenzen in Tieren berücksichtigten, wie die ausgeprägte Paarung der Kernregion der miRNAs zu oftmals mehreren Sequenzabschnitten innerhalb der 3'UTR der mRNAs (Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005).

Anfänglich verwendeten Rhoades et al. (2002) einen einfachen *pattern search* Algorithmus, um Zielgene verschiedener miRNAs aus Arabidopsis vorherzusagen. Sie suchten nach komplementären Bereichen zu der jeweiligen miRNA innerhalb des gesamten Arabidopsis Transkriptoms. Bis zu drei Fehlpaarungen waren erlaubt, G:U-Paare wurden als Fehlpaarungen gewertet und ungepaarte Nukleotide (*bulges*) wurden nicht toleriert. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten insgesamt 49 Zielgene für elf der dreizehn bis dahin bekannten *MIR*-Familien vorhergesagt werden, viele Zielgene konnten zudem erfolgreich experimentell validiert werden. Weitere Ansätze nutzten eine ähnliche wie die oben beschriebene Vorgehensweise und konnten weitere miRNA-Zielgene in Arabidopsis und in anderen Pflanzenspezies voraussagen (Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Sunkar und Zhu, 2004; Adai et al., 2005). Palatnik et al. (2003) konnten schließlich zeigen, dass zwischen einer miRNA und ihrer Bindestelle im Zielgen durchaus mehr als drei Fehlpaarungen auftreten können. Sie überexprimierten miR319 in Arabidopsis und führten mRNA Expressions-Arrays durch, die zeigten, dass der mRNA-Gehalt von fünf verschiedenen *TCP* Transkriptionsfaktor-Genen in den transgenen Pflanzen reduziert war. Hier weisen die Bindestellen inklusive G:U-Hybridisierungen bis zu fünf Fehlpaarungen mit miR319 auf. Jones-Rhoades und Bartel



(2004) stellten schließlich einen weiterentwickelten Ansatz vor, in dem zum einen mehr Fehlpaarungen zwischen miRNA und Bindestelle sowie ungepaarte Nukleotide erlaubt waren. Zum anderen bildete die Konservierung von homologen Sequenzen zwischen Arabidopsis und Reis ein weiteres Kriterium. Es wurden jeder Bindestelle gemäß der Bindungseigenschaften, die sie zur miRNA zeigt, ein Wert zugewiesen: Für eine Fehlpaarung wurde der Wert eins zugewiesen, ungepaarte Nukleotide trugen mit eineinhalb Punkten und G:U-Paarungen je mit einem halben Punkt zum Gesamtwert bei. Die Summe aller Werte für eine betrachtete Bindestelle sollte schließlich definitionsgemäß dreieinhalb nicht überschreiten, und die Bindestelle musste in mindestens einer homologen mRNA in Reis identifiziert werden.

Nachdem viele miRNA-Zielgene identifiziert worden waren, formulierten Schwab et al. (2006) einige Regeln betreffend der miRNA:Zielgen Hybride, basierend auf den bereits bekannten und validierten Hybriden, die die Bewertung eines neuen putativen *MIR*-Zielgens erleichtern sollten. In diesem Ansatz wurde der Paarung im 5'-Bereich der miRNA mehr Bedeutung zugewiesen als der des 3'-Bereichs. Nur eine Fehlpaarung wurde außerdem in der miRNA-Region der Nukleotide zwei bis zwölf toleriert, welche auch die mutmaßliche Spaltungsstelle zwischen den Nukleotiden zehn und elf beinhaltet (Kasschau et al., 2003; Llave et al., 2002a). Im 3'-Ende waren Fehlpaarungen von bis zu zwei Nukleotiden erlaubt, und eine perfekte Paarung in dieser Region kompensierte bis zu zwei Fehlpaarungen im 5'-Ende. Die minimale freie Energie eines miRNA:Zielgen Hybrids sollte laut Schwab et al. (2006) mindestens 72 % des Wertes einer perfekten Paarung betragen, und dieser Wert sollte mindestens -30 kcal/mol oder weniger betragen. Diese Parameter nahmen die Autoren auch als Grundlage für die Generierung von künstlichen miRNAs in Arabidopsis.

Zur Verifizierung von miRNA-Zielgenen (*targets*) können verschiedene Methoden eingesetzt werden. Eine der am häufigsten verwendete ist eine modifizierte Variante der 5'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) zur Detektion von miRNA-vermittelten mRNA-Spaltungsprodukten (Jones-Rhoades und Bartel, 2004; Llave et al., 2002a; Mallory et al., 2005; Palatnik et al., 2003; Xie et al., 2003). Hier wird zunächst ein Adaptor-Oligonukleotid an die 5'-Enden der miRNA-vermittelten 3'-Spaltungsprodukte von isolierter Gesamt-RNA ligiert. Daraufhin folgen reverse Transkription und PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden. Nach anschließender Klonierung der PCR-Produkte und Sequenzierung der DNA-Fragmente kann die Position der Spaltung exakt bestimmt werden.

Weiterhin wurden *Nicotiana benthamiana* Blätter einer *A. tumefaciens*-vermittelten Infiltration unterzogen um Spaltungsprodukte von miRNA-Zielgenen zu identifizieren (Llave et al., 2002a; Kasschau et al., 2003). In diesem Ansatz werden die cDNA eines möglichen *targets* und das entsprechende *MIR*-Gen transient in Tabakblättern co-exprimiert und die spezifischen Spaltungsprodukte können entweder durch *Northern Blot* Experimente (Llave et al., 2002a; Kasschau et al., 2003; Palatnik et al., 2003;

Wang et al., 2005) oder mit der oben beschriebenen 5'RACE-Methode analysiert werden (Llave et al., 2002a; Kasschau et al., 2003; Palatnik et al., 2003).

Um zusätzlich zur Validierung der miRNA-Zielgene auch Informationen über ihre Funktion in Pflanzen zu erhalten, können miRNA-resistente cDNAs des Zielgens in Pflanzen exprimiert werden (Palatnik et al., 2003; Bartel, 2004; Kidner und Martienssen, 2004; Mallory et al., 2004a und b; Parizotto et al., 2004). Durch gerichtete Mutagenese werden meist so viele Nukleotide wie möglich innerhalb der miRNA-Bindestelle des potentiellen Zielgens durch stille Mutationen verändert, so dass es nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des kodierten Proteins kommt. Die mutierte cDNA wird *in planta* nicht von der entsprechenden miRNA als *target* erkannt und unterliegt daher nicht ihrer Kontrolle. Unter Verwendung eines starken Promotors kommt es zur Akkumulierung miRNA-resistenter mRNAs und der kodierten Proteine, deren Effekte Hinweise auf die Funktionen von miRNA und Zielgen liefern können. Ein weiterer Ansatz führt auf andere Art zur Akkumulierung von miRNA-Zieltranskripten. Franco-Zorrilla et al. (2007) entdeckten, dass miR399 in Arabidopsis durch die nicht-kodierende RNA des *IPS1* (*Induced By Phosphate Starvation 1*)-Gens reguliert wird. *IPS1* RNA enthält ein komplementäres Sequenzmotiv zu miR399, die unter Phosphat-Mangel induziert wird, jedoch wird die Paarung durch eine kurze ungepaarte Region im Bereich der eigentlichen Spaltungsstelle unterbrochen. Dies führt dazu, dass *IPS1* RNA zwar nicht der miRNA-vermittelten Spaltung unterliegt, die miRNA aber an eine andere RNA als ihre eigentliche Ziel-mRNA *PHO2* gebunden ist. *PHO2* wird somit in geringerem Maße durch miR399 reguliert. Dieses Phänomen wurde von Franco-Zorrilla et al. (2007) als *target mimicry* bezeichnet. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte auch, dass dieses Prinzip ganz einfach auf andere endogene miRNAs und ihre Zielgene in Arabidopsis übertragen werden kann. Sie nutzten *IPS1*, um Zielgen-Imitationen mit nicht-spaltbaren Bindestellen für miR156 und miR319 zu exprimieren, was tatsächlich zur Akkumulierung der jeweiligen Zieltranskripte und der Ausprägung entsprechender Phänotypen führte.

Ein weiterer Ansatz zur funktionalen Analyse beinhaltet die Überexpression von MIR-Genen mit Hilfe starker Promotoren (Schwab et al., 2005; Achard et al., 2004; Wang et al., 2005). Dadurch wurden einerseits pleiotrope Entwicklungsphänotypen erzeugt, andererseits konnten auch häufig keine Effekte festgestellt werden. Dies könnte zum einen bedeuten, dass die untersuchte miRNA und deren Zielgene in diesen Fällen keine limitierenden Faktoren für die Entwicklung der Pflanze waren, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass transkriptionelle oder post-transkriptionelle Mechanismen die miRNA-Überexpression kompensieren können (Mallory und Vaucheret, 2006). Im Fall von miR166a führt deren Überexpression in Arabidopsis sogar zur Letalität (Kim et al., 2005). Ergänzend können an miRNA-überexprimierenden Pflanzen wie oben bereits angedeutet, mRNA Expressions-Arrays durchgeführt werden, in denen eine herabgesetzte mRNA-Menge eines oder mehrerer möglicher Zielgene auf die Regulation der Gene durch die miRNA hindeutet. Auf diese Weise wurden fünf *TCP*-Transkriptionsfaktoren als Zielgene von miR319 identifiziert (Palatnik et al., 2003).

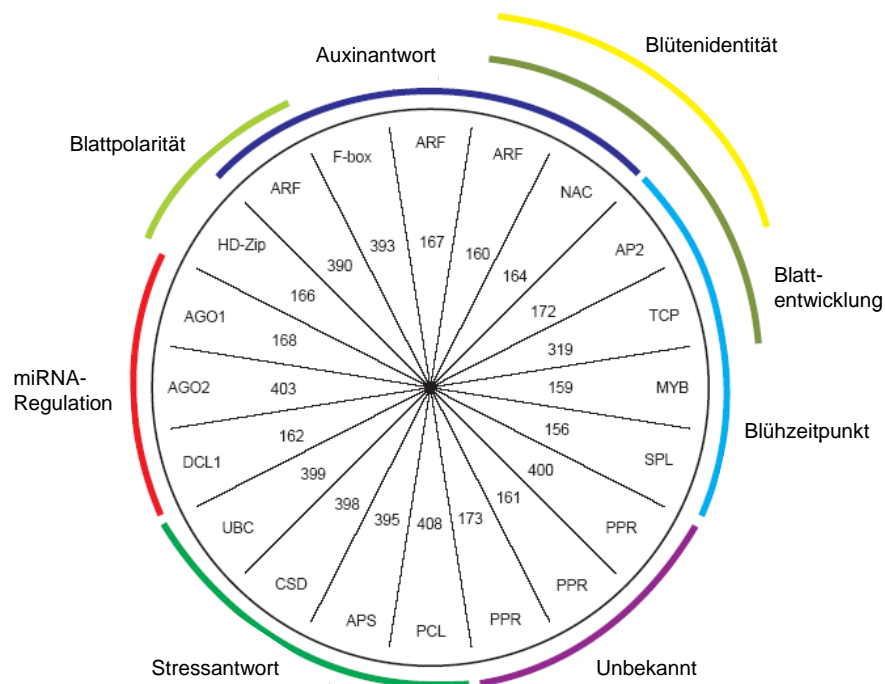
#### 1.1.4.5 Funktionen von microRNAs in Pflanzen

microRNAs spielen eine erhebliche Rolle in verschiedenen Entwicklungsprozessen, in der Regulierung von Haushaltsgenen bis hin zu Antworten auf umweltbedingten Stress. Oft sind sie auch gewebe- oder entwicklungspezifisch exprimiert. Eine große Anzahl von miRNA-Zielgenen kodiert in Arabidopsis für regulatorische Proteine, insbesondere für Transkriptionsfaktoren (Jones-Rhoades et al., 2006; Sunkar und Zhu, 2004, Abb. 1.3). Die hohe Spezifität pflanzlicher miRNAs gegenüber ihren Zielgenen macht die experimentelle oder *in silico* Identifizierung dieser Zielgene im Vergleich zu Tieren einfacher, über sie können miRNAs auf relativ unkomplizierte Weise Funktionen zugewiesen werden. Weiterführende Ansätze bedienen sich der Analyse von miRNA *knockout*- oder Überexpressionsmutanten sowie der Expression von miRNA-*targets* mit mutierten miRNA-Bindestellen. Auf diese Weise konnte verschiedenen miRNAs in Arabidopsis eine Rolle in der Blattmorphogenese und -polarität (Mallory et al., 2004b; Bao et al., 2004), in der Blütendifferenzierung und -entwicklung (Aukerman und Sakai, 2003; Chen, 2004), in der Wurzel- und Seitenwurzelbildung (Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2004a; Guo et al., 2005), Leitbündelentwicklung (Kim et al., 2005) sowie im Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum (Achard et al., 2004; Lauter et al., 2005) zugeordnet werden. Weitere Funktionen liegen in der Regulierung von Auxin-Signalwegen (Kasschau et al., 2003; Mallory et al., 2005; Guo et al., 2005) und der Phosphat-Homöostase (Chiou et al., 2006; Fujii et al., 2005), in der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Sunkar und Zhu, 2004; Navarro et al., 2006) sowie in der Regulierung der miRNA-Biogenese- und Reaktionswege selbst (Rajagopalan et al., 2006; Xie et al., 2003).

Eine der ersten Dokumentationen über die Funktionen von miRNAs in Arabidopsis beschrieb den Einfluss von miR319 (auch als miR<sub>JAW</sub> bekannt) auf die Blattentwicklung. Diese miRNA zeigt unter anderem einen hohen Grad an Komplementarität zu einem konservierten Sequenzmotiv in verschiedenen *TCP*-Genen, und ihre Überexpression führt zu einem Phänotyp mit gewellten Blatträndern und gewölbten Oberflächen (Palatnik et al., 2003). In diesen Pflanzen wurde eine reduzierte Transkriptmenge der Zielgene festgestellt und die durch die miRNA induzierten Spaltungsstellen konnten den miR319-Bindestellen innerhalb der *TCP*-Gene zugeordnet werden. Die konstitutive Überexpression von *TCP2* oder *TCP4* konnte den Wildtyp-Phänotyp nur ansatzweise wiederherstellen (Palatnik et al., 2003). miR159 und miR319, die gemeinsam in eine Familie gegliedert wurden, da sie sich durch nur wenige Nukleotide unterscheiden, regulieren unterschiedliche Gene. Die Überexpression von miR159, die hauptsächlich MYB-Transkriptionsfaktoren reguliert (Gocal et al., 2001), ruft eine fehlerhafte Antherenentwicklung, verminderte Fruchtbarkeit und verspätetes Blühen im Kurztag hervor (Achard et al., 2004), während bei der Expression miRNA-resistenter *MYB33*-Transkripte pleiotrope Defekte wie reduzierte Wuchsform, kürzere Internodien, gestörte Entwicklung von Kotyledonen und Keimlingen auftreten (Millar und Gubler, 2005).

Das Phytohormon Auxin beeinflusst in großem Maße das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen. Die meisten der Effekte werden von *Auxin Response Factor (ARF)*-Genen vermittelt, deren Proteine als Transkriptionsfaktoren an spezifische Elemente in den Promotoren von *auxin response* Genen binden. In Arabidopsis besteht diese Familie aus 23 Mitgliedern und drei verschiedene miRNAs regulieren einige dieser Gene: *ARF10*, *ARF16*, *ARF17* wurden als Zielgene von miR160 bestätigt (Kasschau et al., 2003; Mallory et al., 2005) und die miR167-vermittelte Spaltung von *ARF8* konnte nachgewiesen werden (Kasschau et al., 2003). *ARF3* und *ARF4* werden indirekt durch miR390 über den TAS3-siRNA-Weg reguliert (Allen et al., 2005). Eine Mutation in der miR160-Bindestelle von *ARF17* und dessen Überexpression führt zu dramatischen Entwicklungsdefekten, einschließlich Anomalien der Blattform und Wurzeln sowie in der Symmetrie von Embryos (Mallory et al., 2005).

Interessanterweise wird auch der Biogenese- beziehungsweise Reaktionsweg von miRNAs selbst durch verschiedene miRNAs reguliert. So ist die Expression von *DCL1*, dem Hauptenzym der miRNA-Biosynthese in Arabidopsis, der Kontrolle von miR162 unterstellt (Xie et al., 2003), und höchstwahrscheinlich ist es zusätzlich das Zielgen von miR838 (Rajagopalan et al., 2006). Letztere miRNA stammt aus einem Intron aus der *DCL1* pre-mRNA, so dass von einer negativen *feedback*-Regulation gesprochen werden kann. Die mRNA von *AGO1*, der Schlüsselkomponente von RISC, wird außerdem durch miR168 reguliert. Die Expression einer *AGO1*-Version mit verminderter Komplementarität zu miR168 führt zur Anreicherung von *AGO1*-Transkripten und zu Defekten in der Entwicklung dieser transgenen Pflanzen, die große Ähnlichkeit zu anderen miRNA-Biogenese Mutanten (*dcl1*, *hyl1*) aufweisen (Vaucheret et al., 2004). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass neben der Regulierung von *AGO1* durch miR168 zusätzlich ein siRNA Regulationsweg in die *AGO1*-Homöostase eingreift (Mallory und Vaucheret, 2009). Dabei dienen die Spaltungsprodukte der *AGO1* mRNA, die durch das Einwirken von miR168 erzeugt werden, als Substrate für verschiedene Enzyme wie RDR6 (RNA Dependent RNA Polymerase 6) zur Herstellung von doppelsträngiger RNA und anschließender Prozessierung in siRNAs durch DCL2 und DCL4. Die siRNAs beeinflussen zusätzlich durch Spaltungsaktivität das Niveau der *AGO1* mRNA.



**Abb. 1.3: Funktionen von microRNAs in Pflanzen**

miRNAs sind an der Regulierung von häufig ineinander übergreifenden Netzwerken beteiligt. Einige der in Arabidopsis identifizierten miRNAs sind hier im inneren Kreis zusammen mit ihren Zielgenen (äußerer Kreis) angeordnet. Farbige Markierungen weisen auf gemeinsame Funktionen von miRNAs und Zielgenen hin. Mögliche Interaktionen, die zwischen den einzelnen miRNA-Zielgenen bestehen, sind nicht angegeben. (modifiziert nach Mallory und Vaucheret, 2006)

Des Weiteren wurde der Einfluss von miRNAs in Bezug auf Antworten auf biotischen und abiotischen Stress festgestellt. Unter Sulfat-Mangelbedingungen ist beispielsweise miR395 nachweisbar, was bei Wachstum der Pflanzen unter Standardbedingungen nicht der Fall ist. Die Expression von miR395 führt zur Herunterregulierung von Transkripten der *APS*-Gene, die wichtig für die Assimilierung anorganischer Sulfate sind (Jones-Rhoades und Bartel, 2004). Auf ähnliche Weise wird die Expression von miR399 unter Mangel von Phosphat induziert, so dass die Anreicherung der Transkripte von *UBC* (*Ubiquitin-Conjugating Enzyme*)-Genen herabgesetzt wird. In Folge dessen wird das Phosphat-Transportergen *PT1* induziert und die Elongation des Primärsprosses wird verlangsamt (Fujii et al., 2005; Chiou et al., 2006). Im Gegensatz dazu wird die Expression von miR398 bei Vorliegen von oxidativem Stress gedrosselt, so dass sich die Transkripte der zwei Superoxiddismutasen *CSD1* und *CSD2* (Sunkar et al., 2006) anreichern können. Diese Beispiele zeigen, dass die Regulierung der miRNA-Expression als Antwort auf einen umweltbedingten Stressfaktor die Expression der Zielgene ändert, was der Pflanze die wichtige Möglichkeit zur Akklimatisierung bietet.

### 1.1.5 RNA *silencing* in Pflanzen

Eine weit verbreitete und erfolgreiche Methode, um Gene zwecks Untersuchungen zu ihrer Funktion auszuschalten, ist die T-DNA Mutagenese. Hier wird, vermittelt durch *Agrobacterium tumefaciens*, an zufälliger Stelle im Genom der Pflanze eine T-DNA inseriert. Zerstört diese Insertion ein Strukturgen und ist dieses komplett ausgeschaltet, spricht man von einer Null- oder *knockout*-Mutante (Krysan et al., 1999). Diese Methode erweist sich jedoch als nachteilig, wenn das zu untersuchende Gen einer Multigenfamilie angehört, die resultierende Mutation letal ist oder die Mutante von Interesse erst gar nicht verfügbar ist (Stitt und Sonnwald, 1995). Mit großem Erfolg konnten daher RNA-basierte Ansätze etabliert werden, die allgemein ebenfalls unter *gene silencing* zusammengefasst werden und einige Nachteile der *knockout*-Technik umgehen.

Bereits in den frühen 80er Jahren wurden eher durch Zufall erste Protein-kodierende mRNAs durch RNA-vermitteltes *gene silencing* reguliert. Izant und Weintraub (1984) fanden heraus, dass die Expression langer antisense RNA einen inhibitorischen Effekt auf die entsprechenden kodierenden sense mRNAs in tierischen Zellen hat. Weiterführende Experimente bestätigten diese Beobachtungen und auch in Pflanzen konnte dieser Ansatz erfolgreich etabliert werden (van der Krol et al., 1988). Zum ersten Mal wurde dsRNA als möglicher Auslöser für die gezielte Degradierung von RNA erachtet. Nur kurz darauf wurde ein ähnliches Phänomen unter dem Begriff Kosuppression bekannt. Hier führte die starke Expression eines sense Transgens sowohl zur reduzierten Expression des Transgens als auch zu der des homologen endogenen Gens (Napoli et al., 1990). Mit Aufdeckung der sRNA-Reaktionswege ist mittlerweile deutlich geworden, dass beide Erscheinungen durch kleine RNAs vermittelt werden, die entweder aus sense-antisense RNA-Hybriden oder aus doppelsträngiger RNA, die durch RNA-abhängige RNA Polymerasen generiert wird, produziert werden. Mit der Erzeugung von siRNAs aus langen Haarnadelstrukturen (*hairpins*) wurde eine noch effektivere Methode zur Regulierung pflanzlicher Gene entwickelt (Wesley et al., 2001). Hier tragen die entsprechenden Konstrukte eine DNA-Sequenz sowohl in sense- als auch in antisense-Orientierung, so dass nach der Transkription auf einfache Weise die Faltung zu doppelsträngiger RNA vollzogen wird. Transformierte Pflanzen können auf diese Weise eine Verringerung der Zielgen-Expression von bis zu 90 % zeigen (Smith et al., 2000; Kerschen et al., 2004). Man spricht in diesem Zusammenhang von RNA-Interferenz (RNAi).

Während die erwähnten Ansätze unter PTGS zusammengefasst werden, wurden auch weniger häufig genutzte Methoden entwickelt, bei denen die Zielgene auf Ebene der DNA reguliert werden, was als TGS bezeichnet wird (Aufsatz et al., 2002). In diesem Fall entstammen die siRNAs *hairpin*-formenden Transgenen, die nicht-kodierende, promotor-nahe Sequenzen enthalten und die Methylierung von DNA oder Chromatinmodifizierungen mit sich bringen. Weiterhin wurde Virus-induziertes *gene*

*silencing* (VIGS) erfolgreich in Pflanzen etabliert (Baulcombe, 1999). Diese Methode nutzt die Fähigkeit von Pflanzen aus, virale RNA zu erkennen und deren Verbreitung im Organismus zu unterdrücken (Molnar et al., 2005). In das virale Genom wird die entsprechende pflanzliche Sequenz eingebracht, was nach der Infektion einer Pflanze mit dem Virus zur Produktion von siRNAs führt, die auf effektive Weise das pflanzliche Zielgen regulieren. Die Regulierung kann dann abhängig von der Größe der generierten siRNAs sowohl über PTGS als auch über TGS erfolgen. Da viele Viren Proteine kodieren, die pflanzliche RNA-vermittelte Abwehrreaktion unterdrücken sollen, hat es sich für ein effizientes *silencing* als vorteilhaft erwiesen, mit Viren zu arbeiten, die nur eine schwache Unterdrückung der siRNA-Antwort übertragen (Watson et al., 2005).

Mit der Entdeckung von miRNAs hat sich eine weitere Möglichkeit zur gezielten sRNA vermittelten Genregulierung ergeben. Diese Methode nutzt endogene miRNA *precursor* aus, um aus ihnen miRNAs von gewünschter Sequenz prozessieren zu lassen. Hier werden die Sequenzen der natürlichen miRNA und miRNA\* gegen die entsprechenden neuen ausgetauscht ohne dabei strukturelle Merkmale wie Fehlpaarungen oder ungepaarte Nukleotide zu verändern. Dieser Ansatz ist unter den Begriffen künstliche (*artificial*) oder synthetische microRNA-Technologie (amiRNA- oder smiRNA-Technologie) bekannt geworden. Zum ersten Mal wurde er in menschlichen Zellen erfolgreich angewendet (Zeng et al., 2002) und nur kurze Zeit später konnte er auch von Parizotto et al. (2004) in Arabidopsis etabliert werden. Diese Gruppe konnte die Expression des Reportergens *GFP* anhand einer künstlichen miRNA, basierend auf dem *precursor* von *MIR171*, in Tabak herunter regulieren. Andere Publikationen zeigten kurz darauf, dass auch endogene Gene in Arabidopsis mit Hilfe dieses Ansatzes gezielt reguliert werden können (Alvarez et al., 2006; Schwab et al., 2006).

## 1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport

In der vorliegenden Arbeit wurde die smiRNA-Technik für die Generierung von *knockdown*- Mutanten eingesetzt. Eine Anwendung bestand in dem multiplen *knockdown* von Mitgliedern einer kleinen Genfamilie in Arabidopsis, die für die zytosolischen Poly(A)-bindenden Proteinen (PABPCs) kodieren. In den folgenden Abschnitten werden die Funktionen der PABPCs in einem größeren biologischen Kontext und im Detail erläutert.

### 1.2.1 Kernhülle und Kernporenkomplexe

Im Gegensatz zu Prokaryoten besitzen eukaryotische Zellen einen Kern, der durch die Kernhülle (*nuclear envelope*, NE) vom Zytoplasma getrennt wird. Diese Kompartimentierung führt zur räumlichen Trennung fundamentaler zellulärer Vorgänge wie Transkription und Translation. Dabei dient die Kernhülle nicht nur der Verankerung der im Zellkern befindlichen Chromosomen, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Dissoziation und Reassoziierung des Zellkerns während der Mitose (Rose et al., 2004). Außerdem ermöglicht sie den gezielten und regulierten Austausch von Substraten zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. Kernproteine wie Histone oder Transkriptionsfaktoren werden im Zytoplasma synthetisiert und müssen in den Kern importiert werden, wohingegen tRNAs, rRNAs und mRNAs nach ihrer Synthese vom Nukleus ins Zytoplasma exportiert werden, um dort ihre Aufgaben ausführen zu können (Rose et al., 2004). Auf diese Weise trägt die Kompartimentierung zur effizienten Verarbeitung und Regulierung von genetischer Information bei.

Die Kernhülle besteht aus der äußeren und inneren Kernmembran, die durch den so genannten perinukleären oder periplasmatischen Raum getrennt sind. Dieser Raum steht in enger Verbindung mit dem Lumen des endoplasmatischen Retikulums, in welches die äußere Kernmembran kontinuierlich übergeht (Rose et al., 2004). In die Kernhülle eingelagert befinden sich zahlreiche Kernporenkomplexe (*nuclear pore complexes*, NPCs), die beide Membranen vollständig durchdringen und so die Verbindung zwischen Kern und Zytoplasma herstellen (Vasu und Forbes, 2001). Über sie wird der kontinuierliche und selektive Transport von Makromolekülen gewährleistet (Ryan und Went, 2000; Fahrenkrog et al., 2001). Die NPCs sind ringförmige Strukturen mit oktagonaler Symmetrie. Sowohl auf zytoplasmatischer als auch auf karyoplasmatischer Seite werden die Poren von einem Ring gebildet, der aus acht globulären Untereinheiten besteht. Ins Zytoplasma reichen acht bis zu 50 nm lange Filamente, auf Seiten des Zellkerns liegen ebenfalls acht Filamente vor, die mit einer Länge von bis zu 100 nm eine korbähnliche Struktur ausbilden (Adam, 2001; Akey und Rademacher, 1993). Die zwei Ringe sind über ein Speichensystem miteinander verbunden, welches einerseits der Verankerung der NPC in der Kernhülle dient und



andererseits einen zentralen Transportkanal formt, die eigentliche Kernpore (Akey und Radermacher, 1993).

NPCs fungieren als eine Art selektive Pforte, die den Kernimport und -export von Molekülen durch passive oder erleichterte Diffusion zulassen (Mataj und Englmeier, 1998). Kleine Makromoleküle, Ionen und Metabolite können frei durch das Lumen der NPCs hindurch diffundieren, unterliegen also einem passiven Transport. Die Diffusion wird allerdings ab einem Molekulargewicht der zu transportierenden Moleküle von 40 bis 60 kDa (Haasen et al., 1999) sehr ineffizient und kann eine große Zeitspanne in Anspruch nehmen (Bohnsack et al., 2002). Größere Makromoleküle wie beispielsweise ribosomale Untereinheiten werden daher über die so genannte erleichterte Diffusion aktiv durch die NPCs transportiert (Panté und Kann, 2002), was unter Zufuhr metabolischer Energie auch den Transport gegen einen Konzentrationsgradienten erlaubt. Allerdings werden auch Proteine und RNA-Moleküle, die kleiner als 40 kDa sind, aktiv durch die NPCs transloziert. Dadurch kann dieser Prozess bezüglich seiner Geschwindigkeit und Selektivität kontrolliert werden. NPCs von Vertebraten bestehen aus 50-100 unterschiedlichen Proteinen, den so genannten Nukleoporinen (Nakielny und Dreyfuss, 1999; Vasu und Forbes, 2001). Viele dieser Proteine kleiden den zentralen Transportkanal aus und sind direkt an der Translokation von Makromolekülen beteiligt. Häufig besitzen sie Phenylalanin-reiche Regionen mit einem charakteristischen Cluster aus hydrophoben und dazwischen liegenden hydrophilen Resten (Ryan und Went, 2000). Diese so bezeichneten FG-Repeats spielen vermutlich eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Permeabilität von Kernporenkomplexen und die gerichtete Translokation von Molekülen (Frey und Görlich, 2007).

### 1.2.2 Import und Export von Proteinen

Kerntransportrezeptoren, auch Karyopherine genannt, vermitteln den aktiven Transport von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma. Sie erkennen bestimmte Proteinsignale und vermitteln durch die Interaktion mit Nukleoporinen des NPCs den Transport in den Kern beziehungsweise aus dem Kern heraus. Die größte Gruppe unter den Kerntransportrezeptoren bildet die Importin  $\beta$  Superfamilie. Ihre Mitglieder interagieren mit bestimmten Nukleoporinen, was die kontinuierliche Translokation zwischen Kern und Zytoplasma ermöglicht. Charakteristischerweise erkennen sie außerdem bestimmte Klassen von Makromolekülen als Cargoproteine und zeigen Interaktion mit der regulatorischen GTPase Ran in GTP-gebundener Form (Moore und Blobel, 1993). Man unterscheidet Importine, die als Rezeptoren für den Transport von Proteinen in den Kern verantwortlich sind und Exportine, die Proteine aus dem Kern heraus ins Zytoplasma transportieren (Weis, 1998).

Der Export von Proteinen aus dem Zellkern wird von einem zur Importin  $\beta$  Familie gehörenden Exportrezeptor, der Exportin 1 (XPO1) genannt wird, vermittelt. Exportin 1 erkennt Kernexportsignale (*nuclear export signal*, NES) in Proteinen, die sich durch kurze Aminosäure-Sequenzen auszeichnen, in denen in spezifischen Abständen Leucine oder andere langkettige, hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin, Valin, Phenylalanin oder auch Methionin auftreten (Hutten und Kehlenbach, 2007). In Kooperation mit Ran-GTP bindet XPO1 im Zellkern an die NES des zu transportierenden Cargoproteins und vermittelt mit Hilfe spezifischer Nukleoporine die Translokation des trimeren Komplexes ins Zytoplasma (Neville et al., 1997). Dort katalysieren RanBP1 (*Ran binding protein 1*) und RanGAP (*Ran-specific GTPase activating protein*) kooperativ die Hydrolyse von Ran-GTP, so dass die Substrataffinität von Exportin 1 stark reduziert wird und der Exportkomplex dissoziiert. Das Cargoprotein wird ins Zytoplasma entlassen und XPO1 steht nach Rückkehr in den Zellkern durch Interaktion mit spezifischen Nukleoporinen des NPCs für einen weiteren Exportvorgang zur Verfügung (Bischoff et al., 1995; Becker et al., 1995; Bischoff und Görlich, 1997).

### 1.2.3 Export von mRNA

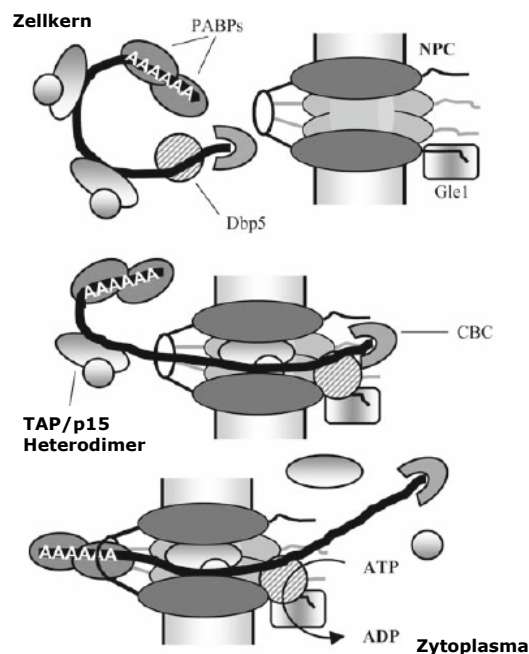
Neben Proteinen müssen auch RNA-Moleküle verschiedener Klassen vom Kern ins Zytoplasma transportiert werden. Dieser Transportmechanismus ist ebenfalls Signal- und Rezeptor-vermittelt und schließt verschiedene hoch konservierte Faktoren wie RNA-bindende Proteine, NPC-assoziierte Proteine und Exportrezeptoren ein. mRNA wird in Form von Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs) ins Zytoplasma transportiert, welche bereits während der mRNA-Synthese durch die Bindung der ersten Proteine an das wachsende Molekül entstehen. Vor allem in Hefe und Säugern wurde der mRNA-Exportmechanismus untersucht und viele beteiligte Faktoren konnten identifiziert werden. In Hefe wurde der entsprechende Exportrezeptor für mRNA, der nicht zur Klasse der Importin  $\beta$ -Rezeptoren gehört, Mex67p benannt, im Menschen heißt das entsprechende Gegenstück TAP/NXF1 (Segref et al., 1997; Gruter et al., 1998; Katahira et al., 1999). Sie bilden einen Komplex mit Mtr2p in Hefe beziehungsweise p15/NXT1 im Menschen (Santos-Rosa et al., 1998; Gruter et al., 1998). Das jeweilige Heterodimer vermittelt die Translokation durch den NPC, indem Mex67p beziehungsweise TAP/NXF1 über ihre RRM's an die mRNA binden und zusammen mit Mtr2p beziehungsweise p15/NXT1 mit FG-Motiven ausgewählter Nukleoporine der NPCs interagieren. Mtr2p und p15/NXT1 weisen zwar keine signifikanten Ähnlichkeiten in ihren Sequenzen auf, aber Mutationen in *mex76p* und *mtr2p* können durch die Koexpression von TAP und p15/NXT1 komplementiert werden. Dies deutet auf sehr ähnliche Funktionen der Heterodimere hin (Katahira et al., 1999). Mex67p und TAP/NXF1, die zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her wandern, besitzen nachweislich jeweils zwei funktionale NESs (Murphy und Wentz, 1996; Segref et al., 1997; Thakurta et al., 2004).

Werden Hefe- oder Säugerzellen mit Leptomycin B, einem Inhibitor für Exportin 1 behandelt, führt dies zur Akkumulation von mRNA im Kern. Inwieweit Exportin 1 am Export von mRNA aus dem Kern beteiligt ist, ist allerdings noch unklar.

Für den effizienten Transport von mRNPs aus dem Zellkern sind allerdings noch weitere Proteine vonnöten. So bindet in Hefe die RNA-abhängige ATPase und Helikase Dbp5 kotranskriptional an das 5'-Ende der naszierenden prä-mRNA und bleibt mit dieser bis zum Eintritt ins Zytoplasma verbunden. Auch die Proteine des Cap-Bindekomplexes (*cap-binding complex*, CBC), die sich an das 5'-Ende der wachsenden mRNA anlagern, begleiten die mRNPs bis ins Zytoplasma (Hodge et al., 1999; Schmitt et al., 1999). Weiterhin beeinflussen die Modifizierung des 3'-Endes und die anschließende Anlagerung von Proteinen, vor allem der Poly(A)-bindenden Proteine (PABPs) den mRNA-Export in Hefe (Brune et al., 2005; Dunn et al., 2005).

Aufgrund ihrer Größe von mehr als 50 MDa (Cole und Scarcelli, 2006) müssen mRNP-Komplexe zumindest teilweise aufgelöst werden um die NPCs passieren zu können, eine reine Diffusion der gesamten Komplexe ist sehr unwahrscheinlich. Vermutlich wird die mRNA über ATP-Hydrolyse mit dem 5'-Ende voran durch den Transportkanal der NPCs gezogen (Cole und Scarcelli, 2006; Politz et al., 2006). Nach dem von Merkle (2008) modifizierten Modell von Cole und Scarcelli (2006) und Stewart (2007), bindet Dbp5 an spezifische Nukleoporine der zytoplasmatischen Filamente und dessen ATPase-Aktivität wird durch Gle1, eine Komponente der zytoplasmatischen Filamente, und Phosphoinositid IP<sub>6</sub>, einen zytosolischen Kofaktor, stimuliert (Cole und Scarcelli, 2006). Die Helikase-Funktion von Dbp5 schränkt vermutlich zusätzlich die Bildung von mRNA-Sekundärstrukturen ein, um das Eintreten des mRNPs ins Zytoplasma zu vereinfachen. Unterstützt durch die ATP-Hydrolyse durchquert der mRNP-Komplex den NPC, was eine Umstrukturierung des mRNPs auf der zytoplasmatischen Seite bewirkt und die Dissoziation von nicht mehr benötigten Exportfaktoren nach sich zieht. So könnten die Rückkehr des mRNPs in den Zellkern verhindert und Direktionalität des Transportvorgangs erzielt werden (Abb. 1.4).

Der mRNA-Export in Pflanzen ist bislang wenig verstanden, einige beteiligte Proteine wie der Cap-Bindekomplex bestehend aus CBC80 und CBC20 (Kmieciak et al., 2002) konnten in Arabidopsis jedoch identifiziert werden. Als möglicher homologer Kandidat für Dbp5 aus Hefe wurde die RNA-Helikase LOS4 gefunden (Gong et al., 2005), als Homologon zum humanen p15/NXT1 gilt NTL (*NTF2-like*; Zhao et al., 2006). Für Mex67p und TAP/NXF1 konnte in Arabidopsis bislang kein homologer Kandidat identifiziert werden. Einzig eine sehr schwache Sequenzähnlichkeit zwischen AtSDE5, welches in die Generierung von tasiRNAs involviert ist, und der TAP-C Domäne wurde beschrieben (Hernandez-Pinzon et al., 2007), jedoch fehlen weiterführende Studien, um eine Funktion von SDE5 beim Export von mRNA zu belegen.



**Abb. 1.4: Hypothetisches und vereinfachtes Modell für den Kernexport mRNA**

Mit dem 5'-Ende der mRNA voran erreicht der mRNP-Komplex den Kernporenkomplex (NPC). Seine Translokation wird durch die Interaktion des Exportrezeptorkomplexes TAP/p15 (im Fall von Säugern) mit spezifischen Nukleoporinen des NPC vermittelt. Die ATPase Dbp5 interagiert hingegen mit Nukleoporinen der zytoplasmatischen Filamente, unter anderem mit Gle1 und Phosphoinositid  $IP_6$ , welche die ATPase-Aktivität stimulieren. Der mRNP-Komplex wird, angetrieben durch die ATP-Hydrolyse, durch den NPC gezogen und die beteiligten Exportfaktoren dissoziieren, so dass der Wiedereintritt des mRNP in den Kern verhindert wird. (nach Merkle (2008); modifiziertes Modell nach Cole und Scarcelli (2006) und Stewart (2007))

#### 1.2.4 Poly(A)-bindende Proteine

Die in Eukaryoten hoch konservierten Poly(A)-bindenden Proteine (PABPs) bilden den Hauptbestandteil von Proteinen in mRNPs, welche zahlreiche weitere Proteine und natürlich mRNA enthalten. PABPs gehören zur Klasse der RNA-bindenden Proteine (RBPs), die sich durch RNA-Bindedomänen (*RNA recognition motifs*, RRM) auszeichnen (Hecht et al., 1997). Basierend auf ihrer bevorzugten subzellulären Lokalisation werden sie in zwei Gruppen unterteilt. Während die PABPCs überwiegend im Zytoplasma lokalisiert sind, zeigen die PABPNs vor allem eine Lokalisation im Zellkern. Außerdem liegen auch strukturelle und funktionelle Unterschiede vor (Kühn und Wahle, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit waren jedoch nur die zytosolischen PABPs von Interesse. Sie binden nachweislich an den Poly(A)-Schwanz von mRNAs und sind in Prozesse wie die Translationsinitiation, mRNA-Biogenese (Belostotsky, 2003) und mRNA-Stabilität (Palanivelu et al., 2000b) involviert.

##### 1.2.4.1 Struktur zytosolischer PABPs

Im Allgemeinen besitzen PABPCs vier aufeinander folgende RRM an ihrem N-Terminus (Abb. 1.5). Diese vermitteln die kooperative Bindung der Proteine an Poly(A)-Schwänze von mRNAs. Durch diese Interaktion wird die Deadenylierung und damit Degradierung der mRNAs verhindert (Bernstein et al., 1989). Die verschiedenen RRM eines Proteins können sich stark voneinander unterscheiden, während die einzelnen RRM zwischen

verwandten PABPs eine deutliche Ähnlichkeit aufweisen (Palanivelu et al., 2000a). Daher wird vermutet, dass sie unterschiedliche Funktionen im Protein übernehmen. Khanam et al. (2006) konnten anhand von Deletionsstudien und Protein-RNA Bindungsassays *in vitro* zeigen, dass das Zusammenspiel der verschiedenen RRM entscheidend für die Bindungsaffinität des Proteins zur mRNA ist. So binden RRM1 und RRM2 sowie RRM3 und RRM4 jeweils in Kombination mit besonders hoher Affinität an lange Adenosinsequenzen. Letztere RRM-Kombination interagiert auch mit Bereichen, die nicht ausschließlich aus Adenosinen bestehen. Andere RRM in Kombination, wie RRM2 und RRM3 zeigen eine vergleichsweise schwache Bindung zum Poly(A)-Schwanz (Khanam et al., 2006).

Des Weiteren besitzen die meisten PABPCs eine hoch konservierte PABC-Domäne an ihrem C-terminalen Ende (Kozlov et al., 2001; Mangus et al., 2003; Abb. 1.5). Dieser auch CTC-Domäne genannte Bereich vermittelt Interaktionen mit Proteinen, die eine PAM2-Domäne (*PABP-interacting motif 2*) besitzen. Die Struktur der etwa 74 Aminosäure-langen humanen CTC-Domäne wurde mittels NMR Spektroskopie bestimmt. Diese Untersuchung ergab, dass die Domäne fünf  $\alpha$ -Helices ausbildet, die in Form eines Pfeils angeordnet sind (Kozlov et al., 2001).



**Abb. 1.5: Der strukturelle Aufbau zytosolischer PABPs**

Die meisten Mitglieder zytosolischer Poly(A)-bindender Proteine (PABPCs) zeichnen sich durch vier aufeinander folgende *RNA recognition motifs* (RRMs) am N-Terminus und eine konservierte CTC- oder PABC-Domäne am C-Terminus aus.

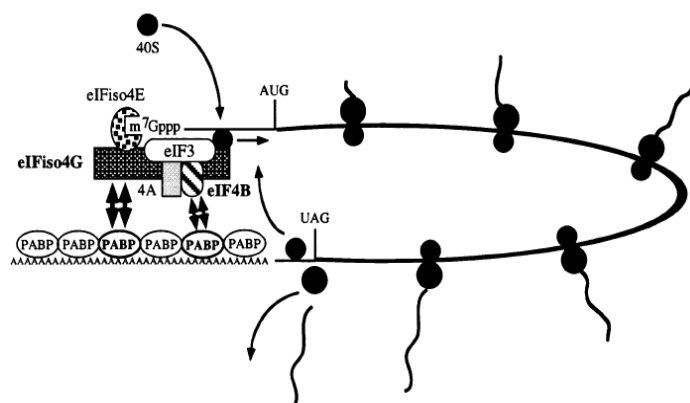
#### 1.2.4.2 Funktionen zytosolischer PABPs

Am besten charakterisiert sind das PABPC-Gen und das Protein in *S. cerevisiae*. Hier kommt, wie in anderen einzelligen Organismen auch, nur ein entsprechendes Gen vor, welches Pab1p benannt wurde (Sachs et al., 1987). Pab1p ist in Hefe essentiell (Sachs et al., 1987) und auf vielfache Weise in den Metabolismus von mRNA involviert, wobei jedoch jeglicher Hinweis auf eine eigene katalytische Aktivität fehlt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Pab1p bereits während der Prozessierung des 3'-Endes neu synthetisierter mRNA eine Rolle spielt. Sowohl *in vivo* (Sachs und Davis, 1989; Brown und Sachs, 1998) als auch *in vitro* (Amrani et al., 1997; Brown und Sachs, 1998) konnte der Einfluss von Pab1p auf die Länge des Poly(A)-Schwanzes von mRNA nachgewiesen werden. Vermutlich führt die Interaktion mit einer Pab1p-abhängigen Poly(A)-Nuklease (PAN) und deren Exonukleaseaktivität zur erforderlichen

Prozessierung des mRNA 3'-Endes (Siddiqui et al., 2007), gefolgt vom Einwirken einer Poly(A)-Polymerase. Weiterhin wurde gezeigt, dass Pab1p die Translation auf verschiedene Arten stimuliert. Einerseits bindet das Protein an Poly(A)-Schwänze von mRNAs und interagiert gleichzeitig mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G (Abb. 1.6). eIF4G liegt als Komplex mit eIF4E und eIF4A vor und bildet mit ihnen einen 5'-Cap-Bindekomplex (Gingras et al., 1999). eIF4E bindet direkt an die 5'-Cap-Strukturen von mRNAs, während eIF4A als Helikase zur Entwindung der 5'-UTR von mRNAs führt, was die anschließende Anlagerung der Ribosomen erleichtert (Rogers et al., 2001). Die Rekrutierung der 40S ribosomalen Untereinheit an die mRNA durch die Pab1p-eIF4G Interaktion stabilisiert zusätzlich den gesamten Initiationskomplex (Sachs et al., 1997). Außerdem führt diese Interaktion nach dem *closed-loop* Modell von Jacobson et al. (1996) durch die Zusammenführung von 5'- und 3'-Ende zur Zirkularisierung der mRNA, was möglicherweise das Recycling der Ribosomen erleichtert (Belostotsky, 2003). Zusätzlich trägt die Zirkularisierung vermutlich zur Stabilisierung der mRNA bei, da das Poly(A)-Ende vor Angriffen von Deadenylasen geschützt wird (Siddiqui et al., 2007). Unter Umständen inhibiert Pab1p auch das Decapping der mRNA, was weiterhin die Stabilität des Transkriptes unterstützt (Bernstein et al., 1989; Caponigro und Parker, 1996). Gleichzeitig scheint Pab1p aber auch in die Deadenylierung während der Degradierung von mRNA im Zytoplasma involviert zu sein, da auch hier der Interaktionspartner PAN eine wichtige Rolle spielt (Mangus et al., 2004). Pab1p könnte die Initialisierung der mRNA-Degradierung unterstützen, nicht aber den Prozess an sich beschleunigen (Chekanova und Belostotsky, 2003; Belostotsky, 2003). Vermutlich sind für die Spezifität der verschiedenen Prozesse, in die Pab1p involviert ist, wie mRNA-Prozessierung, Stabilisierung der mRNA und Initiation der Translation unterschiedliche Faktoren vonnöten, die in Abhängigkeit von ihrer zellulären Lokalisierung um die Interaktion mit Pab1p konkurrieren. Dunn et al. (2005) zeigten, dass Pab1p ein nicht-essentielles Kernexportsignal (NES) nahe dem N-Terminus besitzt und sowohl über einen Exportin1-abhängigen Mechanismus, als auch über die Verbindung mit mRNA zwischen Nukleus und Zytoplasma pendeln kann. So kann Pab1p als Vermittler zwischen mRNA-Biogenese und mRNA-Export angesehen werden (Dunn et al., 2005; Chekanova und Belostotsky, 2003).

Im Mensch wurden drei Pab1p Homologe identifiziert, PAB1, PAB2 und PAB3. Ihnen konnten ganz ähnliche Funktionen zugewiesen werden, wie sie für Pab1p in Hefe ermittelt wurden. So ist PAB1 an der Translation und am Umsatz von mRNA beteiligt, PAB2 spielt eine wichtige Rolle bei der Polyadenylierung von mRNA, und PAB3 wurde als Testis-spezifisch identifiziert (Craig et al., 1998; Khaleghpour et al., 2001). Außerdem wurden konservierte PAB-Proteine in *Aspergillus nidulans* (Marhoul und Adams, 1996), *C. elegans* (Crittenden et al., 2002) und *D. melanogaster* gefunden (Sigrist et al., 2000), wo sie essentiell für die Vitalität der verschiedenen Organismen sind.

a



**Abb. 1.6: Die Rolle von zytosolischen Poly(A)-bindenden Proteinen während der Initiation der Translation**

Protein-Interaktionen, die für die Einleitung der Translation benötigt werden, sind durch Doppelpfeile kenntlich gemacht. PABPCs interagieren in Pflanzen mit eIF4G und eIF4B, während sie gleichzeitig an den Poly(A)-Schwanz einer mRNA gebunden sind. Dies führt zur Zirkularisierung der mRNA, was zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt und vermutlich das Recycling der Ribosomen während der Translation unterstützt. eIF4A, B, E, G und eIF3: Translationsinitiationsfaktoren; m7Gppp: 5'-Cap-Struktur; 40S: kleine ribosomale Untereinheit. (nach Gallie, 1998)

#### 1.2.4.3 Zytosolische PABPs in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis* konnten acht *PABPC*-Gene identifiziert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Proteinsequenzen, Übereinstimmungen im Expressionsmuster und Analysen der Intronanzahl und -lage wurden sie in vier Klassen unterteilt (Belostotsky, 2003). Klasse I umfasst *PAB3* und *PAB5*, die überwiegend in reproduktivem Gewebe exprimiert werden. Belostotsky und Meagher (1996) zeigten, dass *PAB5* im Pollen, in Samenanlagen und während der Embryonalentwicklung exprimiert ist. Beide Mitglieder der Klasse I sind vermutlich spezifische Faktoren während der Gametogenese und der frühen Entwicklung. Die zweite Klasse, die *PAB2*, *PAB4* und *PAB8* umfasst, zeigt generell eine sehr starke und ubiquitäre Expression (Hilson et al., 1993; Palanivelu et al., 2000b; Belostotsky, 2003) zeigten zwar, dass *Arabidopsis PAB2* RNA und Protein in Wurzeln, Stängel, Blättern, Blüten, Pollen und Schoten exprimiert werden, jedoch wird die Expression im jeweiligen Organ örtlich und zeitlich spezifisch reguliert. Beispielsweise zeigt sich die Expression in Wurzeln als begrenzt auf das Leitbündel- und Meristemgewebe. Weiterhin wurde ein starker Abfall der Expression in den Samenanlagen nach der Befruchtung beobachtet (Palanivelu et al., 2000b). Die Mitglieder der dritten Klasse, *PAB6* und *PAB7*, zeichnen sich durch eine eher schwache Expression aus, die auf wenige Gewebearten wie Blätter und junge Keimlinge im Fall von *PAB6* und Schoten im Fall von *PAB7* beschränkt ist (Belostotsky, 2003). Klasse IV

wird lediglich von *PAB1* gebildet, welches auch als verwaistes Gen bezeichnet wird und strukturell von den anderen *PABPCs* abweicht (Mangus et al., 2003). Die schwache Expression dieses Gens beschränkt sich auf die Wurzel und Blütengewebe (Belostotsky, 2003).

Komplementationen der *pab1p* Mutation in Hefe mit Arabidopsis *PAB2*, *PAB3* und *PAB5* führten jeweils zur Aufhebung des letalen Effekts (Belostotsky und Meagher 1996, Chekanova et al., 2001, Palanivelu et al., 2000a). Die Analysen zeigten, dass viele der Arabidopsis *PABPCs* viele der Funktionen von Pab1p ersetzen konnten. Vermutlich sind die Funktionen der *PABPCs* in der mRNA-Prozessierung zwischen Hefe und Pflanzen stark konserviert (Belostotsky, 2003). *PAB2* konnte beispielsweise die metabolische Verbindung zwischen Deadenylierung, Decapping und mRNA-Degradierung teilweise wiederherstellen. Die Interaktion von *PAB2* mit PAN aus Hefe und die damit verbundene Kürzung des Poly(A)-Schwanzes wurden in den Komplementationsversuchen außerdem beobachtet (Palanivelu et al., 2000a). Weiterhin wurde die Interaktion von *PAB2* mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G aus Arabidopsis nachgewiesen, was die Funktion von *PAB2* in der pflanzlichen Translation bestätigt (Palanivelu et al., 2000a). Ähnliche, jedoch nicht identische Ergebnisse wurden für *PAB3* und *PAB5* erhalten. *PAB3* konnte das vorzeitige Decapping nicht verhindern (Chekanova et al., 2001), sondern korrigierte lediglich den für *pab1p*-Mutationsstämme typischen verzögerten Eintritt der mRNA in den Degradierungsweg und scheint eine konservierte Funktion in der mRNA-Biogenese und dem mRNA-Export zu haben (Chekanova und Belostotsky, 2003). Für *PAB5* konnte ebenfalls die Beteiligung an der Kürzung des Poly(A)-Schwanzes und der Translationsinitiation gezeigt werden. Die Inhibition des Decapping, wie es für *PAB2* dokumentiert wurde, konnte *PAB5* in den Komplementationsanalysen jedoch nicht wiederherstellen (Belostotsky und Meagher, 1996). Die Arabidopsis *PABPCs* scheinen leicht unterschiedliche, teilweise überlappende Funktionen auszuüben, wobei *PAB2* einen ähnlich umfassenden Einfluss wie Pab1p in Hefe haben könnte.

Weiterhin wurde in Arabidopsis gezeigt, dass *PABPCs* an der Bindung von mRNA an Mikrotubuli beteiligt sind. Mikrotubuli sind Bestandteile des Cytoskeletts, an denen mRNPs im Zytoplasma entlang gleiten, um sie gezielt zu transportieren. *PABPCs* und YB-1 vermitteln mit Hilfe ihrer kationischen Eigenschaften die Bindung von mRNPs an Mikrotubuli (Chernov et al., 2008).

Zusätzlich zu den acht *PABPC*-Genen wurde in Arabidopsis ein weiteres Gen identifiziert, welches ein kleines Protein kodiert, das nur aus der C-terminalen Domäne der *PABPCs* besteht (Tiwari et al., 2008). Der Name *maternally expressed PAB C-terminal (MPC)* wurde gewählt, weil dieses Gen im Endosperm maternal exprimiert wird. Die Reduktion seiner Expression führt zum Abort von Samen, geringerer Samengröße sowie Abnormalitäten betreffend Embryo- und Endospermentwicklung. Als Interaktionspartner wurden die gleichen Proteine wie für die *PABPC*-Familie identifiziert, so dass vermutet wird, dass *MPC* ebenfalls in die Regulierung der Translation eingebunden ist.



Möglicherweise beeinflusst es die Funktionsweise der PABPCs, indem es selbst an Interaktionspartner der PABPCs anlagert und es so zur Konkurrenz um die Bindung kommt (Tiwari et al., 2008).

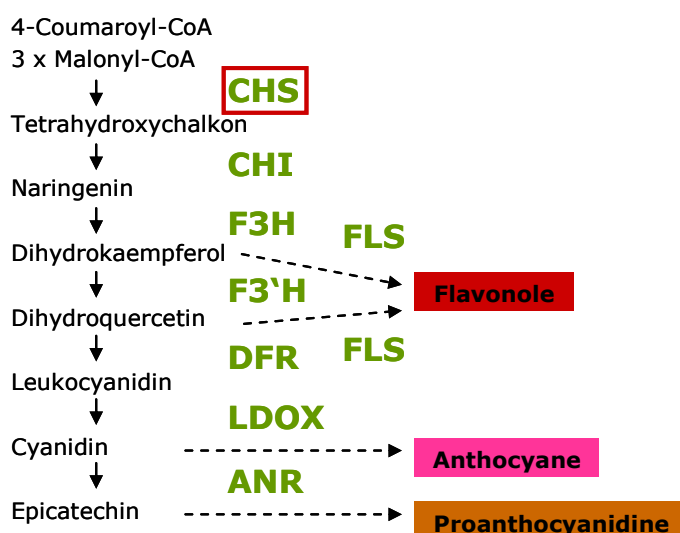
Bis auf PAB1 und PAB6 besitzen alle PABPCs in Arabidopsis eine CTC-Domäne (Bravo et al., 2005). Mittels Sequenzanalysen und anhand eines *Yeast-Two-Hybrid* Screens wurden in Arabidopsis 13 Proteine identifiziert, die mit der CTC-Domäne interagieren. Diese wurden *CTC-interacting domain* (CID) Proteine benannt. Sie besitzen, wie auch andere PABP-interagierende Proteine, eine konservierte N-terminale PAM2-Domäne. Eine Untergruppe, die aus sechs Mitgliedern besteht (*CID8-CID13*), enthält zudem zwei C-terminale RRM, wodurch diese Gruppe wie die PABPs zu den RNA-bindenden Proteinen gezählt werden kann (Bravo et al., 2005).

Für PAB2, PAB4 und PAB8 konnten funktionale NESs sowie die Interaktion mit XPO1 nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten für Arabidopsis PABPCs C-terminale Kernimportsignale identifiziert werden, über die eine Interaktion mit Transportin 1 ermöglicht wird (Niemeier et al., 2010).

### 1.3 Das Chalkonsynthase-Gen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten einige Verbesserungen zu der in 1.1.5 vorgestellten synthetischen miRNA-Technik entwickelt werden, unter anderem in Bezug auf die Spezifität der entworfenen smiRNAs und die Generierung von synthetischen Primärtranskripten, aus denen die smiRNAs prozessiert werden sollten. Für diese Untersuchungen wurde das *Chalkonsynthase*-Gen als Zielgen für verschiedene spezifisch entworfene smiRNAs ausgewählt. Die allgemeinen Charakteristika und Funktionen der Chalkonsynthase werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

Die Chalkonsynthase (CHS) ist eines der Schlüsselenzyme in der Biosynthese von Flavonoiden, einer Gruppe von Sekundärmetaboliten in Pflanzen. Aufgrund der potentiell gesundheitsfördernden Eigenschaften von Flavonoiden wird ihnen großes Interesse entgegengebracht, so dass ihr Biosyntheseweg eines der am besten untersuchten Sekundärmetabolit-Systeme im Pflanzenreich geworden ist (zusammengefasst in Winkel-Shirley, 2001). Ausgehend von Malonyl-CoA und 4-Coumaroyl-CoA kommt es zur Bildung von insgesamt neun Flavonoid-Untergruppen. Diese üben vielfältige Funktionen in der Pflanze aus, vor allem vermitteln sie Schutz vor biotischen Stressoren und UV-Strahlung. Außerdem sind sie für die charakteristische Färbung von Blüten und Früchten verantwortlich, die eine entscheidende Rolle in der Reproduktion von Pflanzen spielen.



**Abb. 1.7: Vereinfachte Darstellung eines Zweiges des Flavonoidbiosyntheseweges**

CHS: Chalkonsynthase, CHI: Chalkonisomerase, F3H: Flavanon 3-Hydroxylase, FLS: Flavonsynthase, F3'H: Flavonoid 3'-Hydroxylase, DFR: Dihydroflavonol-4-Reduktase, LDOX: Leucoanthocyanidin-Dioxygenase, ANR: Anthocyanidin-Reduktase (modifiziert nach Winkel-Shirley, 2001).

Die Chalkonsynthase katalysiert mit der Synthese von Tetrahydroxychalkon aus 4-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA einen der initialen Schritte auf dem Weg zur Produktion von Flavonolen, Anthocyanen und Proanthocyanidinen (Abb. 1.7). Das Fehlen dieses Enzyms zieht auch das Ausbleiben von Flavonoiden nach sich (Koorneef, 1990; Shirley et al., 1995). Am offensichtlichsten ist dies anhand der Samen zu beobachten. Die charakteristische Braunfärbung von Samen, die durch Einlagerung von Proanthocyanidinen in der Samenschale (Testa) entsteht, geht in *chs knockout* Pflanzen verloren. Das resultierende gelbe Erscheinungsbild der *chs*-Samen ist auf die durchsichtigen Samenschalen zurückzuführen. Pflanzen, die Defekte in der Akkumulierung von Proanthocyanidinen zeigen, werden als *transparent testa (tt)*-Mutanten bezeichnet (Koorneef, 1990; Shirley et al., 1995), der *knockout* des *Chalkonsynthase*-Gens wird auch *tt4* genannt.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten zum einen Verbesserungen für das Design und die Generierung synthetischer miRNAs entwickelt werden. Zu diesem Zweck sollte das miRNA *target* Vorhersageprogramm *RNAhybrid* (Rehmsmeier et al., 2004) genutzt werden, um mögliche ungewollte Zielgene (*off-targets*) eines entworfenen smiRNA-Kandidaten neben dem eigentlich angesteuerten Zielgen ausfindig zu machen. Dabei sollten strukturelle wie auch energetische Aspekte in die letztendliche Auswahl einer smiRNA einbezogen werden. Weiterhin sollten die Anforderungen von funktionalen miRNA:*target* Hybridstrukturen analysiert werden. Dies sollte Auskunft darüber geben, wie viele Fehlpaarungen oder G:U-Paarungen in einem Hybrid toleriert werden können, um trotzdem noch die Regulierung eines Zielgens auszulösen. Dies spielt nicht nur eine Rolle bei der Minimierung oder Vermeidung von *off-targets*, sondern auch, wenn eine smiRNA für den multiplen *knockdown* einer Genfamilie oder von nahe verwandten Genen entworfen werden soll. Diese Untersuchungen sollten mit einer smiRNA durchgeführt werden, die für das *Chalkonsynthase*-Gen entworfen wurde.

Um die Generierung synthetischer miRNAs zu vereinfachen und zu beschleunigen, sollte ein Vektor auf Basis des Primärtranskriptes der natürlichen *MIR159a* entworfen werden, der es erlaubt, die miRNA- und miRNA\*-Sequenzen in nur einem Klonierungsschritt gegen die gewünschten smiRNA- und smiRNA\*-Sequenzen auszutauschen.

