

Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

---

Deletion plastidärer ribosomaler Proteine in *Nicotiana  
tabacum* im Kontext reduktiver Genomevolution

und

Entwicklung einer Hochdurchsatzplattform zur Analyse  
von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades „doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Tobias Fleischmann

Potsdam, März, 2012

---

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/6039/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-60393>  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-60393>

...to boldly go, where no man has gone before.  
(Gene Roddenberry)



# I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1 Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden	1
1.1.1 Plastiden und die Evolution des Plastoms	1
1.1.1.1 Der Chloroplast	1
1.1.1.2 Der Ursprung der Organellen: Endosymbiose	2
1.1.1.3 Endosymbiontischer Gentransfer von Organellen zum Kerngenom	4
1.1.1.4 Reduktive Evolution des Plastidengenoms	6
1.1.1.5 Evolution kryptischer Plastome	8
1.1.2. Translation in Plastiden höherer Pflanzen	11
1.1.2.1 Knockout plastidär kodierter essentieller Gene	12
1.1.2.2 Das Plastiden-Ribosom	12
1.1.2.3 Ribosomenassemblierung	14
1.1.3 Zielsetzung des Projektes	16
1.2 Detektion und Charakterisierung von miRNAs aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
1.2.1 Regulation der Genexpression durch miRNAs	17
1.2.2 Biogenese und Funktionsweise von miRNAs	18
1.2.3 miRNAs im Kontext der Evolution der Metabionta	20
1.2.4 Zielsetzung des Projektes	21

## 2. Material und Methoden

2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial	23
2.1.2 Geräte	25
2.1.3 Enzyme	26
2.1.4 Kits	26
2.1.5 Puffer und Lösungen	26
2.1.6 Verwendete Software und Netzlinks	28
2.2 Methoden: Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden	28
2.2.1 Pflanzenmaterial, Wachstumsbedingungen und Phänotypisierung	28
2.2.2 Konstruktion der Plastidentransformationsvektoren und Herstellung der Hybridisierungssonden	29
2.2.2.1 Herstellung der <i>aadA</i> -Kassette (pLS1)	29
2.2.2.2 $\Delta rps16$ Vektor (pSA7)	30
2.2.2.3 $\Delta rps15$ Vektor (pSA15 und pTF16)	30
2.2.2.4 $\Delta rpl23$ Vektor (pSA14)	31
2.2.2.5 $\Delta rpl36$ Vektor (pSA9 und pTF17)	31
2.2.2.6 $\Delta rpl32$ Vektoren (pSA12 und pTF15)	32
2.2.2.7 $\Delta rpl22$ (pTF12) und $\Delta rps3$ (pTF13) Vektoren	33
2.2.3 Plastidentransformation	34
2.2.4 DNA-Isolation	34
2.2.5 RFLP-Analyse	35

2.2.6 Plasmid-Isolation	36
2.2.7 RNA-Isolation und Hybridisierungsprozeduren	36
2.2.8 Bestimmung der rRNA-Verhältnisse	37
2.2.9 Polysomen-Analyse	37
2.2.10 <i>E. coli</i> -Stämme	38
2.2.11 Ribosomenisolation und Massenspektrometrie	38
2.2.12 Physiologische Messungen	38
2.3 Methoden: Detektion und Charakterisierung von miRNAs in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	39
2.3.1 Wachstumsbedingungen	39
2.3.2 Stämme und Medien	40
2.3.2.1 Stämme	40
2.3.2.2 Medien	40
2.3.3 Ernte der Zellen	42
2.3.4 miRNA-Isolation	43
2.3.5 Denaturierendes Agarosegel	43
2.3.6 miRNA-cDNA-Synthese und PCR-Primerdesign	43
2.3.6.1 cDNA-Synthese Protokoll	43
2.3.6.2 Primerdesign	44
2.3.7 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)	44
2.3.7.1 Auswertung der qRT-PCR-Daten	45
2.3.7.2 Vorhersage von miRNA-Zieltranskripten	45
3. Ergebnisse	47
3.1 Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden	47
3.1.1 Knockout einzelner ribosomaler Proteine	47
3.1.1.1 Essentielle Proteine	47
3.1.1.1.1 Knockout von <i>rps3</i>	47
3.1.1.1.2 Knockout von <i>rps16</i>	49
3.1.1.1.3 Knockout von <i>rpl22</i>	51
3.1.1.1.4 Knockout von <i>rpl23</i>	53
3.1.1.1.5 Knockout von <i>rpl32</i>	55
3.1.1.2 Nicht-essentielle Proteine	57
3.1.1.2.1 Knockout von <i>rps15</i>	58
3.1.1.2.1.1 Physische Karten, RFLP, Keimlingstests und Massenspektrometrie	58
3.1.1.2.1.2 Phänotyp der $\Delta rps15$ -Pflanzen	59
3.1.1.2.1.3 Bestimmung der rRNA-Verhältnisse	61
3.1.1.2.1.4 Analyse der plastidären rRNAs per Northern Blot	62
3.1.1.2.1.5 Polysomen-Analyse	66
3.1.1.2.1.6 Fluoreszenzspektroskopische Messung von Photosyntheseparametern	68
3.1.1.2.2 Knockout von <i>rpl36</i>	71
3.1.1.2.2.1 Physische Karten und RFLP	71
3.1.1.2.2.2 Phänotypen der $\Delta rpl36$ -Pflanzen	72
3.1.1.2.2.3 Analyse der plastidären rRNAs per Northern blot	74
3.1.2 Doppelknockout plastidärer ribosomaler Proteine	75
3.1.2.1 Knockout von <i>rpl36</i> auf der Basis von $\Delta rps15$	75