Weitere Ziele dieser Arbeiten bestanden in der Anwendung der verbesserten smiRNA-Technik für verschiedene Gene. Mehrere Gene, die für zytosolischen Poly(A)-bindenden Proteine (PABPCs) in Arabidopsis kodieren, sollten in verschiedenen Kombinationen simultan durch smiRNAs post-transkriptionell reguliert werden. Der *knockout* einzelner Gene dieser Familie führt nicht zu Phänotypen, die vom Wildtyp abweichen. Durch die molekulare und phänotypische Analyse transgener, pri-smiRNA(PABP) exprimierender Pflanzen sollten weitere Hinweise auf die Funktionen dieser Proteine erhalten werden. Insbesondere war auch von großem Interesse, ob die PABPCs eine Rolle im Kernexport von mRNA in Arabidopsis spielen. Diese Vermutung lag nahe, weil die PABPCs über ihre RNA-Bindedomänen (RRMs) fähig sind, an Poly(A)-Schwänze von mRNA zu binden und die meisten von ihnen gleichzeitig funktionale Kernexportsignale besitzen, die die Interaktion mit dem Kernexportrezeptor Exportin1 ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Für alle verwendeten Chemikalien wurde der höchste Reinheitsgrad gewählt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden diese, sowie weitere Verbrauchsmaterialien, von den Firmen Amersham Bioscience (Freiburg), Biorad (München), Biozym (Hameln), Difco (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Steinheim), GE Healthcare (München), Genomed (Löhne), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Quiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Starlab (Ahrensburg) und Sigma (Steinheim) bezogen. Eventuelle Abweichungen wurden entsprechend vermerkt. Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und bei Bedarf durch Sterilfiltrieren oder Autoklavieren sterilisiert. Die Zusammensetzungen der einzelnen Puffer und Lösungen sind überwiegend direkt im Anschluss an die entsprechenden Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

#### 2.1.2 Nährmedien

##### 2.1.2.1 Anzucht von Bakterien

LB (Luria-Bertani)- Flüssigmedium:	10	g/l	DIFCO Bacto Trypton
	5	g/l	DIFCO Bacto Hefeextrakt
	5	g/l	NaCl
			mit H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> aufgefüllt und autoklaviert
LB-Festmedium:			LB-Flüssigmedium mit 1,6 % DIFCO Bacto Agar versetzt und autoklaviert
SOC-Flüssigmedium:	20	g/l	DIFCO Bacto Trypton
	5	g/l	DIFCO Bacto Hefeextrakt
	0,5	g/l	NaCl
	2,5	mM	KCl
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	20	mM	Glukose
			autoklaviert

YEP-Flüssigmedium:	10	g/l	DIFCO Bacto Trypton
	10	g/l	DIFCO Bacto Hefeextrakt
	5	g/l	NaCl autoklaviert

Für die Selektion mit Antibiotika (Duchefa Biochemie, Niederlande) wurden diese den Medien nach dem Autoklavieren in folgenden Endkonzentrationen hinzugefügt:

**Tab. 2.1 Antibiotikakonzentrationen**

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ampicillin	Amp	100
Gentamycin	Gen	40
Kanamycin	Kan	50
Rifampicin	Rif	100
Tetracyclin	Tet	12,5

### 2.1.2.2 Anzucht von Pflanzen

MS-Festmedium:	0,5	x	Murashige & Skoog Salt Mixture
	0,8	%	Phytoagar (Merck) pH 5,8 (mit KOH eingestellt) autoklaviert

### 2.1.2.3 Anzucht von Hefe

YPD-Flüssigmedium:	10	g/l	DIFCO Bacto Hefeextrakt
	20	g/l	DIFCO Bacto Pepton
	2	% (w/v)	nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben: Glukose
SD U <sup>-</sup> glc-Flüssigmedium:	6,7	g/l	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB) ohne Aminosäuren
	650	mg/l	<i>dropout</i> HWU <sup>-</sup>
	2	% (w/v)	nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben: Glukose
	20	mg/l	Histidin
	20	mg/l	Tryptophan
SD U <sup>-</sup> glc Festmedium:			SD U <sup>-</sup> glc-Flüssigmedium
	+ 1,8	% (w/v)	Difco Agar

<i>dropout</i> HWU <sup>-</sup> :	30 mg/l	L-Isoleucin
	150 mg/l	L-Valin
	20 mg/l	L-Adenin
	20 mg/l	L-Arginin HCl
	100 mg/l	L-Leucin
	30 mg/l	L-Lysin HCl
	20 mg/l	L-Methionin
	50 mg/l	L-Phenylalanin
	200 mg/l	L-Threonin
	30 mg/l	L-Tyrosin

Die aufgeführten Komponenten wurden eingewogen, durch Mörsern homogenisiert und bei RT gelagert.

### 2.1.3 Zellstämme und Plasmidvektoren

#### 2.1.3.1 Bakterien- und Hefestämme

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme aufgeführt. Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue diente zur Vermehrung von Plasmiden, für die Gewinnung unmethylierter DNA wurde der *E. coli*-Stamm K12 ER2925 genutzt. Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 durchgeführt, der Hefestamm EGY48 diente zur Analyse von Protein-Interaktionen im *Yeast-2-Hybrid* System.

**Tab. 2.2 Zellstämme**

Stamm	Referenz	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, USA Bullock et al., 1987	<i>recA1, endA1, gyrA46, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> [proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (tet<sup>r</sup>)]</i>
<i>E. coli</i> K12 ER2925	Woodcock et al., 1989	<i>ara-14, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx78, glnV44, galK2, galT22, mcrA, dcm-6, hisG4, rfbD1, R(zgb210::Tn10)TetS, endA1, rpsL136, dam13::Tn9, xylA-5, mtl-1, thi-1, mcrB1, hsdR2</i>
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Icon Genetics Koncz und Schell (1986)	pMP90 (Virulenzplasmid); Gm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup>
<i>S. cerevisiae</i> EGY48[p8op-lacZ]	Clontech BD Biosciences, Belgien	Mato, his3, trp1, ura1, LexA <sub>op(x6)</sub> <sup>-</sup> LEU2, Reporterplasmid p8op-lacZ: lacZ unter Kontrolle des lexA <sub>op(x8)</sub> , URA3, Amp <sup>R</sup>

### 2.1.3.2 Plasmidvektoren

Tabelle 2.3 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidvektoren zusammen.

**Tab. 2.3 Plasmidvektoren**

Plasmid	Referenz	Merkmale
pUC19	Amersham Biosciences, Freiburg	Amp <sup>R</sup>
5'GFP	5'GFP (S65T), T. Merkle (unveröffentlicht)	CaMV 35S-Promotor, mGFP4-cDNA, <i>nos</i> - Terminator; Amp <sup>R</sup>
3'GFP	mGFP4 (S65T), T. Merkle (unveröffentlicht)	CaMV 35S-Promotor, mGFP4-cDNA, <i>nos</i> - Terminator; Amp <sup>R</sup>
pKS Blueskript	Stratagene, USA	lac-Promotor, $\beta$ -Galaktosidase $\alpha$ -Fragment; Amp <sup>R</sup>
pGPTV-BAR	Becker et al. (1992)	<i>uid A</i> -(Reporter-)Gen, <i>nos</i> -Promotor, pAnos, pAg7, <i>bar</i> -Selektionsmarker; Kan <sup>R</sup>
pFFL	pBIN (Haseloff et al., 1997), T. Merkle	CaMV 35S-Promotor, mGFP4-cDNA, <i>nos</i> - Terminator; Kan <sup>R</sup>
pB42AD	Clontech BD Biosciences, Belgien	Aktivierungsdomäne B42, TRP1, HA-Epitop- Tag; Amp <sup>R</sup>
pGilda	Clontech BD Biosciences, Belgien	DNA-Bindedomäne LexA <sub>(1-202)</sub> , <i>his3</i> ; Amp <sup>R</sup>

### 2.1.4 Pflanzenmaterial

Die vom Lehrstuhl zur Verfügung gestellten *Arabidopsis thaliana* Samen und Pflanzen der Akzession Columbia-0 (Col-0) wurden in allen Experimenten als Wildtypen genutzt und dienten auch zur Transformation mittels *A. tumefaciens*. In den folgenden Tabellen 2.4 und 2.5 sind alle im Rahmen dieser Arbeit genutzten T-DNA Insertionslinien bzw. hergestellten überexprimierenden *A. thaliana* Linien aufgeführt.

**Tab. 2.4 Verwendete T-DNA Insertionslinien**

Gen	Linie	Plasmid
<i>chs (tt4)</i>	SALK_020583; Col-0	pROK2



**Tab. 2.5 Hergestellte bzw. untersuchte überexprimierende Linien**

Name	Konstrukt	Vektor
SN001	35S:pri-smiRNA(CHS)-nosT	pGPTV-BAR
SN004	35S:pri-smiRNA(CHS)Var3-nosT	pGPTV-BAR
SN005	35S:pri-smiRNA(CHS)Var4-nosT	pGPTV-BAR
SN006	35S:pri-smiRNA(CHS)Var1-nosT	pGPTV-BAR
SN007	35S:pri-smiRNA(CHS)Var2-nosT	pGPTV-BAR
AB001	35S:pri-smiRNA(CHS)-ECV-nosT	pGPTV-BAR
AB002	35S:pri-smiRNA(PABP)-3cac-nosT	pGPTV-BAR
AB003	35S:pri-smiRNA(PABP)-1-nosT	pGPTV-BAR
AB004	35S:pri-smiRNA(PABP)-3-nosT	pGPTV-BAR
SN013	35S:PAB2mBS-nosT (in wt-Hintergrund und AB004)	pBIN-FFL
SN014	35S:PAB3mBS-nosT (in wt-Hintergrund und AB004)	pBIN-FFL

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bioinformatische Methoden

#### 2.2.1.1 Computergestütztes Design künstlicher microRNAs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene synthetische microRNAs (smiRNAs) hergestellt, um die Transkripte einzelner Gene bzw. Teilgruppen aus kleinen Genfamilien gleichzeitig posttranskriptional herunterzuregulieren. Im Fall eines multiplen *knockdowns* wurde zunächst ein Sequenzalignment mit den Proteinsequenzen der gewünschten *targets* mit ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)) erstellt, um die am stärksten konservierten Bereiche zu identifizieren. Im Anschluss wurde ein Alignment im Bereich der konservierten Proteinbereiche auf DNA-Ebene, ebenfalls mit ClustalW, durchgeführt. Besonders stark konservierte DNA-Bereiche wurden dann als mögliche Bindestellen für eine smiRNA ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden 21 nt lange, zur Bindestelle revers-komplementäre smiRNA-Kandidaten generiert, die zu den Sequenzen aller Zielgene möglichst gleich gute Hybridisierungseigenschaften aufwiesen. Die smiRNA-Kandidaten wurden mit Hilfe des microRNA *target*-Vorhersage Programms *RNAhybrid* (Rehmsmeier et al., 2004) gegen das gesamte *Arabidopsis thaliana* Transkriptom (TAIR\_cds\_20060907; [www.Arabidopsis.org](http://www.Arabidopsis.org)) getestet.

### 2.2.1.2 Überprüfung und Auswahl von smiRNA-Kandidaten

Zunächst wurden mit dem Programm *RNAcalibrate* (Rehmsmeier et al., 2004) für verschiedene 21 Nukleotide lange Abschnitte der revers-komplementären Sequenzen der Zielgene (=smiRNA-Kandidaten) die zugehörigen *position* ( $\xi$ ) und *shape* ( $\theta$ ) *parameter* bestimmt, die dann neben anderen Parametern in der *RNAhybrid*-Kalkulation (Rehmsmeier et al., 2004) verwendet wurden. Mit diesem Programm wurden die smiRNA-Kandidaten gegen das gesamte *A. thaliana* Transkriptom getestet. Die Werte, die für das Arbeiten mit *RNAcalibrate* und *RNAhybrid* in der jeweiligen Kommandozeile des Programms eingesetzt wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle 2.6 aufgeführt. Um die Vorhersage so spezifisch wie möglich zu gestalten, wurden verschiedene Filter eingesetzt. Die maximale *loop*-Größe, d. h. die Anzahl der aufeinander folgenden Fehlpaarungen in der miRNA:*target* Hybridstruktur, wurde auf zwei festgesetzt, und mehr als ein frei stehendes Nukleotid (*bulge*) auf einer der zwei Seiten war nicht erlaubt. Als Grenzwert für die minimale freie Energie (*mfe*) wurde -25 kcal/mol gewählt, so dass Treffer mit einem höheren Wert der Hybridstruktur nicht aufgeführt wurden. Bei der letztendlichen Auswahl von smiRNAs sollten vor allem keine anderen, sehr wahrscheinlichen *targets* vorhergesagt werden. Außerdem wurde Wert auf möglichst niedrige *mfe* und *p*-Werte gelegt.

**Tab. 2.6: Parameter für die smiRNA-Zielgenvorhersage mit *RNAhybrid***

Parameter	<i>RNAcalibrate</i>	<i>RNAhybrid</i>
u [maximale interne <i>loop</i> Größe]	2	2
v [maximale <i>bulge loop</i> Größe]	1	1
m [maximale <i>target</i> Länge]	30000	30000
e [Energiegrenze / <i>cut-off</i> ]	-----	-25 kcal/mol
p [p-Wert Grenze / <i>cut-off</i> ]	-----	0,001
d [ <i>position</i> ( $\xi$ ) und <i>shape</i> Parameter ( $\theta$ )]	-----	berechnet in <i>RNAcalibrate</i>
t [lange <i>target</i> Sequenz]	<i>A. thaliana</i> CDS	<i>A. thaliana</i> CDS
q [Sequenz der potentiellen smiRNA]	21 nt lange RNA-Seq.	21 nt lange RNA-Seq.

## 2.2.2 Präparation und Analyse von DNA

### 2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide der *in vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente zum Beispiel aus einem Plasmid, genomischer DNA oder einer cDNA-Bank. Man benötigt dazu ein entsprechendes Puffersystem, Desoxyribonukleotide (dNTPs), je ein spezifisches 5'- und 3'-Oligonukleotid (die das zu amplifizierende Fragment flankieren), den zu amplifizierenden DNA-Einzel- oder Doppelstrang (*template* oder Matrize) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase, die den komplementären Gegenstrang zur DNA-Matrize synthetisiert.

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit von Polymerasen, einzelsträngige Nucleinsäuren mit einer freien 3'OH-Gruppe matrizenabhängig in 3'-Richtung zu verlängern. Dazu muss zunächst die doppelsträngige *template*-DNA denaturiert werden, das heißt, sie wird in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Dies geschieht in der so genannten Denaturierungsphase bei einer Temperatur von mindestens 94 °C. In der anschließenden *annealing*-Phase wird eine niedrigere Temperatur gewählt, um die Hybridisierung (*annealing*) der Oligonukleotide mit der komplementären, einzelsträngigen Matrizen-DNA zu ermöglichen. Die optimale *annealing*-Temperatur ist von der Oligonukleotidsequenz abhängig, vor allem vom GC-Gehalt, und wird ungefähr 5-10 °C geringer als die Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide gewählt. Werden zwei Oligonukleotide verwendet, für die unterschiedliche *annealing*-Temperaturen vorliegen, wird die niedrigere Temperatur in der PCR gewählt. Im letzten Schritt, der Elongationsphase, synthetisiert die DNA-Polymerase bei ihrem Arbeitsoptimum von 72 °C vom 3'-terminalen Ende der Oligonukleotide ausgehend in 5'-3'-Richtung jeweils den komplementären Gegenstrang zur *template*-DNA. Es entsteht eine doppelsträngige DNA, die der ursprünglichen *template*-DNA exakt gleicht und die in den nächsten Zyklen selbst als *template* dient. So kann ein Amplifikationsfaktor von bis zu 10<sup>6</sup> erreicht werden. Die Zeit dieses Schrittes innerhalb eines Zyklus hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes ab: Pro kb Länge des Produktes wird üblicherweise 1 min Elongationszeit gewählt. Ein solcher PCR-Zyklus wird in der Regel zwischen 25-36-mal wiederholt.

Durchgeführt wurden die für diese Arbeit relevanten Reaktionen im *Mastercycler* der Firma Eppendorf (Hamburg) und im *PCR Flexcycler* von Jena Analytik (Jena).

#### 2.2.2.2 Standard-PCR

Ein PCR-Standardansatz (modifiziert nach Mullis und Faloona, 1987) wurde in einem Volumen von maximal 100 µl durchgeführt. Enthalten waren etwa 1 µg DNA einer cDNA-Bank oder 100 ng Plasmid-DNA, je 50 pmol der Oligonukleotide, 200-250 µM

dNTPs, 1 x Reaktionspuffer und 1-2 U DNA-Polymerase sowie ein entsprechendes Volumen H<sub>2</sub>O. Meist wurden 25-30 Reaktionszyklen mit der oben beschriebenen Abfolge von Denaturierung, Oligonukleotid-*annealing* und Elongation durchgeführt (Tab. 2.7). Die *annealing*-Temperatur schwankte in Abhängigkeit der Hybridisierungseigenschaften der Oligonukleotide zwischen 55 °C und 64 °C, die Elongationszeit lag zwischen 30 sec und 90 sec entsprechend der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes. Je nach Verfügbarkeit wurden die Pwo- (Roche Diagnostics, Mannheim), Phusion- (Finnzymes, Finnland) oder rTaq-DNA-Polymerase (Takara Bio Inc., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) in ihrem entsprechenden Puffer eingesetzt.

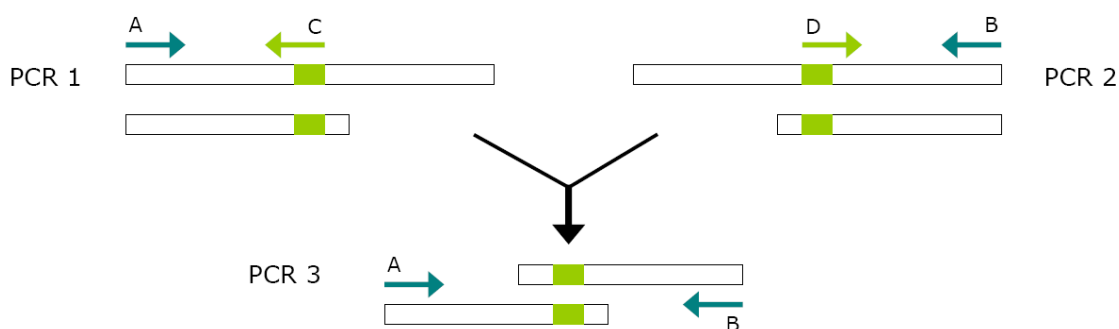
**Tab. 2.7 PCR-Profil für eine Standard-Reaktion**

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur[°C]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	120	94	
Denaturierung	30	94	
Oligonukleotid- <i>annealing</i>	30	55-64	30
Elongation	60 sec/kb	72	
Finale Elongation	180	72	
Kühlung	∞	16	

### 2.2.2.3 *overlap extension*-PCR

Die Methode der *overlap extension*-PCR (Ho et al., 1989) ermöglicht die ortsspezifische Mutagenese einer spezifischen DNA-Sequenz und setzt sich aus drei einzelnen PCRs zusammen. Sie diente zur Herstellung der synthetischen pri-miRNAs sowie für die Generierung der resistenten smiRNA-Bindestellen innerhalb der *PAB2* und *PAB3* cDNAs.

In einer ersten PCR-Runde wurden zunächst jeweils die von der zu mutierenden Sequenz 5'- und 3'-gelegenen Teile der cDNA amplifiziert (PCR 1 und PCR 2), wobei durch spezifische Oligonukleotide (C und D) in einzelnen Reaktionen in Kombination mit je einem insert- oder vektorspezifischen Oligonukleotid (A und B) die gewünschten Mutationen eingefügt wurden. Die zwei resultierenden PCR-Produkte wurden in der dritten, eigentlichen *overlap extension*-PCR (PCR 3) unter Verwendung der insert- oder vektorspezifischen Oligonukleotide (A und B) ohne vorherige Aufreinigung in äquimolaren Mengen als *templates* eingesetzt. Es wurde ein Volllängen-Fragment amplifiziert, welches die gewünschten Punktmutationen bzw. mutierten Sequenzbereiche enthält (vergl. Abb. 2.1).



**Abb. 2.1: Prinzip der *overlap extension*-PCR**

Die Oligonukleotide C und D (grün) dienen der Insertion der gewünschten Punktmutationen bzw. mutierten Sequenzbereiche (grün markierter Bereich) in zwei einzelnen PCRs (1 und 2) zusammen mit vektor- oder insertspezifischen Oligonukleotiden (A und B, blau). In einer dritten Reaktion (PCR 3) wurde ein Volllängenfragment amplifiziert, welches die Mutationen enthielt und mit Hilfe der Oligonukleotide A und B sowie den Produkten aus PCR 1 und PCR 2 als *templates* erhalten worden war.

#### 2.2.2.4 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR (modifiziert nach Gussow und Clackson, 1989) diente zur Identifizierung positiver transformierter *E. coli*-Zellen und konnte als Alternative zur Plasmid-DNA Präparation mit anschließendem Restriktionsverdau angewandt werden (vergl. 2.2.3.2). Mittels einer sterilen Pipettenspitze wurde etwas Material der gewachsenen Bakterienkolonien in einen 25 µl PCR-Reaktionsansatz (10 x Reaktionspuffer, je 10 pmol eines *forward* bzw. eines *reverse* Oligonukleotids, 0,4 mM dNTP-Mix, Taq-Polymerase aus eigener Herstellung) überführt und dieser nach Vorbereitung aller Proben zügig in den Thermocycler (PCR-Profil siehe unten) gestellt. Im Vergleich zu einer Standard-Reaktion erfolgte der erste Denaturierungsschritt bei 94 °C für acht Minuten, um einen vollständigen Aufschluss der Bakterienzellen zu garantieren, die übrigen Schritte entsprachen einer Standard-PCR mit 25 Zyklen. Nach Möglichkeit wurden ein Vektor-spezifischer sowie ein Insert-spezifisches Oligonukleotid gewählt. Nach der Reaktion wurden etwa 10 µl jedes Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und Bakterienkolonien, die das gesuchte DNA-Fragment im Plasmid trugen, konnten anhand der erwarteten Fragmentgröße identifiziert werden.

Restliche, noch an der Pipettenspitze haftende Zellen wurden in 2 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um im Fall der Identifizierung eines positiven Klons Ausgangsmaterial für eine DNA-Präparation im größeren Maßstab zu haben.

### 2.2.2.5 Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Elution aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der amplifizierten DNA aus 50 µl eines PCR-Ansatzes erfolgte mit Hilfe des *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (GE Healthcare, München). DNA-Fragmente, die zuvor in einem Agarosegel aufgetrennt worden waren (Abschnitt 2.2.3.1), wurden unter langwelligem UV-Licht lokalisiert und möglichst genau mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Die anschließende Elution der DNA aus dem Gel wurde ebenfalls mit dem oben genannten *Kit* nach den Angaben des Herstellers vorgenommen.

### 2.2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung

Um die Optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung zu bestimmen, wurde eine Messung mit einer Verdünnung in H<sub>2</sub>O oder 1 x TE-Puffer bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  mit Kunststoff-Einwegküvetten in einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Aus der Formel  $OD_{260} = 50 \text{ ng DNA}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$  wurde die Konzentration der DNA-Lösung ermittelt.

## 2.2.3 DNA-Klonierung und -Präparation

### 2.2.3.1 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine effektive Methode um DNA-Fragmente aufzutrennen, anhand ihrer Größe zu identifizieren und ihre Konzentration abzuschätzen. Aufgrund der negativen Ladung von DNA-Molekülen wandern diese in einem Spannungsfeld durch die Agarosepolymere zur positiv geladenen Anode. Kleinere Moleküle bewegen sich schneller durch das Gel und so werden unterschiedlich große Moleküle innerhalb einer bestimmten Zeit in Form spezifischer Banden aufgetrennt. Um diese Banden sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugefügt, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert und anschließend in ultraviolettem Licht zum Fluoreszieren gebracht wird.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 % - 2 % horizontale Agarosegele vorbereitet, denen 0,04 µg Ethidiumbromid pro ml Gelvolumen zugefügt waren. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 3-5 Volt/cm in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Als Vergleichs- und Kontrollstandard fungierten die *1 kb DNA Ladder* (Invitrogen) und die *100 bp DNA Ladder* (NEB).

50 x TAE-Puffer	242 g/l	Tris
	57,1 ml/l	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0) mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml aufgefüllt
5 x Probenpuffer	20 mM	EDTA (pH 8,0)
	50 % (v/v)	Glycerol
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,02 % (w/v)	Xylencyanol

### 2.2.3.2 Restriktionsverdau von DNA

Unter einem Restriktionsverdau versteht man die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung innerhalb einer bestimmten DNA-Sequenz, wobei ein Ende mit einer 5'-Phosphatgruppe und ein Ende mit einer 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose entstehen. Zumeist werden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die eine definierte palindrome DNA-Zielsequenz von vier bis acht Nukleotiden erkennen und dort hydrolysieren. Es gibt sowohl Enzyme, die glatte Enden (kein Nukleotidüberhang) entstehen lassen, als auch solche, die nach dem Verdau Moleküle mit überstehenden Enden zurücklassen. Um eine optimale Aktivität der Nukleasen zu erreichen, muss ein Puffersystem mit entsprechend passend eingestellter Salzkonzentration eingesetzt werden. Außerdem muss auf das Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms geachtet werden.

Für eine Klonierung wurden der Plasmidvektor und das DNA-Fragment mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt. Auf diese Weise wurden kompatible Enden erzeugt, die mittels anschließender Ligation miteinander verknüpft werden konnten. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2-3 U der Restriktionsenzyme verwendet. Die Inkubation erfolgte im vom Hersteller empfohlenen Puffer, meist unter zusätzlicher Verwendung von BSA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bei 37 °C für eine Stunde.

Im Fall eines Verdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen konnte ein so genannter Doppelverdau stattfinden, wenn die Enzyme bei gleicher Temperatur und sehr ähnlichen Pufferbedingungen eine hohe Aktivität aufwiesen. War dies nicht der Fall, musste ein sequentieller Verdau vorgenommen werden, bei dem die DNA nacheinander mit beiden Enzymen unter den entsprechenden optimalen Puffer- und Temperatureinstellungen verdaut wurde.

Durch Zugabe von 5 x Probenpuffer wurden die Restriktionsverdau gestoppt. Die DNA wurde elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt, analysiert und zur anschließenden Aufreinigung aus dem Gel eluiert. Ein zu präparierender Vektor wurde vor der Elektrophorese einer Dephosphorylierungsreaktion unterzogen (2.2.3.3).

### 2.2.3.3 Dephosphorylierungsreaktion

Um die Religation von linearisierten Vektoren zu verhindern, wurden die Plasmide nach dem Restriktionsverdau mit Antarktischer Phosphatase (New England Biolabs, 5 U/μl) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen an doppelsträngiger DNA und verhindert somit die Rezirkularisierung des Vektors durch Neubildung von Phosphodiesterbindungen. Das präparierte DNA-Fragment, welches in den Vektor ligiert werden soll, besitzt noch die Phosphatreste an beiden Enden und kann daher mit der Vektor-DNA ligiert werden.

Direkt nach dem Restriktionsverdau der Vektoren mit den erforderlichen Restriktionsenzymen wurden die Ansätze einer zehninütigen Inkubation bei 65 °C zur Denaturierung der Enzyme unterzogen. Pro μg DNA wurden anschließend 5 U Antarktische Phosphatase eingesetzt und im dazugehörigen Puffer für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten die Zugabe von 5 x Probenpuffer sowie die Auftrennung und Elution des Plasmidvektors aus einem Agarosegel (2.2.2.5).

### 2.2.3.4 *blunt-end*-Klonierungen

Für die Herstellung von *blunt ends* an einem doppelsträngigen DNA-Molekül (wie z.B. DNA-Fragment oder Vektor) wurde die T4-DNA-Polymerase verwendet. Dieses Enzym spaltet überhängende Nukleotide am 3'-Ende (3'-5'-Exonukleasefunktion) ab, die bei einem Restriktionsverdau mit versetzt schneidenden Restriktionsenzymen oder während der PCR durch die Taq-Polymerase entstehen können. Außerdem besitzt die T4-DNA-Polymerase die Fähigkeit, Nukleotide an das 3'-Ende anzufügen, wenn ein 5'-Überhang vorliegt.

Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 35 μl in T4-DNA-Polymerase-Puffer statt. Dabei wurden 2-3 μg DNA, 3 U T4-DNA-Polymerase und 200-250 μM dNTPs hinzugefügt und bei 16 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Zur Aufreinigung des Ansatzes wurde das gesamte Volumen auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA aus dem Gel eluiert (2.2.2.5).

### 2.2.3.5 Ligation von DNA in Plasmidvektoren

Das Ziel einer Ligation ist es, DNA-Fragmente kovalent miteinander zu verknüpfen. Unter Verbrauch von ATP bildet die T4-DNA-Ligase eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphatende und dem 3'-Hydroxyende doppelsträngiger DNA aus. Ligationen können mit glatten („*blunt ends*“) und überhängenden („*sticky ends*“) DNA-Fragmenten erfolgen.



Für die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor wurde zunächst die relative Konzentration dieser beiden Komponenten auf einem Agarosegel abgeschätzt und je nach Stärke der Banden für den Vektor 0,5 µl - 1 µl und für das Insert 0,5 µl - 7 µl in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt, so dass das zu klonierende DNA-Fragment dem Vektor gegenüber etwa in 2-3-facher molarer Menge vorlag. Als Enzym diente die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) mit dem dazugehörigen T4 DNA-Ligase-Puffer (mit 1 mM ATP). Die Ligation fand entweder über Nacht bei 16 °C oder für zwei Stunden bei RT statt.

### 2.2.3.6 Herstellung chemotransformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen für eine Transformation wurde eine 3 ml Übernachtskultur mit XL1-Blue Zellen angeimpft. Am folgenden Tag wurden 100 ml LB-Medium (12,5 µg/ml) mit 1 ml der Übernachtskultur versetzt und anschließend bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, mindestens 15 min auf Eis aufbewahrt und schließlich bei 4 °C und 5000 rpm für 6 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden auf Eis in je 2 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Mit TFB1 wurde das Volumen auf 40 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden erneut etwa 5 min auf Eis inkubiert, um daraufhin bei 4 °C und 3000 rpm für 6 min pelletiert zu werden. Durch vorsichtiges Schwenken auf Eis wurde das Pellet in 4 ml TFB2 resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert, in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB1	30	mM	K-Acetat
	100	mM	RbCl
	10	mM	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O
	50	mM	MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O
	15	% (v/v)	Glycerol pH 5,8 (mit Essigsäure eingestellt) sterilfiltriert
TFB2	10	mM	MOPS
	75	mM	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O
	10	mM	RbCl
	15	% (v/v)	Glycerol pH 6,5 (mit KOH eingestellt) sterilfiltriert

### 2.2.3.7 Herstellung elektrotransformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Um die Effizienz einer Transformation von Bakterienzellen mit großen Vektoren zu steigern, wurden diese mittels Elektrotransformation in *E. coli*-Zellen eingebracht. Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde 1 l LB-Flüssigmedium (12,5 µg/ml) mit 5 ml einer Übernachtskultur des Stammes XL1-Blue angeimpft und unter Schütteln bei 180 rpm und 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 angezogen. Vor der Ernte wurden die Zellen zunächst 30 min lang auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C für 15 min und 4000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen wie zuvor zentrifugiert, mit 0,5 l eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und vorsichtig in 20 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 4000 g, 4 °C) wurden die Zellen in einem Endvolumen von 2 ml bis 3 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol aufgenommen, in Aliquots von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.8 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein 100 µl Aliquot chemotransformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst auf Eis aufgetaut und zu 10 µl Ligationsansatz gegeben. Der zuvor gemischte Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42 °C für 90 sec einem Hitzeschock unterzogen. Nach etwa 10 min auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C im Inkubator bei 850 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz durch Zentrifugation für 2 min bei 5000 rpm pelletiert und der Überstand bis auf etwa 150 µl entfernt. Das Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und die Suspension auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

### 2.2.3.9 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl zuvor dialysiertem Ligationsansatz und Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Zellen in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben und sofort wurde mit Hilfe eines Micropulsers (Biorad) ein Spannungspuls angelegt (2,5 kV, 25 µFD, 400 Ω). Nach dem Puls wurden die Zellen zügig mit 1 ml LB-Flüssigmedium versetzt, eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert (850 rpm) und anschließend für 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 150 µl entfernt, im restlichen Medium wurde das Bakterienpellet gelöst, um anschließend auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert zu werden.

### 2.2.3.10 DNA-Präparation im Minimalmaßstab

Zur Isolierung von Plasmid-DNA und Identifizierung transformierter *E. coli*-Zellen wurden Kolonien vom LB-Festmedium mit Pipettenspitzen entnommen und über Nacht in einer 2 ml Kultur bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit den Zellen dieser Kulturen eine DNA-Mini-Präparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Die Bakterien werden mit einer NaOH-SDS-haltigen Lösung behandelt, was zur Lyse der Zellen führt. SDS löst als Detergenz Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände, NaOH denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA sowie Proteine. Zur Neutralisation des Lysats wird dieses mit saurem Natriumacetat versetzt, wobei chromosomale DNA langsamer als Plasmid-DNA renaturiert und zusammen mit Proteinen und restlichen Zelltrümmern als unlösliche Komplexe durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Plasmid-DNA, die im Überstand verbleibt, kann im weiteren Verlauf der Präparation durch eine Alkohol-Fällung präzipitiert werden. Die Übernachtskulturen wurden zunächst für 2 min bei 13200 rpm und RT zentrifugiert, die Pellets anschließend in 100 µl Lösung I resuspendiert (Destabilisierung der bakteriellen Zellwände). Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Ansätze mehrmals invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Der Zugabe von 150 µl Lösung III und kräftigem Invertieren folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei RT und 13200 rpm. Daraufhin wurden die Pellets mit 70 % EtOH gewaschen und für 3 min bei RT und 13200 rpm zentrifugiert. Nachdem die Pellets getrocknet waren, wurden sie in 30 µl TE-Puffer (0,1 x) gelöst. Anschließend konnte ein Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen unter zusätzlicher Verwendung von RNaseA sowie eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3.1) durchgeführt werden.

Lösung I	25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	50 mM	Glucose autoklaviert
Lösung II	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Lösung III	3 M	Na-Acetat, pH 4,8 autoklaviert
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA autoklaviert

#### 2.2.3.11 Ammoniumacetat-Fällung von Plasmid-DNA

Für den Fall, dass die aus der Plasmidpräparation im Minimalmaßstab gewonnene DNA sequenziert werden sollte, musste diese zuvor einer zusätzlichen Aufreinigung unterzogen werden. Zu diesem Zweck wurde das Volumen des DNA-Ansatzes mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen 4 M NH<sub>4</sub>Ac versetzt. Nach kräftigem Mischen wurden dem Ansatz 600 µl 100 % EtOH hinzugefügt und nach erneutem Mischen wurde 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde in 200 µl 70 % EtOH gewaschen und wieder zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, RT). Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und schließlich in 50 µl 10 mM Tris-HCl aufgenommen. Nach der Bestimmung der Konzentration war die DNA bereit für die Sequenzierreaktion.

#### 2.2.3.12 Plasmid-DNA Präparation im Großmaßstab (*Midiprep*)

Für die Gewinnung von größeren Plasmid-DNA-Mengen wurde das *JetstarMidisäulen-Kit* von Genomed (Bad Oeynhausen) verwendet. Aus einer 50-100 ml Übernachtskultur wurde dabei die DNA nach dem Protokoll des Herstellers isoliert; die Ausbeute betrug im Allgemeinen zwischen 100 µg und 400 µg.

#### 2.2.3.13 Sequenzierung und Sequenzauswertung

Zur Überprüfung der klonierten DNA wurde jeweils eine Probe mit der Konzentration 250 ng/µl von der Sequencing Core Facility der Universität Bielefeld nach der Kettenabbruchmethode sequenziert. Verwendet wurden dabei der Abi Prism® 3730x1 Sequenzierautomat sowie die *BigDye-terminator v3.1* Chemie. Zur anschließenden Auswertung der Sequenzen wurden entweder der NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) oder das Programm BioEdit (Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA) genutzt.

#### 2.2.4 Präparation und Analyse von RNA

Für das Arbeiten mit RNA wurde ausschließlich Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser eingesetzt, um die verwendeten Lösungen RNase-frei zu halten. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, u.a. auch an für die katalytische Funktion vieler RNasen wichtigen Histidin-Seitenketten in den aktiven Zentren, welche dadurch irreversibel inhibiert werden.

Zur Herstellung des RNase-freien Wassers wurde 1 l Wasser mit 1 ml Diethylpyrocarbonat versetzt, über Nacht unter leichtem Rühren bei RT inkubiert und am Folgetag zweimal autoklaviert.

#### 2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Protoplasten und Pflanzenmaterial mit anschließender DNaseI-Behandlung

Gesamt-RNA wurde aus At7-Protoplasten und *A. thaliana* Keimlingen, Blättern oder Blüten (je etwa 100 mg) mit Hilfe von TRI REAGENT® (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Im Anschluss wurden die RNA-Lösungen zur Eliminierung von DNA mit DNaseI behandelt. Genutzt wurde zu diesem Zweck der DNA-free™ Kit der Firma Ambion; es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die Ausbeute betrug im Allgemeinen 20-40 µg Gesamt-RNA pro Präparation.

#### 2.2.4.2 Reverse Transkription (RT)

1-4 µg DNA-freie RNA wurde mit 10 pmol Oligo(dT) Nukleotiden und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 13 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, nach anschließender Inkubation auf Eis für 10 min folgte die Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Puffer und 2 µl 0,1 M DTT. Nach Inkubation des Ansatzes für 2 min bei 42 °C erfolgte die Zugabe von 1 µl (200 Units) Reverse Transkriptase (SuperScript II, Invitrogen). Der Ansatz wurde weiterhin für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und die Reaktion wurde im Anschluss für 10 min bei 72 °C gestoppt.

#### 2.2.4.3 Quantitative Echtzeit-RT-Polymerasekettenreaktion zur relativen Quantifizierung der Genexpression

Der Ansatz der Quantitativen Echtzeit-RT-Polymerasekettenreaktion (qPCR) beruht auf der spezifischen Amplifikation einer cDNA-Matrize bei gleichzeitiger Quantifizierung des Amplifikats in demselben Reaktionsansatz. Im Anschluss an die Reaktion wird mittels mathematischer Methoden aus dem Vergleich des Amplifikationsverlaufs eines Zielgens und eines zur Standardisierung verwendeten Referenzgens auf die zu Beginn der Reaktion vorliegende relative Matrizenmenge geschlossen. Diese gibt das Maß für das Expressionsniveau des untersuchten Zielgens in einer Probe an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Anwendung der qPCR mit dem *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen) gearbeitet, des Weiteren wurden die

Reaktionen im Rotor-Gene™ 6000 von Corbett Research durchgeführt. Als Referenzgen diente in allen Ansätzen die 18S ribosomale RNA.

#### LiCl-Fällung DNaseI-behandelter Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde zunächst aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und anschließend einer DNaseI-Behandlung unterzogen (2.2.5.1). Um die gewonnene RNA von möglichen Verunreinigungen durch genomische DNA und Proteine zu befreien, wurde zusätzlich eine LiCl-Fällung, welche spezifisch RNA präzipitiert, durchgeführt.

Für die Fällung wurden 2-5 µg der RNA mit 1 Volumen 5 M LiCl versetzt und mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 16000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl 3 M NaAc aufgenommen. Erneut wurde wie oben zentrifugiert und das resultierende Pellet zweimal in 70 % EtOH gewaschen (Zentrifugation wie oben). Nach dem vollständigen Trocknen des RNA-Pellets wurde dieses in 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst.

#### Reverse Transkription (RT)

Die cDNA-Synthese erfolgte abweichend vom oben beschriebenen Protokoll in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Folgende Komponenten wurden zusammengegeben und im Anschluss für 10 min bei RT inkubiert: 4 µl 5 x First Strand Puffer, 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 2 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl oligo(dT) (0,5 µg/µl), 0,5 µl Random-Hexamere (50 ng/µl), 0,5 µl BSA (1 µg/µl), 0,5 µl Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl; Fermentas), 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScriptII, 200 U/µl) und 8 µl gelöste Gesamt-RNA. Daraufhin wurde der Ansatz für 60 min bei 42 °C inkubiert und die Reaktion wurde im Anschluss für 10 min bei 72 °C gestoppt. Für die anschließende Quantifizierung der relativen Genexpression wurde die erhaltene cDNA im Verhältnis 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur Verwendung in Aliquots zu 16 µl bei -20 °C gelagert.

#### Quantifizierung der Genexpression von spezifischen Zielgenen

Für die Quantifizierungsreaktion im Rotor-Gene™ 6000 wurden 5 µl der hergestellten cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Folgende weitere Komponenten waren im Reaktionsansatz vorhanden: 12,5 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG, 0,75 µl 10 µM 5'-Oligonukleotide, 0,75 µl 10 µM 3'-Oligonukleotide, 0,5 µl ROX und Wasser ad 25 µl.

Jedes Experiment wurde in Triplikat-Ansätzen durchgeführt. Des Weiteren wurden Kontrollen mit H<sub>2</sub>O an Stelle von *template*-cDNA angesetzt.

Folgendes Profil wurde verwendet:

**Tab. 2.8: Profil für Quantifizierungsreaktion im Rotor-Gene™ 6000**

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
10	50	
2	95	
10	95	40
10	60	
20	72	

Melt: 72 °C bis 95 °C, in 1 °C-Schritten pro 5 sec

Das Rotor-Gene 6000 Software-Programm korrigiert zunächst automatisch mögliche Abweichungen innerhalb der einzelnen Proben, welche auf Grund von qualitativen und quantitativen Unterschieden in den anfänglichen Matrizen-cDNAs entstehen können. Anschließend erfolgt manuell die Auswertung der Ergebnisse nach Soong (2000):

$$R = \frac{(E_{\text{Referenzgen}})^{C_t(\text{Probe})} \times (E_{\text{Zielgen}})^{C_t(\text{Kalibrator})}}{(E_{\text{Zielgen}})^{C_t(\text{Probe})} \times (E_{\text{Referenzgen}})^{C_t(\text{Kalibrator})}}$$

mit:

R: relative Expression

$E_{\text{Zielgen}}$ : Amplifikationseffizienz des Zielgens

$E_{\text{Referenzgen}}$ : Amplifikationseffizienz des Referenzgens

$C_t(\text{Probe})$ : Schwellenwerte der behandelten/veränderten Probe (z.B. Mutante)

$C_t(\text{Kalibrator})$ : Schwellenwert der unbehandelten Probe (z.B. Wildtyp)

Das Gauss'sche Fehlerfortpflanzungsgesetz wurde zur Berechnung der zugehörigen Fehlerwerte angewendet.

#### 2.2.4.4 *target*-Validierung durch RLM-5'RACE (*RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends*)

modifiziert nach Frohman et al., 1988

Die RLM-5'RACE-Methode diente im Rahmen dieser Arbeit der Validierung von microRNA-*target*-Genen durch das genaue Bestimmen der RISC-induzierten Spaltung innerhalb der *target*-Transkripte.

## Adapter-Ligation und Reverse Transkription (RT)

Blattmaterial der smiRNA-überexprimierenden Pflanzen wurde geerntet und nach der anschließenden Isolierung von Gesamt-RNA sowie DNase-Behandlung (2.2.5.1), wurde an die 5'-Enden der vorliegenden RNA mit Hilfe der T4-RNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich) zunächst ein 45 nt-langer RNA-Adapter ligiert. Die Reaktion fand mit jeweils 10 µg RNA, 600 ng 5'-Adapter-RNA und 80 U T4-RNA-Ligase in 1 x T4 RNA Ligase-Puffer in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl für 1 Stunde bei 37 °C statt. Im Anschluss wurden je 10 µl dieses Ansatzes direkt mit 2 µl 10 mM Oligo(dT)-Oligonukleotiden und 1 µl 10 mM dNTP-Mix für eine Reverse Transkription (RT) eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde wie in 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt.

## *Nested* PCR-Reaktion

Auf die Adapter-Ligation der RNA am 5'-Ende und die anschließende Reverse Transkription folgten zwei PCR-Läufe. Bei dieser so genannten *Nested* PCR wurden für die erste Reaktion als *template* 2 µl cDNA (3.4.7.1) in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass einer am 5'-Ende der cDNA im äußeren Bereich des angehängten, umgeschriebenen Adapters und einer am äußeren 3'-Ende der cDNA binden konnte. Für die zweite Reaktion, die wiederum in 30 µl Gesamtvolumen stattfand, wurde 1 µl des Produktes aus der ersten PCR eingesetzt. In dieser zweiten PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die am 5'-Ende etwa 20 Nukleotide weiter in 3'-Richtung des Adapter-Bereichs bzw. 100-150 Nukleotide weiter in 5'-Richtung des 3'-Endes der cDNA hybridisieren konnten, so dass in diesem PCR-Lauf ein etwas verkürzter Ausschnitt des ersten PCR-Produktes entstand.

Je 10 µl der PCR-Ansätze wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Banden mit der erwarteten Fragmentgröße wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

## TOPO-Klonierung und Kolonie-PCR

Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers kloniert. Nach der Transformation in *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) wurden diese auf LB-IPTG/X-Gal-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag konnten positive Kolonien mittels Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden. Die DNA dieser Bakterienkolonien diente als *template* für zwei Kolonie-PCRs mit unterschiedlichen Oligonukleotid-Kombinationen: Zur Identifizierung von Kolonien mit Insertionen in erwarteter Fragmentgröße im TOPO-Vektor wurde die Reaktion mit genspezifischen



Oligonukleotiden durchgeführt, vektorspezifische Oligonukleotide wurden in der zweiten PCR eingesetzt, um *templates* für die anschließende Sequenzierreaktion zu amplifizieren. Anhand der Sequenzdaten konnten anschließend die durch die jeweiligen smiRNA-vermittelten Spaltungsstellen identifiziert werden.

#### 2.2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und *Northern Blot*

Für einen *Blot* werden zunächst DNA-, RNA- oder Proteinproben elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend dauerhaft auf einer Membran (aus Nitrocellulose oder Nylon) fixiert. Das Ziel ist es, bestimmte Fragmente durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch nachzuweisen. Von einem *Northern Blot* wird beim Transfer von RNA auf eine Membran gesprochen.

Aus Protoplasten oder Arabidopsis Keimlingen isolierte Gesamt-RNA wurde nach DNase-Behandlung in einem 17 % Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen mit dem Elektrophoresesystem *PROTEAN® II Xi Cell* (Ambion) aufgetrennt, um die synthetischen, überexprimierten miRNAs nachzuweisen. Nach dem Gießen des Gels wurde dieses für 1 Stunde bei RT zum vollständigen Polymerisieren aufbewahrt und daraufhin für etwa 1 Stunde einem Vor-Lauf in 0,5 x TBE-Puffer bei 180 V unterzogen. Pro RNA-Präparation wurden 20 µg RNA in möglichst geringem Volumen mit gleichem Volumen Harnstoff-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 4 min inkubiert. Alle RNA-Proben einschließlich des 21 nt großen U6-Größenmarkers und Gesamt-RNA aus nicht-transfizierten Protoplasten bzw. aus WT-Pflanzen sollten das gleiche Volumen (möglichst  $\leq 25 \mu\text{l}$ ) aufweisen und wurden falls nötig mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  entsprechend angeglichen. Kurz vor dem Laden der Proben wurden die Taschen des Polyacrylamidgels mit TBE-Puffer ausgespült um Harnstoff-Ablagerungen zu entfernen. Zunächst erfolgte der Gellauf bei 150 V bis die Proben vollständig in das Gel eingetreten waren, anschließend konnte die Spannung auf 350-400 V hochreguliert werden. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel getreten war.

Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Biosciences) erfolgte mit Hilfe der *Semi-Dry Blotting* Apparatur (Trans-Blot® SD) von Bio-Rad (München). Der Blot wurde auf folgende Weise (von unten nach oben) aufgebaut: Anode, Whatman-Papier, Membran, Gel, Whatman-Papier, Kathode. Das Whatman-Filterpapier und die Nylonmembran waren zuvor in 0,5 x TBE-Puffer für 5 min äquilibriert worden. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 1 Stunde bei einer maximalen Spannung von 22 V.

Zum Fixieren der RNA auf der Membran wurde diese in einem Crosslinker (Stratalinker 1800, Stratagene) bei 120 mJ für 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Nach anschließendem Backen der Membran für 30 min bei 180 °C konnte die Membran zwischen zwei Filterpapieren bis zur Hybridisierung bei RT aufbewahrt werden.

Polyacrylamidgel	17	% (v/v)	Rotiphorese® Gel 30 (Roth)
	42	% (w/v)	Harnstoff
	5	% (v/v)	10x TBE
	6,6	% (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
	0,000375	% (v/v)	TEMED
	0,05	% (v/v)	Ammoniumpersulfat
10 x TBE-Puffer	0,9	M	Tris (pH 7,5)
	0,9	M	Borsäure
	0,02	M	EDTA
Harnstoff-Ladepuffer	8	M	Harnstoff
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol
	0,5	mM	EDTA
	68	% (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>

### Hybridisierung und Nachweis der Sonde

Zur Prähybridisierung der Membran wurde diese zunächst in 10 ml 1 x *PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer* (Sigma, Steinheim) in einem Hybridisierungsröhrchen bei 40 °C für 30 min unter langsamer Rotation inkubiert. Je 100 pmol der mit Biotin am 5'-Ende markierten DNA-Sonde (revers-komplementäre Sequenz zur jeweiligen (s)miRNA bzw. zum U6-Marker) wurden zur Hybridisierung der Membran bzw. der geblotteten RNA in den Hybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 40 °C unter langsamer Rotation im Drehofen inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Membran nacheinander in den auf 50 °C vorgewärmten Waschlösungen I, II und III für je 20 min bei gleicher Temperatur unter Drehen gewaschen. Nach anschließendem Spülen der Membran mit 3 x SSC konnte sie direkt für den Nachweis der mit Biotin markierten Sonde mit dem *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Kit* (Pierce, Irland) nach Angaben des Herstellers eingesetzt werden. Abschließend erfolgte in der Detektionsprozedur die Exposition der Membran in völliger Dunkelheit gegen einen Film (Kodak Biomax Light Film) für einige Sekunden bis zu einigen Minuten. Die Entwicklung und Fixierung des Films erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers.

Waschlösung I	2	x	SSC
	0,2	%	SDS
Waschlösung II	1	x	SSC
	0,1	%	SDS
Waschlösung III	0,5	x	SSC
	0,1	%	SDS

## 2.2.5 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

### 2.2.5.1 Sterile Anzucht

Für die sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana* wurden Samen unter der Sterilbank zunächst in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, in welches daraufhin 1 ml der Waschlösung gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation der Samen in der Waschlösung für 10 min, wobei in regelmäßigen Abständen kräftig invertiert wurde. Diese Lösung wurde anschließend durch 96 % EtOH ersetzt und die Samen wurden 5 min lang inkubiert. Nachdem der letzte Schritt einmal wiederholt worden war, wurden die Samen mit dem Ethanol zusammen auf ein *Whatman*-Filterpapier (*Whatman International*, England) gegeben, bis das Ethanol verdampft war. Anschließend konnten die getrockneten Samen von den Filterpapieren aus direkt auf 0,5 x MS-Platten gleichmäßig verteilt werden. Die Platten wurden für 3 Tage bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert und anschließend in der Lichtkammer unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit in regelmäßigen Zyklen; 22 °C) angezogen.

Samen-Waschlösung	70 %	EtOH
	0,05 %	Triton X-100

### 2.2.5.2 Anzucht auf Erde

Für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde wurden 5 bis 10 Samen pro Topf auf Blumenerde mit 1/3 Vermiculit ausgesät. Zur Stratifikation wurden die Töpfe für 3 Tage bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt und anschließend unter Kurztag- oder Langtag-Bedingungen angezogen.

## 2.2.6 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

### 2.2.6.1 Herstellung chemotransformationskompetenter Agrobakterien

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden chemokompetente Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*) vom Stamm GV3101 mit Rifampicin- und Gentamycinresistenz hergestellt. Eine 5 ml Vorkultur wurde über Nacht in selektivem Medium (mit 100 µg/ml Rifampicin und 40 µg/ml Gentamycin) bei 28 °C unter Schütteln angezogen (200 rpm), und am darauf folgenden Tag in 50 ml selektives LB-Medium überimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 28 °C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 - 1,0 erreicht war. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 2800 g zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml eiskaltem 20 mM

CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Es wurden Aliquots von 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.6.2. Transformation von Agrobakterien

Chemokompetente Agrobakterien wurden mit den zu transformierenden Konstrukten im binären Vektor pGPTV oder pBIN-FFL, die eine Kanamycinresistenz besitzen, transformiert.

Jeweils 4 µg DNA wurden zu den noch gefrorenen, kompetenten Bakterienzellen auf Eis gegeben, woraufhin ein Hitzeschock bei 37 °C für 5 min erfolgte. Nach diesem Schritt wurde jeweils 1 ml LB-Flüssigmedium pro Ansatz dazugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 4 Stunden bei 28 °C und 800 rpm geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in etwa 100 µl des Überstandes gelöst und die Zellen wurden auf LB-Festmedium mit Rifampicin (100 µg/ml), Gentamycin (40 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert. Es folgte eine Inkubation bei 28 °C für 3 Tage. Mit Hilfe einer DNA-Präparation im Minimalmaßstab (2.2.3.10) oder einer Kolonie-PCR (2.2.2.4) wurde das Vorhandensein der Plasmide in den Bakterienzellen bestätigt.

Um die Zellen bis zur Pflanzen-Transformation (2.2.7.3) aufzubewahren, wurden Glycerol-Stocks (36 %) angelegt. Dazu wurden je 5 ml selektives LB-Flüssigmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 2-3 Tage bei 28 °C geschüttelt. Die Bakterienkulturen konnten anschließend direkt für die Herstellung von 36 % Glycerol-Stocks eingesetzt werden.

#### 2.2.6.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps Columbia Col-0 und smiRNA(PABP)3 exprimierende Pflanzen wurden für die Herstellung transgener Pflanzen auf Erde unter LT-Bedingungen angezogen. Dreißig Tage nach der Aussaat wurden die Infloreszenzen nahe der Rosette abgeschnitten. Dies führte zur Synchronisation der Blühzeitpunkte aller Pflanzen sowie zu einer größeren Anzahl von Blüten durch vermehrtes Wachstum sekundärer Infloreszenzen. Nach 7-10 Tagen konnten die Pflanzen für die Transformation eingesetzt werden.

Pro zu transformierendem Konstrukt wurden 500 ml YEP-Medium inklusive Antibiotika mit 5 ml einer Übernachtskultur der mit den binären Plasmiden transformierten Agrobakterien (aus Glycerol-Stocks) angeimpft und unter Schütteln bei 28 °C für 2-3 Tage inkubiert. Am Tag der Transformation wurde die 500 ml Kultur mit 5 % Saccharose und 0,02 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) versetzt und erneut für 10 min bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in ein Becherglas überführt und die Infloreszenzen von Wildtyp Col-0 Pflanzen (fünf pro Topf) oder pri-

smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen wurden etwa zwei Minuten lang in die Agrobakterien-Kultur getaucht. Daraufhin wurden die Pflanzen in Frischhaltefolie verpackt und liegend über Nacht im Dunkeln bei RT aufbewahrt. Am darauf folgenden Tag wurden die Pflanzen ausgepackt und im Gewächshaus weiter unter Langtagbedingungen angezogen. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurde dieser Ablauf nach 4 Tagen mit denselben Pflanzen wiederholt. Die Pflanzen wurden bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen weiter angezogen, bis nach dem Trocknen der Pflanzen die Samen der T1-Generation geerntet werden konnten.

#### 2.2.6.4 Selektion transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Um *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zu identifizieren, die erfolgreich mit dem pGPTV-BAR Vektor transformiert worden waren, wurden etwa 3 Wochen alte Keimlinge der T1-Generation dreimal im Abstand von 5 Tagen mit BASTA-Lösung besprüht. Das Kontaktherbizid BASTA wird von den Pflanzen über die Blätter aufgenommen und blockiert in den Zellen die Glutamin-Synthetase. Ohne dieses Enzym reichert sich das Zellgift Ammoniak im Pflanzengewebe an, welches daraufhin abstirbt. Transformierte Keimlinge enthielten das *BAR*-Gen, das gegen BASTA eine Resistenz hervorruft.

Die abgereiften Samen von Pflanzen, die mit Hilfe des Vektors pBIN-FFL transformiert worden waren, wurden zur Selektion von positiven Transformanten zunächst oberflächensterilisiert (2.2.6.1), auf 0,5 x MS-Platten mit 100 µg/mL Kanamycin ausgesät und unter LT-Bedingungen kultiviert. Transgene Pflanzen mit Kanamycinresistenz zeigten nach 10 Tagen normal entwickelte und ergrünte Keim- und Primärblätter, Pflanzen ohne entsprechende Resistenz starben kurze Zeit nach der Keimung. Transgene Keimlinge wurden in Erde pikiert und im Gewächshaus weiterkultiviert. Identifizierte transgene Pflanzen wurden bis zur Samenreife herangezogen.

BASTA-Lösung	240 µg/ml	BASTA (Hoechst Schering, AgrEvo, Düsseldorf)
	0,005 %	Silwet L-77

#### 2.2.7 Methoden zur Metabolitenanalyse in *Arabidopsis thaliana*

##### 2.2.7.1 Saure methanolische Extraktion von Anthocyanen und photometrische Quantifizierung

(modifiziert nach Rabino und Mancinelli, 1986)

Zur Quantifizierung des Anthocyanengehaltes von smiRNA(CHS)-überexprimierenden Keimlingen sowie Keimlingen, die die mutierten Versionen der smiRNA(CHS)

(smiRNA(CHS)-Var1-4) überexprimierten, wurden diese Pflanzen auf MS-Festmedium mit 4 % Saccharose nach dreitägiger Stratifizierung im Lichtraum unter LT-Bedingungen angezogen. Am fünften bis siebten Tag nach Keimung der Samen erfolgte die Extraktion der Anthocyane. Etwa 100-150 mg frischen Pflanzenmaterials wurden geerntet und eingewogen, mit 1 ml saurem Methanol (1 %HCl, w/v) versetzt und unter mäßigem Schütteln bei RT über Nacht inkubiert. Zur Sedimentation des festen Pflanzenmaterials wurden die Proben für 1 min bei 14000rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl des Überstandes zur Messung der Absorption bei 530 nm und 657 nm Wellenlänge in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) eingesetzt. Die Messungen wurden gegen das Extraktionsmittel als Nullwert ausgeführt. Zusätzlich wurden auch Messungen mit Wildtyp-Extrakten (auf Festmedium mit 4 % und ohne Saccharose angewachsen) durchgeführt.

Mit folgender Formel wurde der Anthocyangehalt quantifiziert (Mancinelli und Schwartz, 1984):

$$Q_{\text{Ant}} = (A_{530} - 0,25 \times A_{657})/M$$

mit

$Q_{\text{Ant}}$ : Maß für den auf die Menge eingesetzten Pflanzenmaterials normalisierten Anthocyangehalt

$A_{530}$ : Absorption bei 530 nm

$A_{657}$ : Absorption bei 657 nm

M: Einwaage frischen Pflanzenmaterials [g]

Alle Proben wurden als Triplikate von zwei unabhängigen biologischen Replikaten gemessen. Der Mittelwert aus diesen sechs Einzelmessungen wurde als Endergebnis für den Anthocyangehalt angegeben. Die zugehörigen Standardabweichungen wurden als Fehlerwerte eingesetzt.

#### 2.2.7.2 Extraktion und Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC) von Flavonolen

Zur Auftrennung und Analyse von Flavonolen wurden methanolische Extrakte aus pr-smiRNA(CHS) exprimierenden Keimlingen hergestellt. Dazu wurden 100-150 mg Material von sieben Tage alte Pflanzen geerntet, mit 500 µl 80 % MeOH versetzt und nach Zugabe einiger Zirconia-Kügelchen (Biospec, USA) für insgesamt zwei Minuten im Tissue Lyser (Quiagen/Retsch) bei 30 Hz homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 65 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (14000 rpm, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, für etwa zwei Stunden bei 60 °C unter Vakuum eingedampft (SPD Speedvac) und schließlich in 1 µl Methanol / mg Pflanzenmaterial aufgenommen.

Die Auftrennung der methanolischen Extrakte konnte anschließend anhand einer hochauflösenden Dünnschichtchromatographie vorgenommen werden. Mit Hilfe einer Glaskapillare wurden je 4 µl der Extrakte auf eine 10 x 10 cm Kieselgelplatte (Kieselgel-60, Merck) im Abstand von 1 cm zueinander und zum unteren Rand aufgetragen. Die Platte wurde anschließend aufrecht in eine abgedeckte Laufkammer gestellt, in die bereits das Laufmittel eingefüllt worden war. Hierzu diente ein Gemisch aus 30 ml Ethylacetat, 3,6 ml Ameisensäure (100 %), 3,6 ml Essigsäure (100 %) und 7,8 ml Wasser. Nach Auftrennung der Extrakte für etwa eine Stunde wurde die Kieselgelplatte nach Trocknung mehrfach mit einer 1 % Naturstoffreagenz A-Lösung (w/v) in Methanol sowie abschließend einmal mit 5 % methanolischem PEG-4000 zur Verstärkung der Färbung besprüht. Zur Dokumentation wurde die Kieselgelplatte unter UV-Licht (312 nm) fotografiert.

#### 2.2.7.3 Naturstoffreagenz A-Färbung von Arabidopsis-Keimlingen

(modifiziert nach Sheahan und Rechnitz, 1992)

Das Vorkommen von Flavonolen in 5 Tage alten Arabidopsis-Keimlingen, die die smiRNA(CHS) exprimierten, wurde mittels Naturstoff-Reagenz A- (Diphenylborsäure-β-aminoethylester, DPBA) Färbung visualisiert, und resultierende Fluoreszenz konnte unter UV-Licht detektiert werden (Leica DM 5500 B, 340-380 nm Anregungsfilter, dichromatischer Spiegel mit Durchlässigkeit von Wellenlängen größer 425 nm). Zuvor waren die zu untersuchenden Keimlinge auf 3 ppm des Carotinoidbiosynthese hemmenden Herbizids Norflurazon angezogen worden, um das Ergrünen der Pflanzen und die daraus resultierende Chlorophyllfluoreszenz zu vermeiden. Geerntete Keimlinge wurden unter leichtem Schütteln für 2 Stunden bis zur Sättigung in einer 0,25 %igen Naturstoffreagenz A-Lösung (in 0,00375 % Triton X-100) gefärbt und anschließend analysiert. Als Kontrollen dienten Wildtyp- sowie *tt4*-Keimlinge.