3.1.2.2	Knockout von <i>rpl36</i> auf der Basis von $\Delta rpl33$	77
3.1.2.3	Knockout von <i>rps15</i> auf der Basis von $\Delta rpl33$	78
3.2	Detektion und Charakterisierung von miRNAs in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	81
3.2.1	Identifikation von miRNA-Kandidaten zur genaueren Analyse	81
3.2.1.1	Gesamtzahl der Reads und Anzahl distinkter Reads	81
3.2.1.2	Konsistenz der NGS-Daten mit publizierten Daten	82
3.2.1.3	miRNA-Vorläufer-Vorhersagen	82
3.2.2	Analyse einzelner Bedingungen	84
3.2.2.1	Etablierung der Stem-Loop-qRT-PCR	84
3.2.2.2	Ergebnisse der Stem-Loop-qRT-PCR	85
3.2.2.2.1	Qualitätsmerkmale der qRT-PCR	85
3.2.2.2.2	Messergebnisse der qRT-PCR	87
3.2.2.3	Zielvorhersagen für einzelne miRNAs	90
4.	Diskussion	91
4.1	Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden	91
4.1.1	Essentielle Konstituenten des Chloroplastenribosoms	91
4.1.2	Nicht-essentielle Konstituenten des Chloroplastenribosoms	92
4.1.2.1	<i>rps15</i>	92
4.1.2.1.1	Reduzierte Abundanz an funktionellen Ribosomen	93
4.1.2.1.2	Reduzierte Funktionalität der Ribosomen	99
4.1.2.1.3	Reduzierte Stabilität der Ribosomen	100
4.1.2.2	<i>rpl36</i>	101
4.1.2.2.1	Funktion von L36 im Ribosom	101
4.1.2.2.2	Anomalien der Wuchs- und Blattform	103
4.1.3	Doppelknockout plastidärer ribosomaler Proteine	106
4.2	Plastomevolution in Parasiten	107
4.3	Detektion und Charakterisierung von miRNAs in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	111
4.3.1	Etablierung der SL-qRT-PCR	112
4.3.2	Zielvorhersagen	113
4.3.3	Beispielhafte Analyse Gameten-spezifisch regulierter miRNAs	113
5.	Zusammenfassung	117
6.	Literaturverzeichnis	119
7.	Publikationsliste	137
8.	Eidesstattliche Erklärung	139
9.	Danksagung	141
10.	Anhang	143
10.1	Untersuchungsergebnisse der Massenspektrometrie	143
10.2	Messergebnisse der SL-qRT-PCR	144

## II. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aa	Aminosäure (amino acid)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bspw.	beispielsweise
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ct	Cycle threshold
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
cDNA	Komplementäre DNA
Chl	Chlorophyll
Ch/I	Chloroform/Isoamyl-Alkohol
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	Kultivar
d	Tage
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	1, 4-Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	Und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
emPAI	Exponentiell modifizierter Proteinabundanz-Index
EMS	Ethylmethanolsulfonat
Fv/Fm	Quanteneffizienz von dunkel- adaptiertem Photosystem II
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanidin
GTP	Guanosin5'-triphosphat
gDNA	Genomische DNA
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
g/L	Gramm pro Liter
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazinethansulfonische Säure
IAA	Indolessigsäure
IBA	Indolbuttersäure
Kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KI	Kaliumiodid

KO	Knockout
LSU	Large subunit (große Untereinheit)
L	Liter
M	Molar
miRNA	Mikro RNA
Mb	Megabasenpaare
m	Meter
min	Minuten
mL	Milliliter
mg/L	Milligramm pro Liter
mM	Millimolar
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MOPS	Morpholinopropansulfonische Säure
mRNA	Boten-RNA
Mw	Molekulargewicht
NAA	Naphthalenessigsäure
NaPP	Natriumpyrophosphat
NEP	Kernkodierte RNA-Polymerase
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Plastidenkodierte RNA-Polymerase
Ph/Ch/I	Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Prrn</i>	Ribosomaler-RNA-Operon-Promotor
Plastom	Plastidengenom
pM	Pikomolar
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
ptDNA	Plastiden DNA
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
RFLP	Restriktionsfragment-längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodekylsulfat

SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SSU	Small subunit (kleine Untereinheit)
SLP	Stem-Loop-Primer
S	Svedberg-Einheit
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T-DNA	Transfer-DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TC	Gewebekultur
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyl-Ethane-1, 2-Diamin
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-Diol
tRNA	Transfer RNA
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Uridin
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
u.a.	Unter anderem
ü.N.	Über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt/WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
Δ	Delta: Steht für die Deletion oder Unterbrechung einer kodierenden Sequenz
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μE	Mikro-Einstein
°C	Grad Celsius

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1:	Prozess der primären Endosymbiose.	3
Abb. 1.1.2:	VGT und HGT.	4
Abb. 1.1.3:	Segmentierte Kryo-EM-Karten von bakteriellen und plastidären Ribosomen.	13
Abb. 1.1.4:	Nomura- und Nierhaus-Assemblierungskarten.	15
Abb. 1.2.1.:	Pflanzlicher miRNA-Biogenese-Pfad.	20
Abb. 2.1:	Primer-Schema zur Stem-Loop-qRT-PCR.	44
Abb. 3.1.1:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrps3</i> -Pflanzen.	48
Abb. 3.1.2:	Molekularer und optischer Phänotyp der <i>Δrps3</i> -Pflanzen.	49
Abb. 3.1.3:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrps16</i> -Pflanzen.	50
Abb. 3.1.4:	Molekularer und optischer Phänotyp der <i>Δrps16</i> -Pflanzen.	51
Abb. 3.1.5:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrpl22</i> -Pflanzen.	52
Abb. 3.1.6:	Molekularer und optischer Phänotyp der <i>Δrpl22</i> -Pflanzen.	53
Abb. 3.1.7:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrpl23</i> -Pflanzen.	54
Abb. 3.1.8:	Molekularer und optischer Phänotyp der <i>Δrpl23</i> -Pflanzen.	55
Abb. 3.1.9:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrpl32</i> -Pflanzen.	56
Abb. 3.1.10:	Molekularer und optischer Phänotyp der <i>Δrpl32</i> -Pflanzen.	57
Abb. 3.1.11:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrps15</i> -Pflanzen.	58
Abb. 3.1.12:	RFLP und Keimlingstest von <i>Δrps15</i> -Pflanzen.	59
Abb. 3.1.13:	Phänotyp der <i>Δrps15</i> -Pflanzen unter Standardbedingungen.	60
Abb. 3.1.14:	Phänotyp junger Blätter des Wildtyps und dreier <i>Δrps15</i> -Knockout-Pflanzen.	60
Abb. 3.1.15:	Blätter des Wildtyps und der Mutante unter Kältestress.	61
Abb. 3.1.16:	Bioanalyzermessungen zur Bestimmung der rRNA-Verteilung der plastidären 70S-Ribosomen.	62
Abb. 3.1.17:	Physische Karte des plastidären rDNA-Operons in Tabak und Positionen der verwendeten Sonden.	63
Abb. 3.1.18:	Northern-Blot-Analysen der 16S und 23S rRNAs.	64
Abb. 3.1.19:	Northern-Blot-Analysen der 4,5S und 5S rRNAs.	65
Abb. 3.1.20:	Gesamt-RNA der Mutante und des Wildtyps.	66
Abb. 3.1.21:	Northern Blots von Polysomen-Analysen der <i>Δrps15</i> -Pflanzen.	67
Abb. 3.1.22:	Analyse des Chlorophyllgehalts und diverser photosynthetischer Parameter in <i>Δrps15</i> - und Wildtyp-Pflanzen.	70
Abb. 3.1.23:	Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrpl36</i> -Pflanzen.	71
Abb. 3.1.24:	RFLP-Analyse von drei Plastidentransformanten und eines Wildtyps.	72
Abb. 3.1.25:	Phänotypen der <i>Δrpl36</i> -Pflanzen in Sterilkultur.	72
Abb. 3.1.26:	Phänotypen der <i>Δrpl36</i> -Pflanzen im Gewächshaus.	73
Abb. 3.1.27:	Stark veränderte Blattformen in <i>Δrpl36</i> -Pflanzen.	73
Abb. 3.1.28:	Northern Blots zur Analyse der 16S und 23S rRNAs.	74
Abb. 3.1.29:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von <i>Δrpl36</i> (pTF17).	76

Abb. 3.1.30:	Phänotyp und RFLP-Analyse der <i>rps15-rpl36</i> -Doppelknockout-Pflanzen.	77
Abb. 3.1.31:	Phänotyp der <i>rpl33-rpl36</i> -Doppelknockout-Pflanzen.	78
Abb. 3.1.32:	Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von $\Delta rps15$ (pTF16).	79
Abb. 3.1.33:	Phänotyp und RFLP-Analyse der <i>rps15-rpl33</i> -Doppelknockout-Pflanzen.	80
Abb. 3.2.2:	Boxplots der Längen von miRNA-Vorläufern.	83
Abb. 3.2.3:	Beispiele für lange miRNA-Vorläufer.	84
Abb. 3.2.4:	Schmelzkurvenanalyse von zwei ausgewählten untersuchter miRNAs.	86
Abb. 3.2.5:	Qualität der biologischen Replikate.	86
Abb. 3.2.6:	Verteilung der im Durchschnitt erreichten Ct-Werte.	87
Abb. 3.2.7:	Grafische Darstellung der Expressionswerte von sieben verschiedenen miRNAs.	88
Abb. 3.2.8:	Konstant bleibende und veränderliche miRNAs.	89
Abb. 4.1.1:	Die Nomura-Assemblierungskarte zeigt die Bindungshierarchien und Abhängigkeiten der ribosomalen Proteine.	94
Abb. 4.1.2:	Bindeverhalten und Lokalisation der Proteine der SSU.	95
Abb. 4.1.3:	Vergleich der 16S-Sequenzen von <i>E. coli</i> und Chloroplasten.	96
Abb. 4.1.4:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von S15 von <i>E. coli</i> und Chloroplasten.	97
Abb. 4.1.5:	Vergleich der 23S-Sequenzen von <i>E. coli</i> und Chloroplasten.	100
Abb. 4.1.6:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von L36 von <i>E. coli</i> und Chloroplasten.	102
Abb. 4.1.7:	Die Auswirkung der Absenz von L36 auf die LSU von <i>Deinococcus radiodurans</i> projiziert.	103
Abb. 4.1.8:	Biparentale Vererbung von Plastiden im Genus <i>Oenothera</i> .	105

## IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.1:	Essentialität und evolutionäre Konservierung von Genen für plastidäre ribosomale Proteine in parasitischen und/oder pathogenen Plastiden-beinhaltenen Gruppen und deren Homologe in <i>E. coli</i>	11
Tab. 1.1.2:	Vergleich zwischen bakteriellen Ribosomen aus <i>E. coli</i> und Plastidenribosomen aus <i>Spinacea oleracea</i> .	13
Tab. 2.1:	Übersicht aller analysierten Bedingungen.	39
Tab. 2.2:	Grundrezept: TAP-Medium.	40
Tab. 2.3:	Grundrezept HS-Medium.	41
Tab. 2.4:	Grundrezept für Hutners-Trace-Metals-Lösung.	41
Tab. 2.5:	Auflistung aller chemischen Komponenten der stärker veränderten Medien.	42
Tab. 4.1:	Übersicht über die Essentialität und die Konservierung der ribosomalen Proteine in <i>E. coli</i> , Tabakplastiden und div. parasitischen/nicht-photosynthetischen Spezies.	108

# 1. Einleitung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden zwei Projekte simultan bearbeitet. Aufgrund der inhaltlichen Distanz zwischen beiden Themen befindet sich unter Punkt 1.1 eine Einleitung zum Thema des ersten Projektes: „Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden“ sowie unter 1.2 eine separate Einleitung zum Projekt: „Detektion und Charakterisierung von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*“.

## 1.1 Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden

Dieses Projekt behandelte grundlegende Aspekte der Ribosomenarchitektur und der Evolution des Genoms von pflanzlichen Organellen anhand der Modellpflanze *Nicotiana tabacum*.

### 1.1.1 Plastiden und die Evolution des Plastoms

#### 1.1.1.1 Der Chloroplast

Chloroplasten leisten einen unabdingbaren Beitrag zur Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge auf der Erde. Sie kommen ubiquitär in der Form von Organellen in photoautotrophen Organismen vor und ermöglichen diesen die Nutzung der von der Sonne freigesetzten Energie durch Photosynthese. Während dieses Vorganges wird Energie in Form von elektromagnetischen Wellen genutzt, um energiereiche, biochemisch verfügbare Verbindungen zu synthetisieren. Dieser Prozess bildet das Existenzfundament fast aller heterotrophen Organismen der Erde.

Chloroplasten sind nur eine mögliche Ausprägungsform dieses Organellentyps. Im Verlauf der Evolution entwickelten sich weitere, für bestimmte Aufgaben spezialisierte Chloroplastentypen mit abgewandelten Funktionen (z.B.: Amyloplasten zur Stärkespeicherung, Chromoplasten zur Farbgebung), die alle, inklusive der Chloroplasten selbst, unter dem Hauptbegriff Plastiden vereint werden (Sitte *et al.*, 1999).

In höheren Pflanzen, Algen und anderen Plastiden-besitzenden Gruppen finden in Chloroplasten neben der Photosynthese (die selbst wiederum nicht in allen Gruppen vorhanden sein muss) noch weitere metabolische Prozesse statt. Dazu gehören wichtige Funktionen, wie die Fettsäuresynthese, die Synthese von Tetrapyrrolen, die Produktion bestimmten Aminosäuren und Pigmenten, als auch von Stärke (Neuhaus und Emes, 2010).

Plastiden besitzen, ebenso wie Mitochondrien, ein eigenes genetisches System zur Expression von Genen. Das Plastiden-spezifische Genom, das Plastom, liegt separat vom Kerngenom in den Plastiden vor und wird unabhängig vom Kern vererbt (Sitte *et al.*, 1999). Die Struktur und der Informationsgehalt des Plastoms werden unter 1.1.1.4 genauer betrachtet. Die Transkription des Plastoms erfolgt über eine Kern-kodierte Polymerase (NEP), bzw. eine Plastiden-kodierte Polymerase (PEP) (Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Darüber hinaus besitzen Plastiden ein eigenständiges Translationssystem, welches unter 1.1.2 exakter betrachtet wird.

Chloroplasten sind zentrale Knotenpunkte jeglicher biologischer Aktivität auf der Erde und weisen viele hochspezialisierte biochemische Anpassungen und Besonderheiten auf. Die Evolution der Chloroplasten begann vor 1-2 Milliarden Jahren, als Teil eines symbiontischen Systems zweier Organismen, was im folgenden Punkt näher erläutert wird.

#### 1.1.1.2 Der Ursprung der Organellen: Endosymbiose

Der evolutionäre Ursprung von Plastiden und Mitochondrien ist in ihrer Abstammung von Cyanobakterien-artigen bzw.  $\alpha$ -Proteobakterien-artigen Organismen zu suchen (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Sagan, 1967).

Mitochondrien waren die ersten Organellentypen, die durch ein primäres Endosymbioseereignis entstanden sind. Es wird davon ausgegangen, dass vor ca. 1,5 bis 2 Milliarden Jahren eine protoeukaryotische Zelle zunächst ein  $\alpha$ -Proteobakterien-ähnliches Bakterium aufnahm, welches fortan als Symbiont im Cytoplasma der eukaryotischen Zelle weiterexistierte (Gray *et al.*, 1999; Zimmer, 2009). In einem selektiven Kombinationsprozess wurde die genetische Kontrolle der Genexpressionsmaschinerie des kleineren Symbionten von diesem auf den Kern des Wirts übertragen. Dies geschah vor allem durch (endosymbiontischen) Gentransfer vom Genom des Endosymbionten zum Nukleus des Wirts, wodurch beide Symbionten im Lauf der Zeit drastisch verändert wurden (Lang *et al.*, 1999) (Abb. 1.1.1). In erheblich kleinerem Umfang erhielten Mitochondriengenome (Chondriom) auch Kern-kodierte Sequenzen des Wirts, als auch einige hunderte Millionen Jahre später einige wenige Sequenzen, deren Ursprung in den Chloroplasten lag (vgl. Punkt 1.1.1.3) (Bock und Timmis, 2008). Im besonderen Maß aber wurde von diesen massiven Umstrukturierungen der kleinere der beiden Partner betroffen. Mitochondrien, in ihrer heute beobachtbaren Form, haben ihre Unabhängigkeit verloren und sind vollkommen auf Kern-kodierte Proteine und Signale sowie das zelluläre Umfeld des Cytosols der eukaryotischen Zelle zum Überleben angewiesen, wie es auch bei Plastiden der Fall ist.