#### 2.2.8 *Arabidopsis thaliana* Zellkultur

Die Pflege der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionskultur (At7) mit Hintergrundakzession Columbia wurde von M. Kuhlmann durchgeführt. Die Kultur wurde im Dunkeln unter Verwendung von modifiziertem B5- (Kombrink und Hahlbrock, 1986) und MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) kultiviert. Fünf Tage nach der Subkultivierung wurden die Zellen für die Isolation von Protoplasten verwendet.

### 2.2.8.1 Protoplastierung der *A. thaliana* Zellkultur

(modifiziert nach Dangl et al., 1987)

At7 Zellen einer 5 Tage alten Zellsuspensionslösung wurden zunächst in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert (Beschleunigung 5, Bremse 3). Das Zellpellet wurde in 240 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und anschließend auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt. Nach kurzem, vorsichtigem Invertieren wurde erneut unter gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 40 ml Enzymlösung resuspendiert und je 20 ml der Suspension wurden in eine Petrischale gegeben, in die zuvor 10 ml der Enzymlösung pipettiert worden waren. Die Petrischale wurde im lichtundurchlässigen Inkubator über Nacht bei 26 °C und 20 rpm inkubiert.

Enzymlösung	240 mM 35 g/l 8,125 g/l	CaCl <sub>2</sub> Cellulase Mazerase sterilfiltriert
B5-Lösung (1 l)	3,2 g 1 mg 0,4 M	Gamborgs B5-Medium (Sigma) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure pH 7,5 Saccharose pH 5,7 mit 1 M NaOH eingestellt sterilfiltriert
PEG-Lösung	25 % (w/v) 450 mM 100 mM	PEG 6000 (Duchefa) Mannitol Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> pH 9 mit 1 M KOH eingestellt autoklaviert
Stoppreagenz	275 mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> autoklaviert

### 2.2.8.2 Transfektion der At7-Protoplasten und Protoplastenernte

(modifiziert nach Hain et al., 1985)

Am Tag nach der Protoplastierung wurden die Protoplasten in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 6 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 25 ml CaCl<sub>2</sub> (240 mM) resuspendiert und nach kurzem, vorsichtigem Invertieren noch einmal unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Zu dem Pellet wurden dann 5,5 ml B5-Lösung gegeben, es wurde kurz invertiert und die Suspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem mit B5-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 14,5 ml aufgefüllt worden war, wurde für 6 min bei 800 rpm und RT zentrifugiert. Die flotierenden Protoplasten wurden anschließend mit *Cell-Saver*-Spitzen abgezogen und in



ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt; es wurde wieder auf 14,5 ml mit B5-Lösung aufgefüllt, wie oben zentrifugiert und flotierenden Protoplasten wurden abermals in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Invertieren wurden 200 µl Aliquots der Protoplastensuspension in Zellkulturgefäße pipettiert, die dann direkt für die nachfolgenden Transfektionsexperimente eingesetzt werden konnten.

Jeweils 10 µg der vorbereiteten DNA-Proben wurden für die Transfektion zur späteren Isolierung von RNA für das *Northern Blot* Experiment (3.3.5) auf die Oberfläche der Protoplastensuspension gegeben. Nachdem vorsichtig 200 µl Polyethylenglycol (PEG) hinzugefügt worden waren, wurde der Ansatz mit der DNA für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden zunächst 1 ml, kurz darauf 4 ml Stoppreagenz hinzugefügt und bei RT und 800 rpm wurde für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zunächst wurden 1 ml, dann 6 ml B5-Lösung hinzu pipettiert. In einem abgedunkelten Inkubator wurden die verschlossenen Zellkulturröhrchengefäße schräg stehend für etwa 20 Stunden bei 26 °C inkubiert.

Für die Ernte der transfizierten Protoplasten wurden am Folgetag jeweils 20 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (240 mM) zu den Zellen gegeben, kurz invertiert und zentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von etwa 1 ml abgesaugt, die Pellets resuspendiert und jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach kurzem Zentrifugieren (15-20 sec, 1300 rpm, RT) wurde der Überstand vollständig mit der Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Protoplasten konnten dann entweder bei -80 °C gelagert oder für die anschließende Verwendung auf Eis gestellt werden.

### 2.2.9 Detektion von Protein-Interaktionen im *Yeast-2-Hybrid* System

Mit Hilfe des Yeast-2-Hybrid (Y2H) Assays kann die Interaktion zweier Proteine im eukaryotischen System *in vivo* getestet werden. Aufgrund der hohen Sensibilität des Systems lassen sich selbst schwache oder transiente Interaktionen nachweisen, außerdem besteht die Möglichkeit, detektierte Protein-Protein-Interaktionen indirekt zu quantifizieren. Des Weiteren kann dieses System angewandt werden, um die Domänen zweier interagierender Proteine ausführlich zu charakterisieren, oder aber um gänzlich neue Interaktionspartner ausfindig zu machen. Es basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsregulatoren aus physikalisch getrennten, funktionsunabhängigen Domänen bestehen. Diese transaktivierenden Regulatoren besitzen häufig eine DNA-Bindedomäne (BD) sowie eine Aktivierungsdomäne (AD), wobei die BD an eine spezifische Promotorsequenz binden kann und die AD den RNA Polymerase II Komplex an die DNA rekrutiert, um das Gen *downstream* der Promotorsequenz zu transkribieren. Gelangen beide Domänen in der Promotorregion in räumliche Nähe zueinander, erfolgt die Transaktivierung des Zielgens.

Im verwendeten MATCHMAKER LexA System (Clontech) wird als DNA-Bindedomäne das prokaryotische LexA-Protein aus *E. coli* benutzt, welches normalerweise als Repressor von SOS Genen fungiert. Die Aktivierungsdomäne besteht aus dem B42-Peptid aus *E. coli*, welches auch die Transkription in Hefe bewirken kann. Beide Domänen sind in verschiedenen Klonierungsvektoren kodiert und bilden Fusionen mit Genen, deren Proteininteraktionen untersucht werden sollen. Die AD B42 ist mit einem Protein fusioniert, das entweder bekannt ist oder aus einer cDNA-Bank stammt. Durch Interaktion eines *target*-Proteins mit dem AD-fusionierten Protein kommt es unter Umständen zur Ausbildung eines Transkriptionsaktivators mit DNA-BD und AD, der an die LexA-Operatoren in der Promotorsequenz des Gens binden kann. Die Interaktion der Proteine wird phänotypisch durch die Aktivierung des Reportergens (in diesem Fall das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase) sichtbar.

Der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] wurde mit den zwei Vektoren pGilda und pB42AD nach dem Protokoll von Clontech kotransformiert. Der pGilda-Vektor enthielt das Gen, welches für das LexA-Protein mit DNA-BD kodiert, sowie ein Gen für die Histidin-Biosynthese, während der pB42AD-Vektor die B42-AD sowie ein Gen für die Tryptophan-Biosynthese enthielt. CID11 war als „*bait*“-Protein mit der BD fusioniert, die verschiedenen Varianten von PABP2 und PABP3 („*prey*“-Proteine) waren mit der AD fusioniert. Alle PABP-cDNAs wurden jeweils EcoRI/XhoI in pB42AD kloniert.

Der Hefestamm EGY48[p8op-LacZ] enthielt den Vektor p8op-LacZ, in dem acht LexA-Operatoren hintereinander vorliegen, an die das LexA-Protein binden konnte. Zusätzlich enthielt das Plasmid ein Gen für die Uracil-Biosynthese, damit der Stamm auf U<sup>-</sup>Medium selektiert werden konnte.

Kam es zu einer Interaktion zwischen dem „*bait*“- und dem „*prey*“-Protein, also zwischen CID11 und einer der verschiedenen Varianten von PABP2 und PABP3, wurden DNA-BD und AD in räumliche Nähe gebracht, wodurch das durch die LexA-Operatoren gesteuerte lacZ-Reportergen abgelesen werden konnte. Die Hefezellen exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase, deren Aktivität durch Blaufärbung der Hefekolonien sichtbar wurde.

Hefezellen, die die drei Vektoren enthielten, wurden mit einem HWU<sup>-</sup>Medium selektiert. Da die AD im pB42AD-Vektor und das LexA-Fusionsprotein im pGilda-Vektor unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors standen, war eine Induktion durch Galaktose notwendig.

#### 2.2.9.1 Anzucht und Herstellung kompetenter Hefezellen

150 ml YPD-Medium wurden mit einer Übernachtskultur des Hefestamms EGY48[p8oplacZ] in SD-U<sup>-</sup>Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,3 angeimpft. Unter ständigem Schütteln (220 rpm) wurde die Suspension bei 30°C inkubiert und bis zur OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 angezogen. Nach der Überführung in drei 50 ml Reaktionsgefäße und einem Zentrifugationsschritt bei 1000 g und RT für 5 min wurde der Überstand verworfen, die Pellets in je 25 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, in einem Reaktionsgefäß vereinigt

und wiederum unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Hefepellets wurden anschließend in 5-10 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und schließlich in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die Suspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt und erneut wie oben zentrifugiert. Daraufhin folgte das Resuspendieren des Pellets in 1,5 ml 1x TE/LiAc.

10 x TE-Puffer	0,1 M	Tris (pH 7,5 mit HCl)
	10 mM	EDTA
10 x Li-Acetat	1 M	Li-Acetat
		pH 7,5 (mit Essigsäure)

### 2.2.9.2 Transformation von Hefe

Für die Transformation wurden jeweils 1 µl der zu transformierenden Plasmide, 10 µl Lachs-Sperma-DNA (10 mg/ml) und 100 µl kompetente Hefezellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Durch Zugabe von 600 µl PEG/TE/LiAc wurde die Transformation vermittelt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 30°C unter Schütteln (220 rpm) wurden 70 µl DMSO hinzugefügt und ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C durchgeführt. Daraufhin wurden die Transformationsansätze für einige Sekunden auf Eis inkubiert und für 10 sec bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 300 µl 1 x TE resuspendiert. Jeweils 100 µl der Transformationsansätze wurden abschließend auf SD glc HWU<sup>-</sup>-Festmedium ausplattiert, die Platten mit Parafilm versiegelt und drei Tage bei 30°C inkubiert.

PEG/TE/LiAc	1 x	TE
	1 x	LiAc
	40 % (v/v)	PEG4000
SD glc HWU-Festmedium	6,7 g/l	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
	650 mg/l	HWU- dropout
	20 g/l	DIFCO Bacto Agar
	2 % (w/v)	nach dem Autoklavieren steril zugegeben: Glukose

### 2.2.9.3 Interaktionstest von Proteinen auf Indikatorplatten

Die auf SD glc HWU<sup>-</sup>-Platten gewachsenen transformierten Hefezellen wurden vollständig mit einer Impföse unter Zugabe von 0,5 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein

1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, woraufhin die Suspension für 10 sec bei 13200 rpm zentrifugiert wurde. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 0,2-0,4 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und 5 µl des Ansatzes wurden auf SD gal HWU<sup>-</sup> X-Gal Festmedium als *Dots* aufpipettiert. Nach vollständigem Trocknen der Hefen wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei 30°C bzw. RT über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurden, wie nachfolgend beschrieben, Glycerol-Dauerkulturen angelegt. Zu diesem Zweck wurden etwa 300 µl der Hefesuspension mit dem gleichen Volumen 65 % Glycerol versetzt. Nach sorgfältigem Mischen konnten die Kulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert werden.

SD gal HWU- X-Gal Festmedium	6,7	g/l	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
	650	mg/l	HWU--dropout
	18	g/l	DIFCO Bacto Agar nach dem Autoklavieren steril zugegeben:
	2	% (w/v)	Galaktose
	50	ml/l	20 x BU salts
	1,6	ml/l	X-Gal (50 mg/ml)
Glycerol-Lösung	65	% (v/v)	Glycerol
	100	mM	MgSO <sub>4</sub>
	25	mM	Tris-HCl (pH 7,5)

### 2.2.10 *Whole mount in situ* Hybridisierung

Für eine *in situ* Hybridisierung (nach Gong et al, 2005) in ganzen Arabidopsis Keimlingen zur Lokalisierung von Gesamt-RNA wurden 4-5 Tage alte, auf 0,5 x MS-Festmedium im Lichtraum angezogene Keimlinge geerntet und in sterile Reaktionsgefäße gegeben. Ein Anteil der Keimlinge wurde in 0,4 µM Leptomycin B (LMB) für 10 min Vakuum infiltriert, einige Keimlinge wurden auf gleiche Weise mit 1,4 % EtOH mock-behandelt. Es folgte eine Inkubation für 45 min bei RT.

Zur Fixierung wurden die Pflanzen in 1 ml *Fixation Cocktail* aufgenommen und 45-60 min unter leichtem Schütteln (40 rpm) bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Proben in 100 % MeOH für 5 min (ein Mal wiederholen), sowie in 100 % EtOH (zwei Mal wiederholen) für die gleiche Zeitspanne unter leichtem Schütteln. Daraufhin wurden die Pflanzen in 1 ml EtOH:Xylen (1:1) unter leichtem Schütteln bei RT für 30-45 min inkubiert und es folgten erneut Inkubationsschritte in zunächst 100 % EtOH und dann 100 % MeOH wie zuvor beschrieben. Die Pflanzen wurden im Anschluss kurz in MeOH:*Fixation Buffer* FA<sup>-</sup> (1:1) gewaschen und schließlich 60 min lang bei RT unter leichtem Schütteln in *Fixation Buffer* inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in *Fixation Buffer* FA<sup>-</sup> wurden die Proben kurz mit *PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer* (Sigma) gespült und anschließend in diesem für 1 Stunde bei 50 °C vorhybridisiert. Es

folgte die Zugabe von 5 pmol der 5'-Fluorescein-markierten Oligo(dT)-Sonde (45mer). Die Proben wurden für mindestens 8 Stunden im Dunkeln unter langsamem Rotieren inkubiert. Am Folgetag wurden zwei 20-minütige Waschschrte bei 50 °C im Dunkeln durchgeführt (2 x SSC/0,1 % SDS, 0,2 x SSC/0,1 % SDS) und schließlich konnten die Keimlinge im konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica DM RBE TCS4D) analysiert werden.

<i>Fixation Buffer</i>	120	mM	NaCl
	7	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,7	mM	KCl
	0,1	%	Tween 20
	80	mM	EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure)
	5	% (v/v)	Formaldehyd (FA)
	10	% (v/v)	DMSO

*Fixation Cocktail*

*Fixation Buffer + n-Heptan (1:1)*

*Fixation Buffer FA-*

*Fixation Buffer ohne Formaldehyd*

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der smiRNA-Technologie mit Hilfe bioinformatischer Werkzeuge am Beispiel des *Chalkonsynthase*-Gens

Die Chalkonsynthase ist eines der Schlüsselenzyme in der Biosynthese von Flavonoiden (vergleiche 1.3). Sie katalysiert einen der initialen Schritte auf dem Weg zur Produktion von Flavonolen, Anthocyanen und Proanthocyanidinen (Abb. 1.7). In *chs*-Mutanten (auch *transparent testa*, *tt4*) werden keine Flavonoide gebildet. *tt4*-Samen zeigen aufgrund des Mangels an Proanthocyanidinen eine gelbe Färbung, und Keimlinge akkumulieren unter Stressbedingungen keine Anthocyane im Hypokotyl und den Kotyledonen.

#### 3.1.1 Design und Auswahl der smiRNA(CHS) mit Hilfe von *RNAhybrid*

Um eine geeignete synthetische microRNA (smiRNA) für den *knockdown* von *CHS*-Transkripten auszuwählen, wurden zunächst manuell verschiedene 21 Nukleotide (nt) lange smiRNA-Kandidaten erstellt. Diese zeigten entgegengesetzte Komplementarität zu kodierenden Bereichen der *CHS* Sequenz, die möglichst nicht am Rande sondern bevorzugt in der Mitte der 1180 nt langen cDNA liegen sollten. Insgesamt neun smiRNA(CHS)-Kandidaten wurden mit dem *target*-Vorhersageprogramm *RNAhybrid* (Rehmsmeier et al., 2004) gegen das gesamte *A. thaliana* Transkriptom (TAIR6\_cds\_20060907) getestet. Die eingesetzten Parameter sind unter 2.2.1 zusammengefasst. Auf diese Weise wurde überprüft, ob der jeweilige smiRNA-Kandidat noch andere, unerwünschte Zielgene, so genannte *off-targets* neben der *CHS* haben würde. Zusätzlich zu den Hybridisierungsstrukturen zwischen der miRNA und der jeweiligen Zielsequenz wird durch *RNAhybrid* auch die minimale freie Energie (*mfe*) des Hybrids ermittelt. Außerdem betrachtet *RNAhybrid* G:U-Paarungen im Gegensatz zu anderen *target*-Vorhersageprogrammen nicht als Fehlpaarungen, sondern berechnet für Hybride, in denen solche Paarungen vorkommen entsprechend höhere *mfe*-Werte.

smiRNA(CHS)-Kandidaten, die die angeforderten Voraussetzungen nicht erfüllten, weil beispielsweise der *mfe*-Wert zu hoch war oder sehr wahrscheinliche *off-targets* vorausgesagt wurden, wurden entweder direkt verworfen oder aber bei viel versprechenden Kandidaten um ein oder mehrere Nukleotide entlang der Zielsequenz in 5'- oder 3'-Richtung versetzt, und die Vorhersage wurde wiederholt. Auf diese Weise

konnten zuvor vorhergesagte *off-targets* eliminiert werden. Bei der Einschätzung putativer *off-targets* wurde vor allem die Hybridstruktur, die sie mit dem smiRNA-Kandidaten bilden, überprüft.

Die schließlich für das weitere Vorgehen ausgewählte smiRNA(CHS) hybridisiert perfekt mit ihrer Bindestelle, die von Position 844 bis 864 in der kodierenden *CHS*-Sequenz reicht (Tab. 3.1). Die vorhergesagte minimale freie Energie des smiRNA(CHS):*CHS* Hybrids liegt bei -44 kcal/mol. Eines der zwölf vorhergesagten *off-targets* wurde unter Anwendung der oben genannten Regeln tatsächlich als wahrscheinliches Ziel der smiRNA(CHS) eingestuft (Tab. 3.1). Mit der vorliegenden Hybridisierungsstruktur und einem *mfe* von -32,1 kcal/mol erfüllt es die spezifizierten Bedingungen. Die vollständigen Ergebnisse der *RNAhybrid*-Vorhersage für die smiRNA(CHS) sind im Anhang aufgeführt (7.2.1).

**Tab. 3.1: Zusammenfassung des *RNAhybrid* Ergebnisses für smiRNA(CHS)**

AGI: *Arabidopsis* Genome Initiative gene identification number, *mfe*: minimale freie Energie

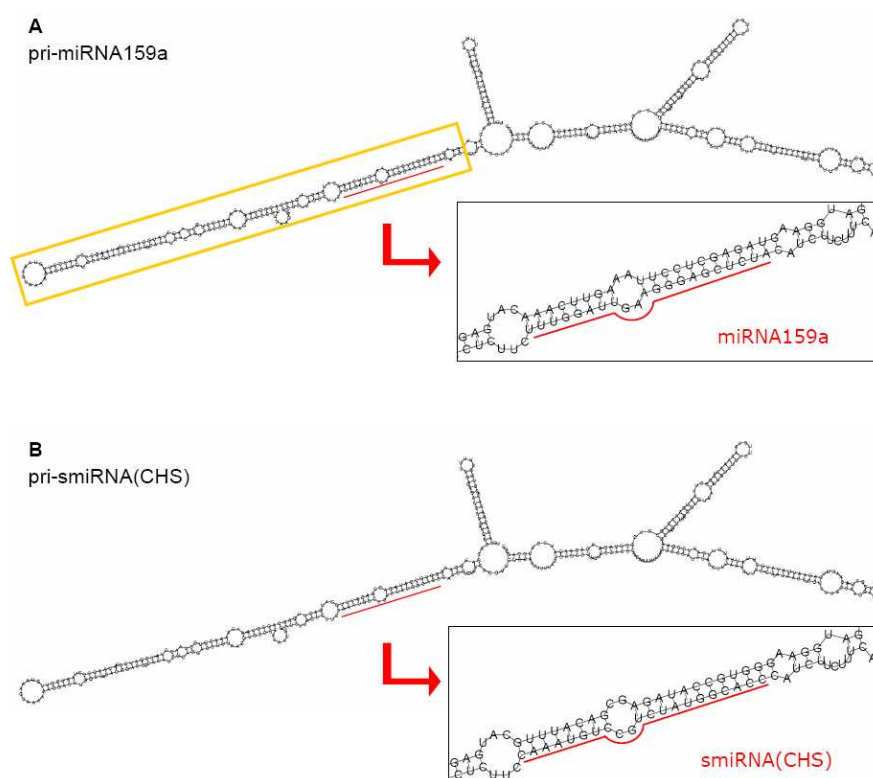
<i>target</i> -Gen	AGI	<i>mfe</i> [kcal/mol]	smiRNA: <i>target</i> Hybrid		
<i>Chalkonsynthase (CHS)</i>	At5g13930	-44,0	<i>target</i>	5' U	A 3'
				GGUGCCAUAAGACGGACAUUUG CCACGGUAUCUGCCUGUAAAC	
			smiRNA(CHS)	3'	5'
<i>Oxidoreduktase</i>	At1g49390	-32,1	<i>target</i>	5' C G C 3'	
				GGUGCCG AGAUGGAUAAU CCACGGU UCUGCCUGUAA	
			smiRNA(CHS)	3' A AC 5'	

### 3.1.2 Analyse der Sekundärstruktur der pri-smiRNA(CHS) mit *RNAfold*

Die ausgewählte smiRNA(CHS) sollte aus dem etwa 470 bp langen Primärtranskript der natürlichen *MIR159a* prozessiert werden (Alves Jr, 2007). Dieses Primärtranskript wurde als Basis oder *backbone* ausgewählt, weil ihr Gen sehr gut charakterisiert ist und hohe Mengen reifer miRNAs hervorbringt (Reinhart et al., 2002).

Zunächst wurde die Faltung des Transkriptes mit dem *web*-basierten Programm *RNAfold* (Mathews et al., 1999) bestimmt (Abb. 3.1 A). Zur Generierung der pri-smiRNA(CHS) wurden die Sequenzen der miRNA159a und miRNA159a\* *in silico* gegen die smiRNA(CHS)-Sequenz und ihre komplementäre Sequenz ausgetauscht. Dabei wurde auch die in der natürlichen miRNA vorliegende Fehlpaarung zur miRNA\* an gleicher Position nachgebildet. Für die vorhergesagte pri-smiRNA(CHS) Sekundärstruktur ergab sich schließlich keine Abweichung zur Sekundärstruktur von pri-miRNA159a (Abb. 3.1 B). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die getestete smiRNA(CHS) schließlich für die Herstellung einer pri-smiRNA(CHS) ausgewählt.

Durch zwei aufeinander folgende *overlap extension*-PCR Reaktionen mit der pri-miR159a cDNA (in einem modifizierten pUC19-Vektor, T. Merkle) als *template* wurden die zwei entsprechenden Sequenzbereiche modifiziert. Das neue Konstrukt sollte unter der Kontrolle des starken, konstitutiven CaMV 35S-Promotors stehen (vergleiche auch 3.2.1 für detaillierte Beschreibung). *A. thaliana* Wildtyppflanzen wurden mittels *A. tumefaciens* mit dem pri-smiRNA(CHS) Konstrukt (im pGPTV-BAR Vektor) transformiert (2.2.6) und elf transgene Linien wurden identifiziert.



**Abb. 3.1: Sekundärstruktur von pri-smiRNA(CHS) im Vergleich zu pri-miRNA159a**

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen der Primärtranskripte der natürlichen miRNA159a (A) und der synthetischen miRNA(CHS) (B), bei der die Sequenzen der reifen miRNA159a und miRNA\* gegen die Sequenzen der smiRNA(CHS) und ihre komplementäre Sequenz ausgetauscht wurden. Zur Verdeutlichung werden detaillierte Ansichten auf die Bereiche der miRNA:miRNA\* bzw. smiRNA:smiRNA\* gezeigt. Zusätzlich wird in (A) der *precursor* von miRNA159a durch gelbe Umrandung hervorgehoben. Die Vorhersage der Faltung wurde mit dem Programm *RNAfold* bei 25 °C durchgeführt.

### 3.1.3 Experimentelle Validierung der smiRNA(CHS) und ihres Zielgens

Um zu überprüfen, ob die in Arabidopsis exprimierte pri-smiRNA(CHS) *in vivo* zur reifen smiRNA(CHS) prozessiert wird, wurde ein *small RNA Northern Blot* zu ihrem Nachweis

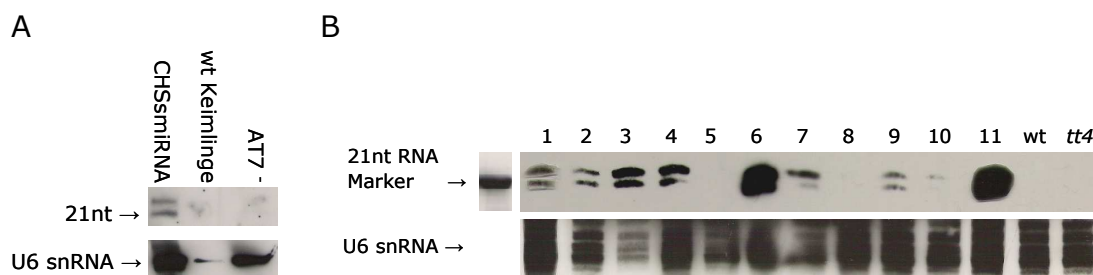


durchgeführt. Weiterhin sollte durch einen RLM-5'RACE (*RNA ligase-mediated rapid amplification of 5'cDNA ends*) Ansatz getestet werden, ob sie im pflanzlichen System funktional ist, das heißt ihr Zielgen erkennt und erfolgreich durch Spaltung der mRNA reguliert.

### 3.1.3.1 Northern Blot-Analyse

*Arabidopsis thaliana* Protoplasten wurden mit der pri-smiRNA(CHS) transient transfiziert (2.2.8.2). Anschließend wurde RNA aus den Protoplasten isoliert (2.2.4.1), welche nach Eliminierung kontaminierender DNA mittels Gelelektrophorese in einem 17 %igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt wurde (2.2.4.5). Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde sie mit einer smiRNA(CHS)-spezifischen Sonde hybridisiert. Diese war am 5'-Ende mit Biotin markiert, wodurch ein nicht-radioaktiver Nachweis der smiRNA(CHS) ermöglicht wurde. Gleiches wurde mit RNA durchgeführt, die aus 15 Tage alten, pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Keimlingen der elf Linien extrahiert worden war. Zur Bestimmung der Größe der detektierten RNA diente ein 21 nt langer RNA-Marker.

In den Abbildungen 3.2 A und B sind die Ergebnisse der *Blots* dargestellt. Sowohl unter Verwendung von RNA aus transfizierten Protoplasten als auch solcher, die aus transgenen *Arabidopsis* Keimlingen isoliert wurde, wurden jeweils zwei Hybridisierungssignale im Bereich von 21 nt sowie 22 oder 23 nt detektiert. Diese Signale wurden nicht in Kontroll-Experimenten nachgewiesen, die mit RNA aus nicht-transfizierten bzw. Col-0 Wildtypkeimlingen oder *tt4*-Keimlingen durchgeführt wurden. Doch nicht alle Proben, die aus den elf transgenen pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Linien gewonnen wurden, zeigten nach der Hybridisierung die Signale. So konnte für RNA der Linien 5 und 8 kein Signal detektiert werden, wohingegen mit RNA aus den Linien 6 und 11 eine vergleichsweise starke Bande nachgewiesen wurde. U6 snRNA wurde in jeder der Spalten als Kontrolle für einen erfolgreichen Ablauf des Experiments ermittelt.



**Abb. 3.2: Northern Blot und Nachweis der smiRNA(CHS)**

Zum Nachweis der reifen smiRNA(CHS) wurde RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer smiRNA-spezifischen, Biotin-markierten Sonde hybridisiert. Es folgten die Detektion mittels Chemilumineszenz und Exposition der Membran gegen einen Film. (A) zeigt das Ergebnis für Gesamt-RNA, die aus mit 35:pri-smiRNA(CHS)-transfizierten AT7-Protoplasten isoliert wurde, in (B) ist ein Ausschnitt aus dem Blot dargestellt, der mit Gesamt-RNA aus pri-smiRNA(CHS)-überexprimierenden Pflanzenlinien (1-11) durchgeführt wurde. Als Ladekontrolle diente jeweils endogene U6 snRNA. Zur Kontrolle wurde auch Gesamt-RNA aus nicht-transfizierten Protoplasten bzw. aus *chs knock out* Pflanzen (*tt4*) sowie aus Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen aufgetragen.

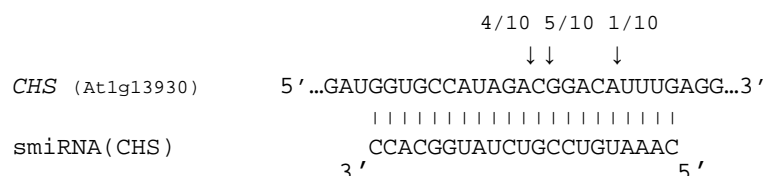
### 3.1.3.2 Nachweis von *CHS*-Spaltungsprodukten in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Keimlingen

Mit Hilfe des RLM-5'RACE-Experimentes sollten durch die smiRNA(CHS)-Aktivität hervorgebrachte 3'-Spaltungsprodukte der *CHS*-Transkripte nachgewiesen und Spaltungspositionen innerhalb der Transkripte exakt bestimmt werden.

Gesamt-RNA wurde aus 12 Tage alten Keimlingen zweier pri-smiRNA(CHS) exprimierender Linien (4 und 6) isoliert und einer DNaseI-Behandlung unterzogen (2.2.4.1). Im Anschluss wurde die Ligation eines RNA-Adapters an 5'-Enden von RNAs, die einen Phosphatrest trugen durchgeführt und die RNA mit Hilfe von Oligo(dT) Nukleotiden und Reverser Transkription in cDNA überführt. Diese wurde für eine *Nested PCR* eingesetzt (2.2.4.4), in der Adapter-spezifische sowie *CHS*-spezifische 3'-Oligonukleotide eingesetzt wurden. Resultierende PCR-Produkte wurden isoliert, kloniert und im Anschluss sequenziert.

Insgesamt konnten zehn positive Klone identifiziert werden, deren Sequenzierung das Vorliegen von *CHS*-Sequenzen bestätigte. Direkt im Anschluss an die bekannte Adaptersequenz folgte die Sequenz des 3'-Spaltungsproduktes der *CHS*, so dass durch einfachen Sequenzabgleich die Positionen der smiRNA(CHS)-vermittelten Spaltungen ermittelt werden konnten. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.3 zusammengefasst. Vier Mal konnte die Spaltungsposition zwischen den Nukleotiden festgestellt werden, die mit den smiRNA-Nukleotiden von Position zehn und elf paaren, fünf Mal wurde die Spaltung zwischen Nukleotiden ermittelt, die eine Position weiter in 3'-Richtung liegen. Ein

weiteres Spaltungsereignis wurde einige Nukleotide weiter in 3'-Richtung identifiziert, dessen Position aber noch in der smiRNA(CHS)-Bindestelle liegt.



**Abb. 3.3: Validierung der smiRNA(CHS)-vermittelten Spaltungsaktivität durch RLM-5'RACE**

Zusammenfassung eines RLM-5'RACE Experimentes zur Validierung der *CHS*-Transkripte als Ziele für die smiRNA(CHS)-vermittelte Spaltungsaktivität. Die smiRNA-Bindestelle innerhalb der *CHS*-mRNA sowie angrenzende Nukleotide sind in 5'-3'-Orientierung und die smiRNA(CHS)-Sequenz in 3'-5'-Orientierung angegeben. Zehn *CHS* mRNA-Spaltungsprodukte konnten nach Klonierung und Sequenzierung identifiziert werden, die Anzahl der identifizierten Produkte und Positionen der smiRNA-vermittelten Spaltung sind durch Pfeile angezeigt. Watson-Crick Paarungen werden durch Striche verdeutlicht.

### 3.1.4 Phänotypische Analyse pri-smiRNA(CHS) exprimierender Pflanzen

Die identifizierten transgenen Arabidopsis Linien, die die pri-smiRNA(CHS) exprimierten beziehungsweise als positiv durch BASTA-Selektion identifiziert worden waren, wurden im Hinblick auf das Vorkommen von Sekundärmetaboliten untersucht, welche im Verlauf des *CHS*-regulierten Flavonoidbiosyntheseweges entstehen.

#### 3.1.4.1 Proanthocyanidine

Samen der pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Arabidopsis Linien zeigten zum Teil auffällige Abweichungen zu Wildtypsamen (Abb. 3.4). Ihre Färbung reichte von braun (vergleiche Linie 5 und 8), was für Wildtypsamen charakteristisch ist, bis hin zu einer etwas dunkleren Gelbfärbung als jener, wie sie für Samen des *chs knockouts* beobachtet wird (vergleiche Linie 4 und 11). Weiterhin kamen Abstufungen zwischen diesen beiden Extremen vor.



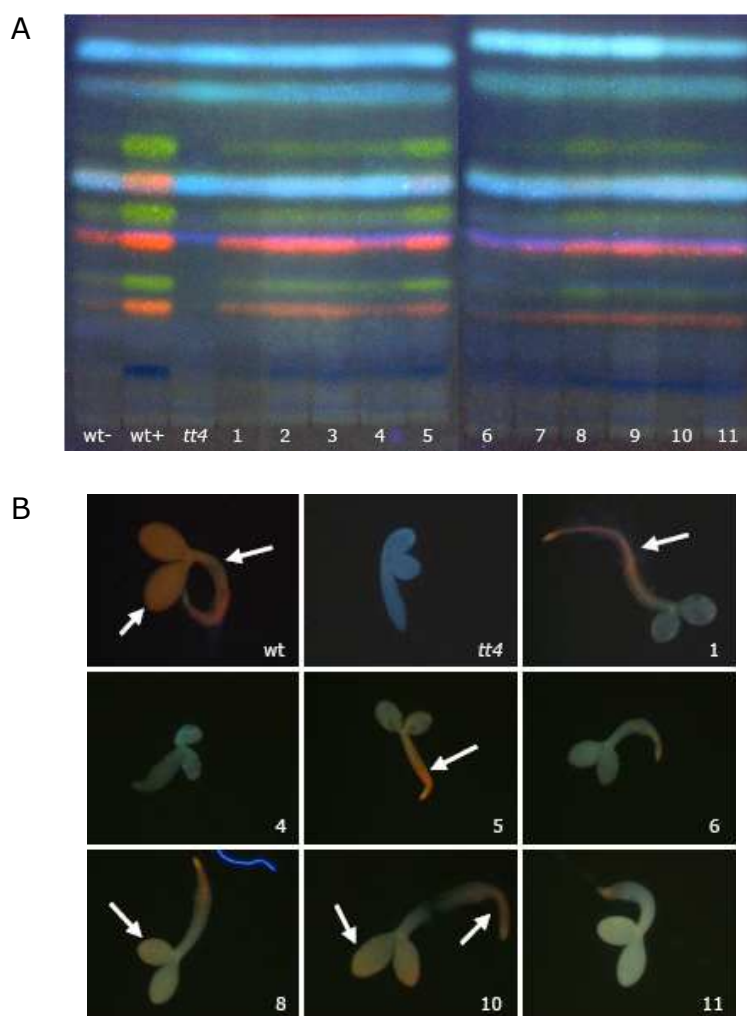
**Abb. 3.4: Proanthocyanidine in Samenschalen pri-smiRNA(CHS) exprimierender Pflanzen**

Vergleich der Samenschalenfarben verschiedener transgener Linien (1-11) der T2-Generation, die die pri-smiRNA(CHS) exprimieren. *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (wt)- und *tt4*-Samen werden zusätzlich als Referenzen in der Übersicht (links) und im Detail (rechts) gezeigt.

#### 3.1.4.2 Flavonolderivate

Zum Nachweis von Flavonolderivaten wurden methanolische Extrakte aus allen pri-smiRNA(CHS) exprimierenden *Arabidopsis* Linien im Alter von sieben Tagen nach ihrer Keimung auf MS-Medium mit 4 % Saccharose gewonnen. Diese wurden anschließend mittels hochauflösender Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (2.2.7.2). Durch die Behandlung der Proben mit Naturstoffreagenz A wurden sie gefärbt und aufgetrennte Flavonolderivate konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Abbildung 3.5 A zeigt das Ergebnis für die untersuchten Linien im Vergleich zu Extrakten aus Wildtyppflanzen und *tt4*-Extrakten. In allen transgenen Linien wurden Kämpferol- und Quercetinglykoside (grün bzw. orange) nachgewiesen, jedoch in geringeren Konzentrationen als im Wildtyp. Die Extrakte aus den transgenen Linien 5 und 8 brachten die stärksten Signale für die untersuchten Flavonolderivate hervor, sie waren aber nicht so stark wie die der Wildtyp-Extrakte. Das schwächste Signal wurde für die Linien 4, 6 und 7 detektiert.



**Abb. 3.5: Flavonolderivate in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen**

(A) Dünnschichtchromatographie methanolischer, mit Naturstoffreagenz A gefärbter Extrakte aus pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Keimlingen (Linien 1-11), die auf 4% Saccharose angezogen wurden im Vergleich zu Extrakten aus Wildtyp- (wt+) und *tt4*-Pflanzen. Wildtyp-Keimlinge wurden zusätzlich ohne Saccharose angezogen und analysiert (wt-). Grün: Kämpferolglykoside, Orange: Quercetinglykoside, Blau: Sinapatderivate. (B) Naturstoffreagenz A-Färbung ausgewählter pri-smiRNA(CHS) exprimierender Keimlinge (1, 4, 5, 6, 8, 10, 11) zum Nachweis von Flavonolderivaten im Vergleich zu Wildtyp- (wt) und *tt4*-Keimlingen. Pfeile deuten auf orange gefärbte Flavonolderivate.

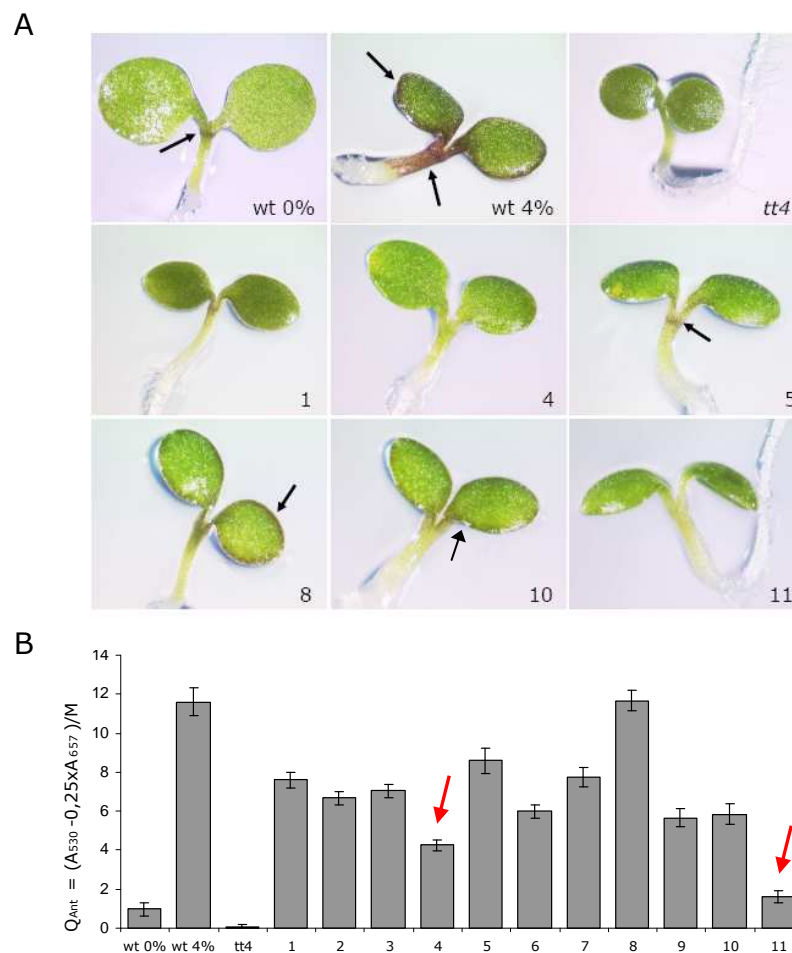
Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurden zusätzlich Flavonolderivate in ausgewählten fünf Tage alten, pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Keimlingen nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die Keimlinge auf Norflurazon angezogen, um ihre Ergrünung und die daraus resultierende Chlorophyllfluoreszenz zu unterdrücken (2.2.7.3). Aufnahmen von repräsentativen Keimlingen sind in Abbildung 3.5 B dargestellt. Die orange Färbung

zeigt die Anwesenheit von Flavonolderivaten an, die in allen transgenen Linien in schwächerem Maß als im Wildtyp beobachtet werden konnte. Auffälligerweise kommen die Derivate in den Wurzelspitzen der meisten untersuchten transgenen Pflanzen deutlich gehäuft vor.

#### 3.1.4.3 Stress-induzierte Anthocyane

Die Expression der *CHS* und damit auch die Anthocyan synthese sind in Pflanzen durch Stress induzierbar. Zu diesen induzierenden Stressfaktoren gehören beispielsweise das Wachstum unter starkem UV-Licht oder die Anzucht von Keimlingen auf MS-Medium (2.1.2.2), dem Saccharose zugefügt war (Teng et al., 2005). Letzteres wurde mit pri-smiRNA(*CHS*) exprimierenden Keimlingen sowie Wildtyp- und *tt4*-Pflanzen durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen dieser sieben Tage alten Keimlinge sind in Abb. 3.6 A zusammengefasst. Alle transgenen Linien zeigten eine schwächere Rotfärbung im oberen Hypokotyl und den Kotyledonen als Wildtyppflanzen, die auf Medium mit Saccharose gewachsen waren. In Keimlingen der Linien 4 und 11 war mit bloßem Auge keine Rotfärbung erkennbar, andere Linien ähnelten sehr dem Wildtyp, der ohne Zugabe von Saccharose gewachsen war.

Die Akkumulation von Stress-induzierten Anthocyanen wurde in allen pri-smiRNA(*CHS*) exprimierenden Linien auch quantifiziert. Dazu wurden die Anthocyane aus sieben Tage alten Keimlingen mittels saurer methanolischer Extraktion isoliert (2.2.7.1) und photometrisch gemessen. Der relative Anthocyangehalt bezogen auf das eingesetzte Frischgewicht konnte daraufhin ermittelt werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 3.6 B zusammengefasst. In allen Linien war der Anthocyangehalt reduziert im Vergleich zu Extrakten aus Wildtyp-Keimlingen, nur in Linie 8 wurde ein sehr ähnlicher Wert wie für den Wildtyp unter gleichen Bedingungen gemessen. Linie 11, in der die stärkste Reduzierung zu beobachten war, wies nur 13 % des Wildtyp-Anthocyangehaltes auf.



**Abb. 3.6: Anthocyane in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen**

(A) Ausgewählte Linien transgener Keimlinge (1, 4, 5, 8, 10, 11), die zur Akkumulation Stress-induzierter Anthocyane auf 0,5 x MS-Medium mit 4 % Saccharose angezogen wurden im Vergleich zu *tt4*- und Wildtypkeimlingen (wt 4%). Pfeile deuten auf angereicherte, rötliche Anthocyane. wt 0%: Keimlinge, die in Abwesenheit von Saccharose angezogen wurden. (B) Relativer Anthocyanengehalt der in (A) gezeigten und weiterer transgener Keimlinge (1-11) verglichen mit *tt4*- und Wildtyp-Keimlingen (in An- und Abwesenheit von Saccharose angezogen, s.o.). Pfeile deuten auf Ergebnisse für transgene Linien mit dem geringsten Anthocyanengehalt.

### 3.1.5 Molekulare Analyse pri-smiRNA(CHS) exprimierender Pflanzen

Die quantitative Echtzeit reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht die relative Quantifizierung der Expression eines Zielgens in einer Probe. Mit Hilfe eines zur Standardisierung verwendeten Referenzgens kann unter Anwendung mathematischer Methoden auf die zu Beginn der Reaktion vorliegende relative Matrizenmenge des Zielgens geschlossen werden.

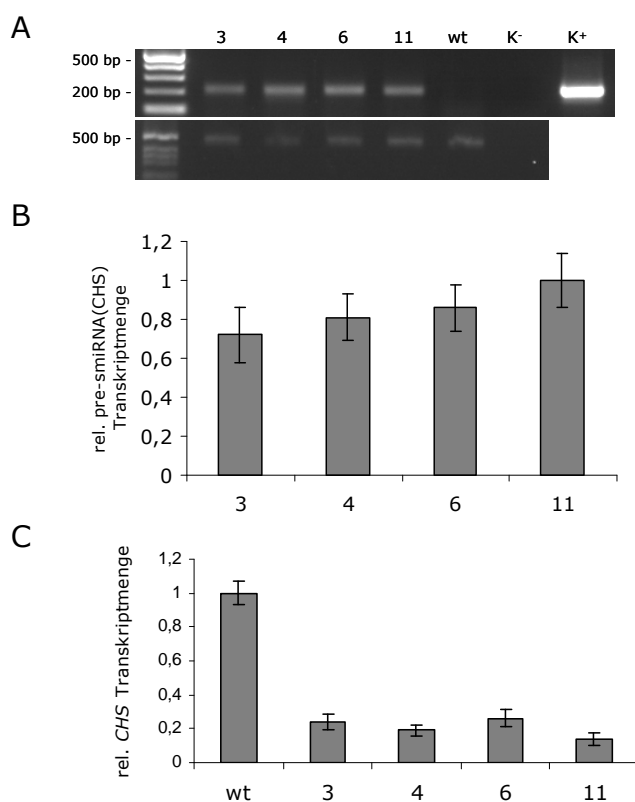
Diese Methode wurde herangezogen, um die Expression der *CHS* in ausgewählten pri-smiRNA(*CHS*) exprimierenden Linien zu analysieren (2.2.4.3). Neben einer weiteren Bestätigung für die Funktionalität der entworfenen smiRNA(*CHS*) sollte dadurch auch eine fundierte Aussage über das Maß der smiRNA(*CHS*)-vermittelten Regulierung getroffen werden. Durch die zusätzliche Quantifizierung der Expression des smiRNA(*CHS*) *precursors* sollte der Einfluss seiner Expressionsstärke auf sein Zielgen näher untersucht werden. Weiterhin wurde auch die Transkriptmenge des vorhergesagten, möglichen *off-targets* At1g49390 in einigen transgenen Linien untersucht, um eine etwaige, durch die smiRNA(*CHS*) hervorgerufene Reduzierung verglichen mit Wildtyppflanzen zu detektieren. Die entworfenen Oligonukleotide für die zwei zu testenden Zielgene flankierten die vorhergesagte smiRNA(*CHS*)-Bindestelle.

Für jede untersuchte Linie wurden zwei biologische Replikate jeweils in Dreifachmessungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Soong (2000). Die relative Expression der Gene im Wildtyp wurde als Wert 1,0 festgesetzt, die Werte aus den transgenen Linien wurden entsprechend angeglichen. Im Fall der *precursor*-Expression wurde der höchste Exprimierer auf den Wert 1,0 gesetzt.

Für den *precursor* der smiRNA(*CHS*) wurde zusätzlich zur Quantifizierung der Expression durch qRT auch eine einfache Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt (2.2.4.2). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 A aufgeführt. In den Ansätzen für die transgenen Linien 3, 4, 6 und 11 wurden PCR-Produkte von erwarteter Größe sichtbar, die im Ansatz mit Wildtyp-RNA nicht detektiert werden konnten. Dieses Experiment bestätigte zum einen die Spezifität der Oligonukleotide für das Transgen und diente zum anderen als Qualitätskontrolle für die präparierte RNA, da die gleiche RNA für die aufwendigere qRT-PCR eingesetzt werden sollte. Eine quantitative Aussage bezüglich der *precursor*-Expression lässt sich anhand der RT-PCR nicht treffen. Die qRT-PCR für den *precursor* ergab schließlich, dass die Expression in Linie 11 am höchsten war, Proben aus den drei weiteren analysierten Linien erreichten allesamt ein ähnliches, aber etwas geringeres Niveau (3.7 B).

Die Transkriptmenge des Zielgens *CHS* war in den vier untersuchten Linien deutlich im Vergleich zum Wildtyp reduziert (3.7 C). Hier wurde die geringste Transkriptmenge in Linie 11 gemessen, die weniger als ein Fünftel der Wildtyp-Transkriptmenge betrug. In den übrigen Linien war die verbleibende Transkriptmenge etwas höher, bewegte sich aber auf einem ähnlichen Niveau. Ein kompletter *knockout* wurde in keiner der untersuchten Linien erreicht.

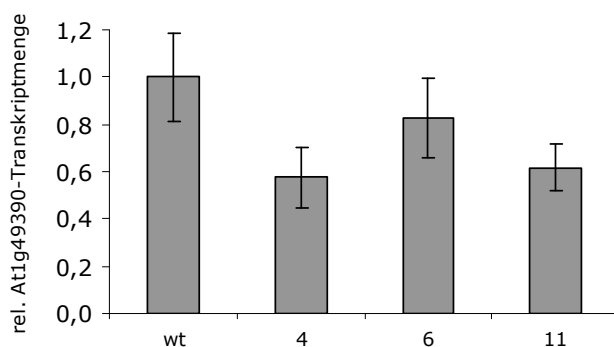




**Abb. 3.7: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(CHS) und dem Zielgen CHS in pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen**

(A) RT-PCR zum Nachweis der Expression des smiRNA(CHS) *precursors* (oben) mit RNA aus ausgewählten pri-smiRNA(CHS) exprimierenden (3, 4, 6, 11) und aus Wildtyp-Pflanzen (wt). Eine PCR zur Amplifizierung eines ActinII-Ausschnitts (unten) diente als Qualitätskontrolle für die präparierte cDNA. K<sup>-</sup>: Kontroll-PCR ohne cDNA, K<sup>+</sup>: Kontroll-PCR mit pri-smiRNA(CHS)-DNA als *template*. (B) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des smiRNA(CHS) *precursors* und des Zielgens CHS (C) in den gleichen transgenen Linien mittels qRT-PCR. Werte wurden in Bezug zum höchsten Exprimierer bzw. zum Wildtyp normalisiert.

Das potentielle, von *RNAhybrid* vorhergesagte smiRNA(CHS) *off-target* At1g49390 kodiert für eine putative Oxidoreduktase der Fe(II)-Oxygenase Familie. Ein qRT-PCR Experiment zur Analyse der At1g49390-Transkriptmenge sollte Auskunft darüber geben, ob es sich bei diesem vorhergesagten Zielgen um ein wahres *off-target* handelt. In den drei analysierten pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Linien konnte schließlich die Reduzierung der At1g49390-Transkriptmengen verglichen mit Proben aus Wildtyppflanzen detektiert werden (Abb. 3.8). Diese erreichte allerdings nicht das Niveau, das für die CHS in den gleichen transgenen Linien beobachtet wurde (Abb. 3.7).



**Abb. 3.8: Expressionsanalyse eines putativen smiRNA(CHS) *off-targets***

Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des putativen, mit *RNAhybrid* vorhergesagten smiRNA(CHS) *off-targets* At1g49390 mittels qRT-PCR in verschiedenen pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Linien (4, 6, 11) und im Wildtyp (wt). Werte wurden in Bezug zum Wildtyp normalisiert.

## 3.2 Konstruktion eines Vektors zur vereinfachten Klonierung synthetischer microRNAs

Allein der Austausch der miRNA- und miRNA\*-Sequenzen gegen gewünschte synthetische Sequenzen reicht in der smiRNA-Technik aus, um gewünschte smiRNAs prozessieren zu lassen und ein Zielgen oder mehrere Zielgene effektiv zu regulieren. Eines dieser Verfahren, das eine optimierte Vorhersage von Zielgenen und *off-targets* mittels des Programms *RNAhybrid* beinhaltet, wird im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt und unter 3.1 detailliert beschrieben.

Um die Generierung synthetischer pri-miRNAs im Bezug auf ihre Klonierung zu vereinfachen und zu beschleunigen, wurde ein Vektor auf Basis des Primärtranskriptes von *MIR159a* entworfen. Dieser sollte es ermöglichen, die gewünschten smiRNA- und smiRNA\*-Sequenzen gleichzeitig in nur einem Klonierungsschritt auszutauschen. In bislang genutzten Methoden wurden hingegen zwei Klonierungsexperimente benötigt, um das verwendete Primärtranskript entsprechend zu modifizieren.

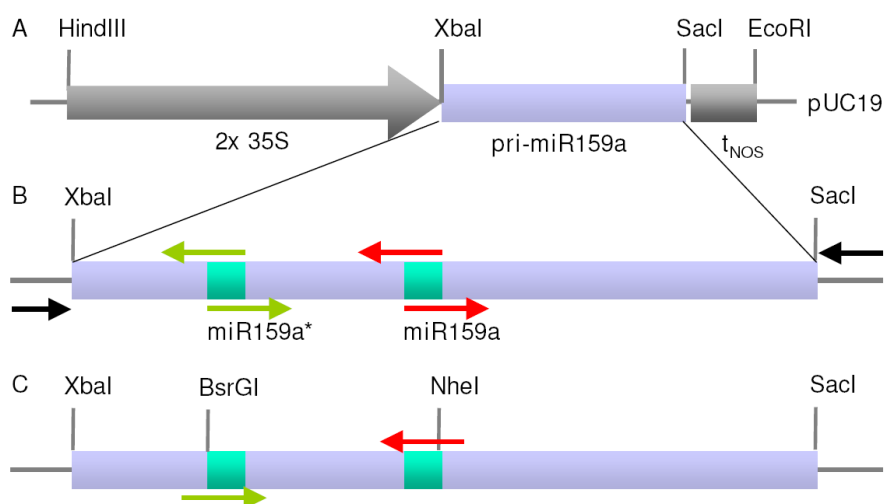
### 3.2.1 Vereinfachte Klonierungsstrategie zur Herstellung von pri-smiRNAs

Für die Generierung des Vektors, der zur beschleunigten Klonierung von pri-smiRNAs genutzt werden sollte, wurde das Primärtranskript des gut charakterisierten *MIR159a*-Gens ausgewählt. Dieses Primärtranskript wurde bereits für die Erstellung einer effizienten pri-smiRNA(CHS) erfolgreich genutzt (Abschnitt 3.1). Um die miRNA159a- und miRNA159a\*-Sequenzen gegen gewünschte smiRNA-Sequenzen auszutauschen, müssen im konventionellen Verfahren zwei aufeinander folgende *overlap extension*-PCR (2.2.2.3) Reaktionen durchgeführt werden, in denen jeweils ein Sequenzbereich (miRNA

oder miRNA\*) mutiert bzw. ausgetauscht wird (Abb. 3.9 B). Dies zieht jeweils ein vollständiges Klonierungsexperiment nach sich und beinhaltet den Einsatz von insgesamt vier smiRNA-spezifischen Oligonukleotiden sowie zweier Vektor-spezifischer Oligonukleotide.

Für das Prinzip der vereinfachten Klonierung von pri-smiRNAs sollten zwei neue Restriktionsschnittstellen in die cDNA der pri-miRNA159a eingefügt werden. Diese sollten ein Einschnitt-Klonierungsverfahren ermöglichen, in dem neben den Vektor-spezifischen Oligonukleotiden nur zwei zusätzliche Oligonukleotide für die Mutagenese der miRNA- und miRNA\*-Sequenzen benötigt werden (Abb. 3.9 C).

Verschiedene Sequenzen für Restriktionsschnittstellen wurden zu diesem Zweck nahe des 5'-Bereichs der miRNA159a\*-Sequenz und nahe des 3'-Bereichs der miRNA159 *in silico* in die cDNA des Primärtranskriptes unter Einbezug vorhandener Nukleotide inseriert, so dass diese den *precursor* von *MIR159a* flankierten. Daraufhin wurde die Sekundärstruktur der modifizierten Primärtranskripte mit dem Programm *RNAfold* (Mathews et al., 1999) vorhergesagt. Das beste Ergebnis wurde erzielt, als die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *BsrGI* *in silico* inseriert und die Vorhersage für die Faltung dieses modifizierten Primärtranskriptes durchgeführt wurde. In diesem Fall kam es zu der Ausformung einer kleinen zusätzlichen Schleife (*loop*) im Bereich der neuen Schnittstellen, die die Gesamtstruktur des Transkriptes nicht drastisch veränderte (Abb. 3.10).

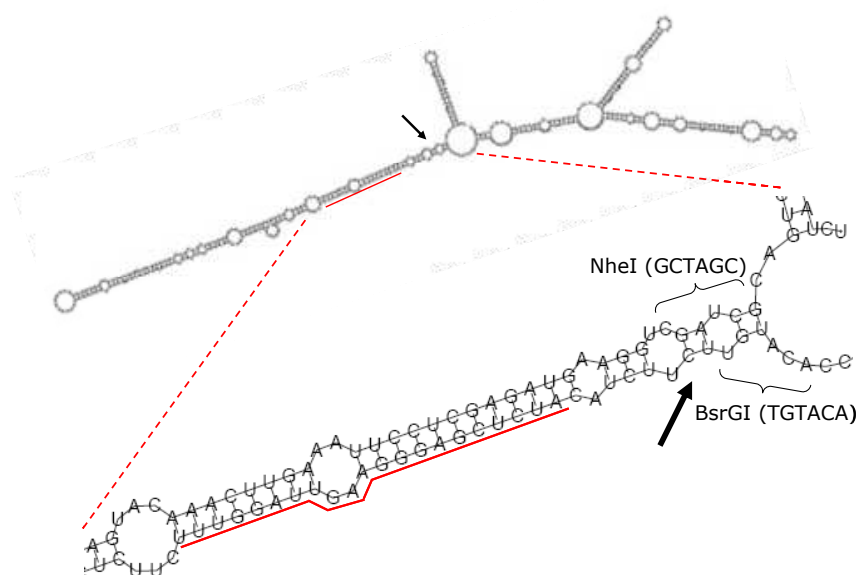


**Abb. 3.9: Klonierungsstrategien für synthetische pri-miRNAs**

pri-smiRNAs wurden auf Grundlage des Primärtranskriptes des Arabidopsis *MIR159a* Gens erzeugt (A). Um die originalen miRNA159a und miRNA159a\* mit Hilfe der konventionellen Klonierungsstrategie gegen neue smiRNA und smiRNA\* Sequenzen auszutauschen, werden zwei aufeinanderfolgende *overlap extension*-PCR Reaktionen durchgeführt, in denen zwei spezifische Oligonukleotidpaare (grüne bzw. rote Pfeile) sowie zwei Vektor-spezifische Oligonukleotide (schwarze Pfeile) benötigt werden (B). Der *easy cloning* Vektor Ansatz (C) basiert auf der Insertion zweier zusätzlicher Schnittstellen in das ursprüngliche *MIR159a* Primärtranskript, die das smiRNA/smiRNA\* cDNA-Fragment einschließen und eine vereinfachte und beschleunigte Klonierung synthetischer pri-smiRNAs ermöglichen.

Die Restriktionsschnittstellen wurden schließlich *in vitro* eingefügt. Der resultierende Vektor wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter dem Namen pri-smiRNA „easy cloning“ Vektor (ECV) geführt. Um diesen zu verwenden, muss er zunächst mit den Restriktionsenzymen NheI und BsrGI behandelt werden. Das ausfallende Fragment, das in etwa dem *MIR159a precursor* entspricht (vergl. Abb. 3.1), wird verworfen. Gleichzeitig wird mittels PCR ein Fragment hergestellt, welches die neuen gewünschten smiRNA- und smiRNA\*-Sequenzen und die zwei neuen Schnittstellen am 3'- bzw. 5'-Ende enthält, und dieses wird in den vorbereiteten ECV ligiert.

Um die Funktionalität dieses Vektors zu überprüfen, wurde die smiRNA(CHS) mit Hilfe dieses Ansatzes kloniert. Auf diese Weise konnte eine vergleichende Analyse zwischen der Effektivität des ECV-Ansatzes und des konventionellen, pri-miRNA159a-basierten Ansatzes durchgeführt werden. Die pri-smiRNA(CHS)-ECV wurde mittels *A. tumefaciens* in Arabidopsis Wildtyppflanzen transformiert.



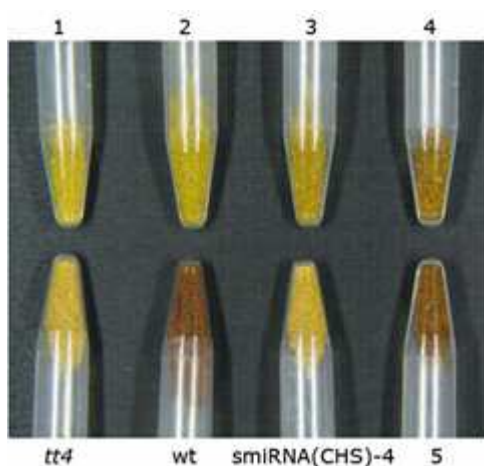
**Abb. 3.10: Sekundärstruktur des pri-smiRNA „easy cloning“ Vektors (ECV)**

Vorhersage der Faltung der pri-smiRNA159a in der ECV-Variante mit dem Programm *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) bei 25 °C. Die gesamte Primärstruktur (oben) sowie ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich der miRNA-Sequenz (unten) sind dargestellt. Die inserierten Schnittstellen NheI und BsrGI sowie die miRNA159a-Sequenz (roter Balken) werden hervorgehoben, Pfeile deuten auf den Bereich im Primärtranskript, der nach Insertion der neuen Schnittstellen Veränderungen im Vergleich zur natürlichen pri-miRNA159a aufweist (vergleiche Abb. 3.1 A).

### 3.2.2 Analyse pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierender Pflanzen

Mehr als 30 transgene Linien, die die pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierten, konnten nach der Selektion mit BASTA identifiziert werden. Die Samen der T2-Generation dieser Linien zeigten phänotypische Auffälligkeiten: Auch hier wurde ein breites Farbspektrum der Samenschalen zwischen braun und gelb beobachtet (Abb. 3.11), wie es auf ähnliche Weise für pri-smiRNA(CHS) exprimierende Pflanzen der Fall war, die auf konventionelle Weise kloniert worden waren (d. h. mit Hilfe der originalen pri-miRNA159a als *backbone*). Auch hier kamen Samen vor, die denen des *chs knockout* in ihrer Farbe sehr ähnelten. Ebenso wurden transgene Linien beobachtet, deren Samen kaum von denen des Wildtyps zu unterscheiden waren.