Plastiden sind einige hundert Millionen Jahre später, vor ca. 1,5 Milliarden Jahren in Folge eines zweiten primären Endosymbioseereignisses entstanden. Hierbei nahm ein eukaryotischer Nachfahre jener protoeukaryotischen Zelle, welche zuvor Mitochondrien als Organellen etabliert hatte, einen Cyanobakterien-artigen Organismus als neuen, zweiten Symbionten auf (Reyes-Prieto *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2008; Archibald, 2009). Die neue Symbiose ermöglichte es dem Wirt von den photoautotrophen Eigenschaften des Cyanobakteriums zu profitieren und stellte den Startpunkt zur Entwicklung aller Plastiden-beinhaltenen Organismen dar. Es entwickelte sich eine stabile Symbiose die zur Entstehung der heutigen Plastiden führte. Dies geschah, wie auch zuvor bei den Mitochondrien stattgefunden, durch massiven Gentransfer vom Genom des kleineren Symbionten zum Wirtsgenom. Die damit verbundene Reduktion des bakteriellen Genoms (sowohl Größe als auch Gengehalt betreffend) führte abermals zu einer tiefgreifenden genetischen Reorganisation beider Symbionten (Abb. 1.1.1).

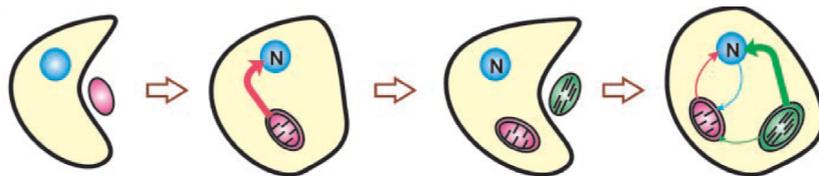


Abb. 1.1.1: Prozess der primären Endosymbiose. Im Schema dargestellt ist der mehrere hundert Millionen Jahre dauernde Prozess der Entwicklung einer protoeukaryotischen Zelle durch sequentielle Aufnahme zweier Bakterien zu einer typischen pflanzlichen Zelle mit Mitochondrien und Chloroplasten. Blau: Nucleus/Nucleoid der Wirtszelle, rot:  $\alpha$ -Proteobakterium, bzw. Mitochondrium, grün: Cyanobakterium, bzw. Chloroplast. Die Pfeile symbolisieren die Richtung und das Ausmaß des Gentransfers (Abb. aus Bock und Timmis, 2008)

Alle Landpflanzen besitzen Plastiden, die aus jenem primären Endosymbioseereignis hervorgegangen sind. Neben primären Endosymbioseereignissen existieren auch sekundäre, tertiäre und quartäre Endosymbioseereignisse, die sich aus einer weiteren endosymbiotischen Inkorporation eines Plastiden-beinhaltenen Eukaryoten in einen anderen Eukaryoten entwickelten. In einigen Meeresalgen und pathogenen Apicomplexa sind solche sekundäre Plastiden zu finden (Gould *et al.*, 2008; Krause, 2008).

Die beiden beschriebenen primären Endosymbioseereignisse können als Startschuss zur Entwicklung jeglichen komplexeren Lebens auf der Erde betrachtet werden. Erst danach kam es zur Evolution höherer Eukaryoten, wie Tiere und Pflanzen. Nach welchen Kriterien bestimmte Gene in den Kern transferiert, bzw. im Organellengenom belassen werden, konnte noch nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Die Beleuchtung dieser Frage war ein Nebenaspekt dieser Arbeit.

### 1.1.1.3 Endosymbiotischer Gentransfer von Organellen zum Kerngenom

Der übliche Fluss der genetischen Information findet in vertikaler Richtung (Vertikaler Gentransfer: VGT), während der vegetativen oder sexuellen Vermehrung von Organismen, statt. Dies bedeutet, Gene werden von einer Generation innerhalb einer Spezies an die nächste Generation weitergegeben. Horizontaler Gentransfer (HGT) zeichnet sich durch eine Durchbrechung der Speziesgrenzen bei der Übertragung genetischer Informationen aus. (Keeling und Palmer, 2008; Bock, 2010) (Abb. 1.1.2).