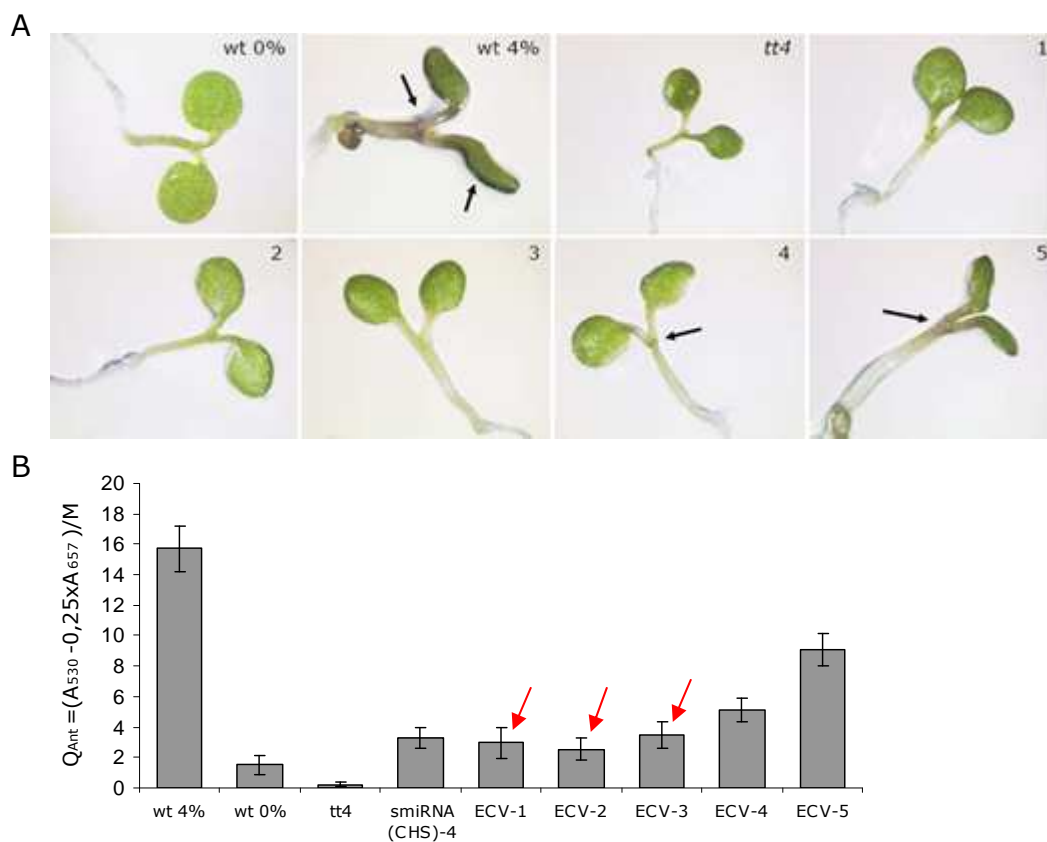
Für weitere Analysen, die auf die Untersuchung des Anthocyanengehaltes dieser Linien beschränkt wurden, wurden fünf transgene Linien (1-5) ausgewählt.



**Abb. 3.11: Proanthocyanidine in Samenschalen pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierender Pflanzen**

Vergleich der Samenschalenfarben verschiedener transgener Linien (1-5), die die pri-smiRNA(CHS) in der „easy cloning“ Vektor Version exprimieren. Arabidopsis Wildtyp (wt)- und *tt4*-Samen sowie Samen, die die pri-smiRNA(CHS) nach konventioneller Klonierung exprimieren (*smiRNA(CHS)-4*), werden als Referenz gezeigt.

Sieben Tage alte pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierende Keimlinge, die auf 0,5 x MS-Medium mit 4 % Saccharose angezogen wurden, zeigten Abweichungen in der Akkumulierung von rötlichen Anthocyanen verglichen mit gleich behandelten Wildtyp-Keimlingen (Abb. 3.12 A), so wie es auch für pri-smiRNA(CHS) exprimierende Keimlinge beobachtet worden war (vergl. Abb. 3.7). Durch die Quantifizierung der Anthocyane in diesen Keimlingen (Abb. 3.12 B) wurde die Reduzierung des Anthocyanengehaltes in den transgenen Linien festgestellt. Die ECV-Linien 1, 2 und 3 zeichneten sich durch eine sehr helle Samenfarbe aus und zeigten entsprechend geringe Mengen an Stress-induzierten Anthocyanen, wohingegen die dunklere ECV-Linie 5 den höchsten Anthocyanengehalt unter den untersuchten transgenen Linien aufwies.



**Abb. 3.12: Anthocyane in pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierenden Pflanzen**

(A) Transgene Keimlinge, die die pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimieren (1, 2, 3, 4, 5) und die zur Akkumulierung Stress-induzierter Anthocyane auf 0,5 x MS-Medium mit 4 % Saccharose angezogen wurden im Vergleich zu *tt4*- und Wildtypkeimlingen (wt 4%). Pfeile deuten auf angereicherte, rötliche Anthocyane. wt 0%: Keimlinge, die in Abwesenheit von Saccharose angezogen wurden.

(B) Relativer Anthocyangehalt der in (A) gezeigten transgenen Keimlinge (1-5) verglichen mit *tt4*- und Wildtyp-Keimlingen (in An- und Abwesenheit von Saccharose angezogen, s.o.) sowie Keimlingen der konventionell klonierten Linie pri-smiRNA(CHS)-4. Pfeile deuten auf transgene Linien mit dem geringsten Anthocyangehalt.

### 3.3 Variationen der smiRNA(CHS) und ihre Analysen

Verschiedene Varianten der bereits gut charakterisierten und funktionalen smiRNA(CHS) wurden erstellt (vergl. Abschnitte 3.1 und 3.2). Zwei dieser Varianten wurden so verändert, dass sie Fehlpaarungen zum *target CHS* ausbildeten, in zwei weiteren Varianten wurde der Anteil an Guaninen (Gs) und Uridinen (Us) verändert, so dass es zu mehr G:U-Paarungen in der miRNA:*target* Hybridstruktur kam. Die Effekte dieser Veränderungen sollten in transgenen Pflanzen untersucht werden.

### 3.3.1 Auswahl und Design von smiRNA(CHS) Varianten

In der ersten smiRNA(CHS) Variante (smiRNA(CHS)-Var1) wurde im 5'-Bereich der smiRNA ein Nukleotid verglichen mit der ursprünglichen smiRNA ausgetauscht, so dass es zu einer einzelnen Fehlpaarung in der smiRNA:CHS Hybridstruktur kam (Tab. 3.2). Der *mfe*-Wert für diese smiRNA und CHS ergab mit -38,9 kcal/mol einen etwas höheren Wert verglichen mit der ursprünglichen Hybridstruktur zwischen smiRNA(CHS) und CHS.

**Tab. 3.2: Zusammenfassung der RNAhybrid Ergebnisse für smiRNA(CHS)- Var1, -Var2, -Var3 und -Var4**

*mfe*: minimale freie Energie

Name	<i>mfe</i> [kcal/mol]	smiRNA :target Hybrid	
smiRNA(CHS)	-44	target 5' U GGUGCCAUAGACGGACAUUUG CCACGGUAUCUGCCUGUAAAC	A 3' 5'
smiRNA(CHS)-Var1	-38,9	target 5' U GGUGCCAUAGACGGACAUUUG CCACGGUAUCUGCCUGU AAU	A 3' 5'
smiRNA(CHS)-Var2	-32,5	target 5' U GGUGCCAUAGACGGACAUUUG CC CG UAUCUGCCUGUAAAU	A 3' 5'
smiRNA(CHS)-Var3	-29,6	target 5' U GGUGCCAUAGACGGACAUUUG UUUUGGUAUUUGUUUGUAAAU	A 3' 5'
smiRNA(CHS)-Var4	-36,7	target 5' U GGUGCCAUAGACGGACAUUUG CCACGGUAUCUGUUUGUGGGU	A 3' 5'

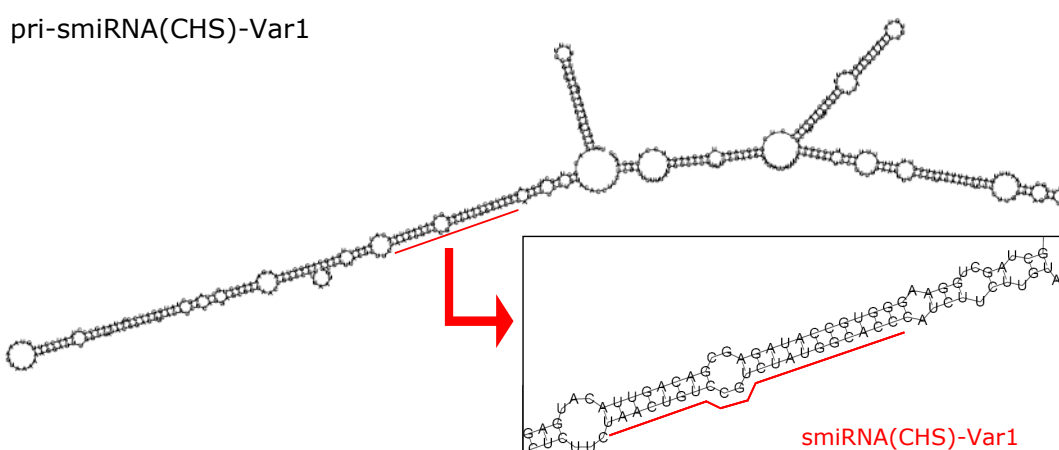
Für die zweite Variante, smiRNA(CHS)-Var2 wurden hingegen zwei Nukleotidaustausche vorgenommen, so dass es zu zwei Fehlpaarungen im miRNA:target Hybrid kam, die im 3'-Ende der smiRNA angesiedelt waren (Tab. 3.2). Der *mfe*-Wert für das Hybrid dieser smiRNA(CHS)-Variante und der CHS-Bindestelle lag bei -32,5 kcal/mol. Die Hybridstrukturen der möglichen *off-targets* mit dieser smiRNA erreichten ähnliche Werte.

In diesen beiden Varianten 1 und 2 wurden zusätzlich die Cytosine an Position eins der smiRNA(CHS) durch Uridine ersetzt. Diese sind in natürlichen miRNAs an Position eins des 5'-Endes überrepräsentiert und scheinen eine wichtige Rolle für die Sortierung und Interaktion der miRNA mit AGO1 zu spielen (Mi et al., 2008).

In den smiRNA(CHS) Varianten 3 und 4 wurden im Vergleich zur ursprünglichen smiRNA(CHS) einige Adenine (As) gegen Guanine und Cytosine (Cs) gegen Uridine

ausgetauscht, so dass in der miRNA:target Hybridstruktur ein großer Anteil an G:U-*wobble*-Paarungen auftrat. In smiRNA(CHS)-Var3 wurden auf der gesamten Länge der smiRNA insgesamt sieben G:U-Paarungen durch den Austausch aller Cs gegen Us eingeführt (Tab 3.2). Dies führte zum Anstieg des *mfe*-Wertes auf -29 kcal/mol. In smiRNA(CHS)-Var4 wurden sechs G:U-Paarungen in die Hybridstruktur mit der CHS-Zielsequenz durch Austausch von Cs gegen Us und As gegen Gs im 5'-Bereich der smiRNA eingeführt (Tab. 3.2). Der resultierende *mfe*-Wert lag bei -36,7 kcal/mol. Die von *RNAhybrid* vorhergesagten 28 *off-targets* erreichten diesen Wert nicht.

Die entsprechenden pri-smiRNA(CHS)-Var Konstrukte wurden mit Hilfe des positiv getesteten „easy cloning“ Vektors (ECV; siehe 3.2) hergestellt. Stellvertretend wird die Sekundärstruktur von pri-smiRNA(CHS)-Var1 ECV gezeigt (Abb. 3.13), die übrigen von *RNAfold* vorhergesagten Strukturen sind im Anhang (7.3.1) aufgeführt. In keinem der Fälle kam es zu Veränderungen der Sekundärstruktur des Primärtranskriptes im Vergleich zur Struktur ohne Sequenzaustausche. Nach Generierung der Konstrukte wurden diese mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* Wildtyppflanzen transformiert und mehr als 50 transgene Linien konnten nach BASTA-Selektion jeweils isoliert werden. Von diesen wurden pro Konstrukt je fünf Linien für weitere Analysen ausgewählt. Sofern es möglich war, wurden dabei die Linien ausgesucht, die aufgrund ihrer Samenfarbe eine hohe Expression der jeweiligen pri-smiRNA(CHS)-Var vermuten ließen.



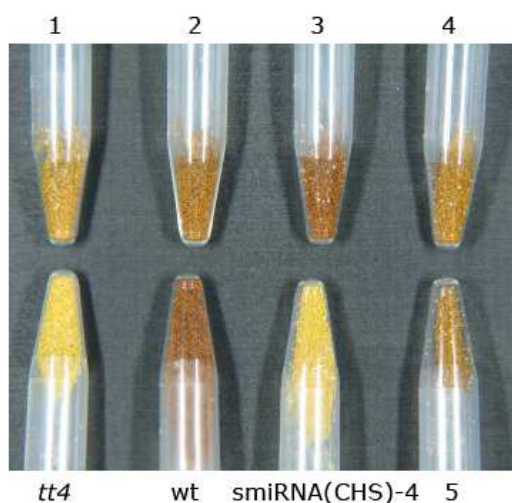
**Abb. 3.13: Sekundärstruktur von pri-smiRNA(CHS)-Var1**

Stellvertretend für die vier Varianten der pri-smiRNA(CHS) sind die Sekundärstruktur des Primärtranskriptes von Variante 1 (Var1) sowie ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich der smiRNA(CHS)-Var1 Sequenz dargestellt. Durch den Austausch der miRNA159 und miRNA159a\* Sequenzen gegen die entsprechenden smiRNA(CHS)-Varianten kam es in keinem der Fälle zu Veränderungen in der Sekundärstruktur gegenüber der von pri-miRNA159a-ECV (vergl. Abb. 3.10). Die Vorhersage der Faltung wurde mit dem Programm *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) bei 25 °C simuliert.



### 3.3.2 Phänotypische Analyse pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierender Pflanzen

Eine deutliche Veränderung der Samenfarbe und damit der Akkumulierung von Proanthocyanidinen konnte im Vergleich zum Wildtyp nur für Samen einiger pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimierender Linien dokumentiert werden (Abb. 3.14). Diese erreichten nicht die helle Farbgebung von *tt4*-Samen oder derer pri-smiRNA(CHS) und pri-smiRNA(CHS)-ECV exprimierender Pflanzen (vergl. Abb. 3.4 und 3.11). Ob dies auf eine niedrige Expression des jeweiligen Primärtranskriptes und/oder die veränderten Eigenschaften der smiRNAs zurückzuführen war, sollte durch weitere Analysen beantwortet werden. Samen der Varianten 2, 3 und 4 werden nicht gezeigt. Wenn überhaupt zeigten sie nur minimalste Abweichungen zu Farben von Wildtypsamensamen.

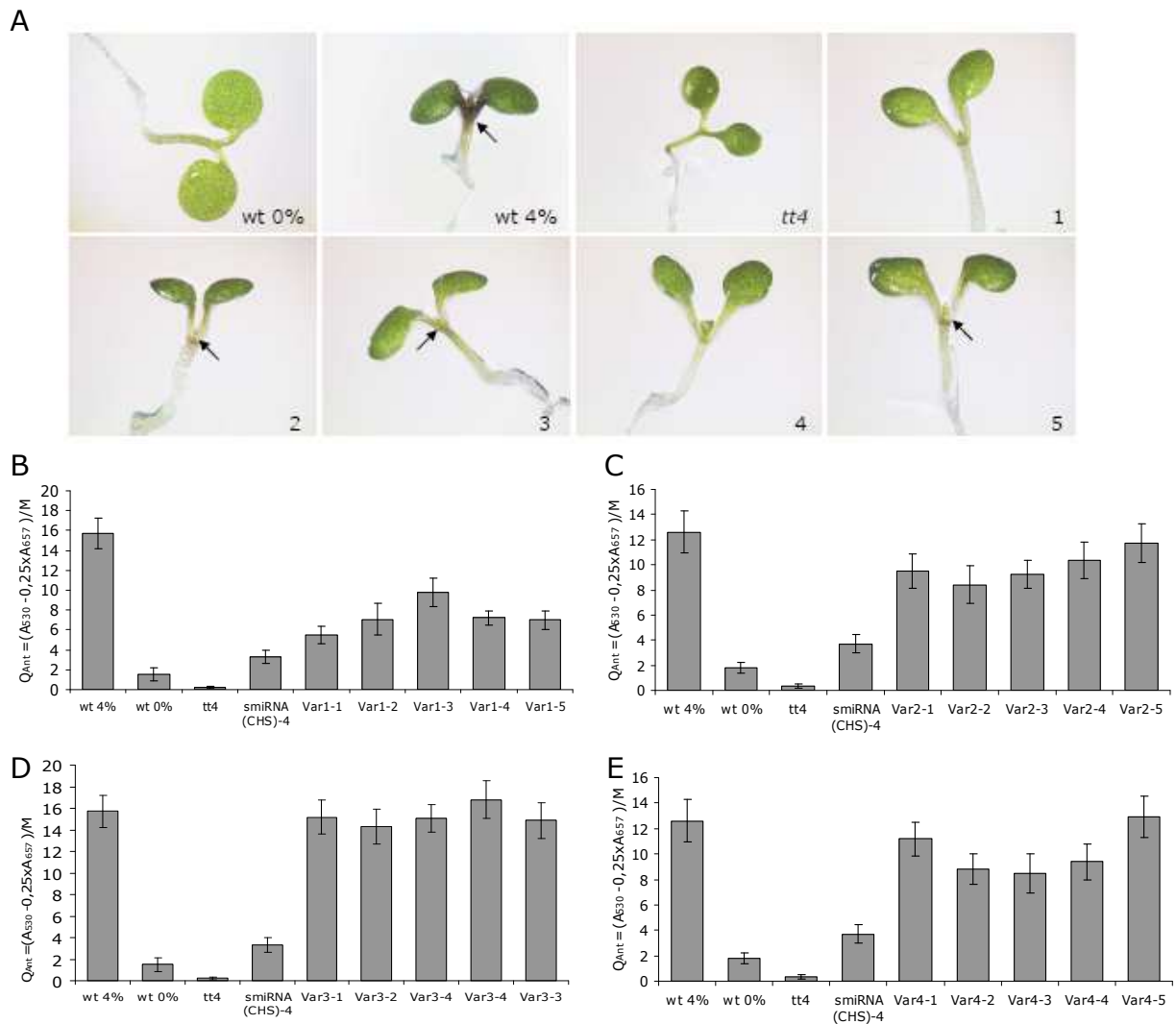


**Abb. 3.14: Proanthocyanidine in Samenschalen pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimierender Pflanzen**

Vergleich der Samenschalenfarben verschiedener transgener Linien (1-5), die die pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimieren. Arabidopsis Wildtyp (wt)- und *tt4*-Samen sowie Samen, die die pri-smiRNA(CHS) nach konventioneller Klonierung exprimieren, smiRNA(CHS)-4), werden als Referenz gezeigt.

Keimlinge von jeweils fünf ausgesuchten Linien der vier verschiedenen pri-smiRNA(CHS) Varianten wurden zur Untersuchung von Stress-induzierten Anthocyanen auf MS-Medium mit 4 % Saccharose angezogen (Abb. 3.15 A). Der deutlichste Effekt zeigte sich wiederum für pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimierende Pflanzen. Für sie konnte ein ähnlicher aber dennoch höherer Anthocyanengehalt berechnet werden, wie er auch für pri-smiRNA(CHS)-4 exprimierende Keimlinge dokumentiert wurde, die zu Vergleichszwecken erneut angezogen und analysiert wurden (Abb. 3.15 B).

Für einige der fünf Linien der Varianten 2 und 4 wurde eine leichte Reduzierung des Anthocyanengehaltes im Vergleich zu gleich behandelten Wildtypkeimlingen beobachtet (Abb. 3.15 C und E). Proben aus Var3-Linien verhielten sich nicht anders als die aus Wildtypkeimlingen (Abb. 3.15 D).



**Abb. 3.15: Anthocyane in pri-smiRNA(CHS)-Var1-4 exprimierenden Pflanzen**

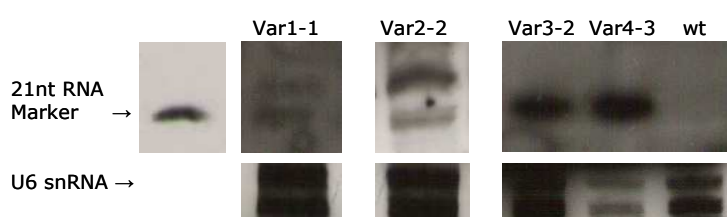
(A) Transgene Keimlinge, die die pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimieren (1-5) und die zur Akkumulation Stress-induzierter Anthocyane auf 0,5 x MS-Medium mit 4 % Saccharose angezogen wurden im Vergleich zu *tt4*- und Wildtypkeimlingen (wt 4%). Pfeile deuten auf angereicherte, rötliche Anthocyane. wt 0%: Keimlinge, die in Abwesenheit von Saccharose angezogen wurden. (B) Relativer Anthocyanengehalt der in (A) gezeigten transgenen Keimlinge im Vergleich zu *tt4*- und Wildtypkeimlingen (in An- und Abwesenheit von Saccharose angezogen, s.o.) sowie Keimlingen der Linie pri-smiRNA(CHS)-4. Unter (C), (D) und (E) sind die Anthocyanquantifizierungen für die übrigen pri-smiRNA(CHS)-Varianten (Var-2, -3, -4) dargestellt.

### 3.3.3 Experimentelle Validierung der smiRNA(CHS) Varianten

Viele Linien der smiRNA(CHS) Varianten zeigten keinen oder nur einen minimalen Effekt auf phänotypischer Ebene. Deshalb sollte in einem *small RNA Northern Blot* Experiment (2.2.4.5) untersucht werden, ob die jeweilige smiRNA(CHS) der verschiedenen Varianten in Pflanzen tatsächlich prozessiert wurde. Gerade im Hinblick auf pri-smiRNA(CHS)-Var3 exprimierenden Pflanzen, in denen keine Reduzierung der Anthocyane festgestellt werden konnte, sollte geklärt werden, ob dies auf eine fehlerhafte oder völlig ausbleibende Generierung der reifen smiRNA zurückzuführen war, zumal in dieser Variante die meisten Veränderungen eingeführt worden waren und eine hoher Guanin- und Uridin-Anteil vorlagen.

Das *Northern Blot* Experiment wurde mit gesamt-RNA aus jeweils 14 Tage alten Keimlingen der verschiedenen pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierenden Linien durchgeführt. Ausgewählt wurde jeweils eine Linie, die aufgrund niedriger Anthocyanwerte auf eine vergleichsweise hohe Expression der Primärtranskripte schließen ließ. Proben aus den Varianten 1 und 2 sowie 3 und 4 wurden jeweils mit den gleichen Sonden hybridisiert, die am 5'-Ende mit Biotin markiert waren.

Der Nachweis der reifen smiRNA(CHS) Varianten ergab für alle Proben Signale im erwarteten Größenbereich (Abb. 3.16). Für die smiRNA(CHS) Varianten 1 und 2 wurden, so wie es auch für die ursprüngliche smiRNA(CHS) der Fall war, zwei eng beieinander liegende Signale detektiert. Das kleinere davon entsprach einer Größe von 21 nt, wie mit Hilfe des 21 nt langen Größenmarkers bestimmt werden konnte. Das zweite nachgewiesene Signal war etwas größer, vermutlich 22 oder 23 Nukleotide lang. Für RNA aus den Varianten 3 und 4 wurde jeweils nur ein Signal detektiert, das sich ebenfalls auf Höhe des 21 nt langen Größenmarkers befand.



**Abb. 3.16: Northern Blot und Nachweis der smiRNA(CHS) Varianten**

Zum Nachweis der reifen smiRNAs wurde Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit verschiedenen smiRNA-spezifischen, Biotin-markierten Sonden hybridisiert. Es folgten die Detektion mittels Chemilumineszenz und Exposition der Membranen gegen einen Film. Gezeigt werden Ausschnitte aus den verschiedenen *Northern Blot* Experimenten mit RNA aus pri-smiRNA(CHS)- Var1 (Linie 1), -Var2 (Linie 2), -Var3 (Linie 2) und -Var4 (Linie 3) exprimierenden Linien. Als Ladekontrolle diente jeweils endogene U6 snRNA. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen aufgetragen.

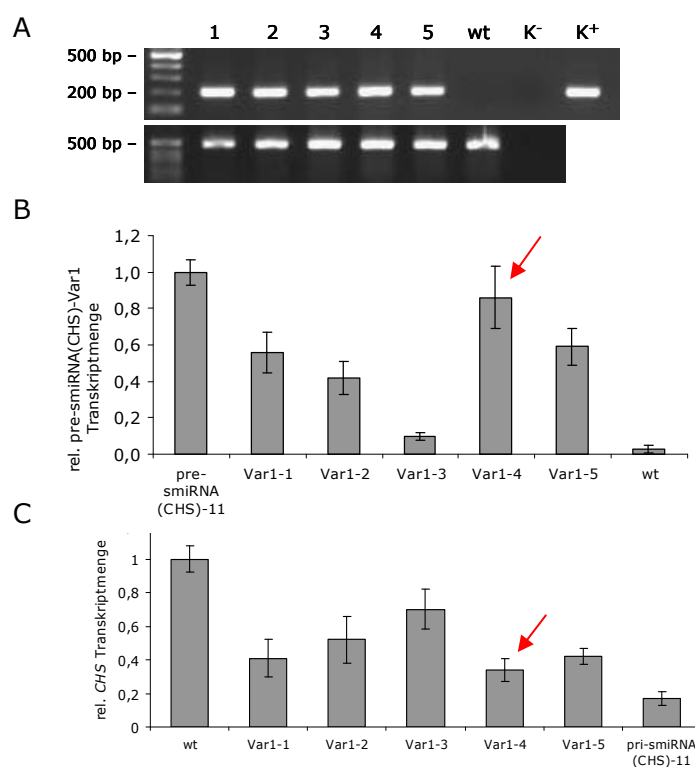
### 3.3.4 Molekulare Analyse pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierender Pflanzen

Um weiterhin festzustellen, in wie weit die Ausprägungen der Phänotypen pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierender Pflanzen mit der Expressionsstärke des jeweiligen Transgens in Verbindung standen, wurde die Expression der *precursor* in jeweils fünf verschiedenen Linien mittels qRT-PCR (2.2.4.3) analysiert. Die Werte wurden in Relation zum starken Exprimierer pri-smiRNA(CHS) Linie 11 gesetzt. Im Vorfeld der qRT-PCR wurde mit allen Proben auch eine einfache RT-PCR (2.2.4.2) durchgeführt, um die Qualität der RNA sowie die Spezifität der Oligonukleotide zu testen (Abb. 3.17 und 3.18).

Untersuchungen von Proben aus pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimierenden Linien ergaben, dass die Expression des *precursors* und damit des Primärtranskriptes von Linie 4 am höchsten im Vergleich zu den anderen Linien und ähnlich hoch wie die der Referenz smiRNA(CHS) Linie 11 war (Abb. 3.17 B). Die geringste Expression wurde in Linie 3 dokumentiert. Für das Zielgen *CHS* wurden die größten Transkriptmengen in pri-smiRNA(CHS)-Var1 Linie 3 und die geringsten in Linie 4 detektiert (Abb. 3.17 C). In allen Linien war die *CHS* mRNA Menge geringer als im Wildtyp, aber nicht so stark herunterreguliert wie in der pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Linie 11. Für pri-smiRNA(CHS)-Var2 exprimierende Pflanzen wurde festgestellt, dass die Expression des *precursors* in den Linien 1, 2 und 3 sehr ähnlich und am höchsten unter den fünf untersuchten Linien war, sie erreichten aber nicht den Wert des *precursors* von pri-smiRNA(CHS) Linie 11 (Abb. 3.18 A).

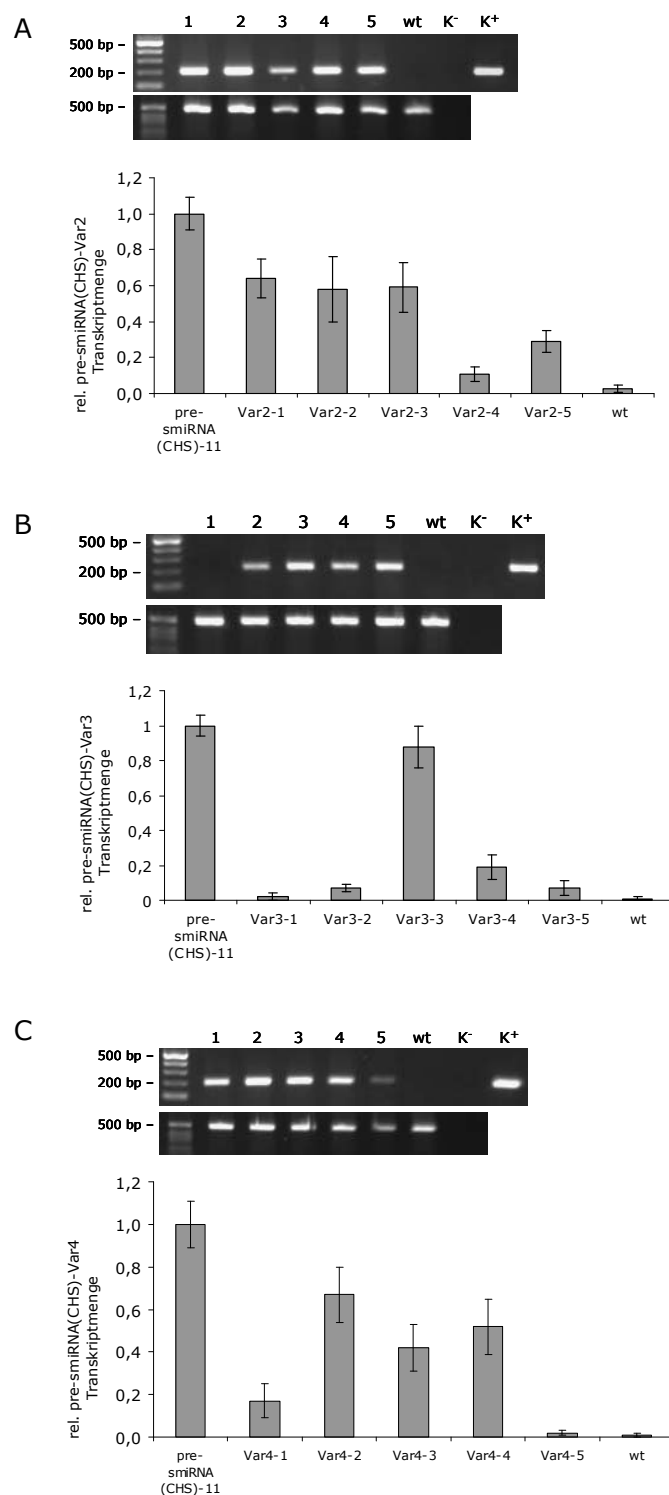
Für pri-smiRNA(CHS)-Var3 wurde lediglich in Linie 3 eine Expression gemessen, die annähernd der von pri-smiRNA(CHS) exprimierenden Pflanzen der Linie 11 glich (Abb. 3.18 B). In den anderen Linien war sie entweder kaum detektierbar (Linie 1) oder im Vergleich sehr schwach (Linien 2, 4, 5). Ein entsprechendes Bild findet sich aber nicht in den Ergebnissen für die Quantifizierung der Anthocyane wieder, hier ähnelten die Ergebnisse allesamt sehr dem für Wildtyp-Keimlinge.

Die qRT-PCR Ergebnisse für pri-smiRNA(CHS)-Var4 exprimierende Pflanzen zeigten, dass die Expression des *precursors* in Linie 2 am höchsten war, gefolgt von den Linien 3 und 4 (Abb. 3.18 C). Allerdings wurde auch hier nicht die Expressionsstärke vom *precursor* von smiRNA(CHS) Linie 11 erreicht. Die Linien 1 und 5 exprimieren das Transgen offensichtlich nur schwach.



**Abb. 3.17: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(CHS)-Var1 und dem Zielgen CHS**

(A) RT-PCR zum Nachweis der Expression des smiRNA(CHS)-Var1 *precursors* mit RNA aus fünf pri-smiRNA(CHS)-Var1 exprimierenden (1-5) und aus Wildtyp-Pflanzen (wt). K<sup>-</sup>: Kontroll-PCR ohne cDNA, K<sup>+</sup>: Kontroll-PCR mit pri-smiRNA(CHS)-Var1 DNA als *template*. (B) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des smiRNA(CHS)-Var1 *precursors* und des Zielgens CHS (C) in den gleichen transgenen Linien mittels qRT-PCR. Werte wurden in Bezug zum starken Exprimierer pre-smiRNA(CHS)-11 bzw. zum Wildtyp normalisiert. Pfeile deuten auf die Ergebnisse von pri-smiRNA(CHS)-Var1 Linie 4, die die stärkste Expression des *precursors* und die geringste Expression des Zielgens CHS aufweist.



**Abb. 3.18: Expressionsanalyse der pre-smiRNA(CHS) Varianten 2, 3 und 4**

RT-PCR zum Nachweis der Expression der smiRNA(CHS)-Var *precursor* mit RNA aus jeweils fünf pri-smiRNA(CHS)-Var exprimierenden (1-5) und aus Wildtyp-Pflanzen (wt). K<sup>-</sup>: Kontroll-PCR ohne cDNA, K<sup>+</sup>: Kontroll-PCR mit der jeweiligen pri-smiRNA(CHS)-Var DNA als *template* ((A), (B), (C), jeweils oben). Jeweils unten: Quantifizierung der relativen Transkriptmenge der smiRNA(CHS)-Var *precursor* in den gleichen transgenen Linien mittels qRT-PCR. Werte wurden in Bezug zum starken Exprimierer pre-smiRNA(CHS)-11 normalisiert.

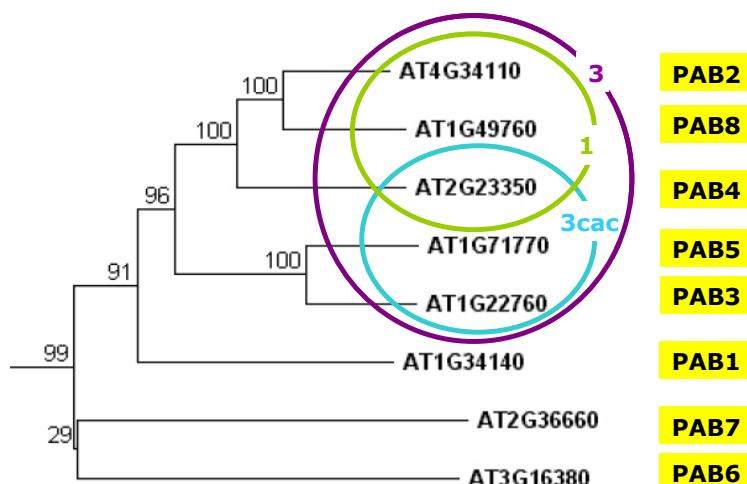
### 3.4 Multipler *knockdown* ausgewählter Poly(A)-bindender Proteine durch synthetische microRNAs

Zytosolische Poly(A)-bindende Proteine (PABPCs) sind eine Klasse hoch konservierter Proteine in Eukaryoten, die einen Hauptbestandteil von *messenger*-Ribonukleoproteinkomplexen (mRNPs) bilden. Sie sind in Prozesse wie Translationsinitiation (Palanivelu et al., 2000a), mRNA-Biogenese (Belostotsky, 2003) und mRNA-Stabilität (Palanivelu et al., 2000b) eingebunden. Analysen von Arabidopsis *pab2* und *pab5 knockout* Linien konnten die Integration von T-DNAs in diesen Genen bestätigen, jedoch wurde kein Phänotyp, der von Wildtyppflanzen abwich, beobachtet (Niemeier et al., 2010). Deshalb wurde die bereits beschriebene pri-smiRNA-Technologie für ausgewählte Mitglieder der *PABPC*-Familie angewandt.

#### 3.4.1 Design von smiRNA(PABP)s mit Hilfe bioinformatischer Werkzeuge

Um den simultanen *knockdown* von Mitgliedern der *PABPC*-Familie in Arabidopsis zu erreichen, wurden drei verschiedene synthetische miRNAs entworfen, die jeweils eine unterschiedliche Kombination der Familienmitglieder zum Ziel haben sollten. Abbildung 3.19 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der *PABPC* Familie (Merkle, pers. Kommunikation) und skizziert, welche *PABPC*s jeweils gleichzeitig durch eine der drei smiRNA(PABP)s spezifisch herunterreguliert werden sollten. Die erste smiRNA(PABP) sollte für alle *PABPC*-Mitglieder der Klasse II (*PAB2*, *PAB4*, *PAB8*) spezifisch sein und zu ihrem *knockdown* führen. Mit der zweiten smiRNA(PABP) (später smiRNA(PABP)-3 genannt) sollten alle Mitglieder aus den Klassen I (*PAB3* und *PAB5*) und II gezielt reguliert werden. Die dritte smiRNA(PABP) sollte schließlich den *knockdown* von *PABPC*s der Klasse I sowie *PAB4* aus Klasse II herbeiführen (smiRNA(PABP)-3cac genannt).

Wenn mehrere Zielgene gleichzeitig durch eine synthetische miRNA reguliert werden sollen, muss zunächst nach einem Sequenzabschnitt gesucht werden, der eine größtmögliche Übereinstimmung zwischen den gewünschten Zielgenen aufweist. Im Fall von Genfamilien oder nahe verwandten Genen bietet es sich daher meist an, die smiRNA-Bindestellen in eine konservierte Domäne zu legen. Gleichzeitig muss diese Domäne jedoch möglichst spezifisch für diese Genfamilie sein.



**Abb. 3.19: Phylogenetischer Stammbaum der PABPC Proteinfamilie und Auswahl von Mitgliedern als Ziele für synthetische miRNAs**

Auf Grundlage der Vollängen-Proteinsequenzen wurde mit Hilfe von ClustalW (Thompson et al, 1994) ein Sequenzalignment der PABPC-Familienmitglieder durchgeführt, der phylogenetische Stammbaum wurde mittels TreeCon (Van de Peer und Wachter, 1994) erstellt. Phylogenetische Distanzen wurden nach Tajima und Nei (1984) berechnet und *bootstrap*-Werte ergaben sich aus 100 Berechnungen. Die Topologie des Stammbaums wurde mittels der *neighbor joining* Methode ermittelt (Saitou und Nei, 1987). (modifiziert nach Merkle, pers. Kommunikation)

Farbige Kreise umschließen jeweils die verschiedenen PABPC-Familienmitglieder, die simultan durch eine synthetische miRNA reguliert werden sollten, der Name der jeweiligen smiRNA(PABP) ist angegeben.

### 3.4.1.1 Sequenzanalysen der PABPC-Familienmitglieder

Im Vorfeld des Designs für eine smiRNA zur Herunterregulierung verschiedener PABPCs wurde ein multiples Alignment mit den Sequenzen aller PABPCs auf Proteinebene durchgeführt um konservierte Bereiche zu identifizieren. Ein Ausschnitt aus diesem Alignment ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Viele Übereinstimmungen fanden sich im Bereich der PABC-Domänen, so dass dieser Bereich für das smiRNA-Design näher in Betracht gezogen wurde. Ein weiterer Vorteil dieser Domäne liegt darin, dass sie nur in der PABPC-Familie vorkommt, so dass eine größere Wahrscheinlichkeit besteht, die Anzahl der möglichen *off-targets* zu minimieren. Zwei der PABPC-Familienmitglieder, PAB1 und PAB6, besitzen allerdings keine PABC-Domänen und waren deshalb vom smiRNA-Design ausgeschlossen.

Die RRM-Domänen kommen zwar in allen Familienmitgliedern vor und bieten auch einige gut konservierte Sequenzabschnitte, sie sind aber auch charakteristisch für andere RNA-bindende Proteine. Dadurch könnte eine größere Anzahl putativer *off-targets* auftreten, die das Design erschweren.



```

PAB2 (At4g34110) : -----GSGDVPPYDMGNNMPLTI GALASNLSNATPEQQRIMLGEVLYPLVEQVEAESAAKVT
PAB4 (At2g23350) : -----MVPVAYDMNVMPYSQPMSAGQLATSLANATPAQQRILLGESTYPLVDQIESEHAAKVT
PAB8 (At1g49760) : TQNMLSVPYDVSSGGGVHHRDSPTSQPVPIVALATRLANAAPEQQRIMLGENLYPLVEQLEPESAAKVT
PAB3 (At1g22760) : SVPQGILPPIIPLPIDASSISHQKAPLLPI SKLITSSLASASPADRTRMLGEQLYPLVERHPLHVAKVT
PAB5 (At1g71770) : QG-I IPLPLNASANSHNAPQRSHKPTPLTISKLASDLALASPDKHPRLGDHLYPLVEQQEPANAAKVT
PAB7 (At2g36660) : -----RGKEMKKSIIQQRQSETVGMEMQLLGELHPLVEKLEPQLANKIT
PAB1 (At1g34140) : -----
PAB6 (At3g16380) : LSPEVKVEESGKQLQ-----

PAB2 (At4g34110) : GMLLEMDQTEVLHLLLESPEALKAKVAEAMDVLR SVAAGGATEQLASLNLNLS-----
PAB4 (At2g23350) : GMLLEMDQTEVLHLLLESPEALNAKVSEALDVLNRNVNQPSSQSGSEGNKSGSPDLLASLSINDHL
PAB8 (At1g49760) : GMLLEMDQTEVLHLLLESPEALKAKVTEAMDVLR SVAQQQAGGAADQLASLSLGDNIIVP-----
PAB3 (At1g22760) : GMLLEMDQAEIILHLMESPEALKSKVSEALDVLRLSVDPTDHDLGFSITD-----
PAB5 (At1g71770) : GMLLEMDQAEIILHLMESPEALKAKVSEALDVLRRSADPAAVSSVDDQFALSSSE-----
PAB7 (At2g36660) : GMLLEMDKSELLELLIKSPEDLAVRVDEAFEVLR SSKTNLTAPNTHRSDYLASGIAGVSIK----
PAB1 (At1g34140) : -----
PAB6 (At3g16380) : -----

```

**Abb. 3.20: Multiples Sequenzalignment aller PABPCs aus Arabidopsis**

Das Alignment der Aminosäuresequenz aller PABPC-Familienmitglieder wurde mit *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalW2>) erstellt. Im Anschluss wurde es mit dem Programm GeneDoc (Nicholas et al, 1997) bearbeitet. Hier ist ein Auszug der C-Termini dargestellt. Graustufen geben den Grad der Konservierung an (schwarz = 100 %, dunkelgrau ≥ 80 %, hellgrau ≥ 60 %, weiß ≤ 60 %). Der grüne Balken markiert die PABC-Domäne. (nach Merkle, pers. Kommunikation)

Auf Ebene der Nukleotidsequenzen wurde ebenfalls ein Alignment erstellt, das alle *PABPCs*, die eine PABC-Domäne besitzen mit einschloss. In Abbildung 3.21 ist ein Auszug aus diesem Alignment dargestellt. Der grüne Balken markiert die PABC-Domäne, der gelb unterlegte Abschnitt gibt einen besonders gut konservierten Bereich an, der für mögliche Positionen von smiRNA-Bindestellen in Betracht gezogen wurde.



**Abb. 3.21: Multiples Sequenzalignment der *PABPCs* aus Arabidopsis auf DNA-Ebene**

Das Alignment der Nukleotidsequenzen der *PABPC*-Familienmitglieder (ausgenommen *PAB1* und *PAB6*) wurde mit *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalW2>) erstellt, hier ist ein Auszug daraus dargestellt. Der grüne Balken markiert die PABC-Domäne, gelb unterlegte Sequenzbereiche zeigen an, in welcher Region sich mögliche Bindestellen für spezifisch entworfene, synthetische miRNAs befinden sollten. In Spalten, die mit einem Stern markiert sind, herrscht Übereinstimmungen aller Nukleotide. (nach Merkle, pers. Kommunikation)

### 3.4.1.2 Design dreier smiRNA(PABP)s mit Hilfe von *RNAhybrid*

Manuell erstellte smiRNA(PABP)-Kandidaten mit einer Länge von 21 nt wurden mit den gleichen Parametern wie in Abschnitt 3.1 beschrieben gegen das gesamte *A. thaliana* Transkriptom getestet, um mögliche *off-targets* für die einzelnen smiRNAs zu identifizieren. Um unerwünschte Zielgene, aber insbesondere auch unerwünschte *PABPCs* von der Regulierung durch einen smiRNA-Kandidaten auszuschließen, wurden die smiRNA-Sequenzen um ein oder mehr Nukleotide entlang der Zielsequenz in 5'- oder 3'-Richtung verschoben und erneut getestet. Zusätzlich wurden aus dem gleichen Grund auch einzelne Basen ausgetauscht und der smiRNA(PABP)-Kandidat erneut überprüft (in Zusammenarbeit mit A. Benzel, 2008). Schließlich wurden drei smiRNAs ausgewählt, die den Anforderungen entsprachen (vergl. 3.1).

smiRNA(PABP)-1 wurde entworfen, um die Mitglieder der Klasse II (*PAB2*, *PAB4*, *PAB8*) herunterzuregulieren. Mit diesen *PABPCs* sollte sie möglichst perfekt paaren, andere *PABPC*-Familienmitglieder sollten möglichst ausgeschlossen werden. Die *target*-Vorhersage mit *RNAhybrid* ergab schließlich, dass die smiRNA(PABP)-1 perfekt mit ihren Bindestellen in *PAB2* und *PAB4* paart und in diesen Hybridstrukturen *mfe*-Werte von weniger als -39 kcal/mol zustande kommen (Tab. 3.3). In der Hybridstruktur zwischen dieser smiRNA und *PAB8* kommt es zu einer Fehlpaarung im 3'-Bereich, so dass der *mfe*-Wert in diesem Fall auf -35,3 kcal/mol ansteigt.

**Tab. 3.3: Zusammenfassung des *RNAhybrid* Ergebnisses für smiRNA(PABP)-1**

AGI: *Arabidopsis Genome Initiative gene identification number*, *mfe*: minimale freie Energie

<i>target</i> -Gen	AGI	<i>mfe</i> [kcal/mol]	smiRNA: <i>target</i> Hybrid		
<i>PAB2</i>	At4g34110	-39,8	<i>target</i>	5' U	U 3'
			smiRNA(PABP)-1	3'	5'
<i>PAB4</i>	At2g23350	-39,3	<i>target</i>	5' U	C 3'
			smiRNA(PABP)-1	3'	5'
<i>PAB8</i>	At1g49760	-35,3	<i>target</i>	5' U U	C 3'
			smiRNA(PABP)-1	3' C	5'

Der zweite ausgewählte smiRNA(PABP)-Kandidat, der im weiteren Verlauf der Arbeit smiRNA(PABP)-3 genannt wird, sollte alle Mitglieder der Klassen I und II spezifisch als Zielgene erkennen. Die Hybridstrukturen zwischen den Bindestellen dieser Gene und der smiRNA(PABP)-3 ergaben *mfe*-Werte zwischen 35,6 kcal/mol und 39,3 kcal/mol. Alle zuvor visuell identifizierten *PABPC*-Zielgene wurden durch *RNAhybrid* bestätigt. Nur eine

Fehlpaarung kam insgesamt vor, und zwar in Zusammenhang mit *PAB8* im 3'- Bereich der smiRNA (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4: Zusammenfassung des RNAhybrid Ergebnisses für smiRNA(PABP)-3**

AGI: *Arabidopsis Genome Initiative gene identification number*, mfe: minimale freie Energie

target-Gen	AGI	mfe [kcal/mol]	smiRNA:target Hybrid		
<i>PAB2</i>	At4g34110	-38,9	target	5' U	G 3'
			smiRNA (PABP) -3	3' G	5'
<pre> UGGAGAUGGACCAGACUGAA ACCUUUUACCUGGUUUGGCUU </pre>					
<i>PAB3</i>	At1g22760	-35,9	target	5' U	A 3'
			smiRNA (PABP) -3	3' G	5'
<pre> UGGAGAUGGAUCAAGCUGAG ACCUUUUACCUGGUUUGGCUU </pre>					
<i>PAB4</i>	At2g23350	-39,3	target	5' U	G 3'
			smiRNA (PABP) -3	3'	5'
<pre> CUGGAAAUGGAUCAGACCGAG GACCUUUUACCUGGUUUGGCUU </pre>					
<i>PAB5</i>	At1g71770	-37,2	target	5' G	A 3'
			smiRNA (PABP) -3	3'	5'
<pre> CUGGAGAUGGAUCAAGCUGAG GACCUUUUACCUGGUUUGGCUU </pre>					
<i>PAB8</i>	At1g49760	-35,6	target	5' U U	G 3'
			smiRNA (PABP) -3	3' C	5'
<pre> CU GAAAUGGACCAAACCGAA GA CUUUUACCUGGUUUGGCUU </pre>					

Die dritte smiRNA(PABP), genannt -3cac, unterschied sich in drei Basen von der smiRNA(PABP)-3. Durch den Austausch dieser Basen sollten nur noch *PAB3*, *PAB4* und *PAB5* spezifisch durch die smiRNA reguliert werden (Tab. 3.5). Die Vorhersage mit *RNAhybrid* bestätigte dies: Mit mfe-Werten zwischen -38,4 kcal/mol und -42,2 kcal/mol wurden die gewünschten *PABPCs* als Zielgene vorausgesagt, andere *PABPC*-Familienmitglieder tauchten in den Ergebnissen der Vorhersage nicht auf (siehe 7.2.8).

**Tab. 3.5: Zusammenfassung des RNAhybrid Ergebnisses für smiRNA(PABP)-3cac**

AGI: *Arabidopsis Genome Initiative gene identification number*, mfe: minimale freie Energie

target-Gen	AGI	mfe [kcal/mol]	smiRNA:target Hybrid		
<i>PAB3</i>	At1g22760	-40,9	target	5' U	A 3'
			smiRNA (PABP) -3cac	3' G	5'
<pre> UGGAGAUGGAUCAAGCUGAG ACCUCUACCUAGUUUUGGCUC </pre>					
<i>PAB4</i>	At2g23350	-38,4	target	5' U A	G 3'
			smiRNA (PABP) -3cac	3' C	5'
<pre> CUGGA AUGGAUCAGACCGAG GACCU UACCUAGUUUUGGCUC </pre>					
<i>PAB5</i>	At1g71770	-42,2	target	5' G	A 3'
			smiRNA (PABP) -3cac	3'	5'
<pre> CUGGAGAUGGAUCAAGCUGAG GACCUCUACCUAGUUUUGGCUC </pre>					

Nach Berechnung und Vergleich der Sekundärstrukturen der smiRNA(PABP) Primärtranskripte mit den ursprünglichen Primärtranskript-Strukturen mit Hilfe von *RNAfold* (siehe 7.3.1), wurden diese drei beschriebenen smiRNA(PABP)s mittels *overlap extension*-PCR und spezifischer Oligonukleotide in das originale Primärtranskript von *MIR159a* (smiRNA(PABP)-3cac) oder den *MIR159a*-basierten ECV inseriert (smiRNA(PABP)-1 und -3; vergl. Abschnitt 3.2). Arabidopsis Wildtyppflanzen wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* mit den pri-smiRNA(PABP) Konstrukten (im pGPTV-BAR Vektor) transformiert (2.2.7) und mehr als 20 transgene Linien wurden nach der Selektion mit dem Kontaktherbizid BASTA jeweils identifiziert (A. Benzel, 2008).

### 3.4.2 Analyse smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen

Transgene Arabidopsis Pflanzen, die die pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierten zeigten starke Abweichungen im Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Daher wurden diese Pflanzen der intensivsten Analyse unterzogen. Sechs der identifizierten pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Linien wurden im Gewächshaus angezogen und einer phänotypischen Betrachtung unterzogen. Drei dieser Linien, die die stärksten Phänotypen zeigten, wurden für eingehendere Analysen ausgewählt.

#### 3.4.2.1 Experimentelle Validierungen der smiRNA(PABP)-3 und ihrer Zielgene

Abbildung 3.22 zeigt die Ergebnisse eines *Northern Blot* Experimentes mit RNA aus pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen (2.2.4.5). In allen aufgetragenen Proben konnte jeweils ein Signal im Bereich von 21 nt detektiert werden, deren Zuordnung anhand eines 21 nt langen RNA-Größenmarkers möglich war. Dieses Signal wurde nicht im Kontroll-Experiment nachgewiesen, das mit RNA aus Col-0 Wildtyppflanzen durchgeführt worden war. U6 snRNA konnte in allen Proben nachgewiesen werden und bestätigte die Qualität der präparierten RNA. So wurde die Prozessierung der smiRNA(PABP)-3 in den Linien 2, 4 und 5 bestätigt. Das Signal war in Proben aus Linie 2 am stärksten.

Mit Hilfe eines modifizierten 5'RACE-Experimentes (2.2.4.4) sollten des Weiteren durch die smiRNA(PABP)-3 Aktivität hervorgebrachte 3'-Spaltungsprodukte von *PABPC*-Transkripten nachgewiesen und Spaltungspositionen innerhalb der Transkripte bestimmt werden. Dies dient der Verifizierung der smiRNA(PABP)-3 Zielgene.

Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus jungen Rosettenblättern der pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Linien 2 und 4 isoliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 B und C zusammengefasst. Für *PAB2* wurden neun Klone identifiziert, von denen sieben die smiRNA(PABP)-3 vermittelte Spaltung des *PAB2*-Transkriptes zwischen den Positionen zehn und elf bestätigten (Abb. 3.23 B). Zwei weitere Spaltungsereignisse wurden einige Nukleotide weiter in Richtung 3'- bzw. 5'-Ende



(Abb. 3.23). Untereinander unterschieden sich die sechs pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Linien jedoch nicht gravierend. Dies machte sich erst im Alter von 49 Tagen bemerkbar. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Linien 1, 3 und 6 eine ähnliche Rosettengröße auf, die allerdings nicht an die von Wildtyppflanzen heranreichte (Abb. 3.24 und 3.25). Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 waren allesamt deutlich kleiner und ließen Auffälligkeiten in der Wuchsform erkennen. Sie hatten kürzere Blattstiele und rundere, wellige Blätter und wirkten insgesamt gedrungener. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Wildtyp bereits zu blühen begonnen, hohe Infloreszenzen und die ersten Schoten ausgebildet, während die Ausbildung der Infloreszenzen der transgenen Linien 1, 2, 3, 4, und 6 in einzelnen Pflanzen gerade erst einsetzte. Für Pflanzen der Linie 5 konnte noch keine Bildung von Infloreszenzen beobachtet werden. Es war aber auffällig, dass ein hoher Anteil an Pflanzen (etwa 30 %) dieser Linie bis zu dem Zeitpunkt abgestorben war. Sie hatten zusammen mit Pflanzen der Linie 2 die kleinste Wuchsform.



**Abb. 3.23: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 34 Tagen**

pri-smiRNA(PABP)-3 Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) angezogen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Wildtyppflanzen (A) und Pflanzen der Linien 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E), 5 (F), und 6 (G) im gleichen Maßstab.



**Abb. 3.24: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 49 Tagen**

pri-smiRNA(PABP)-3 Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) angezogen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Pflanzen der Linien 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), und 6 (F) im gleichen Maßstab. Wildtyppflanzen blühten zu diesem Zeitpunkt bereits und sind hier nicht abgebildet, vergleiche aber mit Abbildung 3.25. Pfeile deuten auf sich bildende Infloreszenzen.



**Abb. 3.25: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 49 Tagen im Vergleich zum Wildtyp**

pri-smiRNA(PABP)-3 Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) angezogen. (A) zeigt eine Wildtyppflanze gleichen Alters zum Vergleich (links) sowie Pflanzen der Linie 2 (Mitte links), Linie 4 (Mitte rechts) und Linie 5 (rechts) im gleichen Maßstab. (B) Vergrößerte Aufnahme einer Pflanze der Linie 2 und (C) vergrößerte Aufnahme einer Pflanze der Linie 4. Pfeile deuten auf sich bildende Infloreszenzen.



Nach 60 Tagen Wachstum im Langtag hatte sich der Unterschied zwischen Pflanzen der *pri-smiRNA(PABP)-3* exprimierenden Pflanzen der Linien 1, 3 und 6 und denen des Wildtyps etwas verkleinert (nicht gezeigt). Die transgenen Pflanzen hatten ähnlich große Rosetten sowie annähernd gleich hohe Infloreszenzen ausgebildet und produzierten die ersten Schoten. Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 waren in ihrer Wuchsform weiterhin deutlich kleiner und in ihrer Entwicklung verzögert (Abb. 3.26). Am auffälligsten war die Tatsache, dass die Infloreszenzen von Pflanzen der Linien 2 und 4 sehr kurz blieben. Es zeigten sich aber einige Blütenstände und Schoten wurden gebildet, die in Größe und Morphologie denen von Wildtyppflanzen glichen. Nur wenige Pflanzen der Linie 5 zeigten zu diesem Zeitpunkt erste Anzeichen für die Ausbildung von Infloreszenzen, und die Größe ihrer Rosette hatte sich kaum verändert.



**Abb. 3.26: *pri-smiRNA(PABP)-3* exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 60 Tagen**

*pri-smiRNA(PABP)-3* Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) angezogen. (A) zeigt eine Wildtyppflanze gleichen Alters zum Vergleich (links) sowie Pflanzen der Linie 2 (Mitte) und Linie 4 (rechts). Die gleichen transgenen Pflanzen der Linien 2 (B) und 4 (C) sowie der Linie 5 (D) in der Aufsicht im gleichen Maßstab. (E) und (F) zeigen Vergrößerungen von Pflanzen der transgenen Linie 4 bzw. 2. Pfeile deuten auf Schoten.

Nach 76 Tagen Wachstum im Langtag hatten die ersten Wildtypschoten bereits begonnen zu trocknen und reife Samen zu entlassen (Abb. 3.27 A). Ganz ähnlich verhielten sich pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen der Linien 1, 3 und 6 (nicht gezeigt). Die Infloreszenzen der transgenen Linien 2 und 4 waren nicht weiter in die Höhe gewachsen, es hatten sich aber besonders bei Pflanzen der Linie 4 vermehrt Sekundärinfloreszenzen entwickelt, so dass ein buschiges Erscheinungsbild entstand. In diesen Linien begannen die Schoten noch nicht zu trocknen, sondern waren überwiegend noch in der Entwicklungsphase. Das Abtrocknen der Schoten setzte hier vereinzelt nach etwa 87 Tagen (Linie 2) bzw. 83 Tagen (Linie 4) ein.

Bis zu diesem Zeitpunkt hatten auch alle Pflanzen der transgenen Linie 5 eher schwächliche und sehr kurze Infloreszenzen entwickelt (Abb. 3.27 B). Nur wenige Schoten, die allerdings in Größe und Morphologie denen von Wildtyppflanzen glichen, wurden kurze Zeit später entwickelt. Sie begannen entsprechend später, nach etwa 96 Tagen Wachstum zu trocknen und lieferten, wie auch Pflanzen der Linien 1, 2, 3, 4 und 6, keimfähige Samen.



**Abb. 3.27: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Langtag im Alter von 76 Tagen**

pri-smiRNA(PABP)-3 Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) angezogen. (A) zeigt eine Wildtyppflanze gleichen Alters zum Vergleich (links) sowie Pflanzen der Linie 2 (Mitte) und Linie 4 (rechts). Vergrößerte Aufnahmen von Pflanzen der Linien 5 (B) und 2 (C). Der Pfeil deutet auf eine sich entwickelnde Infloreszenz.

Die gleichen pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Linien verhielten sich während ihrer Anzucht im Kurztag ähnlich. Zu Beginn, 34 Tage nach Keimung, zeigte sich bereits ein geringer Unterschied im Wachstum der Linien verglichen mit Wildtyppflanzen (Abb. 3.28 A). Dabei war dieser Unterschied in Pflanzen der Linien 1, 3 und 6 (nicht gezeigt) wiederum nicht so stark ausgeprägt wie in Pflanzen der Linien 2, 4 und 5, was sich auch im Verlauf des weiteren Wachstums nicht änderte (Abb. 3.28 B-D). Nach 60 Tagen wurden für Pflanzen der transgenen Linien 2, 4 und 5 neben ihrer insgesamt kleineren Wuchsform auch auffällige Abweichungen in der Wuchsform der Blätter augenscheinlich. Wieder waren die Blattstiele verkürzt, die Blätter wellten sich an den Rändern und wirkten insgesamt gedrungener. Sechzehn Tage später hatten von diesen drei Linien merklich nur die Rosettenblätter von Pflanzen der Linie 2 an Größe dazu gewonnen. Pflanzen der Linien 4 und 5 zeigten umso deutlicher einen zwergenartigen Phänotyp.



**Abb. 3.28: Übersicht über pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Kurztag**

pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit) angezogen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen 34 (A), 49 (B), 60 (C) und 76 (D) Tage nach Aussaat von Pflanzen der Linien 2 (Mitte links), 4 (Mitte rechts) und 5 (rechts) im gleichen Maßstab. Zum Vergleich werden repräsentative Aufnahmen von Wildtyppflanzen gleichen Alters gezeigt (links).

Wildtyppflanzen begannen in der Regel nach etwa 85-95 Tagen mit der Bildung einer Infloreszenz (Abb. 3.29). Dies trat in den pri-smiRNA(PABP)-3 Linien 1, 3 und 6 nur kurze Zeit später ein (ab einem Alter von etwa 93 Tagen), wurde aber in den Linien 2, 4 und 5 erst nach durchschnittlich 120, 122 und 130 Tagen entsprechend dokumentiert (nicht gezeigt). Die Blüten zeigten keine Besonderheiten oder Abweichungen in ihrer Entwicklung oder Wuchsform. Entsprechende Zeit später bildeten diese Pflanzen Schoten, die sich ebenfalls nicht von denen der Wildtyppflanzen unterschieden und entwickelten keimfähige Samen.

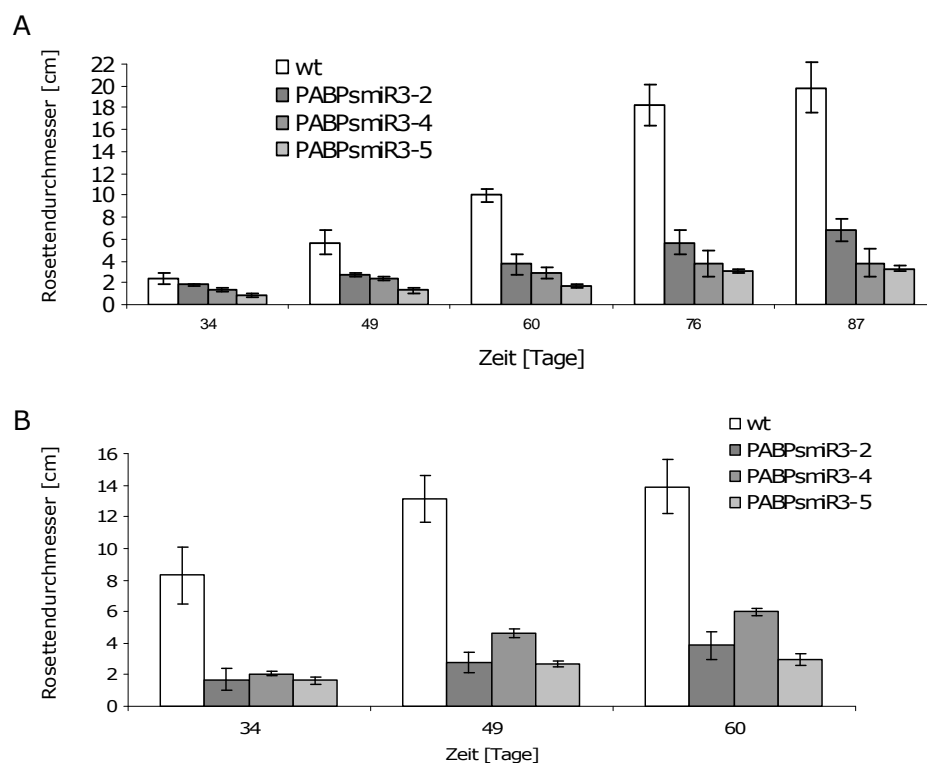


**Abb. 3.29: pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen im Kurztag im Alter von 111 Tagen**

pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen wurden 111 Tage lang im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit) angezogen. (A) zeigt eine Wildtyppflanze gleichen Alters zum Vergleich (links) sowie Pflanzen der Linie 2 (Mitte links), Linie 4 (Mitte rechts) und Linie 5 (rechts). (B) Vergrößerte Aufnahmen von Pflanzen der Linie 2 und 5 (C).

Die beschriebenen Unterschiede im Wachstum von pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen im Verlauf ihrer Entwicklung wurden auch quantifiziert. Zu den Zeitpunkten, zu denen diese Pflanzen fotografiert wurden, wurde der Rosettendurchmesser von jeweils zehn Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 bestimmt, so dass deren Wachstum anschaulich im Vergleich zu dem von Wildtyp-Rosettenblättern nachvollzogen werden kann (Abb. 3.30). Es ist erkennbar, dass die Rosetten von Wildtyppflanzen besonders im Langtag von Beginn der Dokumentation an deutlich größer waren. Weiterhin wird deutlich, dass sich die Größen der Rosetten der drei transgenen Linien in einem ähnlichen Rahmen

bewegten, Pflanzen der Linie 4 aber im Langtag vergleichsweise den größten, und Pflanzen der Linie 2 im Kurztag den größten Rosettendurchmesser hatten.

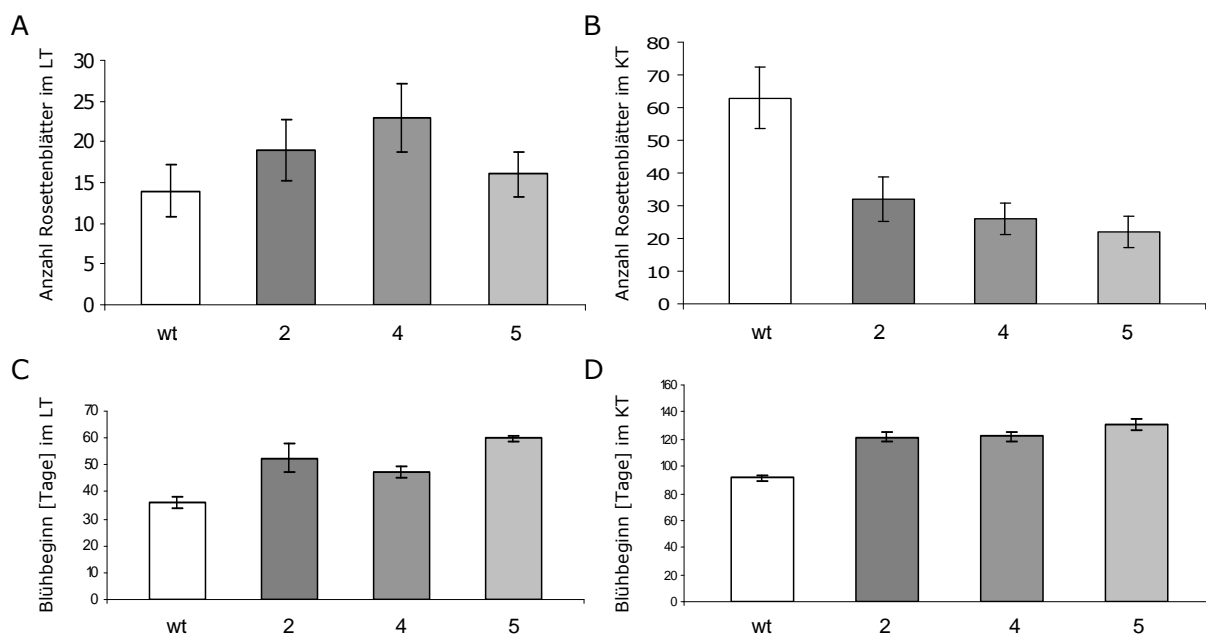


**Abb. 3.30: Durchmesser der Rosetten pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen**

Arabidopsis Wildtyppflanzen (wt) und pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 wurden unter Langtag- (A) und Kurztagbedingungen (B) im Gewächshaus angezogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Durchmesser von jeweils zehn Pflanzen ermittelt. Hier sind Durchschnittswerte und die zugehörigen Standardfehler angegeben.

Weiterhin wurden auch die Blühzeitpunkte der pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen unter Langtag- und Kurztagbedingungen gemessen. Wenn die Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 und Wildtyppflanzen begannen ihre Infloreszenzen auszubilden und diese eine Höhe von etwa 0,5 cm erreichten, wurde die Anzahl der Rosettenblätter von jeweils zehn Pflanzen bestimmt. Durchschnittswerte sind in Abbildung 3.31 mit zugehörigen Standardfehlern angegeben. Wildtyppflanzen hatten im Langtag durchschnittlich etwa 14 Rosettenblätter zum Zeitpunkt der beginnenden Entwicklung ihrer Infloreszenzen, wohingegen die transgene Linie 4 eine deutlich höhere Menge, durchschnittlich 22 Blätter zum entsprechenden Zeitpunkt aufwies (Abb. 3.31 A). Für die Linien 2 und 5 ist es hier schwierig, eine eindeutige Aussage zu treffen, da große Unterschiede zwischen den Pflanzen bestanden, doch hatten auch sie meist mehr Rosettenblätter als Wildtyppflanzen zum Zeitpunkt der Infloreszenzbildung.

Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, verhielten sich anders (Abb. 3.31 B). Hier hatten die Pflanzen aller drei transgenen Linien zum untersuchten Zeitpunkt durchschnittlich weniger Rosettenblätter als Wildtyppflanzen zu Beginn ihrer Infloreszenzentwicklung. Die Abweichungen zwischen den transgenen Linien waren ähnlich stark ausgeprägt.



**Abb. 3.31: Blühbeginn pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen**

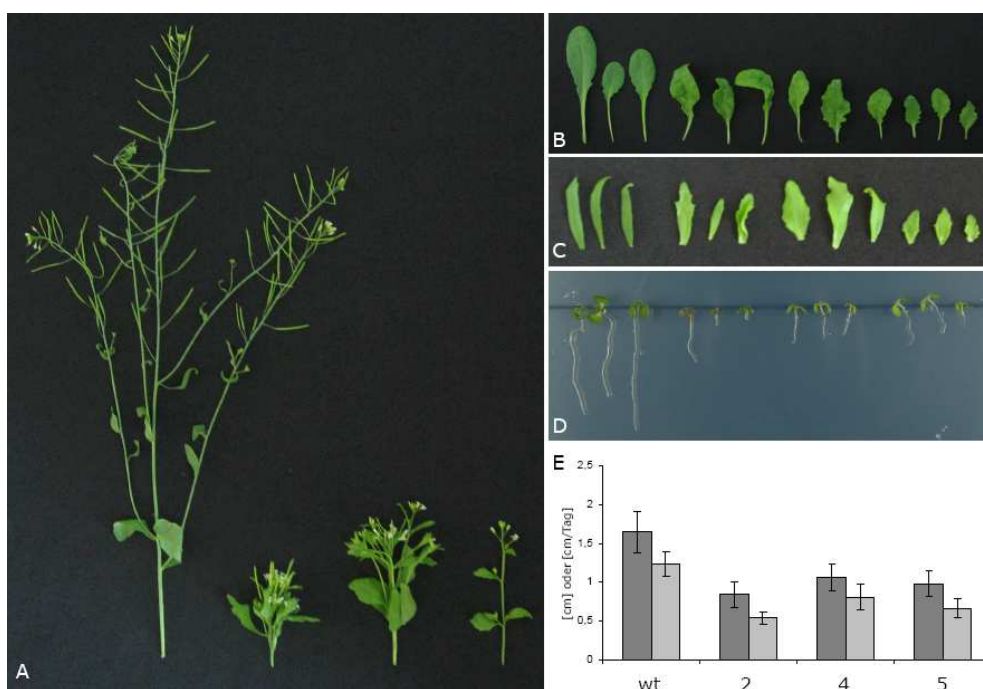
Arabidopsis Wildtyppflanzen (wt) und pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 wurden unter Langtag- (A, C) und Kurztagbedingungen (B, D) im Gewächshaus angezogen. Die Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn (Länge der Infloreszenz etwa 0,5 cm) (A, B) sowie der Zeitpunkt des Blühbeginns (C, D) nach Keimung sind dargestellt. Jeweils zehn Pflanzen wurden analysiert, Durchschnittswerte und die zugehörigen Standardfehler sind angegeben.

Zusätzlich wurde auch die Wachstumsdauer bis zum Eintreten der Infloreszenzbildung anhand der gleichen Pflanzen dokumentiert (Abb.3.31 C und D). Die Infloreszenzhöhe von 0,5 cm bestimmte auch hier den Messzeitpunkt. Im Langtag und im Kurztag entwickelten Wildtyppflanzen ihre Infloreszenzen durchschnittlich früher, wie auch schon anhand von Fotos (Abb. 3.24 und 3.28) hervorgehoben wurde. Die Infloreszenzbildung der transgenen Linie 5 setzte jeweils am spätesten ein.

In Abbildung 3.32 sind weitere Details der pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen zusammengefasst. Deutlich sichtbar werden die verkürzten Infloreszenzen der transgenen Linien 2, 4 und 5 verglichen mit der Infloreszenz einer Wildtyppflanze 64 Tage nach Keimung der Pflanzen im Langtag (A). Von den gleichen Pflanzen werden repräsentative Aufnahmen von Rosetten- und Hochblättern gezeigt. Rosettenblätter

waren auffallend kleiner als die Blätter von Wildtyppflanzen und zeigten, wie bereits erwähnt, eine wellige Wuchsform (B). Die Hochblätter der gleichen Pflanzen waren auffallend gezackt (Linie 2), breiter und gewellt (Linie 4) oder sehr klein und rundlich (Linien 5) im Vergleich zu denen des Wildtyps (C).

Um einen Eindruck zu bekommen, inwieweit sich die Expression des Transgens auf das Wurzelwachstum in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Keimlingen auswirkt, wurden jeweils zehn Keimlinge der Linien 2, 4 und 5 sowie von Wildtypen in vertikaler Ausrichtung auf 0,5 x MS-Medium in einer Lichtkammer unter Langtagbedingungen angezogen (D). Die Längen der Wurzeln an Tag zehn nach Keimung wurden dokumentiert sowie die Wachstumsrate der gleichen Keimlinge zwischen den Tagen sieben und zehn (E). Auch in Bezug auf das Wurzelwachstum wird deutlich, dass die transgenen Pflanzen in ihrer Entwicklung verzögert sind und zu gleichen Zeitpunkten kleinere Wuchsformen als Wildtyppflanzen aufweisen.



**Abb. 3.32: Infloreszenzen, Wurzeln und Blätter pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen**

(A) Infloreszenzen von Wildtyppflanzen (links) sowie der Linien 2 (Mitte links), 4 (Mitte rechts) und 5 (rechts) im Alter von 64 Tagen, gewachsen unter Langtagbedingungen. (B) Rosetten- und (C) Hochblätter von Wildtyppflanzen sowie der in (A) gezeigten transgenen Linien (in der gleichen Reihenfolge). (D) Zehn Tage alte Wildtyp-Keimlinge der gleichen transgenen Linien wie oben, die in vertikaler Ausrichtung in einer Lichtkammer auf 0,5 x MS-Medium unter LT-Bedingungen gewachsen sind. (E) Wurzellängen der in (D) gezeigten Keimlinge (dunkelgraue Balken) und Wachstumsrate der Wurzeln zwischen Tag 7 und Tag 10 (hellgraue Balken). Je sechs Keimlinge wurden analysiert, Durchschnittswerte und zugehörige Standardfehler sind angegeben.

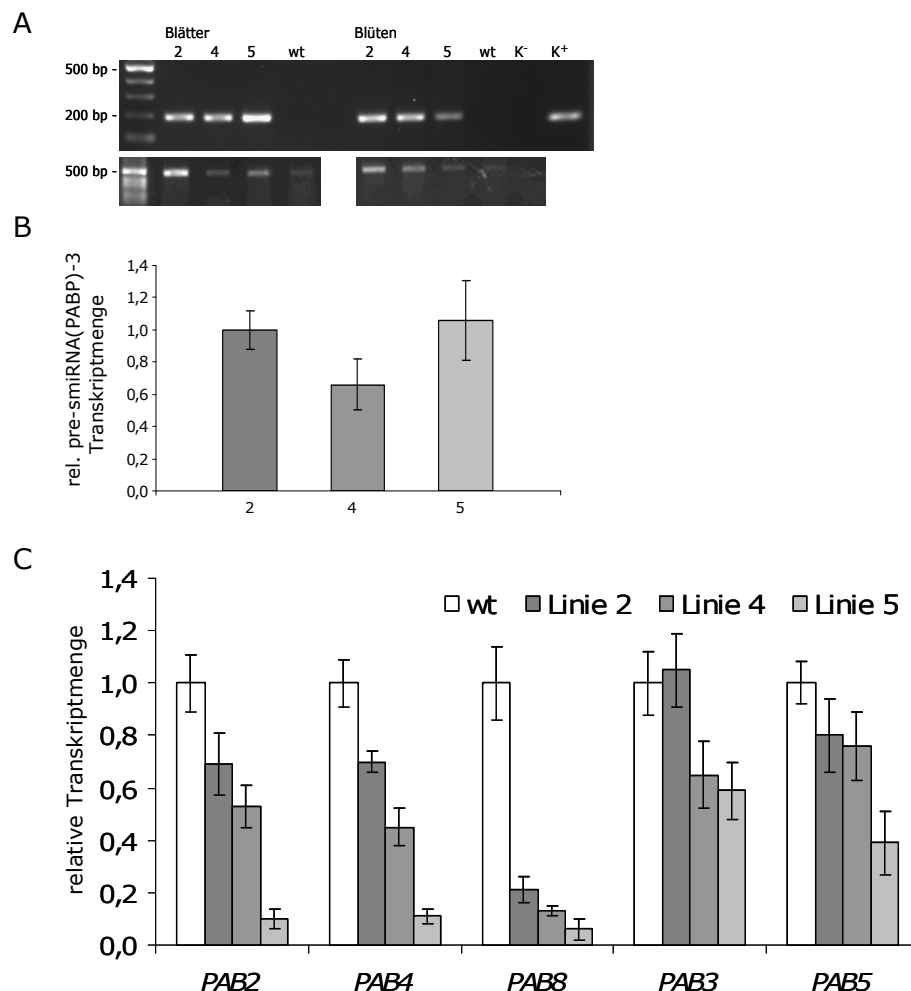
qRT-PCRs wurden mit Proben aus pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen der Linien 2, 4 und 5 durchgeführt, um relative Quantifizierungen der Expression ihrer *precursor* und ihrer Zielgene zu untersuchen (2.2.4.3). Die gewählten Oligonukleotide für die fünf zu testenden Zielgene flankierten die smiRNA(PABP)-3 Bindestellen und waren jeweils spezifisch für eines der *PABPC*-Zielgene. Für jede untersuchte Linie und jedes Zielgen wurden zwei biologische Replikate jeweils in drei Parallelversuchen durchgeführt. Die relative Expression der Zielgene wurde auf den Wildtyp normalisiert, dessen Wert als 1,0 gesetzt wurde. Die Werte aus den transgenen Linien wurden entsprechend angeglichen. Im Fall des *precursors* wurde der Wert von Linie 2 als eins gesetzt.

Im Vorfeld der eigentlichen qRT-PCR Experimente wurde jeweils eine RT-PCR durchgeführt (2.2.4.2), um die Spezifität der Oligonukleotide und die Qualität der präparierten RNA und cDNA zu überprüfen (Abb. 3.33 A). Für diese Experimente sowie in der darauf folgenden qRT-PCR wurde RNA aus Rosettenblättern und aus Blüten eingesetzt. Letztere sollte die Analyse von *PAB3* und *PAB5* erleichtern, da diese überwiegend in reproduktivem Gewebe exprimiert werden (Belostotsky und Meagher, 1996). Die Expression des smiRNA(PABP)-3 *precursors* konnte in allen drei transgenen Linien in Blättern und Blüten mittels RT-PCR gezeigt werden, in Proben mit Wildtyp-RNA wurde kein Fragment amplifiziert. Die qRT-PCR Ergebnisse zeigten außerdem, dass die relative pri-smiRNA(PABP)-3 Expression in Linie 4 geringer war als in den Linien 2 und 5, die zueinander sehr ähnliche Werte lieferten (Abb. 3.33 B). Allerdings waren die Abweichungen innerhalb der einzelnen untersuchten Proben relativ groß, wie die Fehlerbalken verdeutlichen.

Die vorhergesagten smiRNA(PABP)-3 Zielgene *PAB2*, *PAB4* und *PAB8* waren in allen drei untersuchten Linien herunterreguliert im Vergleich zu ihrer Transkriptmenge in Wildtyppflanzen (Abb. 3.33 C). Am stärksten war davon *PAB8* in allen Linien betroffen. Die geringste Reduktion der Zielgentranskripte wurde in allen Proben der Linie 2 beobachtet, am stärksten waren die *PAB2*-, *PAB4*- und *PAB5*-Transkripte in Linie 5 reduziert.

Die Expression von *PAB3* und *PAB5* war zwar in fast allen untersuchten Proben auch geringer als im Wildtyp, aber die Reduktion war für diese zwei Zielgene nicht ganz so drastisch, wie sie für die *PABPCs* der Klasse II berechnet wurde. Für *PAB3* konnte in Linie 2 keine Verringerung der Transkriptmenge festgestellt werden. Wieder war die Reduktion der Transkriptmengen in der transgenen Linie 5 tendenziell am stärksten.





**Abb. 3.33: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(PABP)-3 und ihrer Zielgene**

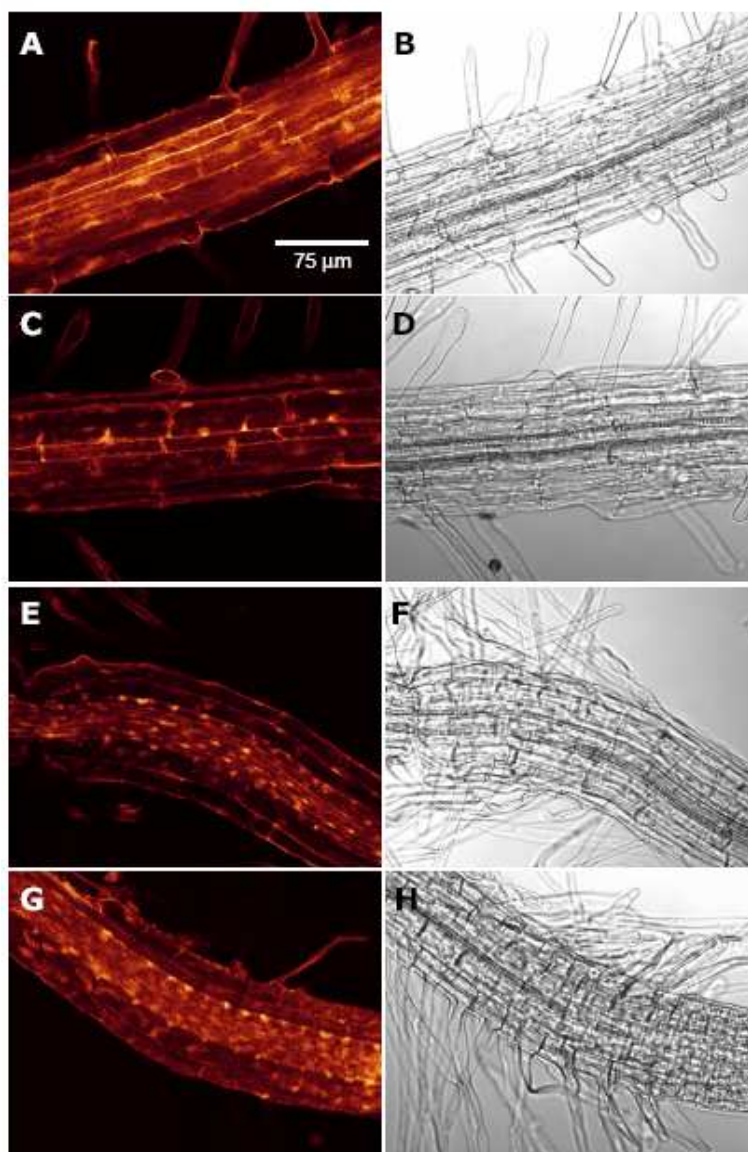
(A) RT-PCR zum Nachweis der Expression des smiRNA(PABP)-3 *precursors* (oben) mit RNA aus drei pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Linien (2, 4, 5) und aus Wildtyp-Pflanzen (wt) in jungen Rosettenblättern und Blüten. Die Qualität der RNA bzw. cDNA wurde durch Amplifikation von ActinII überprüft (unten). K<sup>-</sup>: Kontroll-PCR ohne cDNA, K<sup>+</sup>: Kontroll-PCR mit pri-smiRNA(PABP)-3 DNA als *template*. (B) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des smiRNA(PABP)-3 *precursors* in den gleichen transgenen Linien mittels qRT-PCR mit RNA aus jungen Rosettenblättern. Werte wurden zum erhaltenen Wert für Linie 2 normalisiert. (C) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge der smiRNA(PABP)-3 Zielgene in Rosettenblättern (*PAB2,4* und *8*) und Blüten (*PAB3* und *PAB5*) in den transgenen Linien 2, 4 und 5 mittels qRT-PCR. Werte wurden in Bezug zum Wildtyp normalisiert.

#### 3.4.2.4 Lokalisierung von Poly(A)-RNA in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen

Um der Vermutung nachzugehen, dass die Poly(A)-bindenden Proteine wie in Hefe auch in Pflanzen wichtig für den mRNA-Export sind und möglicherweise über ihre Kernexportsignale (*nuclear localization signals*, NESs) eine Verbindung zum XPO1-vermittelten Kernexport herstellen, wurde die Lokalisierung von Poly(A)-RNA in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen untersucht. Falls die Vermutung zutreffen würde, sollte Poly(A)-RNA in den transgenen Pflanzen vermehrt im Kern zurückgehalten werden und dort akkumulieren.

Deshalb wurden etwa fünf Tage alte transgene Keimlinge und Wildtyp-Keimlinge fixiert und eine *whole mount in situ*-Hybridisierung mit ihnen durchgeführt (2.2.10). Dabei wurde Fluorescein-markiertes oligo(dT) als Sonde zum Nachweis verwendet. Aufgrund der NESs, die in fast allen *PABPCs* vorkommen und eine Verbindung zum XPO1-vermittelten Kernexport herstellen könnten, wurde auch der Effekt von Leptomycin B (LMB) auf die Lokalisierung der Poly(A)-RNA getestet. LMB ist ein spezifischer Inhibitor für die Interaktion von XPO1 und NES-Sequenzen von Cargoproteinen (Kudo et al., 1999).

Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung (Abb. 3.34) zeigen, dass Fluoreszenz-Signale in Wildtyppflanzen in Zellkernen und im Zytoplasma von Wurzelzellen detektiert werden konnten (A, B). In pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Keimlingen der Linie 2 hingegen war das Signal in Zellkernen deutlich stärker als im Zytoplasma (E-H). Ein sehr ähnliches Bild ergab sich für Wildtypkeimlinge, die vor der Fixierung mit LMB behandelt worden waren (C, D). Hier war das Signal in Zellkernen stärker als in unbehandelten Wildtyppflanzen.



**Abb. 3.34: *In situ* Hybridisierung pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierender Pflanzen**

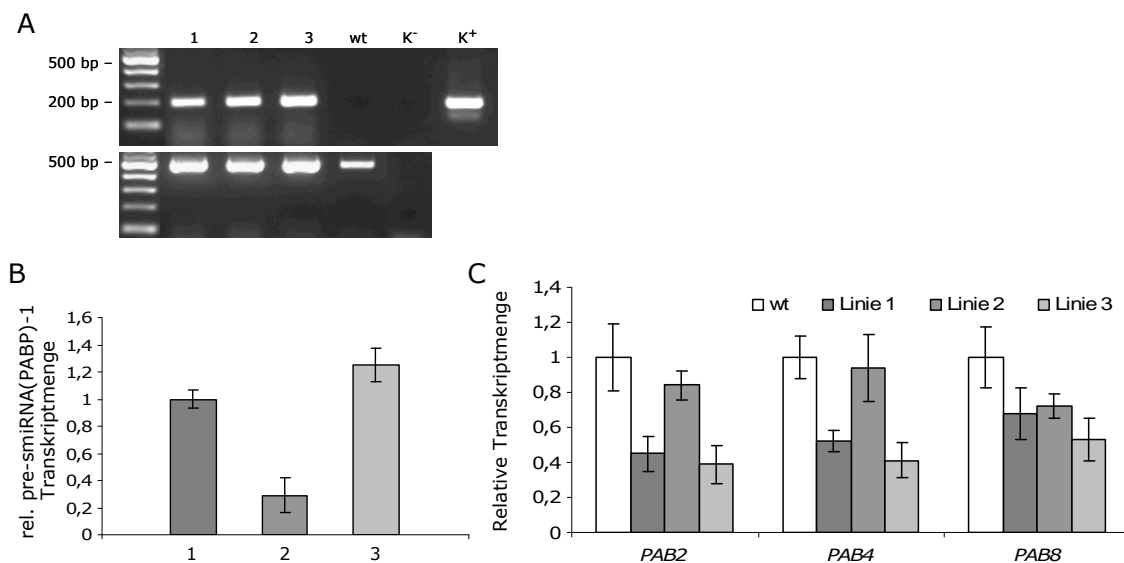
*In situ* Hybridisierungsexperimente wurden mit Fluoreszein markiertem Oligo(dT)<sub>45</sub> als Sonde zur Detektion von Poly(A)-RNA durchgeführt. Repräsentative Bilder, die mit konfokalem Laserscanning Mikroskop aufgenommen wurden, zeigen Ausschnitte aus Wurzelhaarzonen fünf bis sechs Tage alter Keimlinge. Fluoreszenz-Bilder sind in der linken, zugehörige Durchlichtmikroskopie-Bilder in der rechten Spalte dargestellt. (A, B) Wurzel eines Wildtyp-Keimlings; (C, D) Wurzel eines Wildtyp-Keimlings, der vor der Fixierung 45 min lang in Leptomycin B (LMB) inkubiert wurde; (E, F) transgener Keimling der Linie 2, der vor der Fixierung 45 min lang in 1,4 % EtOH inkubiert wurde; (G, H) transgener Keimling der gleichen Linie ohne vorherige LMB- oder EtOH-Inkubation.

### 3.4.3 Analyse pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierender Pflanzen

Die *PABPC*-Familienmitglieder *PAB2*, *PAB4* und *PAB8* sollten durch die entworfene smiRNA(PABP)-1 spezifisch erkannt und durch Spaltung ihrer Transkripte posttranskriptionell reguliert werden (vergl. Abschnitt 3.4.1). pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierende Pflanzen zeigten während der Anzucht unter Langtag- und Kurztagbedingungen keinerlei Auffälligkeiten in ihren Phänotypen im Vergleich zu Wildtyppflanzen.

Um zu überprüfen, ob der Grund dafür die fehlende Expression des Primärtranskriptes oder die ausbleibende Regulierung der Transkripte waren, wurden Expressionsstudien durchgeführt. Die Expression des *precursors* wurde mittels einfacher RT-PCR und qRT-PCR untersucht, und auch ein Teil der Zielgene wurde auf ihre Transkriptmenge hin im Vergleich zu Wildtyppflanzen analysiert. Drei pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierende Linien wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und Gesamt-RNA wurde für die erwähnten Experimente aus jungen Pflanzen (20 Tage alt) vorbereitet.

Durch die RT-PCR konnte in allen drei untersuchten Linien die Expression des *precursors* und damit des smiRNA(PABP)-1 Primärtranskriptes nachgewiesen werden (Abb. 3.35 A). Die qRT-PCR Experimente bestätigten die Expression und zeigten außerdem, dass die Expression in der dritten Linie am stärksten und in der zweiten am schwächsten war (Abb. 3.35 B). Übereinstimmend waren die *PABPC*-Transkripte in den Linien 1 und 3 am stärksten im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert, in Linie 2 fand sich für *PAB2* und *PAB4* nur eine geringe Veränderung in der Expressionsstärke (Abb. 3.35 C).



**Abb. 3.35: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(PABP)-1 und ihrer Zielgene**

(A) RT-PCR zum Nachweis der Expression des smiRNA(PABP)-1 *precursors* (oben) mit RNA aus drei pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierenden Linien (1, 2, 3) und aus Wildtyp-Pflanzen (wt) in jungen Rosettenblättern. Die Qualität der RNA bzw. cDNA wurde durch Amplifikation von ActinII überprüft (unten). K<sup>-</sup>: Kontroll-PCR ohne cDNA, K<sup>+</sup>: Kontroll-PCR mit pri-smiRNA(PABP)-1 DNA als *template*. (B) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des smiRNA(PABP)-1 *precursors* in den gleichen transgenen Linien mittels qRT-PCR mit RNA aus jungen Rosettenblättern. Werte wurden in Bezug zu Linie 1 normalisiert. (C) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge der smiRNA(PABP)-1 Zielgene *PAB2*, *PAB4* und *PAB8* in Rosettenblättern den transgenen Linien 1, 2 und 3 mittels qRT-PCR. Werte wurden in Bezug zum Wildtyp normalisiert.

#### 3.4.4 Analyse pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierender Pflanzen

Unter mehr als 30 transgenen Linien, die die pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimieren sollten, wurden drei Linien entdeckt, die Auffälligkeiten in ihren Phänotypen zeigten (Abb. 3.36). Diese smiRNA wurde entworfen, um die Transkripte von *PAB3*, *PAB4* und *PAB5* zu regulieren.

Die Blattränder dieser Pflanzen waren mehr oder weniger stark gezackt. Dies traf auf Rosetten- sowie auf Hochblätter zu (Abb. 3.36 B, C, D). Die Blätter erreichten aber die Größe von Blättern des Wildtyps, Hochblätter wirkten sogar etwas breiter. Am stärksten waren diese beschriebenen Blattphänotypen in Pflanzen der Linie 3 ausgeprägt. Hinzu kam, dass die Infloreszenzen der transgenen Linien 3 und 4 kürzer waren als die von Wildtyppflanzen (Abb. 3.36 A). Die Bildung der Infloreszenzen setzte zu gleichen Zeitpunkten ein und auch die Entwicklung von Schoten war nicht verzögert. Diese sowie Blüten zeigten in ihrem Erscheinungsbild keine Auffälligkeiten.

Auch in diesen transgenen Pflanzen wurden die Expression des *precursors* sowie eines Zielgens der smiRNA(PABP)-3cac analysiert. Zusätzlich wurde Pflanzenmaterial der Linie 1, die keinerlei Auffälligkeiten in ihren Phänotypen zeigte, in die molekularen Untersuchungen einbezogen.



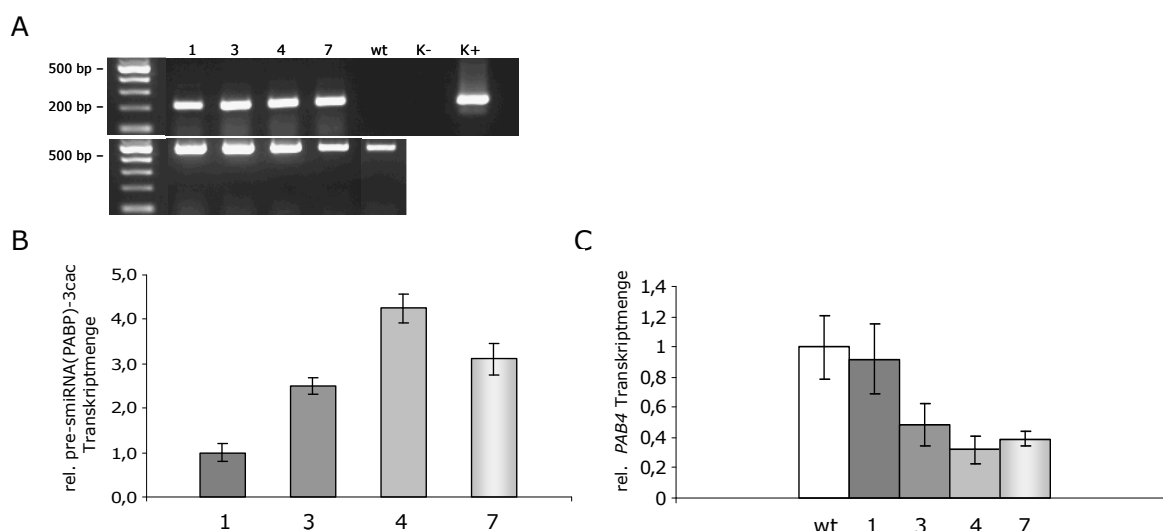
**Abb. 3.36: pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierende Pflanzen im Langtag**

(A) Repräsentative Aufnahme von Pflanzen, die zunächst 21 Tage lang unter Kurztagbedingungen und anschließend 33 Tage lang unter Langtagbedingungen angezogen wurden, links Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen, rechts Pflanzen der pri-smiRNA(PABP)-3cac Linie 3.

(B) Vergrößerter Ausschnitt, der die Rosettenblätter der in (A) gezeigten transgenen Pflanzen zeigt.

(C) Rosettenblätter und (D) Hochblätter von Wildtyppflanzen und den transgenen Linien 3, 4 und 7 (von links nach rechts) im Alter von 53 Tagen.

Eine RT-PCR (2.2.4.2) bestätigte die Expression des smiRNA(PABP)-3cac *precursors* in allen untersuchten Linien (Abb. 3.37 A). qRT-PCR Analysen (2.2.4.3) zeigten, dass seine relative Expression in Pflanzen der Linie 1 am geringsten und in Linie 4 am höchsten war (Abb. 3.37 B). Von den wahrscheinlichen Zielgenen konnte im Rahmen dieser Arbeit nur die relative Transkriptmenge von *PAB4* analysiert werden. Hier stellte sich heraus, dass *PAB4* Transkripte in den Linien 3, 4 und 7 deutlich reduziert waren, wobei der stärkste Effekt für Linie 4 dokumentiert wurde (Abb. 3.37 C). Aufgrund großer Abweichungen zwischen den einzelnen Proben, kann nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob *PAB4* in Linie 1 tatsächlich minimal herunterreguliert wird, oder ob seine Transkriptmenge der des Wildtyps entspricht.



**Abb. 3.37: Expressionsanalyse von pre-smiRNA(PABP)-3cac und dem Zielgen *PAB4***

(A) RT-PCR zum Nachweis der Expression des smiRNA(PABP)-3cac *precursors* (oben) mit RNA aus vier pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierenden Linien (1, 3, 4, 7) und aus Wildtyp-Pflanzen (wt) in jungen Rosettenblättern. Die Qualität der RNA bzw. cDNA wurde durch Amplifikation von ActinII überprüft (unten). K<sup>-</sup>: Kontroll-PCR ohne cDNA, K<sup>+</sup>: Kontroll-PCR mit pri-smiRNA(PABP)-3cac DNA als *template*.

(B) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des smiRNA(PABP)-3cac *precursors* in den gleichen transgenen Linien mittels qRT-PCR mit RNA aus jungen Rosettenblättern. Werte wurden in Bezug zu Linie 1 normalisiert. (C) Quantifizierung der relativen Transkriptmenge des smiRNA(PABP)-3cac Zielgens *PAB4* in Rosettenblättern der transgenen Linien 1, 3, 4 und 7 mittels qRT-PCR. Werte wurden in Bezug zum Wildtyp normalisiert.

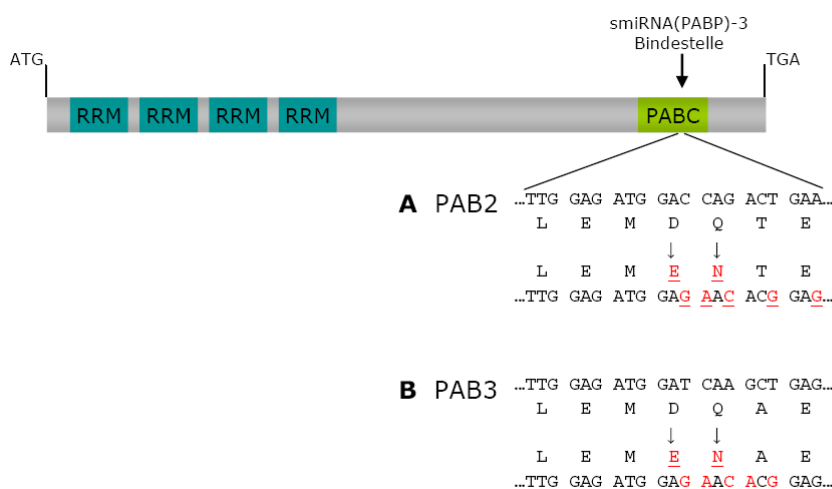
### 3.4.5 Komplementierung von pri-smiRNA(PABP)-3 Mutanten durch smiRNA-resistente *PABP*-cDNAs

Um zu testen, ob einzelne Mitglieder der *PABPC*-Unterklassen I (*PAB3* und *PAB5*) oder II (*PAB2*, *PAB4* und *PAB8*) fähig waren, den drastischen Phänotyp von pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen abzumildern oder gänzlich aufzuheben, sollten Komplementationen dieser Pflanzen mit *PABPC*-mRNAs mit smiRNA(PABP)-3 resistenten Bindestellen vorgenommen werden. Zu diesem Zweck mussten die Bindestellen so verändert werden, dass diese von der smiRNA(PABP)-3 nicht mehr als Zielsequenzen erkannt werden konnten. Um aber die Sequenzen und Eigenschaften der Proteine möglichst nicht oder nur minimal zu verändern, sollten stille Mutationen in die cDNAs eingefügt werden. Als Vertreter der jeweiligen Klasse wurden *PAB3* und *PAB2* ausgewählt.

Abbildung 3.38 verdeutlicht, an welchen Positionen innerhalb der *PAB2* und *PAB3* cDNAs Mutationen vorgenommen wurden. In beiden Fällen wurden jeweils zwei Basen ausgetauscht, die zu stillen Mutationen führten. Da dies aber nicht für die Generierung

resistenter Bindestellen ausreichte, mussten drei weitere Basenaustausche eingeführt werden, die allerdings zu Mutationen auf Proteinebene führten. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die ausgetauschten Aminosäuren möglichst die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie die ursprünglichen hatten. Und so wurden in beiden Fällen Asparaginsäure (D) gegen Glutaminsäure (E) und Glutamin (Q) gegen Asparagin (N) auf Proteinebene ausgetauscht. In den Hybridstrukturen mit der smiRNA(PABP)-3 entstanden so jeweils vier Fehlpaarungen im 5'-Bereich der smiRNA, so dass diese *PAB2* und *PAB3* nicht mehr als Zielgene erkennen würde.

Die zwei cDNAs mit den mutierten Bindestellen (*PAB2mBS* und *PAB3mBS*) wurden durch ortsgerichtete Mutagenese mittels *overlap extension*-PCR hergestellt und unter die Kontrolle des konstitutiven, zweifachen CaMV 35S-Promotors gestellt. Die Expressionskassetten wurden in den binären Vektor pFFL kloniert und dieser mittels *A. tumefaciens* in Arabidopsis Wildtyppflanzen sowie in homozygote pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen transformiert (Roxlau, 2009). Diese konnten im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr analysiert werden.



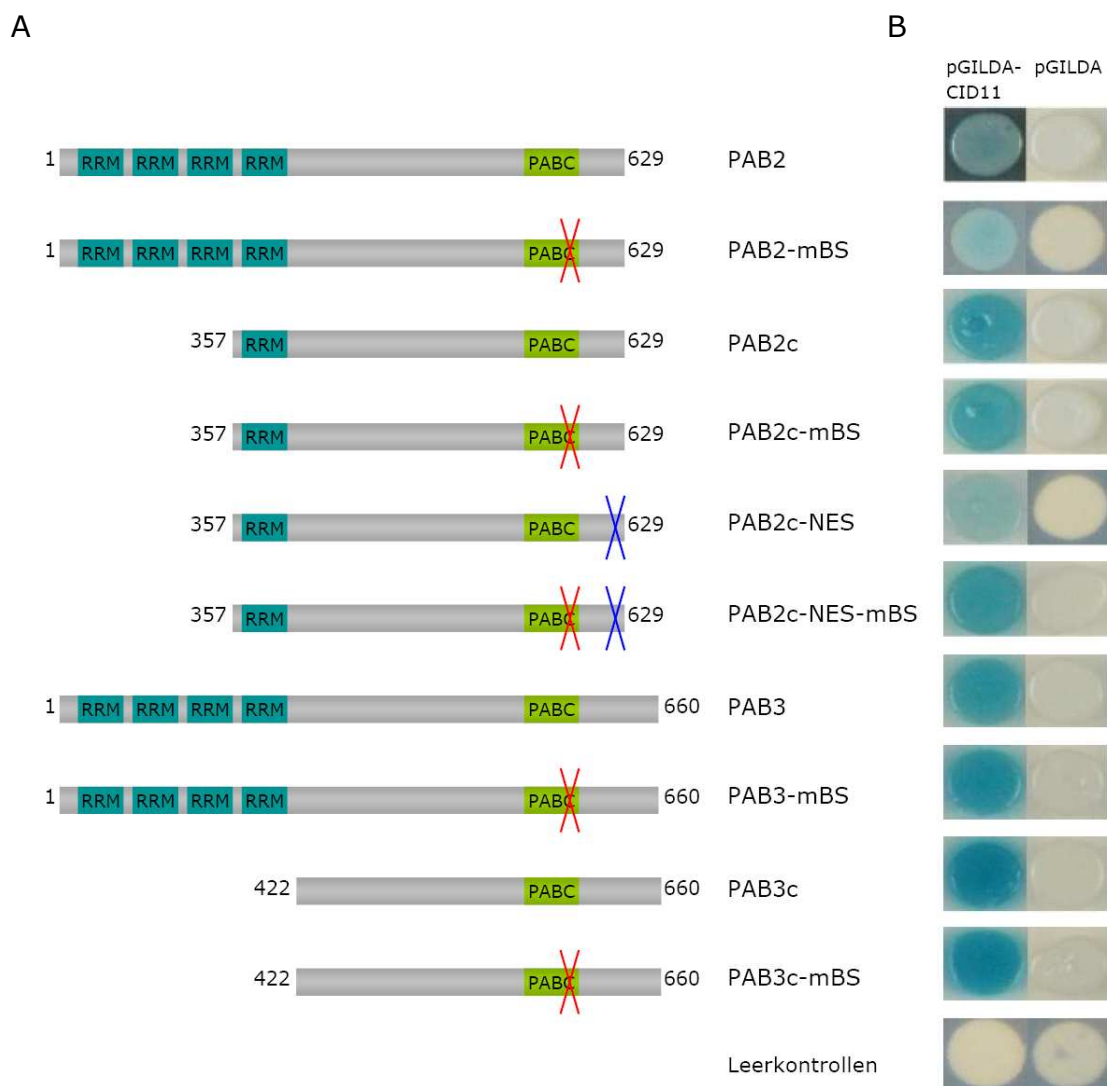
**Abb. 3.38: Mutationen der smiRNA(PABP)-3 Bindestellen in *PAB2* und *PAB3* cDNAs**

Die Bindestellen für smiRNA(PABP)-3 innerhalb der *PAB2* und *PAB3* cDNAs wurden mittels *overlap extension* PCR und spezifischer Oligonukleotide mutiert. Die in der PABC-Domäne befindlichen Bindestellen von *PAB2* (A) und *PAB3* (B) sind vergrößert auf DNA-Ebene dargestellt, ebenso werden die resultierenden Aminosäuresequenzen gezeigt. Pfeile deuten auf veränderte Aminosäuren und Nucleotide nach Mutation der Bindestellen (in rot dargestellt).



Um im Vorfeld von Pflanzenanalysen zu überprüfen, ob PAB2mBS und PAB3mBS auch mit zwei veränderten Aminosäuren in ihrer CTC-Domäne weiterhin funktional waren, wurden Interaktionstests zwischen diesen neu generierten Proteinen und dem bekannten PABPC-Interaktionspartner CID11 im *Yeast-Two-Hybrid* System (MATCHMAKER LexA System, Clontech) durchgeführt (2.2.9). So sollte getestet werden, ob die Interaktionen trotz der Aminosäureaustausche weiterhin bestanden und die Proteine diesbezüglich ihre Funktionen ausführen konnten. Die *PAB2mBS* und *PAB3mBS* cDNAs wurden in den Vektor pB42AD kloniert und mit pGILDA-CID11 in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] kotransformiert (2.2.10). Die bereits untersuchten Interaktionen zwischen CID11 und den Wildtyp PABPCs (T. Merkle, pers. Mitteilung) wurden zur Kontrolle im gleichen Experiment wiederholt. Auch verfügbare N-terminale Verkürzungen von PAB2 und PAB3 (PAB2c, PAB3c) wurden erneut auf ihre Interaktion mit CID11 im Vergleich zu den gleichen Konstrukten mit mutierten Bindestellensequenzen getestet. Des Weiteren stand für PAB2 eine N-terminale Verkürzung zur Verfügung, in der das NES-Signal mutiert war (PAB2c-NES).

In Abbildung 3.39 sind die Ergebnisse von allen durchgeführten Interaktionstests im *Yeast-Two-Hybrid* System zusammengefasst. Alle bereits untersuchten Interaktionen der PAB2 und PAB3 Wildtyp-Proteine, der N-terminalen Verkürzungen sowie der NES-Mutante im Fall von PAB2 mit CID11 wurden bestätigt (Abb. 3.40 B). Auch alle Varianten der mBS-Mutationen interagierten mit CID11, was durch die Blaufärbung der aufgetragenen Hefekolonien deutlich wurde.



**Abb. 3.39: Interaktionsanalyse von PAB2 und PAB3 smiRNA-Bindestellenmutanten mit CID11 im Y2H-System**

In (A) werden die Strukturen der getesteten PABPs veranschaulicht. Es wurden die Vollängen-Proteine und N-terminale Deletionen der Proteine sowie Versionen dieser Proteine mit mutierten smiRNA(PABP)-3 Bindestellen (mBS, rote Kreuze) auf Interaktion mit dem bereits bekannten Partner CID11 getestet. Im Fall von PAB2 wurde zusätzlich eine verkürzte NES-Mutante (*nuclear export signal*, blaue Kreuze) als solche und als Bindestellenmutante analysiert. In (B) sind die zugehörigen Ergebnisse der *Yeast-Two Hybrid* Analyse dargestellt. In der linken Spalte sind jeweils die eigentlichen Interaktionstests gezeigt, die rechte Spalte zeigt Kontrollen mit dem leeren p-Gilda Vektor. Die Interaktion der verschiedenen PABPs mit CID11 initiierte die Expression des lacZ-Reportergens, die entstandene  $\beta$ -Galaktosidase katalysierte die Spaltung des Substrates X-Gal, die zur Synthese des blauen Farbstoffs Indigo führte.

### 3.5. Weitere Anwendungen der verbesserten smiRNA-Technik

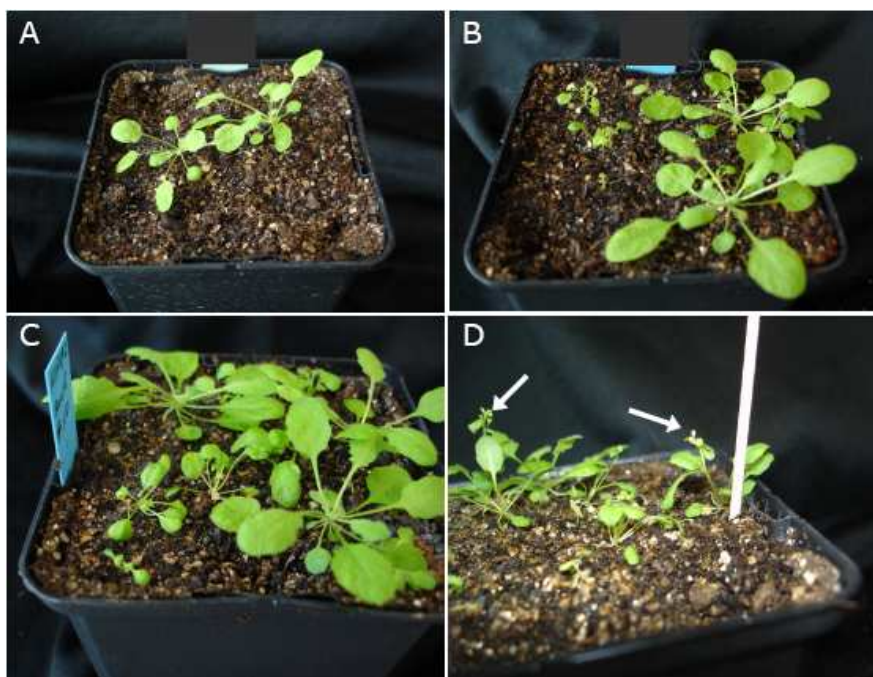
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere synthetische miRNAs entworfen. Diese sollten die Transkripte zweier Nukleoporine (NUPs) zum Ziel haben. Nukleoporine sind Hauptbestandteile von Kernporenkomplexen, die in eukaryotischen Zellen eine Verbindung zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma herstellen (Stoffler et al., 1999; Ryan und Went, 2000). Viele dieser Proteine kleiden den zentralen Transportkanal aus und sind direkt oder indirekt an der Translokation von Makromolekülen beteiligt.

Die zwei Gene, die spezifisch durch smiRNAs reguliert werden sollten, waren *NUP98* und *NUP192*. Über sie liegen in Arabidopsis bislang sehr wenige Erkenntnisse vor. In Hefe und Säugern sind die homologen Proteine zu NUP192 essentiell (Doye und Hurt, 1997; Fornerod et al., 1997) und üben unter anderen Funktionen im Poly(A)-RNA Export aus (Kosova et al., 1999). Drei verschiedene *nup192* T-DNA Insertionslinien wurden analysiert, doch konnten weder homozygote noch heterozygote Pflanzen identifiziert werden. Die zwei smiRNAs für *NUP98* und *NUP192* wurden, wie bereits detailliert anhand anderer Zielgene beschrieben (vergl. Abschnitt 3.1), mit Unterstützung des Programms *RNAhybrid* entworfen und mit unveränderten Parametern gegen das gesamte Arabidopsis Transkriptom getestet, um wahrscheinliche *off-targets* für diese smiRNAs zu identifizieren.

Die schließlich ausgewählten smiRNA(NUP192) und smiRNA(NUP98) hybridisierten perfekt mit ihren jeweiligen Bindestellen, was zu entsprechend geringen *mfe*-Werten um -44 kcal/mol führte. Wahrscheinliche *off-targets* wurden für diese smiRNAs nicht vorausgesagt.

Transgene Pflanzen, die die zwei unterschiedlichen smiRNAs exprimierten, wurden wie für die anderen Ansätze beschrieben generiert, doch konnten diese Pflanzen im Rahmen dieser Arbeit keiner molekularen Analyse mehr unterzogen werden. Einige Pflanzen der T2-Generationen zeigten jedoch drastische Phänotypen. Pflanzen, die die pri-smiRNA(NUP192) exprimierten, waren beispielsweise im Vergleich extrem kleiner als Wildtyppflanzen und in ihrem Wachstum verzögert. Einige Linien wiesen nur wenige Rosettenblätter auf, die lang gestreckt mit langen Blattstielen und zum Teil nach innen gewölbt waren. Andere Pflanzen erweckten den Eindruck, dass sie unter extremem Lichtstress standen, akkumulierten Anthocyane in den Blättern und dem Hypokotyl. Kurz darauf wurden die Blätter welk und viele Pflanzen starben. Nach etwa fünf bis sechs Wochen Wachstum im Kurztag bildeten sich in einigen Linien bereits erste Infloreszenzen (Abb. 3.40 D), während dies bei Pflanzen des Wildtyps noch nicht beobachtet werden konnte (Abb. 3.40 A). Die wenigen Blüten öffneten sich meist nicht, wurden stattdessen ebenfalls welk und kurz darauf starben auch diese Pflanzen. Schoten entwickelten sich meist nicht. Nur für eine Linie, die solch einen extremen Phänotyp zeigte, konnten einige wenige Samen geerntet werden. Ein sehr ähnliches Bild ergab sich für pri-smiRNA(NUP98) exprimierende Pflanzen. In nächsten Schritten sollten

die Expression der pri-smiRNAs sowie ihre Prozessierung zu reifen smiRNAs nachgewiesen werden. Auch die Validierung ihrer Zielgene und deren Expressionsanalysen sollten zunächst die Funktionalität der Ansätze bestätigen.



**Abb. 3.40: Sieben Wochen alte pri-smiRNA(NUP192) exprimierende Pflanzen im Kurztag**

pri-smiRNA(NUP192) exprimierende Pflanzen wurden 45 Tage lang in einer Lichtkammer unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit) angezogen. (A) zeigt Wildtyppflanzen gleichen Alters zum Vergleich, in (B-D) sind Aufnahmen von transgenen Pflanzen der Linie 4, Linie 10 und Linie 19 dargestellt. Die transgenen Linien wurden keiner BASTA-Selektion ausgesetzt, weshalb sie teilweise zusammen mit Wildtyppflanzen in einem Topf wuchsen. Pfeile deuten auf Infloreszenzen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Neue Techniken zur Regulierung der Genexpression in Pflanzen

Mutationen, die zum Verlust der Funktion eines betroffenen Gens führen (*loss-of-function* Mutationen) sind nicht nur in der Pflanzenforschung wichtige Werkzeuge für die Analyse von Genfunktionen geworden, denn der Phänotyp einer Mutante kann Aufschluss darüber geben, in welche biologischen Prozesse ein Gen involviert ist. Weit verbreitete und erfolgreiche Methoden, die die Generierung solcher *knockout* Mutanten erlauben, sind in der Pflanzenforschung die EMS- (Ethylmethansulfonat; Segal 1984) und die T-DNA Mutagenese (Krysan et al., 1999). In letzterem Fall wird an zufälliger Stelle im Genom der Pflanze eine bakterielle T-DNA mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* inseriert, die dabei möglicherweise ein pflanzliches Gen von Interesse zerstört. Verschiedene solcher Populationen wurden generiert und der Wissenschaft für mittlerweile routinemäßige, funktionelle Analysen zugänglich gemacht. Häufig liegen die Insertionen allerdings in 5'- oder 3'-untranslatierten Regionen, und für einen großen Teil von Genen, insbesondere sehr kleinen Genen, konnten bislang keine T-DNA Insertionen ausfindig gemacht werden (Alonso et al., 2003). Weiterhin stößt diese Strategie an ihre Grenzen, wenn das zu untersuchende Gen einer Multigenfamilie angehört und auf aufwendige Weise Mehrfachmutanten hergestellt werden müssen, oder wenn die resultierende Mutation letal ist (Stitt und Sonnwald, 1995).

In den letzten Jahren konnten erfolgreich einige RNA-basierte Ansätze etabliert werden, die die Nachteile der *knockout*-Technik zum Teil umgehen können (zusammengefasst in Gutierrez-Nava et al., 2008 und Ossowski et al., 2008; siehe 1.1.5). Auch siRNAs wurden erfolgreich eingesetzt, um pflanzliche Gene mit hoher Effektivität zu regulieren (Wesley et al., 2001; siehe 1.1.1). Relativ bald wurde aber klar, dass durch siRNAs zwar starke *silencing* Effekte zu erzielen waren, allerdings waren meist nicht nur die gewünschten Gene von der siRNA-vermittelten Regulierung betroffen (Jackson et al., 2003). Viele ungewollte Gene, so genannte *off-targets* wurden gleichzeitig herunterreguliert, wenn sie perfekte oder annähernd perfekte Komplementarität zu den vielen, aus einem langen *precursor* generierten siRNAs zeigten (Birmingham et al., 2006). Die Spezifität dieser vielen siRNAs ist nur schwer kalkulierbar oder steuerbar. Als vorteilhaft erwies sich allerdings, dass induzierbare oder gewebespezifische Promotoren eingesetzt werden konnten und der Effekt außerdem vererbbar war.

Künstliche oder synthetische microRNAs (amiRNAs oder smiRNAs) eröffneten eine weitere Möglichkeit zur gezielten Genregulierung. microRNAs regulieren ihre Zielgene auf ähnliche Weise wie siRNAs, allerdings wird jeweils nur eine miRNA aus einer definierten, endogenen Haarnadelstruktur prozessiert. Diese Primärtranskripte können ausgenutzt werden, um aus ihnen künstliche miRNAs von spezifischer Sequenz für ein Zielgen prozessieren zu lassen. Nur die miRNA und die dazu komplementäre miRNA\* Sequenzen werden dabei gegen die gewünschten Sequenzen ausgetauscht, ohne dabei strukturelle Merkmale des miRNA:miRNA\* Hybrids oder der gesamten Sekundärstruktur zu verändern (Zeng et al., 2002; Parizotto et al., 2004; Alvarez et al., 2006; Schwab et al., 2006). Da für ein Zielgen jeweils nur eine smiRNA entworfen und generiert werden muss, ist deren Spezifität besser planbar und vorhersagbar. Eine Voraussetzung für die möglichst hohe Spezifität einer smiRNA ist allerdings, dass die Charakteristika endogener miRNAs im Organismus von Interesse gut verstanden sind und in das Design von smiRNAs einbezogen werden. Während nämlich miRNAs in Pflanzen oft hohe Komplementarität zu den Bindestellen ihrer Zielsequenzen zeigen, ist dies in Tieren meist weniger stark ausgeprägt. Schwab et al. (2005) formulierten einige Regeln, die die Bindung zwischen einer miRNA und ihrer Zielsequenz beschreiben. Demnach liegen keine Fehlpaarungen (*mismatches*) im Bereich der wahrscheinlichen miRNA-vermittelten Spaltungsposition der mRNA, nicht mehr als eine Fehlpaarung im Bereich von Position zwei bis zwölf und nicht mehr als zwei aufeinanderfolgende Fehlpaarungen nach Position zwölf (ausgehend vom 5'-Ende der miRNA). Außerdem soll die minimale freie Energie (*mfe*) des miRNA:target Hybrids gleich oder geringer als -30 kcal/mol sein und mindestens 72 % des perfekt gepaarten Hybrids ausmachen (Schwab et al., 2005). Die Autoren schlugen vor, dass gleiches für künstliche miRNAs und ihre Zielgene gelten sollte.

Da die smiRNA-Technologie noch relativ neu ist und verhältnismäßig wenige Studien vorliegen, ist bislang schwer einzuschätzen, ob sie generell effektiver als siRNA-Ansätze ist. Einige Publikationen berichten von einer Reduzierung der Zielgentranskripte um bis zu 90 % (Alvarez et al., 2006; Niu et al., 2006; Schwab et al., 2006; Qu et al., 2007). Qu et al. (2007) zeigten an einem Beispiel, dass smiRNAs effektiver als *hairpin* RNAi (hpRNAi) sein können.

#### 4.1.1 Design synthetischer microRNAs mit Hilfe von *RNAhybrid*

In dieser Arbeit wurde das miRNA *target* Vorhersageprogramm *RNAhybrid* (Rehmsmeier et al., 2004) genutzt, um das Design von smiRNAs durch hochsensitive Vorhersage von *off-targets* zu optimieren. *RNAhybrid* sucht nach den energetisch günstigsten Hybridisierungen zwischen einer kurzen und einer langen RNA-Sequenz. G:U-Paarungen werden hier, anders als in anderen Ansätzen, nicht als Fehlpaarungen gewertet, wobei sie jedoch auch nicht als vollwertiger Ersatz für ein Watson-Crick Basenpaar (A:U und

G:C) zählen. Wenn miRNA:target Hybridstrukturen berechnet werden, haben perfekt gepaarte Strukturen niedrigere *mfe*-Werte als solche, in denen eine oder mehrere G:U-Paarungen vorkommen. Der Grund hierfür ist die Destabilisierung der Hybridstruktur durch G:U-Paarungen. Des Weiteren kann der Nutzer verschiedene Parameter festlegen, die die Vorhersage auf seine Bedürfnisse anpassen. So wurde *RNAhybrid* erfolgreich für die Zielgen-Vorhersage in *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* und *A. gambiae* (Rehmsmeier et al., 2004), aber auch für die Prognose von miRNA-Zielgenen in Pflanzen eingesetzt. In Alves-Junior et al. (2009) wurden mit *RNAhybrid* mehr als 600 neue putative Zielgene für die in Arabidopsis identifizierten miRNAs vorausgesagt, von denen einige experimentell bestätigt wurden. Weiterhin wurden auf diese Weise auch mögliche Zielgene von miRNAs in zwölf anderen Pflanzenspezies wie *Brassica napus*, *Oryza sativa* oder *Zea mays* vorhergesagt und in einer Datenbank veröffentlicht (Alves-Junior et al., 2009; [http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/rnahybrid\\_tdb\\_mirnas.cgi](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/rnahybrid_tdb_mirnas.cgi)).

Um das Design synthetischer microRNAs in dieser Arbeit zu unterstützen und mögliche *off-targets* zu minimieren oder sogar auszuschließen, wurden in der Vorhersage für smiRNA-Kandidaten mit *RNAhybrid* folgende Parameter gewählt: Ausgeschlossen wurden solche Hybridstrukturen zwischen dem smiRNA-Kandidaten und einem Zielgen, in denen Fehlpaarungen mit einer Größe von mehr als zwei aufeinander folgenden Nukleotiden vorkamen und solche, in denen ein *bulge* (einzelne ungepaarte Nukleotide auf einer Seite des Hybrids) mit einer Größe von mehr als einem Nukleotid gebildet wurden. Als Filter wurde des Weiteren ein *mfe*-Grenzwert von -25 kcal/mol eingesetzt, so dass Hybride mit einem höheren *mfe* unter den Ergebnissen nicht als Treffer aufgeführt wurden, um die zu analysierende Datenmenge zu reduzieren. Die Suchparameter waren also etwas gelockert im Vergleich zu den von Schwab et al. (2005) vorgeschlagenen. Strukturelle Voraussetzungen des miRNA:target Hybrids wie der Ausschluss der mutmaßlichen Spaltungsstelle im Bereich der Nukleotide zehn und elf der smiRNA wurden in die Vorhersage nicht einbezogen, obwohl dies auch in diesem Ansatz als absolut entscheidungsrelevant betrachtet wurde. Stattdessen wurden die Ergebnisse jeder *RNAhybrid* Vorhersage einer visuellen Überprüfung auf dieses Ausschlusskriterium unterzogen.

smiRNA-Kandidaten wurden so entworfen, dass die entsprechenden Bindestellen in den Zielgenen nicht am Rande der kodierenden Sequenzen lagen. Außerdem wurde auf eine ausgewogene Zusammensetzung der Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uridin (U) innerhalb der smiRNA-Kandidatensequenzen geachtet. smiRNA-Kandidaten wurden gegen das gesamte *Arabidopsis thaliana* Transkriptom (TAIR6\_cds\_20060907) getestet. Wenn sehr wahrscheinliche *off-targets* auftraten, wurden die smiRNA-Sequenzen um ein oder mehr Nukleotide entlang der Zielsequenz in 5'- oder 3'-Richtung verschoben und erneut getestet. Zusätzlich konnten aus dem gleichen Grund auch einzelne Basen ausgetauscht werden, so dass die Hybridisierung zum gewünschten Zielgen strukturell nicht verändert wurde, sich aber die Strukturen für *off-targets* im Sinne der beschriebenen Kriterien verschlechterten. Insbesondere, wenn eine smiRNA

zum simultanen *knockdown* mehrerer Zielgene entworfen werden soll, ist diese Art der „Feinabstimmung“ von großer Bedeutung, da man häufig auf eine oder wenige Regionen beschränkt ist, in denen möglichst hohe Übereinstimmung zwischen den Zielgensequenzen herrscht.