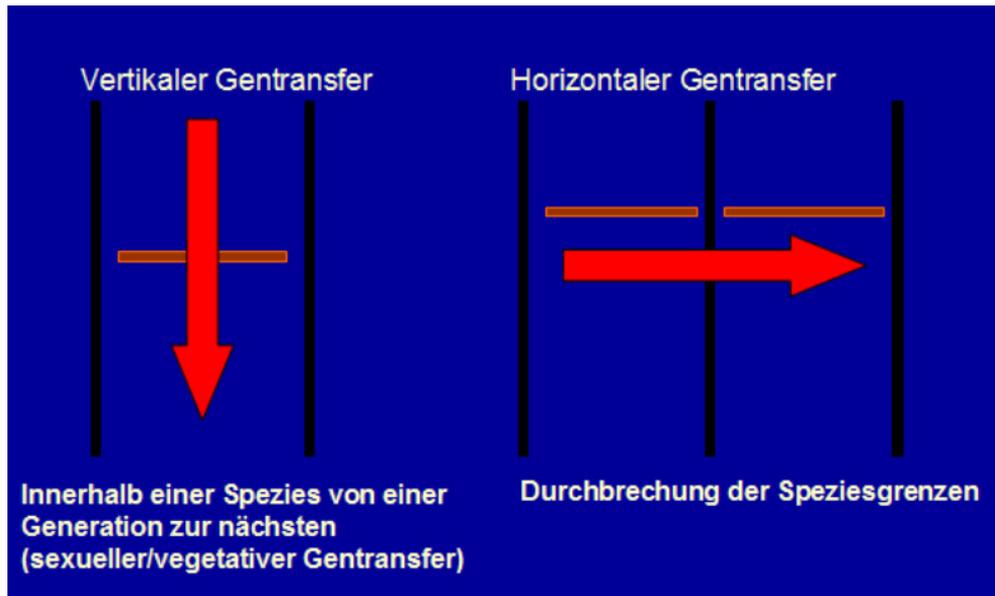


Abb.: 1.1.2: VGT und HGT. Die roten Pfeile stellen den Fluss der genetischen Information dar. Die schwarzen Linien entsprechen den Speziesgrenzen, die braunen Linien der Generationenbarriere. VGT findet innerhalb der Artgrenzen, die Generationenbarriere überbrückend statt. HGT findet die Speziesgrenzen überwindend und die Generationenbarriere außer Acht lassend statt.

Damit es zur Übertragung von Genen kommen kann, ist es notwendig, dass es zu einem engen räumlichen Kontakt der Teilnehmer (Symbiont/Symbiont(Wirt) oder Wirt/Parasit) kommt, der bis zur in 1.1.1.2 geschilderten Integration eines Organismus in den anderen führen kann. Bestimmte Lebensweisen, wie sie in parasitischen oder symbiontischen Ökosystemen zu finden sind, fördern das Aufkommen horizontalen Gentransfers (Keeling und Palmer, 2008). HGT kann einzelnen Spezies signifikante Überlebensvorteile gewährleisten. So werden die größten marinen Algenblüten durch allein zwei Arten von Diatomeen verursacht, *Pseudo-nitzschia sp.* und *Fragilariopsis sp.*. Beide Spezies zeichnen sich durch den Besitz eines von Bakterien stammenden Eisen-Speicher-Proteins, Ferritin, aus. Dieses gewährt beiden Arten in Gewässern, die nur geringe Eisenkonzentrationen aufweisen, einen kompetitiven Wachstumsvorteil gegenüber anderen Algenarten (Marchetti *et al.*, 2009; Bock, 2010).

Eine Sonderform von HGT ist der endosymbiontische Gentransfer (EGT). Dieser tritt zwischen Organismen auf, bei denen ein Partner im Cytoplasma des anderen lebt und bezeichnet den Vorgang, während dessen genetisches Material von einem Symbiont, in der Regel vom kleineren der beiden Organismen zum größeren transferiert und in dessen Genom integriert wird. Die prominentesten Beispiele sind jene zuvor geschilderten Transferereignisse, die zur Entstehung der Genome von Mitochondrien und Plastiden in ihrer heutigen Form geführt haben. Bei Plastiden findet und fand dieser Vorgang unidirektional vom Plastom zum Kerngenom statt und zu einem geringen Anteil vom Plastom zum Chondriom (Bock und Timmis, 2008). Das Mitochondriengenom hingegen nahm im Laufe dieses Prozesses einige wenige Gene des Kerngenoms, bzw. des Plastoms auf, transferierte jedoch auch den Großteil seiner Gene in den Kern (Wang *et al.*, 2007; Kitazaki und Kubo, 2010). EGT hat große Auswirkungen auf die Evolution ganzer Taxa, evident an der Entstehung der Eukaryoten, bzw. des Reiches Plantae.

Der Prozess des endosymbiontischen Gentransfers ist kein Relikt einer vergangenen evolutionären Epoche, sondern ist auch heute noch, bspw. zwischen Plastiden und eukaryotischen Kernen aktiv und nachweisbar. Dieser Sachverhalt konnte erstmals 2003, durch den Transfer von Transgenen vom Plastom in das Kerngenom von Tabak experimentell bewiesen werden (Huang *et al.*, 2003; Stegemann *et al.*, 2003; Timmis, 2004; Stegemann und Bock, 2006; Bock und Timmis, 2008). Welcher Mechanismus maßgeblich für den Transfer von Nukleinsäuren von Organellen zum Kern von Bedeutung ist, konnte noch nicht final geklärt werden. Es gibt sowohl Hinweise auf einen Prozess, der RNA-Intermediate involviert, als auch auf Prozesse, die zur Integration mehrerer Kb großer Abschnitte von plastidärer DNA ins Kerngenom geführt haben (Bock und Timmis, 2008).

Beispiele für natürlich vorkommenden und evolutionär betrachtet jungen EGT sind die symbiontischen Organismen *Pachypsylla venusta*, eine Blattlaus (Psyllidae), und Candidatus *Carsonella ruddii*, welcher im Cytoplasma der Blattlauszellen zu finden ist. Candidatus *C. ruddii* ist ein  $\gamma$ -Proteobakterien-artiges Bakterium und stellt der Laus diverse Aminosäuren zur Verfügung, um im Gegenzug zuckerhaltige Verbindungen aus dem Metabolismus des Insekts zu erhalten (Baumann *et al.*, 2002; Baumann und Baumann, 2005; Nakabachi *et al.*, 2006). Auffällig ist die Reduktion der Größe und des Gengehaltes des Genoms von *C. ruddii*. Das nur 160 kb große Genom erfuhr im Vergleich zu seinen nächsten freilebenden Verwandten eine dramatische Reduktion seiner Größe und seines Gengehaltes, der nur noch 182 ORFs aufweist. Andere  $\gamma$ -Proteobakterien, wie z.B. *E. coli*, besitzen hingegen ein Genom von ~5,4 Mb Größe mit ~5400 Genen. Während der Genomreduktion in *C. ruddii* kam es auch zum

Verlust bestimmter essentieller Gene, die in die Replikation der DNA, ihre Transkription und Translation involviert sind und deren Verlust diese Prozesse somit unmöglich machen sollte (Tamames *et al.*, 2007). *C. rudii* muss daher in kompletter genetischer Abhängigkeit seiner eukaryotischen Partnerzellen stehen, die die verlustigen Komponenten zur Verfügung stellen müssen. Carsonellen werden sowohl während der Mitose, als auch während der Meiose auf die Tochterzellen übertragen, wie es auch bei etablierten pflanzlichen Organellen, Plastiden und Mitochondrien, zu beobachten ist, was die Parallelen zu jenen deutlich macht (Moran *et al.*, 2008). Die beiden letztgenannten befinden sich auf einem weitaus höheren Grad der Anpassung und Integration als *Carsonella*, dennoch zeigt dieses Beispiel, wie häufig und weit verbreitet Gentransferereignisse sind.

Ein weiteres Beispiel für EGT und die Etablierung cytosolischer Organellen ist das genetische Verhältnis zwischen der Meeresschnecke *Elysia sp.* und der Alge *Vaucheria litorea*. Die Meeresschnecke *Elysia sp.* saugt das Cytoplasma aus Algen der Art *V. litorea* heraus und nimmt dabei intakte Chloroplasten auf, die in Körperzellen der Schnecke inkorporiert werden und dort aktiv, nun als Kleptoplasten bezeichnet, über mehrere Monate hinweg Photosynthese betreiben. Es konnte nachgewiesen werden, dass im Zuge dieser Koexistenz Gene vom Algengenom auf das Kerngenom von *Elysia sp.* übertragen wurden. Bisher konnte dies für *psbO*, welches aktiv im Kern exprimiert wird sowie für drei Gene, die LHC-Proteine kodieren, demonstriert werden (Pierce *et al.*, 2007; Rumpho *et al.*, 2008; Bock, 2010).

Das Vorkommen von EGT, dessen Hauptflussrichtung von den Genomen der kleineren Symbionten, wie bspw. von den bakteriellen Plastiden- und Mitochondrienvorläufern zum größeren Symbionten, dem Kerngenom von Eukaryoten verläuft, verdeutlicht die Flexibilität und Anpassungsfähigkeit dieser komplexen genetischen Systeme. Im Besonderen zeigt dies die überragende Plastizität der Organellengenome auf, die im Verlauf der Evolution durch drastischen Genverlust in völlig neue biologische Strukturen transformiert wurden. Diese Plastizität besteht weiterhin und führt zum Teil zu erstaunlichen Ausprägungen (vgl. Punkt 1.1.1.4 und 1.1.1.5).

#### 1.1.1.4 Reduktive Evolution des Plastidengenoms

DNA-Sequenzierungsprojekte zur Bestimmung von Plastomsequenzen und cyanobakteriellen Genomen ermöglichen Rückschlüsse auf die Evolution des frühen Endosymbiontengenoms zu seiner heutigen Form seit seiner Entstehung. Aktuell sind die Sequenzen von 260 Plastidengenomen bekannt (NCBI-Datenbank, Stand: Februar 2012). Das Plastom höherer

Pflanzen besitzt im Schnitt eine Größe von ca. 120 bis 160 kb und kodiert durchschnittlich 100 bis 120 (Median 113) verschiedene Gene (Wicke *et al.*, 2011). Von diesen kodieren wiederum üblicherweise ~80 Proteine, ~30 tRNAs und vier rRNAs (Delannoy *et al.*, 2011).

Aus dem Vergleich des Plastoms grüner Landpflanzen mit dem Genom frei lebender Cyanobakterien wird ersichtlich, dass ein enormer Anteil von ca. 90-95 % der Kodierungskapazität des ursprünglichen endosymbiontischen Genoms eliminiert, bzw. in das Kerngenom transferiert worden sein muss (vgl. Punkt 1.1.1.3). So sind nur ca. 5 % der Proteine, welche für die im Plastiden ablaufenden metabolischen Prozesse benötigt werden, im Organellengenom kodiert. Der überwiegende Anteil der in Chloroplasten detektierbaren Proteine wird im Kern transkribiert, im Cytosol translatiert und von dort aus in die Plastiden importiert (Abdallah *et al.*, 2000; Krause, 2008).