Andere Bedingungen wie die, die von Ossowski et al. (2008) vorgeschlagen wurden, wie ein Uridin am 5'-Ende der miRNA, ein Adenin oder Uridin an Position zehn und ein höherer AU-Gehalt am 5'-Ende der miRNA wurden nicht in die Vorhersage einbezogen, da sie die Möglichkeiten beim smiRNA-Design, insbesondere für Genfamilien oder nahe verwandte Gene reduzieren. Außerdem sind die von Ossowski et al. (2008) beschriebenen Charakteristika zwar in Arabidopsis miRNAs überrepräsentiert, kommen aber bei weitem nicht in allen natürlichen miRNAs vor.

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde zunächst gezeigt, dass die Biogenese einer miRNA nicht negativ beeinflusst wird, wenn einige Nukleotide in ihrer Sequenz ausgetauscht werden (Vaucheret et al., 2004). Kurz darauf wurde bestätigt, dass auch die Prozessierung einer neu inserierten gesamten miRNA-Sequenz noch gewährleistet ist, solange sich die Gesamtstruktur des Primärtranskriptes, insbesondere des *precursors* nicht verändert (Zeng et al., 2002; Vaucheret et al., 2004; Niu et al., 2006). Dies bildet die Grundlage für die erfolgreiche Expression und Prozessierung künstlicher miRNAs (Parizotto et al., 2004). Bislang wurden für die Expression von smiRNAs in Arabidopsis Primärtranskripte von *MIR159a*, *MIR169c*, *MIR169d*, *MIR171*, *MIR172a* und *MIR319a* verwendet (Parizotto et al., 2004; Niu et al., 2006; Schwab et al., 2006; Liu et al., 2010). In diesem Ansatz wurde das etwa 470 bp lange Primärtranskript von *MIR159a* eingesetzt. Dieses ist ein sehr gut charakterisiertes Gen, das hohe Mengen reifer miRNAs produziert (Reinhart et al., 2002). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass miRNA159a unter Verwendung des eigenen Primärtranskriptes in At7-Protoplasten überexprimiert werden kann (Niemeier, 2006).

Die Sekundärstruktur von pri-miRNA159a wurde mit Hilfe von *RNAfold* bestimmt (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>; Mathews et al., 1999) und mit jeder konstruierten pri-smiRNA verglichen. Weil der miRNA159a *precursor* durch viele sehr gut gepaarte Regionen sehr stabil ist und der inserierte smiRNA:smiRNA\* Bereich dem Original nachempfunden wurde, waren Veränderungen in der Sekundärstruktur nicht zu erwarten. Die Fehlpaarung von der Größe von zwei Nukleotiden zwischen miRNA159a und ihrer komplementären Sequenz, der miRNA159a\*, im 5'-Bereich der miRNA wurde auch in künstlichen pri-miRNA Konstrukten an der gleichen Position nachgebildet, so dass es auch in diesem Bereich zu keiner Veränderung der Sekundärstruktur kam. Solche Fehlpaarungen verleihen miRNA:miRNA\* Hybridstrukturen Instabilität in Richtung des 5'-Endes der miRNA. Dies ist ein wichtiges Kriterium für die bevorzugte Auswahl der miRNA gegenüber der miRNA\* für den Einbau in RISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Tatsächlich änderten sich laut Berechnung mit *RNAfold* in keinem der Fälle die Sekundärstrukturen der *in silico* entworfenen pri-smiRNA



Kandidaten im Vergleich zur pri-miRNA159a. Die verschiedenen pri-smiRNAs wurden unter die Kontrolle des starken, konstitutiven Promotors 35S aus Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV) gestellt, um eine höchstmögliche Expression der pri-smiRNA und damit einen starken *silencing*-Effekt zu erzielen.

#### 4.1.2 Optimierte Klonierungsstrategie für pri-smiRNAs

Die Generierung synthetischer miRNAs basierte in dieser Arbeit wie zuvor beschrieben auf dem Primärtranskript von *MIR159a*. Zusätzlich wurde ein Vektor auf Grundlage des gleichen Primärtranskriptes entworfen, der die Klonierung von pri-smiRNAs vereinfachen und beschleunigen sollte (vergl. Abschnitt 3.2). Dieser Vektor sollte es ermöglichen, die gewünschten smiRNA- und smiRNA\*-Sequenzen gleichzeitig in nur einem Klonierungsschritt zu inserieren, was mit der als konventionell bezeichneten Methode zwei komplette, aufeinander folgende Klonierungsexperimente und den Einsatz von insgesamt vier smiRNA-spezifischen Oligonukleotiden sowie zweier Vektor-spezifischer Oligonukleotide erfordert (Niu et al., 2006; Schwab et al., 2006; Warthmann et al., 2008).

Für die vereinfachte Klonierung von pri-smiRNAs wurden zwei neue Restriktionsschnittstellen in die cDNA der pri-miRNA159a eingefügt, um ein Einschnitt-Klonierungsverfahren zu ermöglichen, in dem nur zwei spezifische Oligonukleotide für die Insertion neuer Sequenzen benötigt werden (vergleiche Abb. 3.9). Wie bereits erläutert, galt bisher die Ansicht, dass die Struktur eines Primärtranskriptes nicht verändert werden sollte (Parizotto et al., 2004), um die richtige Prozessierung einer miRNA oder smiRNA zu gewährleisten. Insbesondere sei laut Vaucheret et al. (2004) der Bereich der *precursor*-Struktur von großer Wichtigkeit. Nach Überprüfung der Faltung des Primärtranskriptes mit verschiedenen inserierten Kombinationen von Restriktionsschnittstellen, wurden NheI und BsrGI für die Generierung des so genannten „easy cloning“ Vektors (ECV) ausgewählt, da diese eine Sekundärstruktur des Primärtranskriptes hervorbrachten, die nur minimal von der originalen *MIR159a* Sekundärstruktur abwich. Es kam zur Ausformung einer kleinen zusätzlichen Schleife (*loop*) im Bereich der neuen Schnittstellen, die die Gesamtstruktur des Transkriptes allerdings nicht dramatisch veränderte (vergleiche Abb. 3.10). Die zwei Schnittstellen waren nahe des 5'-Bereichs der miRNA159a\*-Sequenz und nahe des 3'-Bereichs der miRNA159a *in silico* in die cDNA des Primärtranskriptes unter Einbezug vorhandener Nukleotide inseriert worden, so dass sie den *precursor* von *MIR159a* flankierten. Ob sich der Vektor trotz der leichten Veränderungen in der Sekundärstruktur tatsächlich für die Expression von künstlichen miRNAs eignete, wurde zunächst mit einer smiRNA getestet, die die Transkripte des *Chalkonsynthase*-Gens (*CHS*) regulieren sollte.

#### 4.1.3 *knockdown* des *Chalkonsynthase*-Gens und Validierung des smiRNA „easy cloning“ Vektors

Um die Wirksamkeit des *RNAhybrid* basierten Ansatzes für die Vorhersage möglicher smiRNA *off-targets* und die Funktionalität des „easy cloning“ Vektors zu überprüfen, wurde eine smiRNA entworfen, die das Arabidopsis *Chalkonsynthase*-Gen (*CHS*, At5g13930) zum Ziel hatte.

Der leicht zu detektierende Phänotyp der *knockout* und vermutlich auch der *knockdown* Mutationen dieses Gens war ein Grund, weswegen die *CHS* als Zielgen in dieser Arbeit für eine spezifisch entworfene smiRNA ausgewählt wurde. Nicht nur die Identifizierung transgener Pflanzen anhand der Samenschalenfarben, sondern auch die Möglichkeit, diese Pflanzen im Hinblick auf akkumulierende Sekundärmetabolite hin zu untersuchen und diese zu quantifizieren (Rabino und Mancinelli, 1986) sollten ausgenutzt werden. Weiterhin bot die *CHS* den Vorteil, dass sie, bezogen auf den haploiden Chromosomensatz, durch nur ein Gen kodiert wird (Burbulis et al., 1996), so dass auf einfache Weise eine sehr spezifische smiRNA entworfen werden konnte, da nicht auf Unterschiede zwischen Bindestellen mehrerer möglicher Zielgene geachtet werden musste. Da für die *CHS* in Arabidopsis keine nahe verwandten Gene existieren, die den Funktionsverlust ausgleichen könnten, war mit einem eindeutigen Ergebnis für den *knockdown* der *CHS* zu rechnen.

Nachdem verschiedene smiRNA-Kandidaten für die *CHS* mit *RNAhybrid* auf mögliche *off-targets* im gesamten Arabidopsis Transkriptom getestet worden waren, fiel die endgültige Wahl schließlich auf einen smiRNA-Kandidaten, der perfekt mit der Bindestelle hybridisierte. Kriterien wie ein ausgewogener GC-Gehalt und ein geringer *mfe*-Wert unter -30 kcal/mol für das miRNA:*target* Hybrid trafen für diesen Kandidaten mit einem *mfe*-Wert von -44 kcal/mol ebenso zu.

Das vorhergesagte *off-target*, ein Gen für eine putative Oxidoreduktase der Fe(II)-Oxygenase Familie (At1g49390), bildet mit der smiRNA(*CHS*) eine Hybridstruktur aus, die die Anforderungen einer wahren miRNA:*target* Struktur im Sinne der oben formulierten Parameter erfüllt. Dieses putative *off-target* für die smiRNA(*CHS*) wurde toleriert und sollte auch genutzt werden, um die Zuverlässigkeit von *RNAhybrid* und seiner Vorhersagen zu überprüfen. Andere getestete Kandidaten hatten entweder mehrere viel versprechende *off-targets*, oder der *mfe*-Wert der miRNA:*target* Hybridstruktur war im Vergleich zu anderen Kandidaten hoch, so dass diese Kandidaten verworfen wurden.

In allen untersuchten transgenen Arabidopsis Linien, die die smiRNA(*CHS*) entweder durch das originale *MIR159a* Primärtranskript oder den „easy cloning“ Vektor Ansatz exprimierten, konnte der Effekt der smiRNA(*CHS*) auf die Expression der *CHS* beobachtet werden. Einige Linien, in denen eine starke Expression des *precursors*

nachgewiesen wurde, zeigten besonders starke Effekte auf molekularer und phänotypischer Ebene.

In einem *small RNA Northern Blot* mit RNA aus transgenem Pflanzenmaterial und transfizierten Protoplasten wurden zwei kleine RNAs mit der smiRNA(CHS) spezifischen Sonde detektiert, eine mit der Größe von 21 nt, die andere bestand aus 22 oder 23 nt (Abb. 3.2). Ähnliches wurde jedoch auch von Park et al. (2005) für die endogene miRNA156a beobachtet. Sie wurde in *Northern Blot* Experimenten als 20 nt, so wie sie vorhergesagt wurde, sowie als 21 nt große RNA nachgewiesen, so dass anzunehmen ist, dass dieses Phänomen auch bei der Prozessierung natürlicher miRNAs mitunter vorkommt. Die zwei in einem RLM-5'RACE Experiment ermittelten Spaltungspositionen innerhalb der *CHS* mRNA könnten die Folge dieser zwei smiRNA(CHS) von unterschiedlicher Größe sein (Abb. 3.3). Da die miRNA159a als nur eine 21 nt lange RNA prozessiert wird (Reinhart et al., 2002; Niemeier, 2006), sind wahrscheinlich die Änderungen in der Sequenz für die Prozessierung von zwei unterschiedlich großen smiRNAs verantwortlich.

Quantitative RT-PCR Analysen zeigten, dass die *CHS* Transkriptmenge in den untersuchten Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen reduziert war (Abb. 3.7). In der stärksten smiRNA(CHS) exprimierenden Linie wurde eine Reduktion der *CHS* Transkripte um 87 % beobachtet. Das Ausmaß der *CHS* mRNA Verringerung korrelierte dabei negativ mit der Expression des smiRNA(CHS) *precursors*. Ebenso korrelierten die Stärke der phänotypischen Ausprägung gemessen an der beobachteten Samenfarbe und dem Anthocyanengehalt (Abb. 3.4 und 3.6) und die Stärke der im *small RNA Northern Blot* detektierten Signale mit den gemessenen *CHS* Transkriptmengen in der qRT-PCR. Die phänotypische Variation zwischen den smiRNA(CHS) exprimierenden Linien bewegte sich von ähnlich zum Wildtyp bis hin zu den Merkmalen, die in *tt4*-Pflanzen dokumentiert werden. Diese Variationen wurden auch in anderen Studien registriert (Schwab et al., 2006) und können durchaus von Vorteil sein, wenn essentielle Gene mit der smiRNA-Technik angesprochen werden sollen.

Transgene Linien, die die smiRNA(CHS) aus dem ECV exprimierten, ergaben sehr ähnliche Ergebnisse wie die, die mit dem originalen *MIR159a* Primärtranskript erhalten wurden. Der Anthocyanengehalt war in drei Linien ähnlich gering wie in den stärksten analysierten smiRNA(CHS) Linien, die nach der Standardmethode generiert worden waren (3.12), und auch die Samen dieser transgenen Linien zeigten eine ähnliche Gelbfärbung wie *tt4*-Samen (3.11). Die unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen sind vermutlich wiederum auf eine unterschiedlich starke Expression der pri-smiRNA(CHS)-ECV zurückzuführen. Da in beiden Strategien die gleiche smiRNA-Sequenz kloniert wurde, zeigen diese Ergebnisse, dass der ECV-Ansatz mit gleicher Effektivität wie der Standard-Ansatz zum *knockdown* eines Zielgens in transgenen Arabidopsis Linien genutzt werden kann. Ein *small RNA Northern Blot* Experiment wurde für smiRNA(CHS)-ECV exprimierende Pflanzen nicht durchgeführt, es wäre aber von

großem Interesse herauszufinden, ob auch hier zwei unterschiedlich große RNA-Klassen prozessiert werden.

Brodersen et al. (2008) zeigten, dass nicht wie zuvor angenommen nur die Spaltung von miRNA-Zielgenen zum *gene silencing* in Pflanzen führt, sondern dass gleichzeitig auch die Repression der Translation möglicherweise kontinuierlich zur Regulierung der Zielgene beiträgt. Ob der Mechanismus der translationalen Repression auch zur Regulierung der *CHS* in diesem Ansatz beiträgt, wurde nicht untersucht. Auszuschließen ist dies allerdings nicht. Die Identifizierung von *CHS* mRNA-Spaltungsprodukten sowie die detektierte Reduzierung der Transkripte zeigen aber, dass die Spaltung der mRNA für die smiRNA-vermittelte Regulierung der *CHS* eine entscheidende Rolle spielt.

Die Vermeidung oder zumindest die Minimierung von *off-targets* ist von äußerster Bedeutung für die Spezifität von smiRNA-Ansätzen. Die relativen Transkriptmengen des vorhergesagten smiRNA(*CHS*) *off-targets*, einer putativen Oxidoreduktase der Fe(II)-Oxygenase, waren tatsächlich im Vergleich zu Wildtyppflanzen herunterreguliert, was durch qRT-PCR Analysen gezeigt wurde (Abb. 3.8). Die Ergebnisse bestätigten At1g49390 als echtes *off-target* für die entworfene smiRNA(*CHS*). Die Reduzierung der Transkriptmengen war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie die von *CHS*-Transkripten. Andere von *RNAhybrid* vorhergesagte *off-targets* wurden nicht experimentell untersucht, weil ihre Hybridstrukturen mit der smiRNA(*CHS*) zu viele Fehlpaarungen, ungepaarte Nukleotide und/oder lange ungepaarte Überhänge aufwiesen, um effektiv durch die smiRNA(*CHS*) reguliert zu werden (siehe 7.2.1).

Das validierte *off-target* At1g49390 wurde nicht durch andere Programme detektiert, die weithin für die Vorhersage von smiRNA-*targets* genutzt werden (Ossowski et al., 2008). Diese Programme sagten auch keine weiteren sehr wahrscheinlichen *off-targets* für die smiRNA(*CHS*) vorher. Dies bestätigt die hohe Leistungsfähigkeit von *RNAhybrid* als unterstützendes Werkzeug für die Generierung von smiRNAs und die Vorhersage potentieller *off-targets*.

#### 4.1.4 Auswirkungen von Fehlpaarungen und G:U-Paarungen in miRNA:*target* Hybridstrukturen

Die Integrierung von Fehlpaarungen und/oder G:U-Paarungen in die miRNA:*target* Hybridstruktur stellen einen Weg dar, um die Spezifität von smiRNAs für ihr Zielgen zu vergrößern, indem die Bindung an *off-targets* verschlechtert oder ausgeschlossen wird. Gleichzeitig spielt dies eine wichtige Rolle beim Design von smiRNAs, wenn die smiRNA-Technik für Genfamilien oder Gene, für die Paraloge mit hoher Sequenzidentität vorhanden sind, angewandt werden soll. Hier ist die Frage, wie viele G:U- oder Fehlpaarungen in einer Hybridstruktur toleriert werden können, damit letztlich alle gewünschten Zielgene in die smiRNA-vermittelte Regulierung eingebunden werden

können. Obwohl die Rolle von miRNAs und ihre biologische Relevanz in den letzten Jahren untermauert werden konnten, sind die genauen Anforderungen für ein funktionales miRNA:*target* Hybrid nicht bis ins Detail geklärt.

Brennecke et al. (2005) untersuchten systematisch die (minimalen) Bedingungen für eine funktionale miRNA:*target* Hybridstruktur in *D. melanogaster* und gliederten miRNA-Bindestellen aufgrund der Ergebnisse in verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften. Grob vereinfacht gibt es demzufolge so bezeichnete 5'-dominante Bindestellen, die ausreichende Komplementarität zum 5'-Ende der miRNA zeigen und deren anderes Ende kaum oder gar nicht mit dem 3'-Ende der miRNA gepaart sein muss, um zur Regulation des Zielgens zu führen. Die zweite große Gruppe wurde unter dem Begriff 3'-kompensierende Bindestellen zusammengefasst. In diesem Fall ist das 5'-Ende der miRNA nur unzureichend mit der Bindestelle gepaart, und es bedarf einer sehr ausgeprägten Paarung des 3'-Endes, um die Regulation des Zielgens zu vermitteln. Die Arbeitsgruppe überprüfte dabei sehr detailliert, welchen Einfluss integrierte Fehlpaarungen an einzelnen Positionen im 5'-Bereich der miRNA auf die Effektivität der Regulierung (im Fall von *D. melanogaster* vermutlich überwiegend Repression der Translation) hatten. Brennecke et al. (2005) untersuchten auch den Einfluss von inserierten G:U-Paarungen auf die Regulierung des Zielgens und stellten fest, dass bereits ein solches Paar im 5'-Bereich der miRNA zu einer drastischen Verringerung der Effektivität führte, insbesondere, wenn dies mit einer oder mehreren Fehlpaarungen in der Hybridstruktur einherging. Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich jedoch nicht ohne Weiteres auf die Eigenschaften von miRNA:*target* Hybridstrukturen in Pflanzen übertragen, da miRNAs aus Tieren generell schwächere Komplementarität zur Bindestelle zeigen und dies normalerweise zur Repression der Translation statt zur Spaltung der Ziel-mRNA führt (Lewis et al., 2003).

Um diese Fragestellung in Pflanzen näher zu beleuchten und damit ein effizienteres Design von smiRNAs zu ermöglichen, wurden vier verschiedene Varianten der smiRNA(CHS) erstellt (vergl. 3.3). Zwei dieser Varianten wurden so verändert, dass sie Fehlpaarungen zur Ziel-mRNA der CHS ausbildeten. In zwei weiteren Varianten wurde der Anteil an Gs und Us verändert, so dass es zu einer großen Anzahl an G:U-Paarungen in der miRNA:*target* Hybridstruktur kam. In allen smiRNA(CHS) Varianten wurde das 5'-terminale Cytosin gegen ein Uridin ausgetauscht, da kürzlich berichtet wurde, dass das überrepräsentierte 5'-terminale Uridin in pflanzlichen miRNAs vermutlich für die bevorzugte Interaktion von miRNAs mit AGO1 im Vergleich zu anderen AGO-Proteinen verantwortlich ist (Mi et al., 2008). So sollte die Vergleichbarkeit zwischen den smiRNA-Varianten gewährleistet werden, da in zwei der Varianten ohnehin dieser Austausch vorgenommen wurde, um den Einfluss von G:U-Paarungen auf die Effektivität der smiRNA(CHS) zu überprüfen. Außerdem sollte auch getestet werden, ob das 5'-terminale Uridin die Prozessierung der smiRNA(CHS) beeinflusst, da diese ja interessanterweise als 21 nt und zusätzlich 22 oder 23 nt lange smiRNA aus dem *MIR159a* Primärtranskript prozessiert wurde (Abb. 3.2). Die Effekte der beschriebenen

Veränderungen wurden in transgenen Pflanzen im Hinblick auf die Flavonoidproduktion und *CHS*-Transkriptmengen untersucht.

In die Hybridstruktur von smiRNA(*CHS*) Variante1 (Var1) und der *CHS*-Bindestelle wurde eine Fehlpaarung in der 5'-Region der smiRNA eingefügt (Tab. 3.2). Solche Fehlpaarungen kommen auch in natürlichen miRNA:*target* Strukturen vor (z. B. miRNA159a und *MYB101*; Alves-Junior et al., 2009). Es wird vermutet, dass ein perfekt gepaartes 3'-Ende bis zu 2 Fehlpaarungen im 5'-Bereich kompensieren kann (Schwab et al., 2006). Die Fehlpaarung führte zu einem etwas höheren, aber dennoch relativ geringen *mfe*-Wert von -38,9 kcal/mol verglichen mit der ursprünglichen smiRNA(*CHS*) ohne Fehlpaarungen (-44 kcal/mol). Der *mfe*-Wert entsprach über 86 % des Wertes für die perfekte Komplementarität. Die Samenschalen der meisten analysierten pri-smiRNA(*CHS*)-Var1 exprimierenden Linien zeigten eine gelbliche Färbung (Abb. 3.14), und die relative *CHS* Transkriptmenge war ebenfalls deutlich reduziert (Abb. 3.17 C). In einer Linie wurde beinahe die geringe Transkriptmenge erreicht, die auch in einer starken smiRNA(*CHS*) exprimierenden Linie dokumentiert wurde, wobei aber auch die Expression des *precursors* der Variante etwas geringer war (Abb. 3.17 B). Sehr ähnlich, aber nicht ganz so deutlich waren die Ergebnisse der Anthocyanquantifizierung (3.15 B). Obwohl es sehr schwierig ist, die Effekte der Veränderungen in der smiRNA(*CHS*) aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken der *precursor* zu quantifizieren, kann aus diesen Resultaten die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die smiRNA(*CHS*)-Var1 ebenfalls sehr effektiv die Transkripte des Zielgens *CHS* regulierte und zu den entsprechenden Phänotypen führte.

In der microRNA *target* Vorhersage mit *RNAhybrid* wurden für diese smiRNA 27 weitere Zielgene vorhergesagt, von denen einige Hybridstrukturen einen niedrigeren *mfe* als -30 kcal/mol hatten (siehe 7.2.2). Die Überprüfung dieser *targets* ergab jedoch, dass aufgrund vorhandener Fehlpaarungen und deren Positionen (beispielsweise nahe der vermuteten Spaltungsposition) höchstens ein vorhergesagtes Zielgen als mögliches *off-target* (At5g41315) eingestuft werden muss. Dieses kodiert für GLABRA3 (GL3), ein Protein, das in die Entwicklung von Trichomen in Arabidopsis involviert ist. Trichome in *gl3 knockout* Pflanzen weisen keine Verzweigungen auf und sind in ihrer Anzahl reduziert (Payne et al., 2000). Dies wurde jedoch nicht in smiRNA(*CHS*)-Var1 exprimierenden Pflanzen beobachtet, und die Transkriptmengen dieses Gens wurden deshalb nicht analysiert.

Die Einführung von zwei Fehlpaarungen in der smiRNA(*CHS*)-Var2:*target* Hybridstruktur führte zu einem höheren *mfe*-Wert von -32,5 kcal/mol (Tab. 3.2), was 73,8 % des Wertes der perfekten Hybridisierung entspricht. In den meisten der untersuchten transgenen Linien war die Anthocyanmenge verglichen mit Wildtypkeimlingen reduziert (Abb. 3.15 B), doch das geringe Niveau von einigen untersuchten pri-smiRNA(*CHS*) oder pri-smiRNA(*CHS*)-Var1 exprimierenden Linien wurden bei Weitem nicht erreicht. Die Expression des Var2 *precursors* korrelierte weniger eindeutig mit der beobachteten

Reduzierung des Anthocyangehalts, und die Expressionsstärke der als Referenz hinzu gezogenen smiRNA(CHS) Linie 11 wurde nicht erreicht (Abb. 3.18 A). Daher ist wiederum die Quantifizierung der smiRNA(CHS)-Var2 Effekte äußerst schwierig. Es lässt sich jedoch feststellen, dass diese smiRNA(CHS)-Variante trotz der zwei Fehlpaarungen noch fähig war, das Zielgen *CHS* zu regulieren und leichte phänotypische Anomalien verglichen mit Wildtyppflanzen auszulösen. Im Allgemeinen gilt zwar, dass die Paarung des 3'-Endes einer miRNA nicht so ausschlaggebend ist wie die des 5'-Endes (Mallory et al., 2004b), doch tatsächlich werden zwei oder mehr Fehlpaarungen im 3'-Bereich eher selten für natürliche miRNAs und ihre Zielgene beobachtet.

Die *RNAhybrid*-Analyse ergab nach anschließender Überprüfung vier mögliche Zielgene für die smiRNA-Variante 2 (siehe 7.2.3). Die Expression der vorhergesagten möglichen *off-targets* wurde jedoch nicht untersucht, da keine phänotypischen Besonderheiten an den smiRNA(CHS)-Var2 exprimierenden Pflanzen außer denen, die auf die verminderte Expression der *CHS* zurückzuführen waren, beobachtet wurden. Dennoch ist natürlich nicht auszuschließen, dass die Transkripte des putativen Translationsinitiationsfaktors 4E (At1g29550), der putativen Oxidoreduktase der Fe(II)-Oxygenase Familie (At1g49390), des Kupferionen-Transporters (At2g37925) oder des Proteins mit Sequenzähnlichkeit zu einer Flavanon 3 Hydroxylase (At5g20400) im Vergleich zu Wildtyppflanzen reduziert waren.

Die Paarungen zwischen der Bindestelle innerhalb der *CHS* Sequenz und den smiRNAs Var3 und Var4 zeichneten sich durch eine erhöhte Anzahl von G:U-Paarungen aus (Tab. 3.2), was in beiden Fällen die Effizienz des *CHS knockdowns* drastisch verringerte. In den Hybridstrukturen dieser zwei smiRNAs und dem *target* kamen keine Fehlpaarungen im engeren Sinne vor, doch die *mfe*-Werte stiegen aufgrund der *wobble*-Paarungen auf -29,6 kcal/mol für die Paarung mit smiRNA(CHS)-Var3 (sieben G:U-Paarungen auf der gesamten Länge der smiRNA) und auf -36,7 kcal/mol im Fall von Variante 4 (sechs G:U-Paarungen im 5'-Bereich der smiRNA). Dies entspricht 67,3 % beziehungsweise 83,4 % des *mfe*-Wertes für ein perfekt gepaartes Hybrid.

Während in Pflanzen, die die Variante 3 exprimierten, keine Reduzierung der Stress-induzierten Anthocyanmenge zu beobachten war (Abb. 3.15 D), obwohl die Expression des *precursors* zumindest in einer Linie ähnlich hoch wie in der starken smiRNA(CHS) Linie 11 war (Abb. 18 B), war solch eine Reduzierung der Anthocyane in smiRNA(CHS)-Var4 exprimierenden Pflanzen zu beobachten (Abb. 3.15 E). Hier korrelierte die Expression des *precursors* (Abb. 18 C) wieder negativ mit der gemessenen Anthocyanmenge. Die eingeführten G:U-Paarungen verringerten die smiRNA-Effektivität sehr stark, doch scheint das Auftreten von sechs G:U-Paarungen in diesem Fall noch tolerierbar zu sein. Dies ist möglicherweise der Fall, weil auch der *mfe*-Wert noch in einem niedrigen Bereich lag, der in natürlichen miRNA:*target* Hybriden vorkommt (Schwab et al., 2005). Die drei möglichen *off-targets* (siehe 7.2.5), Gene die für eine Phospholipid N-Methyltransferase (At1g80860), das pflanzliche Hämoglobin1

(At2g16060) und eine ATPase der Vakuole (At4g34720) kodieren, wurden wiederum nicht näher untersucht, da keine offensichtlichen außer der *CHS knockdown*-bezogenen Phänotypen auftraten.

Aufgrund der variierenden Expressionsstärken des *precursors* und der relativ geringen Anzahl an analysierten Linien ist es schwierig, eine konkrete Aussage für die Effektivität von smiRNA(*CHS*)-Var3 zu treffen, doch scheint hier die smiRNA-vermittelte Regulation des Zielgens *CHS* nur minimal zu wirken, wenn sie nicht sogar völlig ausbleibt. Scheinbar ist aber nicht eine schwache Expression der pri-smiRNA(*CHS*)-Var3 der Grund für unveränderte Flavonoid-Anteile in den transgenen Linien. Möglicherweise sind die Sequenzeigenschaften der smiRNA(*CHS*) so stark verändert worden, dass mit 29,6 kcal/mol eine zu geringe Affinität zwischen der smiRNA(*CHS*)-Var3 und der *CHS*-Bindestelle herrscht. Durch einen *small RNA Northern Blot* konnte die Präsenz der reifen smiRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.16), so dass davon auszugehen ist, dass auch nicht die fehlerhafte oder ausbleibende Prozessierung der smiRNA(*CHS*)-Var3 der Grund für diese Ergebnisse ist.

Obwohl ein hoher Anteil an Uridinen verglichen mit Cs mehr Paarungen ermöglicht (U:A und U:G), wurden nur neun *off-targets* für smiRNA(*CHS*)-Var3 vorausgesagt (siehe 7.2.4). Vermutlich führten gestiegene *mfe*-Werte zum Ausschluss anderer Zielgene. Die Hybridstrukturen zwischen der smiRNA(*CHS*)-Var3 und den vorhergesagten *off-targets* hatten allesamt überhängende 5'-Enden und ihre *mfe*-Werte bewegten sich um -25 kcal/mol. Keines davon wurde als putatives *off-target* eingestuft.

Interessanterweise wurden die smiRNAs der Varianten 1 und 2 als zwei unterschiedliche große RNAs prozessiert (Abb. 3.16), so wie es auch für die ursprüngliche smiRNA(*CHS*) der Fall war (Abb. 3.2). Das eingefügte Uridin am 5'-Ende der smiRNAs hatte also vermutlich keinen Einfluss auf die Prozessierung, genauso wenig wie das strukturell leicht veränderte Primärtranskript des „easy cloning“ Vektors. Die smiRNAs der Varianten 3 und 4 wurden aber jeweils als nur eine 21 nt lange RNA detektiert. Möglicherweise spielen die veränderten Sequenzeigenschaften in den smiRNA(*CHS*) Varianten eine Rolle bei der Prozessierung der smiRNAs.

Abschließend kann festgestellt werden, dass einzelne Fehlpaarungen oder die begrenzte Anzahl von G:U-Paarungen in miRNA:*target* Hybriden toleriert werden können, dass aber mit einer Abnahme der Effizienz des *silencing* Effektes zu rechnen ist. Wenn es die Sequenzen der eigentlichen Zielgene erlauben, sollte möglichst eine perfekte Bindung zur entworfenen smiRNA vorliegen. Aufgrund der wenigen untersuchten Variationen in der Hybridstruktur, kann bei weitem noch kein eindeutiges Urteil über tolerierbare Fehlpaarungen und *wobble*-Paarungen insbesondere im Hinblick auf deren Positionen im Hybrid sowie ihren Einfluss auf die *silencing* Effektivität gefällt werden. Brennecke et al. (2005) beobachteten in ihren Studien zum Einfluss von Fehlpaarungen auf die Wirksamkeit von miRNAs außerdem unterschiedliche Effektivitäten bei gleichen Anzahlen und Positionen von Fehlpaarungen in verschiedenen miRNAs und zugehörigen



Bindestellen. Möglicherweise sind daher die Ergebnisse, die für die smiRNA(CHS) Varianten erzielt wurden nicht ohne weiteres auf andere miRNA:target Hybride übertragbar. Denkbar ist auch, dass die Lage einer Bindestelle innerhalb der mRNA eine wichtige Rolle für die *silencing* Effektivität spielt, wenn die Bindestelle wegen der Ausformung von Sekundärstrukturen oder angelagerten Proteinen nur eingeschränkt zugänglich für die (s)miRNA ist. Der Einfluss der mRNA-Struktur auf die Wirkung des *gene silencing* wurde bereits für siRNAs und ihre Zielgene bestätigt (Overhoff et al., 2005).

## 4.2 Multipler *knockdown* Poly(A)-bindender Proteine und deren Einfluss auf den Export von mRNA

In diesem Teil der Arbeit wurden drei verschiedene synthetische miRNAs entworfen und in *Arabidopsis* exprimiert, um unterschiedliche Kombinationen von Mitgliedern einer kleinen Proteinfamilie, der PABPC-Familie, spezifisch post-transkriptionell zu regulieren und weitere Aufschlüsse über die Funktionen dieser Proteine zu gewinnen. Bislang wurde festgestellt, dass sie in Prozesse wie Translationsinitiation, mRNA-Biogenese (Belostotsky, 2003) und mRNA-Stabilität (Palanivelu et al., 2000b) eingebunden sind.

Die smiRNA-Technik wurde gewählt, weil T-DNA Insertionslinien für einzelne *PABPC*-Gene wie *pab2* und *pab5* keine vom Wildtyp abweichenden Phänotypen zeigten (Niemeier et al., 2010). Für das Design der smiRNA(PABP)s wurde die gleiche Vorgehensweise gewählt, wie sie erfolgreich für den *knockdown* der *CHS* mit der smiRNA(*CHS*) etabliert wurde. *RNAhybrid* diente der spezifischen Vorhersage von smiRNA(PABP) *off-targets* und unterstützte damit das spezifische Design der smiRNAs. Zwei der pri-smiRNAs wurden mit dem erfolgreich getesteten „easy cloning“ Vektor Ansatz generiert. Schwab et al. (2006) konnten bereits zeigen, dass ein multipler *knockdown* von Zielgenen durch eine synthetische miRNA in *Arabidopsis* möglich ist. Hier wurde eine smiRNA für vier *Ngatha* (*NGA*) Gene entworfen und in *Arabidopsis* exprimiert. Die transgenen Pflanzen zeigten einen sehr ähnlichen Phänotyp wie *nga*-Vierfachmutanten.

### 4.2.1 Design synthetischer miRNAs für ausgewählte Mitglieder der *PABPC*-Familie in *Arabidopsis*

Im Genom von *Arabidopsis* sind acht PABPCs kodiert, die PAB1 bis PAB8 benannt wurden (Belostotsky, 2003), sowie ein verwandtes Gen, welches nur die PABC-Domäne enthält und als *MPC* (*Maternally Expressed PAB C-terminal*) bezeichnet wird (Tiwari et al., 2008). Die *PABPCs* werden aufgrund der Ähnlichkeiten ihrer Proteinsequenzen und Übereinstimmungen im Expressionsmuster in vier Klassen unterteilt (Belostotsky, 2003). Klasse I umfasst *PAB3* und *PAB5*, in die zweite Klasse werden *PAB2*, *PAB4* und *PAB8* eingeordnet und *PAB6* und *PAB7* bilden die dritte Klasse. Die vierte Klasse wird lediglich von *PAB1* gebildet, welches strukturell von den anderen *PABPCs* abweicht (Mangus et al., 2003).

Drei verschiedene smiRNAs wurden für die *PABPC*-Familie entworfen. Die Bindestellen für die smiRNAs lagen in der PABC-Domäne, weil sich hier Sequenzbereiche befinden, die zwischen den *PABPs* gut konserviert sind, so dass die smiRNAs möglichst viele gewünschte Zielgene einschließen konnten und das Auftreten von *off-targets* minimiert werden konnte. Die RRM-Domänen, die zwischen den Familienmitgliedern ebenfalls konserviert sind, waren weniger gut geeignet, um die Bindestellen der smiRNAs in ihren

Bereich zu legen. Sie kommen auch in vielen anderen RBPs vor, weshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit viele ungewollte *targets* aufgetreten wären. *PAB1* und *PAB6*, die keine PABC-Domäne besitzen, wurden nicht in das smiRNA-Design einbezogen. Schließlich wurden nur die Mitglieder der Klassen I und II in verschiedenen Kombinationen durch die smiRNAs angesprochen. Die Kombinationen von Zielgenen für die einzelnen smiRNAs wurden so gewählt, dass einmal alle *PABPCs* der Klasse II (smiRNA(PABP)-1), einmal alle Mitglieder der Klassen I und II (smiRNA(PABP)-3) sowie die Mitglieder der Klasse I und zusätzlich *PAB5* aus Klasse II (smiRNA(PABP)-3cac) sehr wahrscheinliche *targets* waren. Die smiRNAs bildeten allesamt viel versprechende Hybridstrukturen mit ihren Zielensequenzen aus, was sich auch in den niedrigen *mfe*-Werten zwischen -35,3 kcal/mol und -42,2 kcal/mol widerspiegelte.

Nur wenige der vorhergesagten Zielgene für die drei smiRNAs kommen tatsächlich als wahrscheinliche *off-targets* in Frage. Für smiRNA(PABP)-1 waren dies von zwanzig vorhergesagten *off-targets* zwei Kandidaten (siehe 7.2.6). Diese sind ein Gen, das für ein Protein mit unbekannter Funktion kodiert (At3g61280) und ein Gen für ein Protein der Pektinesterase Familie (At5g18990). Im Fall von smiRNA(PABP)-3 wurden zwei der vorhergesagten 25 zusätzlichen Zielgene als mögliche *off-targets* eingestuft (siehe 7.2.7). Diese Gene kodieren zum einen für ein *Prolin rich protein* mit unbekannter Funktion (At5g24316) und zum anderen für ein *NAC domain containing protein* mit Transkriptionsfaktor-Aktivität (At2g02450). Lediglich ein Gen der 24 vorhergesagten *off-targets* wurde als putatives *off-target* für smiRNA(PABP)-3cac eingestuft (siehe 7.2.8). Dieses kodiert ein *F-box family* Protein, das sich durch *kelch repeats* auszeichnet (At4g39580), dem aber noch keine molekulare Funktion zugeordnet wurde.

Die putativen *off-targets*, die für die drei smiRNAs durch *RNAhybrid* vorausgesagt wurden, konnten im Rahmen dieser Arbeit keiner Expressionsanalyse unterzogen werden. Im Fall von smiRNA(PABP)-1 war dies ohnehin nicht angezeigt, weil die entsprechenden transgenen Pflanzen keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten. Die möglichen *off-targets* von smiRNA(PABP)-3 und smiRNA(PABP)-3cac sollten allerdings in naher Zukunft überprüft werden. Nach ersten Erkenntnissen ist aber nicht davon auszugehen, dass ihr möglicher *knockdown* eine Rolle für die beobachteten Phänotypen spielt.

#### 4.2.2 Entwicklungsdefekte in pri-smiRNA(PABP) exprimierenden Pflanzen

Sehr eindeutige, starke Phänotypen wurden nur bei transgenen Pflanzen beobachtet, die die pri-smiRNA(PABP)-3 zum *knockdown* der *PABPCs* aus den Klassen I und II exprimierten. Für pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierende Pflanzen wurde nur ein milder, für pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierende Pflanzen kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp detektiert. Dies deutet darauf hin, dass ein hoher Grad an funktioneller Redundanz zwischen den *PABPCs* der Klassen I und II besteht. Diese Vermutung wird

auch durch die Tatsache unterstützt, dass der *knockout* eines der *PABPC*-Gene keinen Effekt hatte (Niemeier et al., 2010) und große Sequenzähnlichkeit zwischen den *PABPCs*, besonders innerhalb einer Klasse, herrscht. Gleichzeitig ist diese Beobachtung allerdings aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der *PABPCs* (Belostotsky, 2003) aus Klasse I (reproduktives Gewebe) und II (stark und ubiquitär) auch etwas überraschend.

Die Phänotypen der pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Linien variierten bezüglich ihrer Ausprägung. In allen drei Linien, die die stärksten Phänotypen zeigten und daher im Detail untersucht wurden, waren die Zielgen-Transkripte unterschiedlich stark im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 3.33). Die transgenen Pflanzen waren viel kleiner als Wildtypen zum gleichen Zeitpunkt und teilweise extrem zwergewüchsig. Die Verzögerung im Wachstum machte sich bereits einige Tage nach Aussaat bemerkbar, unter Langtagbedingungen war der Effekt noch deutlicher als unter Kurztagbedingungen (Abb. 3.23 bis 3.29). Die Rosettendurchmesser der transgenen Pflanzen waren im Langtag und im Kurztag teilweise nur ein Fünftel so groß wie die der Wildtyppflanzen (Abb. 3.30), und auch die Hochblätter waren kleiner als die von Wildtyppflanzen zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 3.32). Die Rosettenblätter waren außerdem gewellt, und Hochblätter wiesen teilweise leicht gezackte Blattränder auf (Abb. 3.32). Das verzögerte Wachstum der pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen war auch anhand der kürzeren Wurzeln zu beobachten, und auch die Infloreszenzen der transgenen Pflanzen zeigten Auffälligkeiten (Abb. 3.32). Sie waren viel kürzer verglichen mit Wildtyp-Infloreszenzen, und es wurden weniger sekundäre Infloreszenzen ausgebildet. Blüten, Schoten und Samen der Pflanzen waren normal, doch entwickelten sich weniger Schoten, vermutlich aufgrund der kürzeren Infloreszenzen. Im Kurztag und im Langtag blühten pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen später als Wildtyppflanzen, im Kurztag war dies noch ausgeprägter (Abb. 3.31). Hier produzierten die transgenen Pflanzen weniger Rosettenblätter als Wildtypen, bis die ersten Blüten entwickelt wurden. Im Gegensatz dazu produzierten die pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen im Langtag mehr Rosettenblätter als der Wildtyp, was mit Phänotypen von spätblühenden Pflanzen übereinstimmt. Das Verhalten im Langtag deutet darauf hin, dass eher der photoperiodische Weg als der autonome Blühinduktionsweg von der Reduzierung der *PABPC*-Transkripte betroffen ist. In Bezug auf das Verhalten dieser Pflanzen im Kurztag ist es schwierig, eine konkrete Aussage zu treffen. Möglicherweise werden aufgrund der allgemein reduzierten Fitness der transgenen Pflanzen im gleichen Zeitraum weniger Blätter als bei Wildtyppflanzen entwickelt.

Die Expression des smiRNA(PABP)-3 *precursors* war in Linie 5 am höchsten, und entsprechend waren auch in dieser Linie die Zielgen-Transkripte am stärksten herunterreguliert (Abb. 3.33). Auffällig war, dass die Regulierung von *PAB3* und *PAB5* in allen drei untersuchten Linien offensichtlich weniger effektiv war. Aufgrund der vorhergesagten Hybridstrukturen zwischen den einzelnen *PABPCs* und der smiRNA(PABP)-3 sowie deren zugehöriger *mfe*-Werte würde man dies nicht erwarten

(Tab. 3.4). Möglicherweise spielt das Blütengewebe, aus dem für die Analyse von *PAB3* und *PAB5* RNA isoliert worden war, eine Rolle. Einerseits könnten hier die Effekte im Allgemeinen, also auch auf die *PABPCs* der Klasse II weniger stark ausgeprägt sein, andererseits könnte auch die Präparation der RNA aus diesem Gewebe einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Viel eher wäre zu erwarten gewesen, dass *PAB8* Transkripte weniger stark als die der restlichen *PABPCs* reduziert waren, da in der Bindung zur smiRNA(PABP)-3 eine Fehlpaarung im 3'-Bereich der smiRNA auftritt und ein etwas höherer *mfe*-Wert als für die anderen, perfekt gepaarten Hybridstrukturen vorhergesagt wurde (Tab. 3.4).

Die Expression von *PAB2* und *PAB3* mit Mutationen in den smiRNA(PABP)-3 Bindestellen (Abb. 3.38) in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen sollen in Zukunft zeigen, ob eines oder sogar beide Proteine fähig sind, den starken Phänotyp abzumildern oder sogar den Wildtypphänotyp wiederherzustellen. So soll untersucht werden, ob eines der Proteine alleine fähig ist, die wahrscheinlich redundanten Funktionen der *PABPCs* aus den Klassen I und II zu übernehmen. Ein *Yeast-Two-Hybrid* Assay zeigte, dass die zwei *PABPCs* mit den mutierten smiRNA(PABP)-3 Bindestellen genauso wie die gleichen Wildtyp-*PABPCs* mit CID11 interagierten (Abb. 3.39). Augenscheinlich bestanden überwiegend keine großen Unterschiede zwischen den Intensitäten der Blaufärbungen von *PABPC*-Wildtypproteinen und mBS-Mutanten, eine genaue Aussage diesbezüglich könnte aber erst durch die Anwendung eines ONPG-Assays, der zur Quantifizierung der Interaktionen dient, gemacht werden. Die Bestätigung der Interaktionen zwischen den zwei *PABPCs* und CID11 war aber in diesem Fall ausreichend, um die generierten cDNAs in Pflanzen zu transformieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die zwei Proteine durch die Aminosäureaustausche ihre Funktionen nicht verlieren und die Struktur der Wildtypproteine beibehalten, zumal die ausgetauschten Aminosäuren ganz ähnliche Eigenschaften wie die ursprünglichen besaßen.

pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierende Pflanzen zeigten weitaus mildere Phänotypen als pri-smiRNA(PABP)-3. Hier waren vor allem die gezackten Ränder von Rosetten- und Hochblättern sehr auffällig (Abb. 3.36). Die Infloreszenzen der transgenen Pflanzen waren außerdem etwas kleiner als die von Wildtyppflanzen, doch war der Blühbeginn nicht verzögert. Die Reduzierung der *PAB3*-, *PAB4*- und *PAB5*-Transkripte wurde möglicherweise teils durch die unveränderte Expression von *PAB2* und *PAB8* ausgeglichen, so dass es nicht zu einer so starken phänotypischen Ausprägung wie in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen kam. Allerdings steht die Expressionsanalyse für *PAB3* und *PAB5* in pri-smiRNA(PABP)-3cac exprimierenden Pflanzen noch aus, sie konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind aber auch ihre Transkripte herunterreguliert, so wie es für die Transkripte von *PAB4* detektiert wurde, da sie ähnlich viel versprechende, wenn nicht sogar bessere Hybridstrukturen mit den Bindestellen formen (Tab. 3.5).

pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierende Pflanzen zeigten keine phänotypischen Anomalien. Die Transkripte von *PAB2*, *PAB4* und *PAB8* waren jedoch zumindest in zwei untersuchten Linien deutlich reduziert verglichen mit Proben aus Wildtyppflanzen (Abb. 3.35). Fraglich ist, warum *PAB3* und *PAB5* nicht als Zielgene für smiRNA(PABP)-1 von *RNAhybrid* vorausgesagt wurden. Die Hybridstrukturen zwischen smiRNA(PABP)-1 und *PAB5* sowie *PAB3* weisen jeweils nur eine Fehlpaarung im 3'-Bereich der smiRNA auf, die minimalen freien Energien betragen -32,9 kcal/mol und -30,8 kcal/mol (Abb. 4.1). Die Hybridstrukturen erfüllen also die Kriterien, um durch *RNAhybrid* als Zielgene vorhergesagt zu werden. Zusätzlich zu den Fehlpaarungen kommen in diesen beiden Hybridstrukturen aber auch relative hohe Mengen an G:U-Paarungen vor, vier im Fall von *PAB5* und fünf im Fall von *PAB3* (Abb. 4.1). Möglicherweise sind durch die G:U-Paarungen zusammen mit den zwei einzelnen Fehlpaarungen die Effekte auf die *PAB3* und *PAB5* Expression gering, andernfalls würde man ähnliche phänotypische Anomalien erwarten, wie sie für pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierende Pflanzen beobachtet wurden. Die Expression von *PAB5* und *PAB3* in pri-smiRNA(PABP)-1 exprimierenden Pflanzen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestet werden, doch sollen qRT-PCR Experimente in Zukunft Auskunft über eine mögliche Regulierung durch smiRNA(PABP)-1 geben.

Da die Expression des smiRNA(PABP)-1 *precursors* sowie der negative Effekt auf die Ziel-Transkripte nachgewiesen werden konnte, es aber nicht zu phänotypischen Auswirkungen in den untersuchten transgenen Pflanzen kam, muss davon ausgegangen werden, dass der Effekt entweder nicht stark genug war oder die verbleibenden *PABPCs* die Reduzierung der untersuchten *PABPC*-Transkriptmengen ausgleichen konnten. Kandidaten dafür wären *PAB5* und *PAB3*, sofern ihre Expression tatsächlich nicht oder weniger stark als die der anderen *PABPCs* herunterreguliert ist.

```

PAB2 (At4G34110):  GCCAAAGUGACUGGGAUGCUUUGGGAUGGACCAGACUGAAGUGCUCUCAUCUGUUG
PAB8 (At1G49760):  GCUAAAGUCACGGGAUGCUUCUGAAAUGGACCAAACCGAAGUACUUCACUUGCUG
PAB4 (At2G23350):  GCGAAAGUGACUGGUUGCUUCUGGAAUGGAUCAGACCGAGGUUUUGCAUCUGCUC
PAB5 (At1G71770):  GCUAAAGUUACCGGGAUGUUGCUGGGAUGGAUCAAGCUGAGAUUUUGCACCUUCUU
PAB3 (At1G22760):  GCUAAAGUCACAGGAUGUUGUUGGGAUGGAUCAAGCUGAGAUUCUUGCACCUUGAU
PAB7 (At2G36660):  AACAAAUCACAGGAUGCUUCUGGAAUGGACAAGUCGGAAUUGCUUCUUUUGCUG
                -----xx-----
                CGAAGACCUUUACCGGUUUG          smiRNA(PABP)-1

```

#### Abb. 4.1: Alignment der *PABPC*-Sequenzen innerhalb der smiRNA(PABP)-1 Bindestelle

Darstellung eines alignierten Ausschnitts der *PABPC*-Domäne mit den Nukleotidsequenzen der *PABPCs* bis auf *PAB1* und *PAB6*. In blau sind die smiRNA(PABP)-1 Bindestellen innerhalb der *PABPCs* hervorgehoben, rote Buchstaben zeigen Fehlpaarungen an, grüne Buchstaben verdeutlichen G:U-*wobble*-Paarungen. In fettgedruckten Buchstaben sind die Sequenzen der von *RNAhybrid* vorhergesagten smiRNA(PABP)-1 Zielgene angegeben. Die Kreuze markieren die Position der erwarteten smiRNA-vermittelten Spaltung der Ziel-Transkripte.

### 4.2.3 Der Einfluss von PABPCs auf den Kernexport von mRNA

Es wird angenommen, dass der Export von mRNA in Hefe durch das Mex67p/Mtr2p Heterodimer vermittelt wird (Santos-Rosa et al., 1998). Im Menschen wird diese Funktion höchstwahrscheinlich von TAP/NXF1 und p15/NXT1 ausgeführt (Gruter et al., 1998). Das jeweilige Heterodimer vermittelt die Translokation durch den Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC), indem Mex67p beziehungsweise TAP/NXF1 über ihre RRM's an die mRNA binden und zusammen mit Mtr2p beziehungsweise p15/NXT1 mit FG-Repeats ausgewählter Nukleoporene der NPCs interagieren. Für den effizienten Transport von mRNPs aus dem Zellkern werden allerdings noch weitere Proteine benötigt, wie beispielsweise die RNA-abhängige ATPase und Helikase Dbp5p aus Hefe oder die Proteine des Cap-Bindekomplexes (*cap-binding complex*, CBC; Hodge et al., 1999; Schmitt et al., 1999; siehe auch 1.2.3).

Das menschliche p15/NXT1 enthält unter anderem eine NTF2 (nuclear transport factor2) Domäne. Proteine mit solch einer Domäne wurden auch in pflanzlichen Genomen identifiziert. In Arabidopsis kommen *NTF2a* und *NTF2b* vor, die als Orthologe für NTF2 gelten, den Kernimportrezeptor RanGDP in Hefe (Zhao et al., 2006). Eindeutige Homologe für Mex67p oder TAP/NXF1 wurden in pflanzlichen Genomen jedoch bislang nicht gefunden. Eine sehr schwache Sequenzähnlichkeit zwischen AtSDE5, welches in die Generierung von tasiRNAs involviert ist, und der TAP-C Domäne wurde beschrieben (Hernandez-Pinzon et al., 2007), jedoch fehlen weiterführende Studien, um zu entscheiden, ob SDE5 ein mögliches Homolog zum menschlichen mRNA Exportfaktor TAP/NXF1 ist. So bestehen die Möglichkeiten, dass im pflanzlichen Genom Proteine kodiert sind, die Mex67p beziehungsweise TAP/NXF1 funktional entsprechen, oder dass in Pflanzen ein anderer oder mehrere andere Exportwege für mRNPs existieren, was sich generell nicht gegenseitig ausschließen muss.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine der PABPC-Familie binden über ihre RRM's an Poly(A)-Schwänze von mRNAs (Belostotsky, 2003), wandern zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern hin und her und besitzen Leucin-reiche Kernexport Signale (NESs) sowie schwache Kernimport Signale (NLSs; Niemeier et al., 2010). Letzteres verbindet pflanzliche mRNPs möglicherweise mit dem Exportin1 (XPO1)-vermittelten Kernexportweg. XPO1 gehört zur Importin  $\beta$  Familie und vermittelt den Export vieler verschiedener Cargoproteine in Metazoen und Pflanzen (Fornerod et al., 1997; Kudo et al., 1997; Stade et al., 1997). Außerdem werden über Adapterproteine auch RNPs ins Zytoplasma transportiert wie beispielsweise große ribosomale Untereinheiten oder snRNPs (Ho et al., 2000; Ospina et al., 2005). Es liegt daher nahe zu spekulieren, dass PABPCs in direkter oder indirekter Weise als Adapterproteine über den XPO1-Weg am Export von mRNPs in Pflanzen beteiligt sein könnten. Voraussetzung dafür ist, dass die PABPCs im Zellkern an poly(A)-RNA binden. Auch die PABPCs aus Säugern pendeln nachweislich zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma (Afonina et al., 1998), genauso wie Pap1p aus Hefe, welches eine funktionale NES am N-Terminus

besitzt (Brune et al., 2005). Mex67p und TAP/NXF1 tragen allerdings ebenso NESs, die die Interaktion mit dem Kernexportrezeptor XPO1 erlauben (Thakurta et al., 2004). Inwieweit XPO1 hier jedoch zum Export von mRNPs beiträgt ist unklar, da die Heterodimere Mex67p/Mtr2p beziehungsweise TAP/p15 selbständig mit Nukleoporinen der Kernporenkomplexe interagieren und die Translokation von Cargoproteinen vermitteln (Strässer et al., 2000; Thakurta et al., 2004).

Die Untersuchungen zur Lokalisierung von poly(A)-RNA in pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen zeigten, dass die PABPCs eine wichtige Rolle im Export von mRNA in Pflanzen spielen. In den transgenen Pflanzen, die starke Phänotypen sowie eine starke Reduzierung der PABPC-Transkripte aufwiesen, akkumulierte poly(A)-RNA im Vergleich zum Wildtyp verstärkt im Kern (Abb. 3.34). Die Behandlung von Wildtypkeimlingen mit LMB resultierte ebenfalls in der gesteigerten Akkumulierung von poly(A)-RNA im Zellkern, was die Vermutung untermauert, dass XPO1 in Pflanzen am Export von mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma beteiligt ist. Doch es gibt auch Grund zur Annahme, dass weitere mRNA Exportwege in Pflanzen existieren. Es wurden verschiedene Mutanten identifiziert, die poly(A)-RNA im Kern anreichern, was auf die Beteiligung der kodierten Proteine am mRNA Export schließen lässt. Zu diesen Proteinen gehören die drei Nukleoporine AtTPR (Jacob et al., 2007 und 2008), AtNUP160 (Dong et al., 2006) und SAR1 (Parry et al., 2006), das ein Homolog von NUP96 kodiert. Erst kürzlich wurden von Lu et al. (2010) in Arabidopsis Komponenten des Homologs zum TREX-2 mRNA Exportkomplex aus Hefe identifiziert und beschrieben. Dieser Komplex interagiert in Hefe mit dem Dimer Mex67p/Mtr2p und gleichzeitig mit dem NPC-assoziierten Nup1. Das homologe Nukleoporin AtNUP1 interagiert auch in Arabidopsis mit dem TREX-2 Komplex, weitere Interaktionspartner wurden aber bisher nicht gefunden. Der *knockout* von NUP1 führte zur verstärkten Akkumulierung von poly(A)-RNA in den Zellkernen junger Keimlinge.

Weiterhin ist in diesem Zusammenhang das LOS4 Gen in Arabidopsis von großem Interesse, da es einen möglichen Kandidaten zu der DEAD-box Helikase Dbp5p aus Hefe darstellt, *los4* Mutanten verschiedene entwicklungsbezogene Phänotypen zeigen und ebenfalls poly(A)-RNA im Kern akkumulieren (Dong et al., 2006). Dbp5p ist vermutlich an der Translokation von mRNPs und der ATP-abhängigen Neuorganisation der mRNPs auf zytoplasmatischer Seite beteiligt (Cole und Scarcelli, 2006). Durch Dissoziation verschiedener Proteine wird verhindert, dass die mRNPs zurück in den Zellkern gelangen, und so ist Dbp5p möglicherweise dafür zuständig, diesem Exportvorgang Direktionalität zu verleihen. Dies ist umso wahrscheinlicher, weil Mex67p und TAP/NXF1 nicht zur Importin  $\beta$  Familie von Kernexportrezeptoren gehören, weshalb die Direktionalität des Transportes dieser Proteine durch die NPCs unabhängig von RanGTP gewährleistet werden muss.

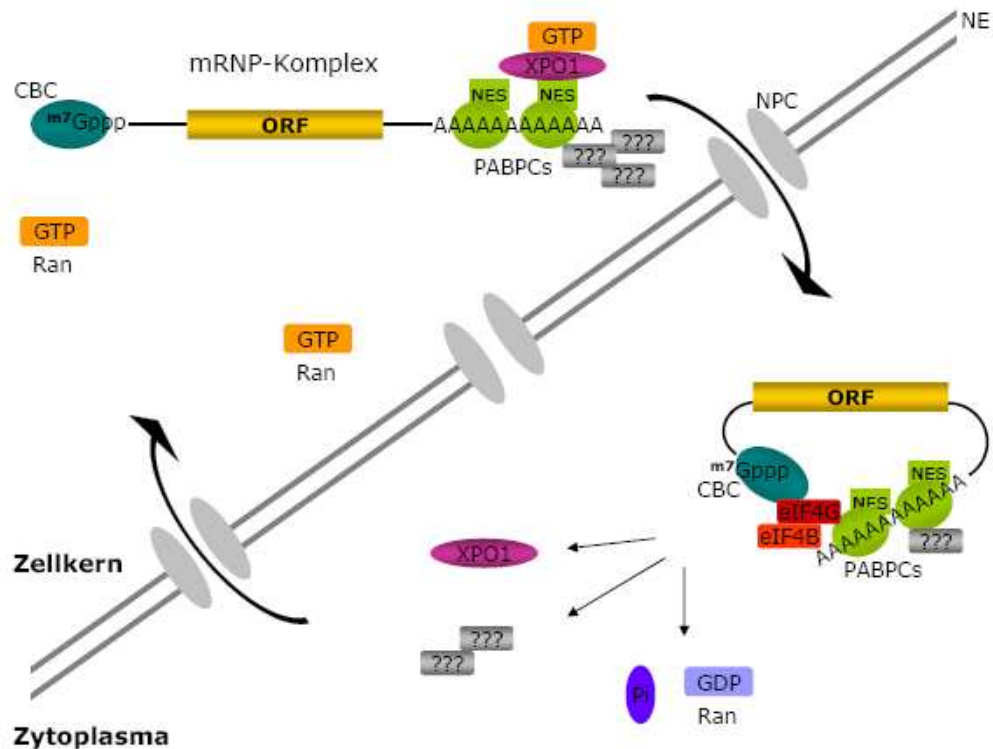
Die beschriebenen Mutationen, die die Anreicherung von poly(A)-RNA im Zellkern hervorrufen, führen zusätzlich zu pleiotropen Phänotypen. Beobachtet wurden



Veränderungen in der Entwicklung sowie in der Antwort auf Phytohormone oder Umwelt bedingten Stress und das frühere Blühen der verschiedenen Pflanzen. Während natürlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass die betreffenden Proteine noch andere Funktionen außerhalb der Exportmaschinerie haben, liegt aber vermutlich ein wichtiger Grund für diese Effekte in der reduzierten Versorgung des Zytoplasmas mit RNAs. Dies trifft sehr wahrscheinlich auch auf die pri-smiRNA(PABP)-3 exprimierenden Pflanzen zu, die neben der Akkumulierung von poly(A)-RNA im Zellkern ebenfalls späteres Blühen als Wildtyppflanzen zeigten (Abb. 3.31). Auch hier ist natürlich nicht auszuschließen, dass die beobachteten Phänotypen mit anderen Funktionen der PABPCs in Zusammenhang stehen wie mRNA-Stabilität oder Initiation der Translation (Belostotsky, 2003).

Mitglieder einer weiteren kleinen Genfamilie aus Arabidopsis, die RBPs kodieren, wurden als Interaktionspartner der PABPCs identifiziert (Bravo et al., 2005). Diese CID-RBP37 Proteine (*CTC-interacting domain*) interagieren mit den CTC-Domänen der PABPCs über ihre PAM2-Domänen und besitzen zwei C-terminal gelegene RRM s (Bravo et al., 2005; Niemeier et al., 2010,). Außerdem haben vier der sechs CID-RBPs funktionale NESs, die die Erkennung durch XPO1 ermöglichen und dadurch eine Verbindung zum XPO1-abhängigen Kernexport von mRNPs ermöglichen. In vielerlei Hinsicht haben die CID-RBPs also ähnliche Eigenschaften wie die PABPCs. Ein Unterschied besteht aber darin, dass sie NLSs besitzen und vermutlich durch das Importin  $\alpha$ /Importin  $\beta$  Heterodimer in den Kern transportiert werden, während der Kernimportrezeptor der PABPCs vermutlich Transportin1 (TRN1) ist (Niemeier et al., 2010). Die genauen Funktionen der CID-RBPs sind bislang nicht bekannt, über ihren mutmaßlichen Einfluss auf den Export von mRNPs aus dem Zellkern, möglicherweise in Zusammenarbeit mit PABPCs kann aber durchaus spekuliert werden.

Das Modell in Abbildung 4.2 veranschaulicht, inwieweit die PABPCs am Export von mRNPs in Pflanzen beteiligt sein könnten. Demnach binden sie über ihrer RRM s an den Poly(A)-Schwanz von mRNA. XPO1 bindet zusammen mit Ran-GTP an die NESs der PABPCs und vermittelt durch Interaktion mit spezifischen Nukleoporinen den Export des Komplexes durch die Kernporen ins Zytoplasma. Dort dissoziiert der Exportkomplex durch die kooperative Aktivität von Ran-GAP (*Ran-specific GTPase-activating protein*) und RanBP1 (*Ran binding protein1*), die die Hydrolyse des GTPs an Ran katalysieren (nicht gezeigt). So wird die Substrataffinität von XPO1 verringert, was zur Freisetzung des mRNP-Komplexes führt. Die Zirkularisierung der mRNA durch Interaktion der PABPCs und des Cap-Bindekomplexes (CBC) mit Translationsinitiationsfaktoren führt zur Einleitung der Translation. Andere, möglicherweise in den Exportprozess involvierte Proteine wie die CIDs sind in dem Modell nicht dargestellt, da über ihren Einfluss zu wenige Informationen vorliegen.



**Abb. 4.2: Hypothetisches Modell für den Kernexport von mRNA in Arabidopsis**

Die Bildung eines mRNP-Komplexes findet im pflanzlichen Zellkern statt. Zytosolische Poly(A)-bindende Proteine (PABPCs) binden an den Poly(A)-Schwanz von mRNA. Gleichzeitig bindet Exportin1 (XPO1) in Kooperation mit Ran-GTP an die NESs der PABPCs und vermittelt durch Interaktion mit spezifischen Nukleoporinen des Kernporenkomplexes (NPC) die Translokation des mRNP. Sehr wahrscheinlich ist die Beteiligung weiterer Proteine (???). Im Zytoplasma dissoziiert der Exportkomplex durch Hydrolyse des GTPs an Ran. Der mRNP-Komplex zirkularisiert durch die Bindung der PABPCs und des Cap-Bindekomplexes (CBC) an die Translationsinitiationsfaktoren eIF4G und eIF4B (u. a.) und es kommt zur Initiation der Translation. XPO1, andere beteiligte Faktoren und später auch die PABPCs werden zurück in den Zellkern transportiert.

### 4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Das miRNA Vorhersageprogramm *RNAhybrid* wurde in dieser Arbeit verwendet, um das Design synthetischer miRNAs (smiRNAs) für pflanzliche Zielgene zu verbessern. Es erlaubt eine sehr sensitive Vorhersage von unerwünschten Zielgenen (*off-targets*) und trägt dadurch zur Vermeidung von *off-targets* während des smiRNA Designs bei. Weiterhin wurde die Generierung von pri-smiRNAs erleichtert, indem ein so genannter „easy cloning“ Vektor auf Basis des Primärtranskriptes von *MIR59a* entworfen wurde. Dieser erlaubte durch zwei neue Restriktionsschnittstellen in einem Einschnitt-Klonierungsverfahren die Insertion einer gewünschten smiRNA und ihrer komplementären Sequenz, der smiRNA\*, um diese aus dem Primärtranskript *in vivo* prozessieren zu lassen. Am Beispiel einer smiRNA für die *CHS* wurde gezeigt, dass ein sehr effektives smiRNA Design ermöglicht wurde. *RNAhybrid* sagte dabei *off-targets* vorher, die unter Anwendung anderer häufig verwendeter Programme nicht gefunden wurden. Der ECV-Ansatz war ebenso erfolgreich um den *knockdown* der *CHS* Transkripte herbeizuführen wie der Standardansatz, bei dem nicht nur zwei vollständige Klonierungsexperimente nötig sind, sondern auch die doppelte Menge an Oligonukleotiden benötigt wird. Die leichte strukturelle Veränderung des ECV-Primärtranskriptes hatte entgegen der allgemeinen Annahmen keine negativen Auswirkungen auf den *knockdown*. In den stärksten pri-smiRNA(*CHS*) exprimierenden Linien waren die *CHS* Transkripte um 85 % im Vergleich zu Wildtyppflanzen reduziert, der *knockdown* Effekt korrelierte negativ mit der Expressionsstärke des *precursors*. Um transgene Pflanzen mit möglichst starker *precursor*-Expression und damit starken *knockdown* Effekten zu identifizieren, sollten immer möglichst viele Linien analysiert werden, da die Expression und damit der *silencing* Effekt stark variieren kann. Die smiRNA- oder amiRNA-Technik wird mit Sicherheit auch in Zukunft nicht nur im Bereich der Pflanzenforschung aufgrund ihrer hohen Effektivität und der technisch relativ einfachen Anforderungen häufige Anwendung finden. Gerade der multiple *knockdown* von Zielgenen, wie er auch in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt wurde, wird dabei weiterhin von großem Interesse sein.

Fehlpaarungen und/oder G:U-Paarungen in der miRNA:*target* Hybridstruktur stellen einerseits einen Weg dar, die Spezifität von smiRNAs für ihr Zielgen zu vergrößern, indem die Bindung an *off-targets* verschlechtert oder ausgeschlossen wird. Andererseits spielt dies eine wichtige Rolle beim Design von smiRNAs, wenn die smiRNA-Technik für Genfamilien oder Einzelgene, für die Paraloge mit hoher Sequenzidentität vorhanden sind, angewandt werden soll. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass einzelne Fehlpaarungen oder die begrenzte Anzahl von G:U-Paarungen in miRNA:*target* Hybriden toleriert werden können. Allerdings ist mit einer starken Abnahme der Effizienz des *silencing* Effektes zu rechnen. Die Reduzierung der *CHS*-Transkripte in dem Maße, wie sie durch die perfekt paarende smiRNA(*CHS*) beobachtet wurde, konnte bei weitem nicht durch die vier verschiedenen smiRNA(*CHS*) Varianten erreicht werden. Wenn es

die Sequenzen der eigentlichen Zielgene erlauben, sollte möglichst eine perfekte Bindung zur entworfenen smiRNA vorliegen, oder Fehlpaarungen sollten auf ein ungepaartes Nukleotid im 5'- oder 3'-Bereich der smiRNA beschränkt werden.

Die Eigenschaften von miRNA:*target* Hybriden sind in Pflanzen bislang wenig untersucht und auch dieser Ansatz konnte nur einen kleinen Teil dazu beitragen. Aufgrund der wenigen untersuchten Variationen in der Hybridstruktur, insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen möglichen Positionen von Fehlpaarungen oder G:U-Paarungen im Hybrid kann bei weitem noch kein eindeutiges Gesamturteil über tolerierbare Fehlpaarungen und *wobble*-Paarungen gefällt werden. Die detaillierte Analyse dieser Strukturen kann in Zukunft die Effizienz von smiRNA-vermittelten *knockdowns* durch Vermeidung von *off-targets* verbessern.

Unter Zuhilfenahme der smiRNA-Technologie wurden *knockdown* Mutanten für verschiedene Kombinationen der *PABPC*-Familienmitglieder generiert. Drastische Phänotypen zeigten sich nur, wenn fünf Mitglieder der Familie simultan herunterreguliert wurden. Der *knockdown* von drei Familienmitgliedern in verschiedenen Zusammensetzungen führte nur zu milden Phänotypen oder hatte keinen Einfluss auf das Erscheinungsbild der Pflanzen. Dies spricht dafür, dass die *PABPCs* der Klassen I und II, die die Zielgene für die verschiedene smiRNA(*PABP*)s waren, sehr stark redundante Funktionen ausführen. Beide Klassen haben zwar ein unterschiedliches Expressionsprofil, doch scheinen diese zwei Klassen den Verlust der jeweils anderen Klasse ausgleichen zu können. Dabei muss natürlich auch immer bedacht werden, dass die Expression der smiRNA(*PABP*)s zu einem *knockdown* der Zielgene führte und nicht zu einem vollständigen *knockout*. Von großem Interesse ist nun, ob die verbleibenden Mitglieder der *PABPC*-Familie, *PAB1*, *PAB6* und *PAB7* einen Teil der Funktionen aus den Klassen I und II übernehmen können. Rein strukturell könnte dies auf *PAB7* zutreffen, da *PAB7* ebenso wie die *PABPCs* der Klassen I und II *RRMs* sowie die *PABC*-Domäne besitzt. Letzteres trifft nicht auf *PAB1* und *PAB6* zu. Weitere *knockdown*-Studien, die *PAB7* einbeziehen, könnten Aufschlüsse darüber liefern. Generell ist aber schon davon auszugehen, dass die Mitglieder der verschiedenen Klassen aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster, den Unterschieden in ihrer Struktur und den bevorzugten subzellulären Lokalisierung mehr oder weniger spezialisierte Funktionen ausführen.

Sehr eindeutig konnte der Einfluss der *PABPCs* auf den Export von mRNA aus dem Zellkern gezeigt werden. Mit Hilfe ihrer C-terminal gelegenen *NESs* interagieren die meisten der *PABPCs* mit dem Kernexportrezeptor Exportin1 und könnten durch die gleichzeitige Bindung ihrer *RRMs* an mRNA als Adapterproteine für den Exportin1-vermittelten Export von mRNA fungieren. Dieser Exportweg könnte zumindest einen von mehreren möglichen Exportwegen in Pflanzen darstellen, da auch *LMB* zur Akkumulierung von poly(A)-RNA im Kern führte. Die beobachteten drastischen Phänotypen sind wahrscheinlich nicht nur auf die reduzierte Versorgung des

Zytoplasmas mit mRNA zurückzuführen, sondern hängen höchstwahrscheinlich auch mit den anderen, für die PABPCs identifizierten Funktionen zusammen. Weitere experimentelle Ansätze, die die Funktionen der PABPCs in der Reifung, im Export und der Translationsinitiation detaillierter untersuchen sowie Protein-RNA Interaktionstests und Analysen von mRNP-Zusammensetzungen sollen die PABPCs in Zukunft weiter charakterisieren und ihren Einfluss auf den mRNP-Export ausführlicher klären.

## 5 LITERATUR

**Achard P, Herr A, Baulcombe D C, Harberd N P (2004).** Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131, 3357-3365.

**Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, Archer-Evans S, Manocha V, Vance V, Sundaresan V (2005).** Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 15, 78-91.

**Adam S A (2001).** The nuclear pore complex. *Genome Biol* 2(9), 1-6.

**Adenot X, Elmayan T, Laressergues D, Boutet S, Bouché N, Gascioli V, Vaucheret H (2006).** DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol* 16(9), 927-32.

**Afonina E, Stauber R, Pavlakis G N (1998).** The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 273(21), 13015-13021.

**Akey C W und Rademacher M (1993).** Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by 3D cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* 122, 1-19.

**Allen E, Xie Z, Gustafson A M, Sung G H, Spatafora J W, Carrington J C (2004).** Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 36, 1282-1290.

**Allen E, Xie Z, Gustafson A M, Carrington J C (2005).** microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121, 207-221.

**Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, Kim C J, Chen H, Shinn P, Stevenson D K, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R et al. (2003).** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633):653-657.

**Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Esheda Y (2006).** Endogenous and Synthetic MicroRNAs Stimulate Simultaneous, Efficient, and Localized Regulation of Multiple Targets in Diverse Species. *Plant Cell* 18, 1134-1151.

**Alves-Junior L (2007).** Prediction, validation and functional analysis of microRNA targets. Dissertation, Lehrstuhl für Genomforschung, Universität Bielefeld

**Alves-Junior L, Niemeier S, Hauenschild A, Rehmsmeier M, Merkle T (2009).** Comprehensive prediction of novel microRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 37(12):4010-21.

**Ambros V, Lee R C, Lavanway A, Williams P T, Jewell D. (2003).** MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* 13, 807-818.

**Amrani N, Minet M, Le Gouar M, Lacroute F, Wyers F (1997).** Yeast Pab1 interacts with Rna15 and participates in the control of the poly(A) tail length in vitro. *Mol Cell Biol* 17, 3694-701.

- Aravin A A, Naumova N M, Tulin A V, Vagin V V, Rozovsky Y M, Gvozdev V A (2001).** Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D.melanogaster* germline. *Curr Biol* 11, 1017-1027.
- Aravin A A, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T (2003).** The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5, 337-350.
- Aravin A A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein M J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo J J, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2006).** A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442(7099), 203-207.
- Aravin A A, Sachidanandam R, Bourchis D, Schaefer C, Pezic D, Toth K F, Bestor T, Hannon G J (2008).** A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* 31, 785-799.
- Arteaga-Vazquez M, Caballero-Perez J, Vielle-Calzada J P (2006).** A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell* 18, 3355-3369.
- Aufsatz W, Mette M F, van der Winden J, Matzke A J, Matzke M (2002).** RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(4), 16499-16506.
- Aukerman M J und Sakai H (2003).** Regulation of flowering time and floral organ identity by microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15, 2730-2741.
- Axtell M J und Bartel D P (2005).** Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell* 17, 1658-1673.
- Axtell M J, Snyder J A, Bartel D P (2007).** Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* 19, 1750-1769.
- Baker C C, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz, E M (2005).** The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 303-315.
- Bao N, Lye K W, Barton M K (2004).** MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell* 7, 653-662.
- Bartel, D P (2004).** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Baskerville S und Bartel D P (2005).** Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring microRNAs and host genes. *RNA* 11, 241-247.
- Baulcombe D (1999).** Viruses and gene silencing in plants. *Arch Virol Suppl* 15, 189-201.
- Baumberger N und Baulcombe D C (2005).** Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11928-11933.
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R (1992).** New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20(6), 1195-1197.

- Becker J, Melchior F, Gerke V, Bischoff F R, Ponstingl H, Wittinghofer A (1995).** RNA1 encodes a GTPase activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 11860-11865.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006).** mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-1898.
- Belostotsky D A und Meagher R B (1996).** A pollen-, ovule-, and early embryo-specific poly(A) binding protein from *Arabidopsis* complements essential functions in yeast. *Plant Cell* 8, 1261-1275.
- Belostotsky D A (2003).** Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics* 163, 311-319.
- Benzel A (2008).** Spezifischer knockdown der Poly(A)-bindenden Proteine mittels synthetischer pri-microRNAs. Masterarbeit, Lehrstuhl für Genomforschung, Universität Bielefeld
- Bernstein P, Peltz S W, Ross J (1989).** The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 9, 659-670.
- Birmingham A, Anderson E M, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall W S, Khvorova A (2006).** 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3(3):199-204.
- Bischoff F R, Krebber H, Smirnova E, Dong W, Ponstingl H (1995).** Co-activation of Ran-GTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* 14, 705-715.
- Bischoff F R und Görlich D (1997).** RanBP1 is crucial for the release of Ran-GTP from importin  $\alpha$ -related nuclear transport factors. *FEBS Lett* 419, 249-254.
- Bohnsack M T, Regener K, Schwappach B, Saffrich R, Paraskeva E, Hartmann E, Görlich D (2002).** Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO J* 21, 6205-6215.
- Bollmann K M, Aukermann M J, Park M Y, Hunter C, Berardini T Z, Poethig R S (2003).** HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130, 1493-1504.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, Van de Peer Y (2004).** Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11511-11516.
- Borsani O, Zhu J, Verslues P E, Sunkar R, Zhu J K (2005).** Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123, 1279-1291.
- Bravo J, Aguilar-Henonin L, Olmedo G, Guzman P (2005).** Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly(A)-binding proteins. *Mol Genet Genomics* 272, 651-665.



**Brennecke J, Stark A, Russell R B, Cohen S M (2005).** Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85.

**Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto Y Y, Sieburth L, Voinnet O (2008).** Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.

**Brown C E und Sachs A B (1998).** Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol* 18, 6548-6559.

**Brune C, Munchel S E, Fischer N, Podtelejnikov A V, Weis K (2005).** Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* 11, 517-531.

**Bullock W, Fernandez J, Short J (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Tech* 5, 376-378.

**Burbulis I E, Iacobucci M, Shirley B W (1996).** A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis. *Plant Cell* 8(6):1013-1025.

**Cai X, Hagedorn C H, Cullen B R (2004).** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.

**Caponigro G und Parker R (1996).** Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60,233-249.

**Carmell M A, Xuan Z, Zhang M Q, Hannon G J (2002).** The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2733-2742.

**Carrington J C und Ambros V (2003).** Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.

**Cech T R (2000).** The Ribosome is a Ribozyme. *Science* 11 289, 878-879.

**Chan S W, Zilberman D, Xie Z, Johansen L K, Carrington J C, Jacobsen S E (2004).** RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303, 1336.

**Chekanova J A, Shaw R J, Belostotsky D A (2001).** Analysis of an essential requirement for the poly(A) binding protein function using cross-species complementation. *Curr Biol* 11, 1207-1214.

**Chekanova J A und Belostotsky D A (2003).** Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA* 9, 1476-1490.

**Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D (2002).** HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Development* 129, 1085-1094.

**Chen X (2004).** A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303, 2022-2025.

- Chen C Z (2005).** MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 353, 1768-1771.
- Chen K und Rajewsky N (2007).** The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 8, 93-103.
- Chen P Y, Weinmann L, Gaidatzis D, Pei Y, Zavolan M, Tuschl T, Meister G (2007).** Strand-specific 5'-O<sup>2</sup>-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA* 14, 263-274.
- Chendrimada T P, Finn K J, Ji X, Baillat D, Gregory R I, Liebhaber S A, Pasquinelli A E, Shiekhattar R (2007).** MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823-828.
- Chernov K G, Curmi P A, Hamon L, Mechulam A, Ovchinnikov L P, Pastre D (2008).** Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP. *FEBS Letters* 582, 2875-2881.
- Chiou T J, Aung K, Lin S I, Wu C C, Chiang S F, Su C L (2006).** Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 412-421.
- Chu C Y und Rana T M (2006).** Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4, e210.
- Cogoni C, Irelan J T, Schumacher M, Schmidhauser T J, Selker E U, Macino G (1996).** Transgene silencing of *al-1* gene in vegetative cells of *is* mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interaction or DNA methylation. *EMBO J.* 15, 3153-3163.
- Cole C N und Scarcelli J J (2006).** Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18, 299-306.
- Craig A W, Haghghat A, Yu A T, Sonenberg N (1998).** Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392, 520-523.
- Crittenden S L, Bernstein D S, Bachorik J L, Thompson B E, Gallegos M, Petcherski A G, Moulder G, Barstead R, Wickens M, Kimble J (2002).** A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 417, 660-663.
- Dangl J L, Hauff S, Lipphardt S, Hahlbrock H, Sheel D (1987).** Parsley protoplasts retain differential responsiveness to u.v. light and fungal elicitor. *EMBO J* 6, 2551-2556.
- Das P P, Bagijn M P, Goldstein L D, Woolford J R, Lehrbach N J, Sapetschnik A, Buhecha H R, Gilchrist M J, Howe K L, Stark R, Matthews N, Berezikov E, Ketting R F, Tavaré S, Miska E A (2008).** Piwi and piRNAs Act Upstream of an Endogenous siRNA Pathway to Suppress Tc3 Transposon Mobility in the *Caenorhabditis elegans* Germline. *Molecular Cell*, 2008. 31(1), 79-90.
- Denli A M, Tops B B, Plasterk R H, Ketting R F, Hannon G J (2004).** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (7014), 231-235.
- Dezulian T, Remmert M, Palatnik J F, Weigel D, Huson D H (2006).** Identification of plant microRNA homologs. *Bioinformatics* 22(3), 359-360.

- Dong C H, Hu X, Tang W, Zheng X, Kim Y S, Lee B H, Zhu J K (2006).** A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Mol Cell Biol* 26(24), 9533-9543.
- Doye V und Hurt E (1997).** From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* 9(3), 401-411.
- Du T und Zamore P D (2005).** microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132(21), 4645-4652.
- Dugas D V und Bartel B (2004).** MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7, 512-520.
- Dunn E F, Hammell C M, Hodge C A, Cole C N (2005).** Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev* 19, 90-103.
- Eamens A L, Smith N A, Curtin S J, Wang M-B, Waterhouse P M (2009).** The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA Journal* 15(12), 2219-35.
- Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T (2001).** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E (2007a).** P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27, 3970-3981.
- Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang S F, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E (2007b).** Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* 21, 2558-2570.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007c).** P-bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8, 9-22.
- Eystathioy T, Chan E K, Tenenbaum S A, Keene J D, Griffith K, Fritzler M J (2002).** A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13, 1338-1351.
- Fahlgren N, Howell M D, Kasschau K D, Chapman E J, Sullivan C M, Cumbie J S, Givan S A, Law T F, Grant S R, Dangl J L, Carrington J C (2007).** High-Throughput Sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for Frequent Birth and Death of MIRNA Genes. *PLoS One* 14:2:e219.
- Fahrenkrog B, Stoffler D, Aebi U (2001).** Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* 259, 95-117.
- Farazi T A, Juranek S A, Tuschl T (2008).** The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* 135, 1201-1214.
- Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N (2008).** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9(2), 102-114.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj I W (1997).** CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.

- Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga M I, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcia J A, Paz-Ares J (2007).** Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity *Nature Genetics* 39, 1033 – 1037.
- Frey S und Görlich D (2007).** A saturated FG-Repeats hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell* 130, 512-523.
- Frohman M A, Dush M K, Martin G R (1988).** Rapid production of cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8998-9002.
- Fujii H, Chiou T J, Lin S I, Aung K, Zhu J K (2005).** A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 2038-2043.
- Gallie D R (1998).** A tale of two termini: A functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216, 1-11.
- Gandikota M, Birkenbihl R P, Hohmann S, Cardon G H, Saedler H, Huijser P (2007).** The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J* 49, 683-93.
- Garcia D (2008).** A miRacle in plants development: role of microRNAs in cell differentiation and patterning. *Semin Cell Dev Biol* 19, 586-595.
- Gascioli V, Mallory A C, Bartel D P, Vaucheret H (2005).** Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing transacting siRNAs. *Curr Biol* 15, 1494-1500.
- Gendrel A-V und Colot V (2005).** Arabidopsis epigenetics: When RNA meets chromatin. *Curr Opin Plant Biol* 8, 142-147.
- Ghildiyal M, Seitz H, Horwich M D, Li C, Du T, Lee S, Xu J, Kittler E L W, Zapp M L, Wenig Z, Zamore P D (2008).** Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in Drosophila somatic cells. *Science* 320, 1077-1081.
- Ghildiyal M und Zamore P D (2009).** Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94-108
- Gilbert W (1986).** Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618.
- Gingras A C, Raught B, Sonenberg N (1999).** eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68, 913-963.
- Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, Grocock R J, Van Dongen S, Inoue K, Enright A J, Schier A F (2006).** Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.
- Gocal G F, Sheldon C C, Gubler F, Moritz T, Bagnall D J, MacMillan C P, Li S F, Parish R W, Dennis E S, Weigel D, King R W (2001).** GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 127, 1682-1693.
- Golden T A, Schauer S E, Lang J D, Pien S, Mushegian A R, Grossniklaus U, Meinke D W, Ray A (2002).** SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130(2),808-22.

**Gong Z, Dong C H, Lee H, Zhu J, Xiong L, Gong D, Stevenson B, Zhu J K (2005).** A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 256-267.

**Griffiths-Jones S, Grocock R J, van Dongen S, Bateman A, Enright A J (2006).** miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucl Acids Res* 34, D140-D144.

**Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie D L, Fire A, Ruvkun G, Mello C C (2001).** Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106(1), 23-24.

**Gruter P, Tabernero C, von Kobbe C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber B K, Izaurralde E (1998).** TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* 1, 649-659.

**Guddeti S, Zhang D C, Li A L, Leseberg C H, Kang H, Li X G, Zhai W X, Johns M A, Mao L (2005).** Molecular evolution of the rice miR395 gene family. *Cell Res* 15, 631-638.

**Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. (1983).** The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849-57.

**Guo H S, Xie Q, Fei J F, Chua N H (2005).** MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* 17, 1376-1386.

**Gussow D und Clackson T (1989).** Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucl Acids Res* 17, 4000.

**Gutierrez-Nava M, Aukerman M J, Sakai H, Tingey S V, Williams R W (2008).** Artificial trans-Acting siRNAs Confer Consistent and Effective Gene Silencing. *Plant Physiol* 147, 543-551.

**Haasen D, Köhler C, Neuhaus G, Merkle T (1999).** Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 20, 695-705.

**Hain R, Stabel P, Czernilofsky P, Steinbiß H-H, Herrera-Estrella L, Schell J (1985).** Uptake, integration, expression and genetic transmission of selectable chimeric gene by plant protoplasts. *Mol Gen Genet* 199, 161-168.

**Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671-4679.

**Han M H, Goud S, Song L, Fedoroff N (2004).** The Arabidopsis double-strand binding-protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1093-1098.

**Hannon G J (2002).** RNA interference. *Nature* 418, 244-251.

**Haseloff J, Siemering K R, Prasher D C, Hodge S (1997).** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2122-2127.

**Hecht V, Stiefel V, Delseny M, Gallois P (1997).** A new *Arabidopsis* nucleic acid-binding protein gene is highly expressed in dividing cells during development. *Plant Mol Biol* 34, 119-124.

**Henderson I R, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers B C, Green P J, Jacobsen S E (2006).** Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics* 38, 721-725.

**Hernandez-Pinzon I, Yelina N E, Schwach F, Studholme D J, Baulcombe D, Dalmay T (2007).** SDE5, the putative homologue of a human mRNA export factor, is required for transgene silencing and accumulation of trans-acting endogenous siRNA. *Plant J* 50,140-148.

**Hilson P, Carroll K L, Masson P H (1993).** Molecular characterization of PAB2, a member of the multigene family coding for poly(A)-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 103, 525-533.

**Hinas A, Reimegard J, Wagner EG, Nellen W, Ambros VR, Soderbom F (2007).** The small RNA repertoire of *Dictyostelium discoideum* and its regulation by components of the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 35, 6714-6726.

**Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T (2005).** Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 57, 173-188.

**Ho S N, Hunt H D, Horton R M, Pullen J K, Pease L R (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

**Ho J H-N, Kallstrom G, Johnson A W (2000).** Nmd3p is a Crm1pdependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* 51, 1057-1066.

**Hodge C A, Colot H V, Stafford P, Cole C N (1999).** Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J* 18, 5778-5788.

**Horwich M D, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, Zamore P D (2007).** The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* 17(14), 1265-1272.

**Hutten S und Kehlenbach R H (2007).** CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond, *Trends Cell Biol.* 17, 193-201.

**Hutvagner G und Zamore P D (2002).** A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.

**Ingelfinger D, Arndt-Jovin D J, Luhrmann R, Achsel T (2002).** The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8, 1489-1501.

**Izant J G und Weintraub H (1984).** Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36, 1007-15.

**Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, Kobayashi S V, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley P S (2003).** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635–637.

**Jacob Y, Mongkolsiriwatana C, Velez K M, Kim SY, Michaels SD (2007).** The nuclear pore protein AtTPR is required for RNA homeostasis, flowering time, and auxin signaling. *Plant Physiol* 144(3), 1383-1390.

**Jacob Y, Michaels S D (2008).** Peering through the pore: The role of AtTPR in nuclear transport and development. *Plant Signal Behav* 3(1),62-64.

**Jacobson A (1996).** Poly(A) metabolism and translation: The closed loop model. In *Translational control* (eds. J W B Hershey et al.), 451-480.

**Jones-Rhoades M W und Bartel D P (2004).** Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced microRNA. *Mol Cell* 14, 787-799.

**Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B (2006).** MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.

**Kasschau K D, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman E J, Krizan K A, Carrington J C (2003).** P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* 4, 205-217.

**Katahira J, Strasser K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung J U, Hurt E (1999).** The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* 18, 2593-2609.

**Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A Jr, Zhu J K, Staskawicz B J, Jin H (2006).** A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18002–18007.

**Kerschen A, Napoli C A, Jorgensen R A, Müller A E (2004).** Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Lett* 566, 223-228.

**Khaleghpour K, Kahvejian A, De Crescenzo G, Roy G, Svitkin Y V, Imataka H, O'Connor-McCourt M, Sonenberg N (2001).** Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21, 5200-5213.

**Khanam T, Muddashetty R S, Kahvejian A, Sonenberg N, Brosius J (2006).** Poly(A)-binding Protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1 + 2 and 3 + 4. *RNA Biol* 3, 170-177.

**Khvorova A, Reynolds A, Jayasena S D (2003).** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.

**Kidner C A und Martienssen R A (2004).** Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428, 81-84.

**Kim J, Jung J H, Reyes J L, Kim Y S, Kim S Y, Chung K S, Kim J A, Lee M, Lee Y, Narry Kim V, Chua N H, Park C M (2005).** microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J* 42, 84-94.

- Kiriakidou M, Tan G S, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson P T, Mourelatos Z. (2007).** An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129(6), 1141-1151.
- Kmieciak M, Simpson C G, Lewandowska D, Brown J W, Jarmolowski A (2002).** Cloning and characterization of two subunits of *Arabidopsis thaliana* nuclear cap-binding complex. *Gene* 283, 171-183.
- Kombrink E und Hahlbrock K (1986).** Responses of Cultured Parsley Cells to Elicitors from Phytopathogenic Fungi. *Plant Phys* 81, 216-221.
- Koncz C und Schell J (1986).** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* 204, 383-396
- Koornneef, M. (1990).** Mutations affecting the testa color in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* 28, 1-4.
- Kosova B, Panté N, Rollenhagen C, Hurt E (1999).** Nup192p is a conserved nucleoporin with a preferential location at the inner site of the nuclear membrane. *J Biol Chem* 274(32), 22646-2265.
- Kozlov G, Trempe J F, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K (2001).** Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4409-4413.
- Krek A, Grun D, Poy M N, Wolf R, Rosenberg L, Epstein E J, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus K C, Stoffel M, Rajewsky N (2005).** Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, Sands J, Gottschling D E, Cech T R (1982).** Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-157.
- Krysan P J, Young J C, Sussmann M R (1999).** T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2283-2290.
- Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M et al. (1997).** Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem* 272, 29742-29751.
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner E P, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S (1999).** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16), 9112-9117.
- Kühn U und Wahle E (2004).** Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1678, 67-84.
- Kurihara Y und Watanabe Y (2004).** *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101/34, 12753-12758.



- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006).** The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12, 206-212.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001).** Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002).** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- Lai E C, Tomancak P, Williams R W, Rubin G M (2003).** Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 4, R 42.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004).** The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14, 2162-2167.
- Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, Bartel D P (2001).** An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J (2004).** MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131, 4311-4322.
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose S P (2005).** microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9412-9417.
- Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V (1993).** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee R C und Ambros V (2001).** An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee Y, Jeon K, Lee J T, Kim S, Kim V N (2002).** MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 4663-4670.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim V N (2003).** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K H, Lee S, Baek S H, Kim VN (2004).** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.
- Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Burge C B (2003).** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Lewis B P, Burge C B, Bartel D P (2005).** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005).** Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 1501-1507.
- Lim L P, Glasner M E, Yekta S, Burge C B, Bartel D P (2003).** Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.

- Lin W C, Li S C, Lin W C, Shin J W, Hu S N, Yu X M, Huang T Y, Chen S C, Chen H C, Chen S J, Huang P J, Gan R R, Chiu C H, Tang P (2009).** Identification of microRNA in the protist *Trichomonas vaginalis*. *Genomics* 93(5):487-493.
- Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T, Martienssen R (2003).** Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol* 1:E67.
- Liu Q, Rand T A, Kalidas S, Du F, Kim H-E, Smith D P, Wang X (2003).** R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921-1925.
- Liu J, Valencia-Sanchez M A, Hannon G J, Parker R (2005).** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
- Liu C, Zhang L, Sun J, Luo Y, Wang M-B, Fan Y-L, Wang L (2010).** A simple artificial microRNA vector based on *ath-miR169d* precursor from *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep* 37(2), 903-909.
- Llave C, Xie Z, Kasschau K D, Carrington J C (2002a).** Cleavage of *Scarcecrow*-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297, 2053-2056.
- Llave C, Kasschau K D, Rector M A, Carrington J C (2002b).** Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14, 1605-1619.
- Lu C, Tej S S, Luo S, Haudenschield C D, Meyers B C, Green P J (2005).** Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 309, 1567-1569.
- Lu C, Kulkarni K, Souret F F, Muthuvalliappan R, Tej S S, Poethig R S, Henderson I R, Jacobsen S E, Wang W, Green P J, Meyers B C (2006).** MicroRNAs and other small RNAs enriched in the *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res* 16,1276-1288.
- Lu Q, Tang X, Tian G, Wang F, Liu K, Nguyen V, Kohalmi S E, Keller W A, Tsang E W T, Harada J J, Rothstein S J, Cui Y (2010).** *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. *Plant J* 61(2), 259-270.
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton M K (1999).** The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* 126, 469-481
- Ma J B, Ye K, Patel D J (2004).** Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318-322.
- Mallory A C, Dugas D V, Bartel D P, Bartel B (2004a).** MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* 14, 1035-1046.
- Mallory A C, Reinhart B J, Jones-Rhoades M W, Tang G, Zamore P D, Barton M K, Bartel D P (2004b).** MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: Importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J* 23, 3356-3364.
- Mallory A C, Bartel D P, Bartel B (2005).** MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17, 1360-1375.

- Mallory A C und Vaucheret H (2006).** Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* 38 Suppl 1, S31-36.
- Mallory A C und Vaucheret H (2009).** ARGONAUTE1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Reports* 10(5), 521-526.
- Mangus D A, Evans MC, Jacobson A (2003).** Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4, 223.
- Mangus D A, Smith M M, McSweeney J M, Jacobson A (2004).** Identification of factors regulating poly(A) tail synthesis and maturation. *Mol Cell Biol* 24, 4196-4206.
- Marhoul J F und Adams T H (1996).** *Aspergillus fabM* encodes an essential product that is related to poly(A)-binding proteins and activates development when overexpressed. *Genetics* 144, 1463-1470.
- Maroney P A, Yu Y, Fisher J, Nilsen T W (2006).** Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Struct Mol Biol* 13, 1102-1107.
- Mathews, D H, Sabina J, Zuker M, Turner D H (1999).** Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J Mol Biol* 288, 911-940.
- Mattaj I W und Englmeier L (1998).** Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- Matzke M A, Primig M, Trnovski J, Matzke A J M (1989).** Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *The EMBO Journal* 8, 643-649.
- Merkle T (2008).** Nuclear export of proteins and RNA. In: Functional organization of the plant nucleus. Meier I (ed.), *Plant Cell Monographs*, Springer-Verlag Berlin HD NY.
- Mette M F, van der Winden J, Matzke M, Matzke A J (2002).** Short RNAs can identify new candidate transposable element families in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130, 6-9.
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon G J, Qi Y (2008).** Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 50 Terminal Nucleotide. *Cell* 133, 1-12.
- Millar A A und Gubler F (2005).** The *Arabidopsis* GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 17, 705-721.
- Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi M C (2005).** Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 19, 2837-2848.
- Molnar A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyan J (2005).** Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol* 79, 7812-7818.
- Molnar A, Schwach F, Studholme D J, Thuenemann E C, Baulcombe D C (2007).** miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447, 1126-1129.

**Moore M S und Blobel G (1993).** The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365, 661-663.

**Mullis K B und Faloona F A (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.

**Murashige T und Skoog F (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.

**Murphy R und Went S R (1996).** An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal. *Nature* 383, 357-360.

**Nakielny S und Dreyfuss G (1999).** Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99, 677-690.

**Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990).** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.

**Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones J D (2006).** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436-439.

**Neville M, Stutz F, Lee L, Davis L I, Rosbash M (1997).** The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* 7, 767-775.

**Niemeier S (2006).** Synthetische microRNAs als Mittel zur Erzeugung stabiler knockdowns für Genfamilien in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit

**Niemeier S, Rößiger T, Benzel A, Köther K I, Merkle T (2010).** Arabidopsis Poly(A)-binding proteins are important for plant development, shuttle between the nucleus and the cytoplasm and function in the nuclear export of mRNA. (in Vorbereitung)

**Niu Q W, Lin S S, Reyes J L, Chen K C, Wu H W, Yeh S D, Chua N H (2006).** Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol* 24(11), 1420-1428.

**Nottrott S, Simard M J, Richter J D (2006).** Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Struct Mol Biol* 13, 1108-1114.

**Olsen P H und Ambros V (1999).** The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680.

**Orban T I und Izaurralde E (2005).** Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11, 459-469.

**Ospina J K, Gonsalvez G B, Bednenko J, Darzynkiewicz E, Gerace L, Matera A G (2005)** Cross-talk between snurportin1 subdomains. *Mol Biol Cell* 16(10), 4660-71.

**Ossowski S, Schwab R, Weigel D (2008).** Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J* 53(4), 674-690.

- Overhoff M, Alken M, Far R K, Lemaitre M, Lebleu B, Sczakiel G, Robbins I (2005).** Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* 348(4):871-881.
- Pak J und Fire A (2007).** Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315, 241-244.
- Palanivelu R, Belostotsky D A, Meagher R B (2000a).** Arabidopsis thaliana poly (A) binding protein2 (PAB2) functions in yeast translational and mRNA decay processes. *Plant J* 22, 187-198.
- Palanivelu R, Belostotsky D A , Meagher R B (2000b).** Conserved expression of *Arabidopsis thaliana* poly (A) binding protein 2 (PAB2) in distinct vegetative and reproductive tissues. *Plant J* 22, 199-210.
- Palatnik J F, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington J C, Weigel D (2003).** Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257- 263.
- Panté N und Kann M (2002).** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13, 425-434.
- Papp I, Mette F, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer S, Ray A, van der Winden J, Matzke M, Matzke A (2003).** Evidence for nuclear processing of plant microRNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol* 132, 1392-1390.
- Parizotto E A, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O (2004).** In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev* 18, 2237-2242.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002).** CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12, 1484-1495.
- Park M, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig S (2005).** Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* 102, 3691-3696.
- Parker R und Song H (2004).** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Struct Mol Biol* 11, 121-127.
- Parker J S und Barford D (2006).** Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem Sci* 31(11), 622-630.
- Parker R und Sheth U (2007).** P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.
- Parry G, Ward S, Cernac A, Dharmasiri S, Estelle M (2006).** The Arabidopsis SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *Plant Cell* 18(7), 1590-603.
- Pasquinelli A E, Reinhart B J, Slack F, Martindale M Q, Kuroda M I, Maller B, Hayward D C, Ball E E, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000).** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.

- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM (2000).** GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* 156, 1349-1362.
- Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht H L, Poethig R S (2004).** SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 18, 2368-2379.
- Peters L und Meister G (2007).** Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26, 611-623.
- Petersen C P, Bordeleau M E, Pelletier J, Sharp P A (2006).** Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-542.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer F, Chien M, Russo J, Ju J, John B, Enright A, Marks D, Sander C, Tuschl T (2004).** Identification of virus-encoded miRNAs. *Science* 304, 734-736.
- Piriyapongsa J und Jordan I K (2008).** Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA* 14, 814-821.
- Politz J C, Tuft R A, Prasanth K V, Baudendistel N, Fogarty K E, Lifshitz L M, Langowski J, Spector D L, Pederson T (2006).** Rapid, Diffusional Shuttling of Poly(A) RNA between Nuclear Speckles and the Nucleoplasm. *Mol Biol Cell* 17, 1239-1249.
- Qi D, Jin H, Lilja T, Mannervik M (2006).** Drosophila Reptin and other TIP60 complex components promote generation of silent chromatin. *Genetics* 174(1), 241-251.
- Qu J, Ye J, Fang R (2007).** Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol* 81(12):6690-6699.
- Rabino I und Mancinelli A L (1986).** Light, Temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiol* 81,922-924.
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel D P (2006).** A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20, 3407-3425.
- Rehmsmeier M, Steffen P, Höchsmann M, Giegerich R. (2004).** Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10, 1507-1517.
- Reinhart B J, Slack F J, Basson M, Pasquinelli A E, Bettinger J C, Rougvie A E, Horvitz H R, Ruvkun G (2000).** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P (2002).** MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616-26.
- Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, Burge C B, Bartel B, Bartel D P (2002).** Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513-520.
- Rogers G W Jr, Richter N J, Lima W F, Merrick W C (2001).** Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* 276, 30914-30922.
- Rose A, Patel S, Meier I (2004).** The plant nuclear envelope. *Planta* 218, 327-336.

**Roxlau T (2009).** Komplementierung stabiler *knockdown*-Linien für RNA-bindende Proteine mit Hilfe microRNA-resistenter cDNAs in *Arabidopsis thaliana*". Bachelorarbeit, Lehrstuhl für Genomforschung, Universität Bielefeld

**Ryan K J und Wente S R (2000).** The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 12, 361-371.

**Sachs A B, Davis R W, Kornberg R D (1987).** A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol* 7, 3268-3276.

**Sachs A B und Davis R W (1989).** The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell* 58(5), 857-867.

**Sachs A B, Sarnow P, Hentze M W (1997).** Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89, 831-838.

**Saitou N und Nei M (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.

**Santos-Rosa H, Moreno H, Simos G, Segref A, Fahrenkrog B, Panté N, Hurt E (1998).** Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* 18(11):6826-38.

**Schmitt C, von Kobbe C, Bachi A, Pante N, Rodrigues J P, Boscheron C, Rigaut G, Wilm M, Seraphin B, Carmo-Fonseca M, Izaurralde E (1999).** Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J* 18, 4332-4347.

**Schwab R, Palatnik J F, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005).** Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8, 517-527.

**Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006).** Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1121-1133.

**Schwarz D S, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore P D (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

**Sega G A (1984).** Review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 134(2-3), 113-42.

**Seggerson K, Tang L, Moss E G (2002).** Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243, 215-225.

**Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Luhrmann R, Hurt E (1997).** Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *EMBO J* 16, 3256-3271

**Sen G L und Blau H M (2005).** Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633-636.

**Sheahan J J und Rehnitz G A (1992).** Flavonoid-specific staining of *Arabidopsis thaliana*. *BioTechniques* 13, 880-883.

- Shirley B W, Kubasek W L, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel F M, Goodman H M (1995).** Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J* 8(5), 659-71.
- Siddiqui N, Mangus D A, Chang T C, Palermino J M, Shyu A B, Gehring K (2007).** Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 282, 25067-25075.
- Sigrist S J, Thiel P R, Reiff D F, Lachance P E, Lasko P, Schuster C M (2000)** Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* 405, 1062-1065.
- Sijen T, Steiner F A, Thijssen K L, Plasterk R H (2007).** Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315, 244-247.
- Smith N, Singh S, Wang M, Stoutjesdijk P, Green A, Waterhouse P (2000).** Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320.
- Soong R, Ruschoff, J. and Tabiti, K. (2000)** Detection of colorectal micrometastasis by quantitative RT-PCR of cytokeratin 20 mRNA. Roche Diagnostics internal Publication
- Stade K, Ford C S, Guthrie C, Weis K (1997).** Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90,1041-1050.
- Stewart M (2007).** Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Mol Cell* 25, 327-330.
- Stitt M und Sonnewald U (1995).** Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46, 341-368.
- Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U (1999).** The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11(3), 391-401.
- Strässer K, Bassler J, Hurt E (2000).** Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 150(4), 695-706.
- Sunkar R und Zhu J K (2004).** Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2001-2019.
- Sunkar R, Girke T, Jain P K, Zhu J K (2005).** Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell* 17, 1397-1411.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K (2006).** Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18(8), 2051-2065.
- Sunkar R und Zhu J K (2007).** MicroRNAs and Short-interfering RNAs in Plants. *Integr Biol* 49(6), 817-826.
- Tajima F und Nei M (1984).** Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 1, 269-285.
- Tam O H, Aravin A A, Stein P, Girard A, Murchison E P, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz R M, Hannon G J (2008).** Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534-538.



**Thakurta A G, Gopal G, Yoon J H, Saha T, Dhar R (2004).** Conserved nuclear export sequences in *Schizosaccharomyces pombe* Mex67 and human TAP function in mRNA export by direct nuclear pore interactions. *J Biol Chem* 279, 17434-17442.

**Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

**Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, Heinrich C, Hentze M W, Ladurner A G (2007).** A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 14(10):897-903.

**Tiwari S, Schulz R, Ikeda Y, Dytham L, Bravo J, Mathers L, Spielman M, Guzman P, Oakey R J, Kinoshita T, Scott R J (2008).** Maternally expressed PAB C-terminal, a novel imprinted gene in Arabidopsis, encodes the conserved C-terminal domain of polyadenylate binding proteins. *Plant Cell* 20, 2387-2398.

**Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore P D (2004).** A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.

**Tomari Y und Zamore P D (2005).** MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 15, R61-4.

**Vagin V V, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore P D (2006).** A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313, 320-324.

**Van de Peer Y und De Wachter Y (1994).** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* 10, 569-570.

**Van der Krol A, Lenting P, Veenstra J, van der Meer I, Koes R, Gerats A, Mol J, Stuitje A (1988).** An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333, 866-869.

**van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Seraphin B (2002).** Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* 21, 6915-6924.

**Vasu S K und Forbes D J (2001).** Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* 13, 363-375.

**Vasudevan S, Tong Y, Steitz J A (2007).** Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.

**Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel D P (2004).** The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18, 1187-1197.

**Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory A C, Hilbert J L, Bartel D P, Crete P (2004).** Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell* 16, 69-79.

- Vazquez F (2006).** Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends Plant Sci* 11(9), 460-468.
- Voinnet O (2009).** Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. *Cell* 136, 669-687.
- Wang X J, Reyes J L, Chua N H, Gaasterland T (2004).** Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* 5, R65.
- Wang M B und Metzloff M (2005).** RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8, 216-222.
- Wang J W, Wang L J, Mao Y B, Cai W J, Xue H W, Chen X Y (2005).** Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2204-2216.
- Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D, Hervé P (2008).** Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS One* 3(3):e1829.
- Watson J M, Fusaro A F, Wang M, Waterhouse P M (2005).** RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett* 579, 5982-5987.
- Weis K (1998).** Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci* 23, 185-189.
- Wesley S, Helliwell C, Smith N, Wang M, Rouse D, Liu Q, Gooding P, Singh S, Abbott D, Stoutjesdijk P, Robinson S, Gleave A, Green A, Waterhouse P (2001).** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27, 581-590.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993).** Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75(5), 855-862.
- Williams L, Carles C C, Osmont K S, Fletcher J C (2005).** A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the Arabidopsis ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9703-9708.
- Willmann M R und Poethig R S (2007).** Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 10, 503-511.
- Winkel-Shirley B (2001).** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126, 485-493.
- Woodcock D M, Crowther P J, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith S S, Michael M Z, Graham M W (1989).** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469-3478
- Wu L, Fan J, Belasco J G (2006).** microRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4034-4039.
- Wu L und Belasco J G (2008).** Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 29(1), 1-7.
- Xie Z, Kasschau K D, Carrington, J C (2003).** Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 13, 784-789.

- Xie Z, Johansen L K, Gustafson A M, Kasschau K D, Lellis A D, Zilberman D, Jacobsen S E, Carrington J C (2004).** Genetic functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2:E104.
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan S A, Carrington J C (2005).** Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol* 138, 2145-2154.
- Yan K S, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou M M (2003).** Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426(6965), 468-474.
- Yang Z, Ebright Y W, Yu B, Chen X (2006).** HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 34, 667-675.
- Yekta S, Shih I H, Bartel, D P (2004).** Micro-RNA directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594-596.
- Yi R, Qin Y, Macara I G, Cullen B R (2003).** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17(24), 3011-3016.
- Yoshikawa M, Peragine A, Park M Y, Poethig R S (2005).** A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 19, 2164-2175.
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett R W, Steward R, Chen X (2005).** Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, Bartel D P (2000).** RNAi: doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zeng Y, Wagner E J, Cullen B R (2002).** Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9, 1327-1333.
- Zhang B H, Pan X P, Wang Q L, Cobb G P, Anderson T A (2005).** Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res* 15, 336-360.
- Zhang B, Pan X, Cannon C H, Cobb G P, Anderson T A (2006).** Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* 46, 243-259.
- Zhao Q, Leung S, Corbett A H, Meier I (2006).** Identification and characterization of the Arabidopsis orthologs of nuclear transport factor 2, the nuclear import factor of ran. *Plant Physiol* 140, 869-878.
- Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu J K (2007).** Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J* 26(6), 1691-701.
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003).** ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.

## 6 Publikationen

**Alves-Junior L , Niemeier S, Hauenschild A, Rehmsmeier M, Merkle T (2009).** Comprehensive prediction of novel microRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res 37(12):4010-21.

**Niemeier S und Merkle T (2009).** Improvement of the generation of stable knockdown lines using primary synthetic microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgh 2009, Poster Abstract Book, P507.

**Alves-Junior L , Niemeier S, Hauenschild A, Rehmsmeier M, Merkle T (2009).** Comprehensive prediction of novel microRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgh 2009, Poster Abstract Book, P508.

**Niemeier S, Alves-Junior L , Merkle T (2010).** Improvement of the design and generation of highly specific plant knockdown lines using primary synthetic microRNAs (pri-smiRNAs). Zur Publikation eingereicht.

**Niemeier S, Rößiger T, Benzel A, Köther K I, Merkle T (2010).** Arabidopsis Poly(A)-binding proteins are important for plant development, shuttle between the nucleus and the cytoplasm and function in the nuclear export of mRNA. (in Vorbereitung)

## 7 Anhang

### 7.1 *RNAcalibrate* Ergebnisse

smiRNA(CHS): 1.867237, 0.192864

smiRNA(CHS)-Var1: 2.063605, 0.161541

smiRNA(CHS)-Var2: 2.097083, 0.152607

smiRNA(CHS)-Var3: 1.700213, 0.106213

smiRNA(CHS)-Var4: 2.164384, 0.151484

smiRNA(PABP)-1: 2.021968, 0.165062

smiRNA(PABP)-3: 2.141565, 0.166129

smiRNA(PABP)-3cac: 2.128262, 0.184834

## 7.2 RNAhybrid Ergebnisse

### 7.2.1 smiRNA(CHS)

target: At1g49390.1 *off-target*  
length: 1047  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.1 kcal/mol  
p-value: 0.000944  
position 116  
target 5' C G C 3'  
GGUGCCG AGAUGGAUAAU  
CCACGGU UCUGCCUGAA  
miRNA 3' A AC 5'

target: At1g52905.1  
length: 144  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.4 kcal/mol  
p-value: 0.000612  
position 108  
target 5' C A CG C 3'  
GCCGUGGACG GGC U  
CGGUAUCUGC CUG A  
miRNA 3' CCA UA AC 5'

target: At1g53625.1  
length: 270  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -27.8 kcal/mol  
p-value: 0.000915  
position 198  
target 5' U G G UG GG G 3'  
GGUG CG AGACGG GU UG  
CCAC GU UCUGCC UA AC  
miRNA 3' G A UG A 5'

target: At2g35460.1  
length: 717  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.9 kcal/mol  
p-value: 0.000936  
position 501  
target 5' C G G G 3'  
GGUGCC GUGGACGGA A  
CCACGG UAUCUGCCU U  
miRNA 3' G AAAC 5'

target: At2g47760.1  
length: 1317  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.5 kcal/mol  
p-value: 0.000674  
position 407  
target 5' U UG A 3'  
GGUGCCAUGG GG CAUU  
CCACGGUAUC CC GUAA  
miRNA 3' UG U AC 5'

target: At3g04230.1  
length: 441  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.2 kcal/mol  
p-value: 0.000574  
position 211  
target 5' C C UG A 3'  
GUGCCA GGGCGG GU  
CACGGU UCUGCC UA  
miRNA 3' C A UG AAC 5'

target: At3g16230.1  
length: 1350  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.7 kcal/mol  
p-value: 0.000635  
position 115  
target 5' A A 3'  
GUGCCAUGGAUGGAUAAU  
CACGGUAUCUGCCUGUA  
miRNA 3' C AAC 5'

target: At4g15955.1  
length: 537  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.2 kcal/mol  
p-value: 0.000473  
position 317  
target 5' A U UG G 3'  
GGUG UCGUAG GGACAU  
CCAC GGUAUC CCUGUA  
miRNA 3' UG AAC 5'

target: At5g01300.1  
length: 489  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.7 kcal/mol  
p-value: 0.000300  
position 197  
target 5' U G 3'  
GGUGCCAUGGACGG UGU  
CCACGGUAUCUGCC GUA  
miRNA 3' U AAC 5'

target: At5g02730.1  
length: 618  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.4 kcal/mol  
p-value: 0.000948  
position 432  
target 5' U U U A 3'  
GGUGCCAUG GCGG CAUU  
CCACGGUAU UGCC GUAA  
miRNA 3' C U AC 5'

target: At5g03350.1  
length: 825  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.4 kcal/mol  
p-value: 0.000912

position 750  
target 5' U            C U            G 3'  
          GGUGCCAUGGG CG GGCGUU  
          CCACGGUAUCU GC CUGUAA  
miRNA 3'                            AC 5'

target: At5g13930        *CHS*  
length: 1188  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -44.0 kcal/mol  
p-value: 0.000003

position 771  
target 5' U                            A 3'  
          GGUGCCAUAGACGGACAUUUG  
          CCACGGUAUCUGCCUGUAAAC  
miRNA 3'                            5'

target: At5g53720.1  
length: 303  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.2 kcal/mol  
p-value: 0.000900

position 217  
target 5'    A                            A 3'  
          CCAUAGACGGACG  
          GGUAUCUGCCUGU  
miRNA 3' CCAC                            AAAC 5'

## 7.2.2 smiRNA(CHS)-Var1

target: At1g52905.1  
length: 144  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.3 kcal/mol  
p-value: 0.000531  
position 108  
target 5' C A C C 3'  
GCCGUGGACG GG CGU  
CGGUAUCUGC CU GCA  
miRNA 3' CCA AAU 5'

target: At1g53625.1  
length: 270  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.5 kcal/mol  
p-value: 0.000235  
position 198  
target 5' U G G UG G 3'  
GGUG CG AGACGG GU  
CCAC GU UCUGCC CA  
miRNA 3' G A UG AAU 5'

target: At1g66790.1  
length: 183  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.7 kcal/mol  
p-value: 0.000710  
position 24  
target 5' C CC UG A 3'  
GGUGCC U GACGG G  
CCACGG A CUGCC C  
miRNA 3' U U UG AAAU 5'

target: At1g80390.1  
length: 540  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.9 kcal/mol  
p-value: 0.000866  
position 465  
target 5' U U 3'  
GUGCCGUGGAU GAUGUUUG  
CACGGUAUCUG CUGCAAU  
miRNA 3' C C 5'

target: At2g26840.1  
length: 822  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.2 kcal/mol  
p-value: 0.000473  
position 150  
target 5' A C A 3'  
GCCAUAGACG GGCGUU  
CGGUAUCUGC CUGCAA  
miRNA 3' CCA AU 5'

target: At2g26990.1  
length: 1320  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.3 kcal/mol  
p-value: 0.000626  
position 1125  
target 5' C G G 3'  
GUGCCA AGACGGAUGU  
CACGGU UCUGCCUGCA  
miRNA 3' C A AAU 5'

target: At2g37925.1  
length: 438  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.9 kcal/mol  
p-value: 0.000142  
position 401  
target 5' U G 3'  
CCGUGGGCGGGCGUUUA  
GGUAUCUGCCUGCAAU  
miRNA 3' CCAC 5'

target: At3g01920.1  
length: 924  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.9 kcal/mol  
p-value: 0.000388  
position 856  
target 5' U UG G 3'  
UGCCGUGGAUGG GUU  
ACGGUAUCUGCC CAA  
miRNA 3' CC UG AU 5'

target: At3g04230.1  
length: 441  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.4 kcal/mol  
p-value: 0.000103  
position 211  
target 5' C C UG A 3'  
GUGCCA GGGCGG GU  
CACGGU UCUGCC CA  
miRNA 3' C A UG AAU 5'

target: At3g09162.1  
length: 201  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.7 kcal/mol  
p-value: 0.000889  
position 41  
target 5' C G G A 3'  
GGU GU AUGG CGGACGU  
CCA CG UAUC GCCUGCA  
miRNA 3' G U AAU 5'



target: At3g13275.1  
length: 210  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.8 kcal/mol  
p-value: 0.000916  
position 2

target 5' U U 3'  
GUGUUGUGGACGGAU  
CACGGUAUCUGCCUG  
miRNA 3' C CAAAU 5'

target: At3g44140.1  
length: 216  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -27.7 kcal/mol  
p-value: 0.000505  
position 17

target 5' C GU UG G 3'  
GGUGCUG GAUGG GU  
CCACGGU CUGCC CA  
miRNA 3' AU UG AAU 5'

target: At3g47380.1  
length: 609  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.3 kcal/mol  
p-value: 0.000446  
position 499

target 5' C GG A 3'  
GG GUCAUGGAUGGGCG UA  
CC CGGUAUCUGCCUGC AU  
miRNA 3' A AA 5'

target: At4g15460.1  
length: 447  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.8 kcal/mol  
p-value: 0.000313  
position 101

target 5' U U A UG G 3'  
GG UGCCA AGGCGG GU  
CC ACGGU UCUGCC CA  
miRNA 3' A UG AAU 5'

target: At4g16240.1  
length: 129  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.4 kcal/mol  
p-value: 0.000810  
position 51

target 5' A AG UG A 3'  
GG GCCAUGG UGG G  
CC CGGUAUC GCC C  
miRNA 3' A U UG AAU 5'

target: At4g18280.1  
length: 474  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.6 kcal/mol  
p-value: 0.000409  
position 260

target 5' A A C UG C 3'  
GG GCCA AGACGG GUU  
CC CGGU UCUGCC CAA  
miRNA 3' A A UG AU 5'

target: At4g22212.1  
length: 267  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.2 kcal/mol  
p-value: 0.000582  
position 75

target 5' A AA G 3'  
G GUAGAUGGGCGUUUA  
C UAUCUGCCUGCAAU  
miRNA 3' CCA GG 5'

target: At4g22680.1  
length: 801  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.4 kcal/mol  
p-value: 0.000394  
position 42

target 5' A UG A 3'  
GG GCCGUGGACGG G  
CC CGGUAUCUGCC C  
miRNA 3' A UG AAAU 5'

target: At4g29030.1  
length: 348  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.8 kcal/mol  
p-value: 0.000700  
position 225

target 5' U CG UG G 3'  
GG GCU UAGGCGG GUUUG  
CC CGG AUCUGCC CAAAU  
miRNA 3' A U UG 5'

target: At5g01300.1  
length: 489  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.2 kcal/mol  
p-value: 0.000039  
position 197

target 5' U G 3'  
GGUGCCAUGGACGG UGU  
CCACGGUAUCUGCC GCA  
miRNA 3' U AAU 5'

target: At5g03100.1  
length: 924  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.7 kcal/mol  
p-value: 0.000824  
position 788

target 5' U G C UG A 3'  
GGUGC A AGACGG GUU  
CCACG U UCUGCC CAA  
miRNA 3' G A UG AU 5'

target: At5g03350.1  
length: 825  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.2 kcal/mol  
p-value: 0.000253  
position 750

target 5' U C U G 3'  
GGUGCCAUGGG CG GGCGUU  
CCACGGUAUCU GC CUGCAA  
miRNA 3' AU 5'

target: At5g10850.1  
length: 546  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.1 kcal/mol  
p-value: 0.000777

position 453  
target 5' A A 3'  
GGU CCAUGGA GGGCGUUUG  
CCA GGUAUCU CCUGCAAU  
miRNA 3' C G 5'

target: At5g13930.1 CHS  
length: 1188  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -38.3 kcal/mol  
p-value: 0.000024  
position 771

target 5' U A A 3'  
GGUGCCAUGACGGAC UUUG  
CCACGGUAUCUGCCUG AAU  
miRNA 3' C 5'

target: At5g28463.1  
length: 396  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.2 kcal/mol  
p-value: 0.000357  
position 321

target 5' U C 3'  
GUGCCAUGG UGGAUGUU  
CACGGUAUC GCCUGCAA  
miRNA 3' C U AU 5'

target: At5g41315.1 put. off-target  
length: 1914  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.8 kcal/mol  
p-value: 0.000947  
position 406

target 5' A C 3'  
UGCC UGGACGGACGUUUG  
ACGG AUCUGCCUGCAAU  
miRNA 3' CC U 5'

target: At5g53720.1  
length: 303  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.7 kcal/mol  
p-value: 0.000270  
position 217

target 5' A A 3'  
CCAUAGACGGACG  
GGUAUCUGCCUGC  
miRNA 3' CCAC AAU 5'

target: At5g64240.1  
length: 918  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.4 kcal/mol  
p-value: 0.000982  
position 28

target 5' C G C G 3'  
GGUGC G AGACGGAUGU  
CCACG U UCUGCCUGCA  
miRNA 3' G A AAU 5'

## 7.2.3 smiRNA(CHS)-Var2

```

target: At1g14980.1
length: 297
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -28.3 kcal/mol
p-value: 0.000564
position 202
target 5' C      U      UG A   3'
          UUCAGAG ACGG GU
          AAGGUCUC UGCC UA
miRNA 3' CC              UG AAU 5'

target: At1g20470.1
length: 441
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -28.8 kcal/mol
p-value: 0.000987
position 209
target 5' A      UU C      G      A 3'
          GGUUCC G GACGGA GUUUG
          CCAAGG C CUGCCU UAAAU
miRNA 3'      U U      G      5'

target: At1g28160.1
length: 738
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -32.7 kcal/mol
p-value: 0.000210
position 586
target 5' A A      G      3'
          GG UUCGGAGACGGAUA
          CC AAGGUCUCUGCCUGU
miRNA 3'      AAAU 5'

target: At1g29550.1      put. off-target
length: 723
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -31.7 kcal/mol
p-value: 0.000396
position 347
target 5' G      C      C 3'
          GGUUUCGGGGGCGGAU UUUA
          CCAAGGUCUCUGCCUG AAU
miRNA 3'      U      5'

target: At1g32290.1
length: 243
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -27.5 kcal/mol
p-value: 0.000633
position 21
target 5' U GG      U      UG G   3'
          GGU CCGGAG CGG GU
          CCA GGUCUC GCC UA
miRNA 3' A      U      UG AAU 5'

target: At1g32290.1
length: 243
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -27.1 kcal/mol
p-value: 0.000860
position 167
target 5' U GG      U      UG G   3'
          GGU CCGG GGCGG AU
          CCA GGUC CUGCC UA
miRNA 3' A      U      UG AAU 5'

target: At1g34720.1
length: 531
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -30.5 kcal/mol
p-value: 0.000451
position 458
target 5' C      G      UG G   3'
          GGUU CAGAGAUGG AU
          CCAA GUCUCUGCC UA
miRNA 3'      G      UG AAU 5'

target: At1g49390.1      put. off-target
length: 1047
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -31.7 kcal/mol
p-value: 0.000881
position 116
target 5' C      G      C 3'
          GGU CCGGAGAUGGAUAUU
          CCA GGUCUCUGCCUGUAA
miRNA 3' A      AU 5'

target: At1g53625.1
length: 270
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -29.3 kcal/mol
p-value: 0.000209
position 198
target 5' U GG      UG G   3'
          GGU CCGGAGACGG GU
          CCA GUCUCUGCC UA
miRNA 3' AG      UG AAU 5'

target: At1g60970.1
length: 534
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -29.7 kcal/mol
p-value: 0.000801
position 393
target 5' U      G      3'
          GUUCUGGAGACGGAU
          CAAGGUCUCUGCCUG
miRNA 3' C      UAAAA 5'

```

target: At2g11005.1  
length: 513  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.8 kcal/mol  
p-value: 0.000020  
position 234

target 5' U                   UG A     3'  
          GGUUC CAGGACGG G  
          CCAAGGUCUCUGCC U  
miRNA 3'                   UG AAU 5'

target: At2g14777.1  
length: 675  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.5 kcal/mol  
p-value: 0.000772  
position 497

target 5' C     G                   UG G     3'  
          GGUU CAGAGAUGG AU  
          CCAA GUCUCUGCC UA  
miRNA 3'                   G           UG AAU 5'

target: At2g15930.1  
length: 177  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.6 kcal/mol  
p-value: 0.000117  
position 142

target 5' C                   UG G     3'  
          UUCAGAGACGG GU  
          AGGUCUCUGCC UA  
miRNA 3' CCA               UG AAU 5'

target: At2g18380.1  
length: 624  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.3 kcal/mol  
p-value: 0.000187  
position 557

target 5' C                   A     3'  
          GGUUC CCGAGAUGGA  
          CCAAGGUCUCUGCCU  
miRNA 3'                   GUAAAU 5'

target: At2g21780.1  
length: 339  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.0 kcal/mol  
p-value: 0.000105  
position 56

target 5' U     U                   G     3'  
          GUUC CCGAGACGGAUAU  
          CAAG GUCUCUGCCUGUA  
miRNA 3' C                   AAU 5'

target: At2g26120.1  
length: 315  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.8 kcal/mol  
p-value: 0.000213  
position 247

target 5' A                   C     UG G     3'  
          GUUCCAG GACGG GU  
          CAAGGUC CUGCC UA  
miRNA 3' C                   U     UG AAU 5'

target: At2g28725.1  
length: 339  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.9 kcal/mol  
p-value: 0.000497  
position 104

target 5' C                                   U 3'  
          UCCGGAGAUGG CGUUUG  
          AGGUCUCUGCC GUAAAU  
miRNA 3' CCA                   U           5'

target: At2g37925.1     *put. off-target*  
length: 438  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.5 kcal/mol  
p-value: 0.000588  
position 399

target 5' U     U                   G 3'  
          UUCCG GGGCGGCGUUUA  
          AAGGU UCUGCCUGUAAAU  
miRNA 3' CC     C                   5'

target: At2g46410.1  
length: 285  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.3 kcal/mol  
p-value: 0.000510  
position 187

target 5' A A C                   C 3'  
          GG UCC GGGACGGACG  
          CC AGG CUCUGCCUGU  
miRNA 3' A U                   AAAU 5'

target: At2g47290.1  
length: 573  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.7 kcal/mol  
p-value: 0.000937  
position 539

target 5' A G                   A     C 3'  
          GG UCCAGAGGC GGCAUU  
          CC AGGUCUCUG CUGUAA  
miRNA 3' A                   C     AU 5'

target: At3g02270.1  
length: 2031  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.3 kcal/mol  
p-value: 0.000648  
position 853

target 5' A C 3'  
UCCAGAGGCGGACAUU  
AGGUCUCUGCCUGUAA  
miRNA 3' CCA AU 5'

target: At3g18430.1  
length: 528  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.7 kcal/mol  
p-value: 0.000387  
position 495

target 5' A G 3'  
CCGAGAGAUGGACGUU  
GGUCUCUGCCUGUAA  
miRNA 3' CCAA AU 5'

target: At3g24370.1  
length: 564  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.5 kcal/mol  
p-value: 0.000517  
position 458

target 5' C G UG G 3'  
GGUU CAGAGAUGG AU  
CCAA GUCUCUGCC UA  
miRNA 3' G UG AAU 5'

target: At3g32394.1  
length: 570  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.1 kcal/mol  
p-value: 0.000174  
position 458

target 5' C G A 3'  
GGUU CAGAGAUGGGCA  
CCAA GUCUCUGCCUGU  
miRNA 3' G AAAU 5'

target: At3g42750.1  
length: 570  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.4 kcal/mol  
p-value: 0.000283  
position 458

target 5' C G A 3'  
GGUU CAGAGAUGGGCG  
CCAA GUCUCUGCCUGU  
miRNA 3' G AAAU 5'

target: At3g43380.1  
length: 648  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.5 kcal/mol  
p-value: 0.000706  
position 458

target 5' C G UG G 3'  
GGUU CAGAGAUGG AU  
CCAA GUCUCUGCC UA  
miRNA 3' G UG AAU 5'

target: At3g53250.1  
length: 330  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.1 kcal/mol  
p-value: 0.000842  
position 108

target 5' U G 3'  
GUUCC GAGA GGACAUUUG  
CAAGG CUCU CCUGUAAA  
miRNA 3' C U G 5'

target: At3g62450.1  
length: 225  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.7 kcal/mol  
p-value: 0.000970  
position 127

target 5' G G 3'  
AGAGACGGGCGUU  
UCUCUGCCUGUAA  
miRNA 3' CCAAGG AU 5'

target: At3g63490.2  
length: 876  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.3 kcal/mol  
p-value: 0.000789  
position 147

target 5' G C G G 3'  
GGUCCAGGGA CGGA AU  
CCAAGGUCUCU GCCU UA  
miRNA 3' G AAU 5'

target: At4g11290.1  
length: 981  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.1 kcal/mol  
p-value: 0.000590  
position 431

target 5' C GG G A 3'  
GG C CAGAGACGGACGU  
CC G GUCUCUGCCUGUA  
miRNA 3' AA AAU 5'

```

target: At4g36880.1
length: 1131
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -32.7 kcal/mol
p-value: 0.000539
position 431
target 5' A          UU A      3'
          GGUUCCAGAGACGG G
          CCAAGGUCUCUGCC U
miRNA 3'          UG AAAU 5'

target: At4g39360.1
length: 393
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -28.5 kcal/mol
p-value: 0.000942
position 40
target 5' U          G G      3'
          UUUCCGAGACGGA AUU
          AAGGUCUCUGCCU UAA
miRNA 3' CC          G AU 5'

target: At5g13930.1      CHS
length: 1188
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -32.5 kcal/mol
p-value: 0.000582
position 771
target 5' U G U          A 3'
          GGU CCA AGACGGACAUUUG
          CCA GGU UCUGCCUGUAAAU
miRNA 3' A C          5'

target: At5g14105.1
length: 231
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -27.8 kcal/mol
p-value: 0.000443
position 194
target 5' A A A C 3'
          GGUUCCG AGA GGACAUU
          CCAAGGU UCU CCUGUAA
miRNA 3' C G AU 5'

target: At5g17090.1
length: 693
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -30.3 kcal/mol
p-value: 0.000938
position 218
target 5' C A UG G 3'
          GG UCCGGAG GGAUGU
          CC AGGUCUC CCUGUA
miRNA 3' A UG AAU 5'

target: At5g20400.1      put. off-target
length: 1047
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -31.7 kcal/mol
p-value: 0.000881
position 116
target 5' C A C 3'
          GGU CCGGAGAUGGAUAAU
          CCA GGUCUCUGCCUGUAA
miRNA 3' A AU 5'

target: At5g35650.1
length: 465
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -30.5 kcal/mol
p-value: 0.000331
position 287
target 5' C G UG G 3'
          GGUU CAGAGAUGG AU
          CCAA GUCUCUGCC UA
miRNA 3' G UG AAU 5'

target: At5g44005.1
length: 285
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -29.3 kcal/mol
p-value: 0.000240
position 29
target 5' A G A 3'
          GUUCCGGAGAUGGG A
          CAAGGUCUCUGCCU U
miRNA 3' C G AAAU 5'

target: At5g46115.1
length: 225
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -26.9 kcal/mol
p-value: 0.000831
position 30
target 5' G G U G 3'
          UCC AGAGAC GGACAU
          AGG UCUCUG CCUGUA
miRNA 3' CCA AAU 5'

```

## 7.2.4 smiRNA(CHS)-Var3

target: At1g03880.1  
length: 1368  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.4 kcal/mol  
p-value: 0.000684  
position 1144  
target 5' C G 3'  
AUGCCAUAGGCGAACA  
UAUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' U AAAU 5'

target: At1g04250.1  
length: 690  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.6 kcal/mol  
p-value: 0.000106  
position 443  
target 5' U G 3'  
UACCAUGGGCAAACA  
AUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' UU AAU 5'

target: At2g26950.1  
length: 1128  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.1 kcal/mol  
p-value: 0.000579  
position 590  
target 5' C A 3'  
UGCCAUGAACGAGCA  
AUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' UU AAAU 5'

target: At2g26960.1  
length: 1284  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.8 kcal/mol  
p-value: 0.000409  
position 721  
target 5' U A 3'  
AUACCAUGAACGAGCA  
UAUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' U AAAU 5'

target: At2g40250.1  
length: 1086  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.1 kcal/mol  
p-value: 0.000530  
position 401  
target 5' U A 3'  
UACCAUGGACAAGCA  
AUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' UU AAAU 5'

target: At3g03340.1  
length: 1209  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.0 kcal/mol  
p-value: 0.000746  
position 252  
target 5' A U 3'  
GAUGCCAUAGACAGGC  
UUAUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' UAAAA 5'

target: At5g13930.1 CHS  
length: 1188  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.7 kcal/mol  
p-value: 0.000009  
position 771  
target 5' U A 3'  
GGUGCCAUAGACGGACA  
UUUUGUAAA  
miRNA 3' 5'

target: At5g22830.1  
length: 1380  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -25.8 kcal/mol  
p-value: 0.000483  
position 1085  
target 5' C G 3'  
AUGCCAUAGACAGGC  
UAUGGUUUUUUUUGU  
miRNA 3' U AAAU 5'

target: At5g53450.1  
length: 2013  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.0 kcal/mol  
p-value: 0.000936  
position 876  
target 5' C A 3'  
AGUACCAUGGACAGACG  
UUUUGUAAA  
miRNA 3' AAAU 5'

target: At5g53450.2  
length: 1773  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.0 kcal/mol  
p-value: 0.000709  
position 636  
target 5' C A 3'  
AGUACCAUGGACAGACG  
UUUUGUAAA  
miRNA 3' AAAU 5'

7.2.5 smiRNA(CHS)-Var4

target: At1g19070.1  
length: 252  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -27.6 kcal/mol  
p-value: 0.000947  
position 159  
target 5' G G C U 3'  
GGU GUUGUGGACAAAC CUCA  
CCA CGGUAUCUGUUUG GGGU  
miRNA 3' U 5'

target: At1g21110.1  
length: 1122  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.2 kcal/mol  
p-value: 0.000292  
position 727  
target 5' U U C C 3'  
GUGCC UGG ACAAGCACCCA  
CACGG AUC UGUUUUGUGGGU  
miRNA 3' C U 5'

target: At1g26770.1  
length: 750  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.1 kcal/mol  
p-value: 0.000482  
position 528  
target 5' U G UU G 3'  
GGUGCCG AGACG CACUCG  
CCACGGU UCUGU GUGGGU  
miRNA 3' A UU 5'

target: At1g27610.1  
length: 345  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.6 kcal/mol  
p-value: 0.000954  
position 255  
target 5' G U C 3'  
GGU UCAUGGACGAAC ACCUA  
CCA GGUAUCUGUUUG UGGU  
miRNA 3' C 5'

target: At1g52905.1  
length: 144  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -26.7 kcal/mol  
p-value: 0.000451  
position 108  
target 5' C G 3'  
GCCGUGGACGAG GCC  
CGGUAUCUGUUU UGG  
miRNA 3' CCA G GU 5'

target: At1g54575.1  
length: 309  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.4 kcal/mol  
p-value: 0.000850  
position 70  
target 5' G A 3'  
GUCAUAGGCAAACAC  
CGGUAUCUGUUUGUG  
miRNA 3' CCA GGU 5'

target: At1g80860.1 put. off-target  
length: 495  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.8 kcal/mol  
p-value: 0.000223  
position 49  
target 5' U G G 3'  
GGU GCUGUGGACGAAUGCUCU  
CCA CGGUAUCUGUUUGUGGGU  
miRNA 3' 5'

target: At1g80860.2 put. off-target  
length: 495  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.8 kcal/mol  
p-value: 0.000223  
position 49  
target 5' U G G 3'  
GGU GCUGUGGACGAAUGCUCU  
CCA CGGUAUCUGUUUGUGGGU  
miRNA 3' 5'

target: At2g04910.1  
length: 375  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.3 kcal/mol  
p-value: 0.000695  
position 51  
target 5' A G A 3'  
GCC AUGGACAGAUACC  
CGG UAUCUGUUUGUGG  
miRNA 3' CCA GU 5'

target: At2g16060.1 put. off-target  
length: 483  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.2 kcal/mol  
p-value: 0.000322  
position 321  
target 5' C U U 3'  
GGUGUCGU GACGAACACUU  
CCACGGUA CUGUUUGUGGG  
miRNA 3' U U 5'



target: At2g21045.1  
length: 423  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.6 kcal/mol  
p-value: 0.000743  
position 360

target 5' C G C G 3'  
GCCG GGACAAAC CCCG  
CGGU UCUGUUUG GGGU  
miRNA 3' CCA A U 5'

target: At2g34450.1  
length: 456  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.8 kcal/mol  
p-value: 0.000374  
position 137

target 5' A A A 3'  
GCCA AGACAAGC CCCA  
CGGU UCUGUUUG GGGU  
miRNA 3' CCA A U 5'

target: At2g35585.1  
length: 471  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.6 kcal/mol  
p-value: 0.000228  
position 40

target 5' A A 3'  
GCCAUAGACGAACAC  
CGGUAUCUGUUUGUG  
miRNA 3' CCA GGU 5'

target: At2g45070.1  
length: 249  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.4 kcal/mol  
p-value: 0.000496  
position 90

target 5' A UC UG U G G 3'  
GGUGCC UGG G GCA CCG  
CCACGG AUC U UGU GGU  
miRNA 3' U UG U G 5'

target: At3g02070.1  
length: 660  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.4 kcal/mol  
p-value: 0.000292  
position 102

target 5' C G C C 3'  
GGUGC GU GGCAGACGCCU  
CCACG UA CUGUUUGUGGG  
miRNA 3' G U U 5'

target: At3g03773.1  
length: 453  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.0 kcal/mol  
p-value: 0.000318  
position 129

target 5' U CA U 3'  
GGUGCC AGGCGAGCGCUU  
CCACGG UCUGUUUGUGGG  
miRNA 3' UA U 5'

target: At3g28310.1  
length: 312  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.3 kcal/mol  
p-value: 0.000938  
position 60

target 5' C U C G 3'  
GCC GUGGACA CACCCA  
CGG UAUCUGU GUGGGU  
miRNA 3' CCA UU 5'

target: At3g44755.1  
length: 450  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.9 kcal/mol  
p-value: 0.000337  
position 85

target 5' C U G 3'  
GGUGCUAU GACAGGC CCUA  
CCACGGUA CUGUUUG GGGU  
miRNA 3' U U 5'

target: At3g49540.1  
length: 501  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.2 kcal/mol  
p-value: 0.000718  
position 338

target 5' C U U A 3'  
GG UGCCGUAG C GCACCCG  
CC ACGGUAUC G UGUGGGU  
miRNA 3' U UU 5'

target: At4g02430.2  
length: 837  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.4 kcal/mol  
p-value: 0.000503  
position 637

target 5' A GU G 3'  
GCCGUGGACGGA CCCA  
CGGUAUCUGUUU GGGU  
miRNA 3' CCA GU 5'

target: At4g02910.1  
length: 381  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.1 kcal/mol  
p-value: 0.000192  
position 260  
target 5' U A UG A 3'  
UGCCG GGAUAA GCCCA  
ACGGU UCUGUU UGGU  
miRNA 3' CC A UG 5'

target: At4g20870.1  
length: 714  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.1 kcal/mol  
p-value: 0.000431  
position 369  
target 5' U A C C 3'  
GG UGCCAU ACAAGCACCCA  
CC ACGGUA UGUUUGUGGGU  
miRNA 3' UC 5'

target: At4g21850.1  
length: 432  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.3 kcal/mol  
p-value: 0.000026  
position 258  
target 5' U U A A 3'  
GGUGCCA UA ACAACGCCCG  
CCACGGU AU UGUUUGUGGGU  
miRNA 3' C 5'

target: At4g34720.1 put. off-target  
length: 495  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.9 kcal/mol  
p-value: 0.000424  
position 354  
target 5' C G 3'  
GGUGUCA GGGCAAUAGCUCA  
CCACGGU UCUGUUUGUGGGU  
miRNA 3' A 5'

target: At5g11280.1  
length: 630  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.2 kcal/mol  
p-value: 0.000602  
position 210  
target 5' U U UG U 3'  
GGUGCUGUAG CAA GCCU  
CCACGGUAUC GUU UGGG  
miRNA 3' U UG U 5'

target: At5g13930.1 CHS  
length: 1188  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -36.7 kcal/mol  
p-value: 0.000065  
position 771  
target 5' U UU A 3'  
GGUGCCAUAGACGGACAU G  
CCACGGUAUCUGUUUGUG U  
miRNA 3' GG 5'

target: At5g14380.1  
length: 453  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.5 kcal/mol  
p-value: 0.000938  
position 378  
target 5' U UG A 3'  
GGUGCCGU GACA AC CUA  
CCACGGUA CUGU UG GGU  
miRNA 3' U U UG 5'

target: At5g65660.1  
length: 411  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.7 kcal/mol  
p-value: 0.000312  
position 268  
target 5' A GG U A 3'  
UGCCA AGAUAA ACACCCA  
ACGGU UCUGUU UGUGGGU  
miRNA 3' CC A 5'

target: At5g66815.1  
length: 318  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.4 kcal/mol  
p-value: 0.000096  
position 79  
target 5' U U A 3'  
GUG CCAUGGACGAAC CCUA  
CAC GGUAUCUGUUUG GGGU  
miRNA 3' C U 5'

## 7.2.6 smiRNA(PABP)-1

target: At1g49760.1 *PAB8*  
length: 2016  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -35.3 kcal/mol  
p-value: 0.000400  
position 1844

target 5' U U C 3'  
GCUUCU GAAUUGACCAAAC  
CGAAGA CUUUACCGUUUG  
miRNA 3' C 5'

target: At1g54060.1  
length: 1152  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.1 kcal/mol  
p-value: 0.000896  
position 489

target 5' U U U 3'  
GCUUCUGG GAUGGACC  
CGAAGACC UUACCGUG  
miRNA 3' U UUUG 5'

target: At1g69295.1  
length: 669  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.2 kcal/mol  
p-value: 0.000999  
position 114

target 5' C G G U U 3'  
GCUU UGGAAAUGGA C GAC  
CGAA ACCUUUACCU G UUG  
miRNA 3' G G U 5'

target: At1g70350.1  
length: 318  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.3 kcal/mol  
p-value: 0.000732  
position 117

target 5' U C U 3'  
GCUUU GGGAAUGGAUCA  
CGAAG CCUUUACCGGU  
miRNA 3' A UUG 5'

target: At2g05070.1  
length: 798  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.8 kcal/mol  
p-value: 0.000522  
position 139

target 5' A A U C 3'  
GC UCUGG AUGGACCAGAC  
CG AGACC UACCGUUUG  
miRNA 3' A UU 5'

target: At2g23350.1 *PAB4*  
length: 1989  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -39.3 kcal/mol  
p-value: 0.000040  
position 1799

target 5' U C 3'  
GCUUCUGGAAAUGGAUCAGAC  
CGAAGACCUUUACCGUUUG  
miRNA 3' 5'

target: At2g23400.1  
length: 762  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.2 kcal/mol  
p-value: 0.000692  
position 142

target 5' C G 3'  
GGAGAUGGCCCAAAC  
CCUUUACCGUUUG  
miRNA 3' CGAAGA 5'

target: At2g23410.1  
length: 912  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.2 kcal/mol  
p-value: 0.000987  
position 244

target 5' C G 3'  
GGAGAUGGCCCAAAC  
CCUUUACCGUUUG  
miRNA 3' CGAAGA 5'

target: At2g41650.1  
length: 201  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.5 kcal/mol  
p-value: 0.000217  
position 21

target 5' U A A G 3'  
GC UCUGGAAA GGAUCGAA  
CG AGACCUUU CCUGUUUU  
miRNA 3' A A G 5'

target: At3g29140.1  
length: 297  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.1 kcal/mol  
p-value: 0.000723  
position 263

target 5' C C G G 3'  
GUUUCUGGA AUGG C GAGC  
CGAAGACCU UACC G UUUG  
miRNA 3' U U G 5'

target: At3g43770.1  
length: 264  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -27.5 kcal/mol  
p-value: 0.000844  
position 94

```
target 5'      G           U 3'
           UGGAGGUGGACCA
           ACCUUUACCGGU
miRNA 3' CGAAG           UUG 5'
```

target: At3g44935.1  
length: 333  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.6 kcal/mol  
p-value: 0.000660  
position 179

```
target 5' U           C 3'
           GUUUCUGGAGAUGG UCAA
           CGAAGACCUUUACC GGUU
miRNA 3'           U   UG 5'
```

target: At3g56910.1  
length: 447  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.4 kcal/mol  
p-value: 0.000376  
position 198

```
target 5' U           C   G   U 3'
           GCUUCUGG  GUGGAC GGGC
           CGAAGACC  UACCG  UUUG
miRNA 3'           UU   G   5'
```

target: At3g61280.1 *put. off-target*  
length: 1017  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.7 kcal/mol  
p-value: 0.000266  
position 169

```
target 5' A           C   U 3'
           GCUUCUGGGGAUGG CUGAGC
           CGAAGACCUUUACC GGUUUG
miRNA 3'           U   5'
```

target: At4g34110.1 *PAB2*  
length: 1332  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -39.8 kcal/mol  
p-value: 0.000012  
position 1184

```
target 5' U           U 3'
           GCUUUUGGAGAUGGACCAGAC
           CGAAGACCUUUACCGGUUUG
miRNA 3'           5'
```

target: At4g37630.1  
length: 972  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.4 kcal/mol  
p-value: 0.000988  
position 885

```
target 5' G   A   C   G 3'
           GCUUC GGAAGUGG GCUAAAC
           CGAAG CCUUUACC UGGUUUG
miRNA 3'           A           5'
```

target: At5g08000.1  
length: 585  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.9 kcal/mol  
p-value: 0.000923  
position 117

```
target 5' U   G           G U   U 3'
           GCUU UGGAAAUGGA C GAC
           CGAA ACCUUUACCU G UUG
miRNA 3'           G   G   U   5'
```

target: At5g18990.1 *put. off-target*  
length: 993  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.7 kcal/mol  
p-value: 0.000466  
position 856

```
target 5' U           A 3'
           GCUUC GGAAGUGGAUCAAAU
           CGAAG CCUUUACCGGUUUG
miRNA 3'           A           5'
```

target: At5g24316.1  
length: 378  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.5 kcal/mol  
p-value: 0.000123  
position 152

```
target 5' A           C   U 3'
           UCUGGAGAUGGACUA GC
           AGACCUUUACCGGU UG
miRNA 3' CGA           U   5'
```

target: At5g51440.1  
length: 633  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.2 kcal/mol  
p-value: 0.000132  
position 468

```
target 5' U           G   G 3'
           GUUUCUGGAGAUGGAC GAG
           CGAAGACCUUUACCGU UUU
miRNA 3'           G   G 5'
```

target: At5g58780.1  
length: 909  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.2 kcal/mol  
p-value: 0.000981  
position 244  
target 5' C G 3'  
GGAGAUGGGCCAAAC  
CCUUUACCGUUUG  
miRNA 3' CGAAGA 5'

target: At5g61130.1  
length: 606  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.8 kcal/mol  
p-value: 0.000293  
position 117  
target 5' U G G U 3'  
GCUU UGGAAAUGGA CAGAU  
CGAA ACCUUUACCU GUUUG  
miRNA 3' G G 5'

target: At5g66270.1  
length: 1350  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.0 kcal/mol  
p-value: 0.000710  
position 453  
target 5' U CU G 3'  
GUUUCUGGA UGGACCAGA  
CGAAGACCU ACCUGUUU  
miRNA 3' UU G 5'

## 7.2.7 smiRNA(PABP)-3

```

target: At1g12830.1
length: 642
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.1 kcal/mol
p-value: 0.000315
position 155
target 5' A                               A 3'
          UGGAAGUGG CCAAAUCGAG
          ACCUUUACC GGUUUGGCUU
miRNA 3' G           U                    5'

target: At1g22760.1      PAB3
length: 1983
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -35.9 kcal/mol
p-value: 0.000596
position 1843
target 5' U                               A 3'
          UGGAGAUGGAUCAAGCUGAG
          ACCUUUACCGUUUUGGCUU
miRNA 3' G                               5'

target: At1g24530.1
length: 1257
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.6 kcal/mol
p-value: 0.000935
position 775
target 5' C   UU                          C 3'
          GGG UGGGCCAAACCGA
          CCU ACCUGGUUUUGGCU
miRNA 3' GA   UU                          U 5'

target: At1g30110.1
diadenosine
length: 528
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -32.1 kcal/mol
p-value: 0.000388
position 387
target 5' G           G   A   G 3'
          UGGAAAUGGGC AAGCC GAA
          ACCUUUACCGU UUUGG CUU
miRNA 3' G           G                    5'

target: At1g49760.1      PAB8
length: 2016
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -35.6 kcal/mol
p-value: 0.000729
position 1848
target 5' U   U                               G 3'
          CU GAAAUGGACCAAACCGAA
          GA CUUUACCGUUUUGGCUU
miRNA 3'   C                               5'

target: At1g69260.1
length: 1038
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.8 kcal/mol
p-value: 0.000566
position 840
target 5' A                               G   A 3'
          GGAGAUGGACCAAAU GGA
          CCUUUACCGUUUUG CUU
miRNA 3' GA                               G   5'

target: At1g71770.1      PAB5
length: 2007
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -37.2 kcal/mol
p-value: 0.000293
position 1851
target 5' G                               A 3'
          CUGGAGAUGGAUCAAGCUGAG
          GACCUUUACCGUUUUGGCUU
miRNA 3'                               5'

target: At2g02450.1      put. off-target
length: 1140
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.8 kcal/mol
p-value: 0.000684
position 356
target 5' A           A           U 3'
          UGGAGAU GACCGAACCGAG
          ACCUUUA CUGGUUUGGCUU
miRNA 3' G           C                    5'

target: At2g02450.2
length: 1245
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.8 kcal/mol
p-value: 0.000815
position 356
target 5' A           A           U 3'
          UGGAGAU GACCGAACCGAG
          ACCUUUA CUGGUUUGGCUU
miRNA 3' G           C                    5'

target: At2g05070.1
length: 798
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -32.6 kcal/mol
p-value: 0.000686
position 143
target 5' U   U                               U 3'
          CUGG AUGGACCAGACCG
          GACC UACCGUUUUGGC
miRNA 3'   UU                               UU 5'

```

target: At2g05635.1  
length: 441  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.7 kcal/mol  
p-value: 0.000648  
position 185

target 5' A U U A 3'  
UGGAGGUGGAU CA ACCGGA  
ACCUUUACCUG GU UGGCUU  
miRNA 3' G U 5'

target: At2g23350.1 PAB4  
length: 1989  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -39.3 kcal/mol  
p-value: 0.000088  
position 1803

target 5' U G 3'  
CUGGAAAUGGAUCAGACCGAG  
GACCUUUACCUGGUUUGGCUU  
miRNA 3' 5'

target: At2g23400.1  
length: 762  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.9 kcal/mol  
p-value: 0.000963  
position 142

target 5' C A 3'  
GGAGAUGGGCCAAAC GAG  
CCUUUACCUGGUUUG CUU  
miRNA 3' GA G 5'

target: At2g23410.1  
length: 912  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.4 kcal/mol  
p-value: 0.000553  
position 244

target 5' C G C 3'  
GGAGAUGGGCCAAAC GG  
CCUUUACCUGGUUUG CU  
miRNA 3' GA G U 5'

target: At2g27540.1  
length: 108  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -27.8 kcal/mol  
p-value: 0.000156  
position 58

target 5' U U 3'  
UGGCCCGGACCGA  
ACCUUGGUUUGGCU  
miRNA 3' GACCUU U 5'

target: At2g38880.1  
length: 426  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.7 kcal/mol  
p-value: 0.000600  
position 362

target 5' G UA A 3'  
UGGAGAUGGAUCAAA GAG  
ACCUUUACCUGGUUU CUU  
miRNA 3' G GG 5'

target: At3g08720.1  
length: 1416  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.6 kcal/mol  
p-value: 0.000656  
position 1137

target 5' G G C 3'  
GGAAGUGGACCGAGC GAG  
CCUUUACCUGGUUUG CUU  
miRNA 3' GA G 5'

target: At3g08720.2  
length: 1416  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.6 kcal/mol  
p-value: 0.000656  
position 1137

target 5' G G C 3'  
GGAAGUGGACCGAGC GAG  
CCUUUACCUGGUUUG CUU  
miRNA 3' GA G 5'

target: At3g18410.1  
length: 321  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -29.2 kcal/mol  
p-value: 0.000870  
position 117

target 5' A A U A 3'  
G GAAAUGGA CCAAAUCGAG  
C CUUUACCU GGUUUGGCUU  
miRNA 3' GA 5'

target: At3g43720.1  
length: 582  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.3 kcal/mol  
p-value: 0.000801  
position 170

target 5' G UG C C 3'  
UGG GUG GGCCAAGCCGGA  
ACC UAC CUGGUUUGGCUU  
miRNA 3' G UU 5'

target: At3g43770.1  
length: 264  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -30.3 kcal/mol  
p-value: 0.000257  
position 94

```
target 5' G          U UU      A 3'
          UGGAGGUGGACCA A CCGGG
          ACCUUUACCUGGU U  GGCUU
miRNA 3' G          U          5'
```

target: At4g01935.1  
length: 714  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.2 kcal/mol  
p-value: 0.000373  
position 55

```
target 5' C          U 3'
          GAAAUGGGCCAAACCGG
          CUUUACCUGGUUUUGGCU
miRNA 3' GAC          U 5'
```

target: At4g23180.1  
length: 2010  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -35.3 kcal/mol  
p-value: 0.000858  
position 1493

```
target 5' U      U          G 3'
          UGGA  UGGACCAAACCGAA
          ACCU  ACCUGGUUUUGGCUU
miRNA 3' G      UU          5'
```

target: At4g27530.1  
length: 393  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.8 kcal/mol  
p-value: 0.000240  
position 281

```
target 5' G          U G          G 3'
          UGGAGAUG GG CAAGCCGAA
          ACCUUUAC CU GUUUGGCUU
miRNA 3' G          G          5'
```

target: At4g30460.1  
length: 489  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.7 kcal/mol  
p-value: 0.000423  
position 152

```
target 5' G          U      U      G 3'
          UGGAGGUGGA CCGGA CCGGA
          ACCUUUACCU GGUUU GGCUU
miRNA 3' G          5'
```

target: At4g34110.1 *PAB2*  
length: 1332  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -38.9 kcal/mol  
p-value: 0.000046  
position 1189

```
target 5' U          G 3'
          UGGAGAUGGACCAGACUGAA
          ACCUUUACCUGGUUUUGGCUU
miRNA 3' G          5'
```

target: At5g24316.1 *put. off-target*  
length: 378  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.9 kcal/mol  
p-value: 0.000105  
position 153

```
target 5' U          C      G 3'
          CUGGAGAUGGACUA GCUGG
          GACCUUUACCUGGU UGGCU
miRNA 3'          U      U 5'
```

target: At5g45660.1  
length: 681  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.9 kcal/mol  
p-value: 0.000217  
position 530

```
target 5' G          UG          G 3'
          GGAGAUGG CAAGCUGAA
          CCUUUACC GUUUGGCUU
miRNA 3' GA          UG          5'
```

target: At5g52080.1  
length: 108  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.2 kcal/mol  
p-value: 0.000114  
position 58

```
target 5'          U          U 3'
          UGGGCCGAACCGA
          ACCUGGUUUUGGCUU
miRNA 3' GACCUUU          U 5'
```

target: At5g58780.1  
length: 909  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.4 kcal/mol  
p-value: 0.000550  
position 244

```
target 5' C          G C 3'
          GGAGAUGGGCCAAAC GG
          CCUUUACCUGGUUUUG CU
miRNA 3' GA          G U 5'
```



## 7.2.8 smiRNA(PABP)-3cac

target: At1g04530.1  
length: 933  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.8 kcal/mol  
p-value: 0.000922  
position 40  
target 5' U U U A 3'  
CUGGAGAUGGG UCAAA CCGA  
GACCUCUACCU AGUUU GGCU  
miRNA 3' C 5'

target: At1g10455.1  
length: 459  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.8 kcal/mol  
p-value: 0.000717  
position 155  
target 5' C U U 3'  
GGAGAUGGAUCA GACC  
CCUCUACCUAGU UUGG  
miRNA 3' GA CUC 5'

target: At1g22760.1 PAB3  
length: 1983  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -40.9 kcal/mol  
p-value: 0.000092  
position 1843  
target 5' U A 3'  
UGGAGAUGGAUCAAGCUGAG  
ACCUCUACCUAGUUUGGCUC  
miRNA 3' G 5'

target: At1g27250.1  
length: 414  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.9 kcal/mol  
p-value: 0.000546  
position 26  
target 5' U A AG G 3'  
UGGAGA GGA UAAACCGAG  
ACCUCU CCU GUUUGGCUC  
miRNA 3' G A A 5'

target: At1g54575.1  
length: 309  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.7 kcal/mol  
p-value: 0.000177  
position 226  
target 5' G U A 3'  
CUGG GGAUGGGUCAGGCC  
GACC UCUACCUAGUUUGG  
miRNA 3' CUC 5'

target: At1g71770.1 PAB5  
PAB5  
length: 2007  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -42.2 kcal/mol  
p-value: 0.000049  
position 1851  
target 5' G A 3'  
CUGGAGAUGGAUCAAGCUGAG  
GACCUCUACCUAGUUUGGCUC  
miRNA 3' 5'

target: At2g05635.1  
length: 441  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.6 kcal/mol  
p-value: 0.000411  
position 185  
target 5' A U U A 3'  
UGGAGGUGGA UCA ACCGG  
ACCUCUACCU AGU UGGCU  
miRNA 3' G U C 5'

target: At2g12685.1  
length: 357  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.4 kcal/mol  
p-value: 0.000160  
position 306  
target 5' A U C 3'  
CUGGGG AUGGAUC GACCGGG  
GACCUC UACCUAG UUGGCUC  
miRNA 3' U 5'

target: At2g15430.1  
length: 960  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.3 kcal/mol  
p-value: 0.000740  
position 281  
target 5' A UG U 3'  
UGGAGAUGGA CAA CGAG  
ACCUCUACCU GUU GCUC  
miRNA 3' G A UG 5'

target: At2g18020.1  
length: 777  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.3 kcal/mol  
p-value: 0.000859  
position 508  
target 5' G A A 3'  
CUGGAGGUGGA GAACUGAG  
GACCUCUACCU UUUGGCUC  
miRNA 3' AG 5'

```
target: At2g23350.1      PAB4
length: 1989
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -38.4 kcal/mol
p-value: 0.000332
position 1803
target 5' U      A                      G 3'
          CUGGA AUGGAUCAGACCGAG
          GACCU UACCUAGUUUGGCUC
miRNA  3'      C                      5'
```

```
target: At2g31930.1
length: 432
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -31.3 kcal/mol
p-value: 0.000852
position 272
target 5' A  C  GG                      C 3'
          UGG GA  GGAUCAAGCCGA
          ACC CU  CCUAGUUUGGCUC
miRNA  3' G  U  A                      C 5'
```

```
target: At2g38880.1
length: 426
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -35.7 kcal/mol
p-value: 0.000060
position 362
target 5' G                      UA  A 3'
          UGGAGAUGGAUCAAA  GAG
          ACCUCUACCUAGUUU  CUC
miRNA  3' G                      GG  5'
```

```
target: At3g03400.1
length: 414
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -31.3 kcal/mol
p-value: 0.000780
position 155
target 5' A                      GG  U 3'
          UGGAGAUGG UCA  UCGA
          ACCUCUACC AGU  GGCU
miRNA  3' G                      U  UU  C 5'
```

```
target: At3g15270.1
length: 546
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -34.6 kcal/mol
p-value: 0.000201
position 425
target 5' U      A                      A 3'
          UGGAGA GGGUCAGGCCGG
          ACCUCU CCUAGUUUGGCUC
miRNA  3' G      A                      C 5'
```

```
target: At3g30610.1
length: 339
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.5 kcal/mol
p-value: 0.000134
position 313
target 5' A      U                      A 3'
          UGGGG AUGGAUCG  ACCGAG
          ACCUC UACCUAGU  UGGCUC
miRNA  3' G                      U      5'
```

```
target: At3g45755.1
length: 891
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -33.9 kcal/mol
p-value: 0.000800
position 594
target 5'      U                      C 3'
          AGAUGGAUCAAAACCGAG
          UCUACCUAGUUUGGCUC
miRNA  3' GACC                      5'
```

```
target: At3g48550.1
length: 477
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -31.4 kcal/mol
p-value: 0.000981
position 313
target 5' A                      C  U  U 3'
          UGGAGAUGG UCAG CUGAG
          ACCUCUACC AGUU GGCUC
miRNA  3' G                      U  U  5'
```

```
target: At4g06490.1
length: 441
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -32.7 kcal/mol
p-value: 0.000388
position 319
target 5' C      U                      U  A 3'
          CUGGAGA UGGAUCGAACU GG
          GACCUCU ACCUAGUUUGG UC
miRNA  3'                      C      5'
```

```
target: At4g16240.1
length: 129
miRNA : command_line
length: 21
mfe: -28.5 kcal/mol
p-value: 0.000338
position 42
target 5' A                      GG  A  3'
          GGAGGUGGA  AGGCC
          CCUCUACCU  UUUGG
miRNA  3' GA                      AG  CUC 5'
```

target: At4g27530.1  
length: 393  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.7 kcal/mol  
p-value: 0.000303  
position 281  
target 5' G U GG A 3'  
UGGAGAUG G CAAGCCGA  
ACCUCUAC C GUUUGGCU  
miRNA 3' G UA C 5'

target: At5g46730.1  
length: 873  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -33.8 kcal/mol  
p-value: 0.000813  
position 806  
target 5' A U G G 3'  
UGGAGGUGG UCAGGC GAG  
ACCUCUACC AGUUUG CUC  
miRNA 3' G U G 5'

target: At4g39580.1 *put. off-target*  
length: 1128  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.5 kcal/mol  
p-value: 0.000897  
position 763  
target 5' A A U 3'  
UGGAGAUGGGUCGGAC UGGG  
ACCUCUACCUAGUUUG GCUC  
miRNA 3' G 5'

target: At5g60460.1  
length: 330  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -32.7 kcal/mol  
p-value: 0.000205  
position 157  
target 5' U U G C 3'  
CUGGAG UGGAUCAG AUCGAG  
GACCUC ACCUAGUU UGGCUC  
miRNA 3' U 5'

target: At5g15500.1  
length: 1056  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -34.9 kcal/mol  
p-value: 0.000639  
position 840  
target 5' A U A 3'  
GGGGAUG GAUCAAGCCGA  
CCUCUAC CUAGUUUGGCU  
miRNA 3' GA C 5'

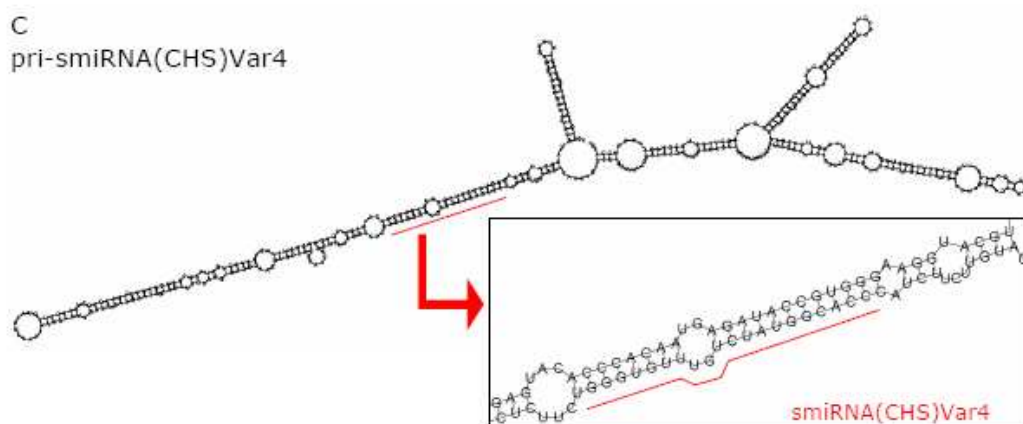
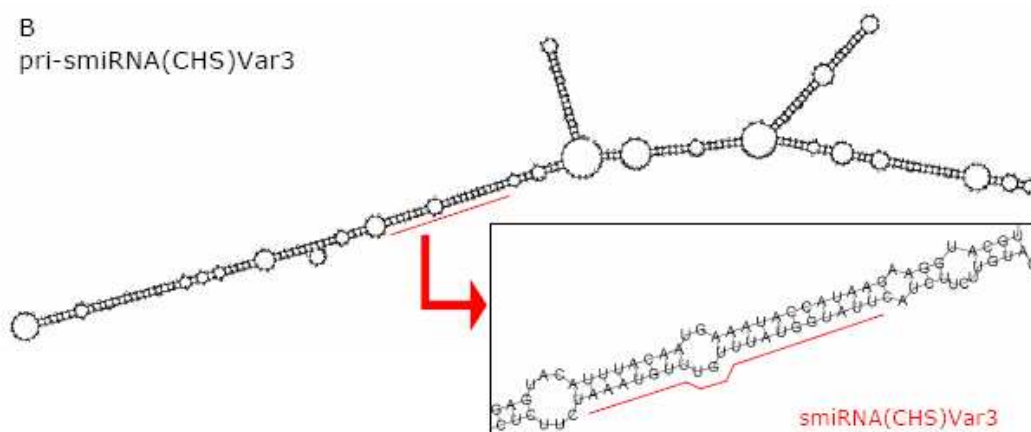
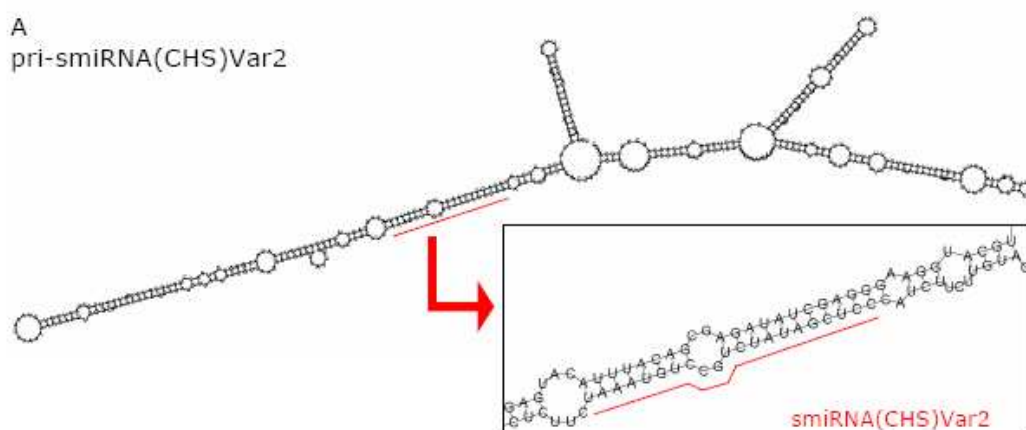
target: At5g24316.1  
length: 378  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -31.0 kcal/mol  
p-value: 0.000774  
position 153  
target 5' U C C C 3'  
CUGGAGAUGGA UA GCUGGG  
GACCUCUACCU GU UGGCUC  
miRNA 3' A U 5'

target: At5g41010.1  
length: 156  
miRNA : command\_line  
length: 21  
mfe: -28.7 kcal/mol  
p-value: 0.000467  
position 67  
target 5' U U C UG A A 3'  
CUGGGGAUG GAU CAA C GAG  
GACCUCUAC CUA GUU G CUC  
miRNA 3' UG 5'

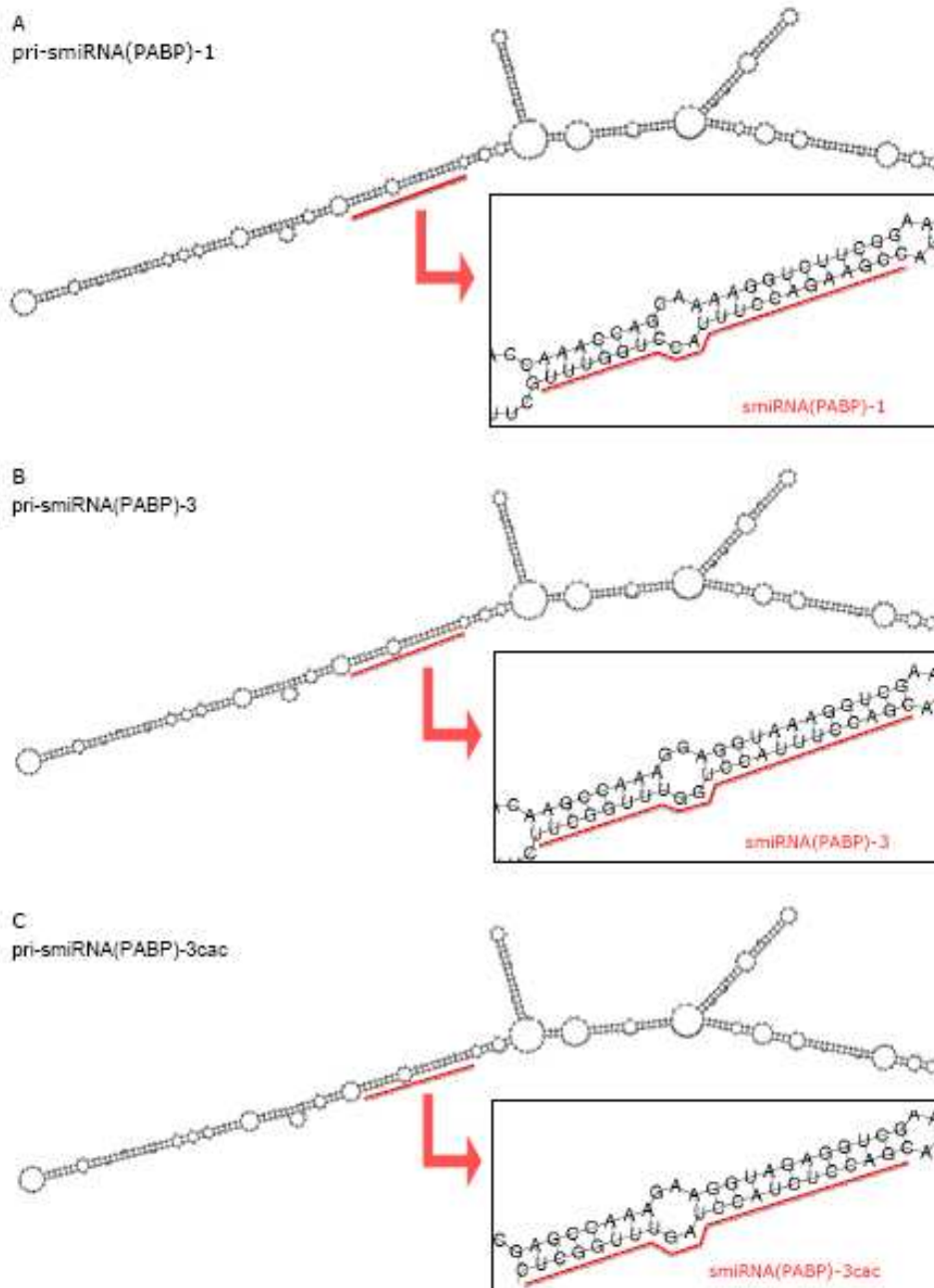
### 7.3 Sekundärstrukturen verschiedener pri-smiRNAs

Die Sekundärstrukturen aller entworfenen pri-smiRNAs wurden mit dem Programm *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) bei 25°C berechnet. smiRNA-Sequenzen werden durch rote Balken hervorgehoben.

#### 7.3.1 pri-smiRNA(CHS)-Var2, -3, -4



## 7.3.1 pri-smiRNA(PABP)-1, -3, -3cac



## 7.4 Oligonukkleotidliste

ID	Name	Sequenz 5' → 3'
N005	smiRNA(CHS)-51	CAAATGTCCGCTCTATGGCACCCATCTTCTTTACCTTCTCTA
N006	smiRNA(CHS)-31	GGTGCCATAGACGGACATTTGGAAGAGTAAAAGCCATTAAGGGC
N007	smiRNA(CHS)*-51	GGTGCCATAGAGCGACATTTGCATGAGTTGAGCAGGGTAAAG
N008	smiRNA(CHS)*-31	CAAATGTCGCTCTATGGCACCCCTCCATCGTCAGATCAAGATC
N030	BIO-smiRNA(CHS)*-52	(Bio)GGTGCCATAGAGCGACATTTG
N032	CHS-GSP1-32	CACCCCACTCCAACCCTTCTCC
N033	CHS-GSP2-33	CGCACGCGCTCGACATGTTT
N034	CHS-GSP3-52	TGGTCTCACCTTCCATCTCCTCA
N050	pre-smiRNA(CHS)-52	GATCTGACGATGGAAGGGTGCC
N051	pre-smiRNA(CHS)-3	AAGGTGAAAGAAGATGGGTGCC
N072	CHS-RT-53	GTCTGCCGCTCAGACCAT
N073	CHS-RT-33	CGTTCGTCTAGACTCTTACA
N080	At1g49390-RT-51	GGAGAGATATCTCCATGCACC
N081	At1g49390-RT-31	CTTCTTGACCGTCTACAGAGG
N078	smiRNA(CHS)-Var1-51	ATCGGCTAGCTGGAAGGGTGCCATAGAGCGACAGTTACATGAGTTGAG CAGGGTAAAG
N068	smiRNA(CHS)-Var1-32	GCTATGTACAAGAAGATGGGTGCCATAGACGGACAGTTAGAAGAGTAAAA GCCATTAAGGG
N079	smiRNA(CHS)-Var2-51	ATCGGCTAGCTGGAAGGGGAGCTATAGAGCGACATTTACATGAGTTGAGC AGGGTAAAG
N071	smiRNA(CHS)-Var2-32	GCTATGTACAAGAAGATGGGAGCTATAGACGGACATTTAGAAGAGTAAA AGCCATTAAGG
N076	smiRNA(CHS)-Var3-52	ATCGGCTAGCTGGAAGAATACCATAAAGTAACATTTACATGAGTTGAGC AGGGTAAAG
N070	smiRNA(CHS)-Var3-32	GCTATGTACAAGAAGATGAATACCATAAACAAACATTTAGAAGAGTAAAA GCCATTAAGGG
N077	smiRNA(CHS)-Var4-52	ATCGGCTAGCTGGAAGGGTGCCATAGAGTAACACCCACATGAGTTGAGC AGGGTAAAG
N069	smiRNA(CHS)-Var4-32	GCTATGTACAAGAAGATGGGTGCCATAGACAAACACCCAGAAGAGTAAA AGCCATTAAGG
N156	BIO-smiR(CHS)-V3+4-52	(Bio)GGTGCCATAGACAAACATTTA
N157	BIO-smiR(CHS)-V1+2-52	(Bio)GGTGCTATAGACGGACATTTG
N132	pre-smiRNA(CHS)-Var3-52	GCTAGCTGGAAGAATACCATAAAG
N133	pre-smiRNA(CHS)-Var3-32	GGTGTACAAGAAGATGAATACCA

---

N134	pre-smiRNA(CHS)-Vars-52	GCTAGCTGGAAGGGTGCCATAGAG
N135	pre-smiRNA(CHS)-Vars-32	GGTGTAACAAGAAGATGGGTGCCAT
N074	ECV-159a-51	GCTAGCCGCATGTGTACACCTTCTCTATTTTTATTTTTTC
N075	ECV-159a-31	TGTACACATGCGGCTAGCGTCAGATCAAGATCTATCG
N082	smiRNA(CHS)-ECV-51	ATCGGCTAGCTGGAAGGGTGCCATAGAGCGACATTTGCATGAGTTGAGC AGGGTAAAG
N083	smiRNA(CHS)-ECV-31	GCTATGTACAAGAAGATGGGTGCCATAGACGGACATTTGGAAGAGTAAA AGCCATTAAAGGG
N090	smiRNA(PABP)-1-51	ATCGGCTAGCTGGAAGGCTTCTGGAAAACGACCAAACCATGAGTTGAGC AGGGTAAAG
N091	smiRNA(PABP)-1-31	GCTATGTACAAGAAGATGGCTTCTGGAAATGGACCAAACGAAGAGTAAA AGCCATTAAAGGG
N092	smiRNA(PABP)-3-51	ATCGGCTAGCTGGAAGCTGGAATGGAGGAAACCGAACATGAGTTGAG CAGGGTAAAG
N093	smiRNA(PABP)-3-31	GCTATGTACAAGAAGATGCTGGAAATGGACCAAACCGAAGAAGAGTAAA AGCCATTAAAGGG
N088	smiRNA(PABP)-3cac-51	CTCGTTTGATCCATCTCCAGCATCTTCTTTACCTTCTCTA
N089	smiRNA(PABP)-3cac-31	CTGGAGATGGATCAAACCGAGGAAGAGTAAAAGCCATTAAAGGGC
N086	smiRNA(PABP)*-3cac-51	CTGGAGATGGAAGAAACCGAGCATGAGTTGAGCAGGGTAAAG
N087	smiRNA(PABP)*-3cac-31	CTCGTTTCTTCCATCTCCAGCTTCCATCGTCAGATCAAGATC
N130	PAB2-GSP1-31	CGAACAAGCTAGAACACGCAACTA
N131	PAB2-GSP2-32	CAAACGCAGTTATGTGGAGGAATCC
N100	PAB2-GSP3-52	AGAAGCTCTCAAGGCCAAAGTTG
N123	PAB4-GSP1	GAAGCCAAGAGATCACTTGGAC
N122	PAB4-GSP3-52	CGAGTACCAGAGGCTCTAAATGCC
N120	PAB2-RT-51	GTTGGTGGAGCAGGTTGAGGCAGAG
N121	PAB2-RT-32	CATCCATAGCCTCTGCAACTTTGGC
N126	PAB3-RT-51	CCCCTTGTGGAAGGCACGAACC
N127	PAB3-RT-31	CAAAGCCTCGGATACTTTAGACTTG
N118	PAB4-RT-54	GAGAACACTTCTGGTGAGAGTC
N119	PAB4-RT-32	AGCCTCTGGTACTCGAGCAGATG
N128	PAB5-RT-51	GGATGCTTGGGGATCATCTTTACCC
N129	PAB5-RT-31	CCTCGGACACTTTAGCCTTAAGAGC
N124	PAB8-RT-51	CGATGCTTGGTGAATCTATACC
N125	PAB8-RT-31	GCTTTAAGTGCCTCTGGTGATTCC
N104	BIO-smiRNA(PABP)*-52	(BIO)GCTTCTGGAGATGGATCAAACCGAG

---

---

N145	pre-smiRNA(PABP)-1-51	CTGGAAGGCTTCTGGAAAACGACC
N146	pre-smiRNA(PABP)-1-31	GAAGATGGCTTCTGGAAATGGACC
N147	pre-smiRNA(PABP)-3-51	GGAAGCTGGAAATGGAGGAAACCG
N148	pre-smiRNA(PABP)-3-31	GAAGATGCTGGAAATGGACCAAACC
N149	pre-smiRNA(PABP)-3cac-51	GGAAGCTGGAGATGGAAGAAACCG
N150	pre-smiRNA(PABP)-3cac-31	AGATGCTGGAGATGGATCAAACCG
N142	F-Oligo(dT)	Fluorescein-d(T) <sub>45</sub>

## Weitere Oligonukleotide:

U6snRNA	UGGCCCCUGCGCAAGGAUGAA
BIO-U6snRNA-star	(BIO)TCATCCTTGCAGGGGCCA
5'RACE-Inner	GAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
5'RACE-Outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
revL	CAGGAAACAGCTATGACCATG
uniS	GTAAAACGACGGCCAGT
P35S	ACAATCCCACTATCCTTC
nosT	GCAAGACCGCAACAGGATT
TO2f	AACAGCTATGACCATGATTACGCC
TO2r	GACGTTGTAACGACGGCCAGTG

---



## 8 Abkürzungen

AGO	Argonaut-Protein
AS	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CaMV	Blumenkohl Mosaik Virus
casRNA	<i>cis-acting siRNA</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHS	Chalkonsynthase
CID	CTC-interagierende Domäne
Col	Ökotyp Columbia
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCL	Dicer-like
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEN1	HUA ENHANCER1
HST	HASTY
HYL1	HYPONASTIC LEAVES1
kb	Kilobasenpaar
KT	Kurztag
LMB	Leptomycin B
LT	Langtag
mfe	minimale freie Energie
miRNA	microRNA
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MS	Murashige Skoog
natsiRNA	<i>natural antisense transcript-derived siRNA</i>
ncRNA	nicht-kodierende RNA ( <i>non-coding RNA</i> )
NES	Kernexportsignal ( <i>nuclear export signal</i> )
NLS	Kernimportsignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
nt	Nukleotide
PABPC	zytosolische Poly(A)-bindende Proteine

---

PCR	Polymerasekettenreaktion
piRNA	PIWI-interagierende RNA
pre-miRNA	<i>precursor</i> microRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> microRNA (microRNA-Primärtranskript)
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i>
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit reverse Transkription-PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLM-5'RACE	<i>RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
tasiRNA	<i>trans-acting siRNA</i>
TGS	<i>transcriptional gene silencing</i>
tRNA	Transfer-RNA
<i>tt4</i>	<i>transparent testa4</i>
UTR	untranslatierte Region
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
Y2H	<i>Yeast-2-Hybrid</i>

## Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Etablierung und Optimierung der synthetischen primär-microRNA Technik für funktionale Genomanalysen in *Arabidopsis thaliana*“ selbst angefertigt und nur angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Zitate sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät im In- oder Ausland mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Außerdem erkläre ich hiermit, dass bisher keine Promotionsversuche im In- oder Ausland meinerseits unternommen wurden.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jede mögliche die obigen Angaben betreffenden Veränderungen dem Dekanat mitzuteilen.

Sandra Niemeier

Enger, im Februar 2010

---

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sandra Niemeier  
Geburtsort: Bünde (Westfalen)  
Familienstand: ledig

### AKADEMISCHE AUSBILDUNG

#### Promotion

02/2010 Abgabe der Dissertation

Titel der Dissertation:

**Etablierung und Optimierung der synthetischen primär-microRNA  
Technik für funktionale Genomanalysen in *Arabidopsis thaliana***

01/2007 Beginn der Promotion am Lehrstuhl für Genomforschung an der Universität Bielefeld im Studiengang „Bioinformatik und Genomforschung“ als Mitglied der NRW *Graduate School in Bioinformatics and Genome Research*

#### Diplom in Biologie

12/2006 Abschluss des Studiums am 13.12.2006 mit der Gesamtnote *sehr gut* (1,2)  
Hauptfächer: Genetik, Zellbiologie, Ökologie, Biochemie

Titel der Diplomarbeit:

**Synthetische microRNAs als Mittel zur Erzeugung stabiler *knock-downs* für Genfamilien in *Arabidopsis thaliana***

Die Diplomarbeit wurde in der Zeit vom 09. Januar 2006 bis 13.12.2006 am von Prof. Bernd Weisshaar geführten Lehrstuhl für Genomforschung an der Universität Bielefeld durchgeführt und von PD Dr. T. Merkle betreut.

09/2003 Vordiplom

10/2001 Aufnahme des Studiums im Diplom-Studiengang Biologie an der Universität Bielefeld

## SCHULISCHE AUSBILDUNG

08/1992 - 06/2001    Widukind Gymnasium Enger  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
08/1988 - 06/1992    Grundschule Belke-Steinbeck/Besenkamp

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Dezember 2009 am Lehrstuhl für Genomforschung der Universität Bielefeld durchgeführt.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernd Weisshaar für seine Unterstützung und die Möglichkeit danken, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente in seinem Labor durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Merkle für die Bereitstellung des Themas und die sehr gute fachliche Betreuung, seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie für die angenehme Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Ich danke allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen am Lehrstuhl für „Gnomforschung“ für die gute fachliche Zusammenarbeit und für viele offene/erfrischende/lustige/fragwürdige Diskussionen im Kaffeeraum und während unseres Freitags-Frühstücks. Mit Euch war es wirklich nie langweilig! Besonders erwähnt seien hier Melanie Kuhlmann, Sandra Frank und Oliver Jahns.

Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Ute Bürstenbinder, für eine tolle Zusammenarbeit in unserem oft einsamen Labor, ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und insbesondere für den professionellen Crash-Kurs im Zellen-Ausstreichen. Ich möchte ihr auch dafür danken, dass sie in jeder Hinsicht immer ein offenes Ohr für mich hatte und denke gerne an unsere spontanen Kochabende zurück!

Meinen (ehemaligen) AG-Kolleginnen Dr. Katja Schmied, Dr. Julia Starmann und Claudia Rubiano danke ich für eine schöne Zeit, gute Zusammenarbeit und viel Spass während der Laborarbeit. Bei Dr. Leonardo Alves-Junior bedanke ich mich für die Einführung in die „RNA world“, für die Einarbeitung in viele Methoden und seinen Einsatz bei Problembehandlungen. Außerdem gilt mein Dank Anita Benzel, Sven Rinkel und Thomas Roxlau, die ich während meiner Arbeit betreut habe, für viel gute Laune im Laboralltag und für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern danke ich von ganzem Herzen für ihre unerschütterliche Unterstützung während der vielen Jahre meiner Aus- und Weiterbildung! Ohne Euch wäre das nicht möglich gewesen! Bei Christian bedanke ich mich ganz besonders für sein Verständnis, wenn am Wochenende mal wieder gearbeitet werden musste und für seine Unterstützung und Aufbauarbeit während der letzten Jahre, besonders in schwierigen Zeiten. Er hat mir gezeigt, dass ich trotz aller Frustration, die manches Mal auftrat, nicht den Spass am „Projekt Promotion“ verlieren durfte.

Vielen Dank!