Die im Plastom lokalisierten Gene können grob in vier Klassen eingeteilt werden. Dies sind (1) Gene, deren Produkte an den Licht- oder Dunkelreaktionen der Photosynthese beteiligt sind; (2) Gene, deren Produkte in die Transkription oder Translation involviert sind, rDNA-Gene mitberücksichtigt; (3) Gene, deren Produkte an nicht-photosyntheseverwandten Stoffwechselfaden teilhaben, wie bspw. der Fettsäuresynthese; (4) Gene, deren Produkte in andere Kategorien fallen, wie posttranskriptionelle Modifikation (z.B. Spleißfaktoren) oder Proteinumsatzregulation (z.B. Proteasen). Zwei Genen, *ycf1* und *ycf2*, konnte bisher noch keine Funktion zugewiesen werden (Palmer, 1991; Sugiura, 1992; Liere und Link, 1995; Peltier *et al.*, 2004; Bock, 2007; Wicke *et al.*, 2011).

Eine Synopsis der Plastome photosynthetisch aktiver Landpflanzen lässt ein bemerkenswert konserviertes Muster hervortreten, was die Identität der nicht transferierten Gene, deren strukturelle Anordnung und die Organisation der Plastomarchitektur angeht (Jansen *et al.*, 2007). Plastome weisen in den meisten Fällen eine dreigeteilte, ringförmige Architektur auf. Ein typisches Plastom besteht aus einer großen nicht-redundanten Region (LSC: *Large Single Copy*), welche die meisten Gene enthält sowie einer kleineren nicht-redundanten Region (SSC: *Small Single Copy*) und zwei invertierten redundanten Segmenten, IR<sub>A</sub> (*Inverted Repeat A*) und IR<sub>B</sub> (*Inverted Repeat B*), die die beiden SC Regionen voneinander separieren. Auch sind in verschiedenen Pflanzenspezies auf den entsprechenden plastomischen Abschnitten fast immer die gleichen Gene in einer ähnlichen oder vollkommen identischen Konstellation präsent. Selbst die gemeinsame Organisation und Expression bestimmter Gene innerhalb von Operons werden parallel über viele Spezies hinweg stabil beibehalten (Ohyama *et al.*, 1986; Shinozaki *et al.*, 1986; Maier *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1999).

Ein für den hohen Grad an evolutionärer Konservierung stellvertretendes und gleichwohl für die vorliegende Forschungsarbeit relevantes Beispiel sind die plastidäre ribosomale Proteine kodierenden Gene. In Samenpflanzen verschiedener Spezies befindet sich eine hochkonservierte Kombination dieser Gene im Plastom in verschiedenen Operons und anderen Loci des Plastoms kodiert (Ohyama *et al.*, 1986; Shinozaki *et al.*, 1986; Maier *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1999). Diese umfasst 12 der 21 Gene, welche Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit kodieren (und gleichzeitig Homologe in *E. coli* besitzen): *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps11*, *rps12*, *rps14*, *rps15*, *rps16*, *rps18*, *rps19*; sowie 9 von 31 Gene, die Proteine der großen Untereinheit kodieren (die Homologe in *E. coli* besitzen): *rpl2*, *rpl14*, *rpl16*, *rpl20*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl32*, *rpl33*, *rpl36*. Die Gene der restlichen 9 Proteine der SSU, bzw. 22 Proteine der LSU, die für den Einsatz im Chloroplasten bestimmt sind, wurden in den Kern transferiert und werden erst sekundär nach der Translation im Cytosol wieder in die Plastiden importiert. Diese über viele Pflanzenarten hinweg konstante Kombination von plastidär kodierten ribosomalen Proteinen lässt vermuten, dass noch vor der evolutionären Diversifikation der größten Pflanzengruppen ein sehr stabiler Status des Gengehaltes von Chloroplasten erreicht wurde (Fleischmann *et al.*, 2011).

Generell weisen Chloroplasten einen bemerkenswert hohen Konservierungsgrad des Gengehaltes und der Plastomarchitektur auf, was angesichts der über mehrere hundert Millionen Jahre umspannenden getrennten Evolution vieler Taxa auf einen sehr starken stabilisierend und konservierend wirkenden Selektionsdruck schließen lässt. Wenn dieser Selektionsdruck, der höchstwahrscheinlich vor allem durch die Notwendigkeit der Photosynthese aufkommt, nicht wirkt, wie dies bei parasitischen, heterotroph lebenden Spezies der Fall ist, kann dies extreme Auswirkungen auf die Organisation deren Plastome haben. (Delannoy *et al.*, 2011; Fleischmann *et al.*, 2011).

#### 1.1.1.5 Evolution kryptischer Plastome

Trotz der im vorherigen Punkt dargelegten Sachverhalte gibt es in vielen Plastomen Abweichungen von den üblicherweise extrem konservierten Gen-Mustern des Gros' der Pflanzen. Die stärksten Abweichungen von diesem hohen Konservierungsgrad sind in Spezies zu finden, die die photosynthetische Kohlenstofffixierung zugunsten einer heterotrophen, (holo)parasitischen Lebensweise aufgegeben haben (Krause, 2008; Fleischmann *et al.*, 2011). Die Entstehung dieses Lebensstiles war kein einmaliges Ereignis, sondern fand allein in blütenbildenden Angiospermenarten mindestens elf mal unabhängig voneinander statt (Barkman *et al.*, 2007). All diese Arten haben drastische morphologische und biochemische

Veränderungen erfahren, wie bspw. den Verlust von Blättern und der damit verbundenen kompensatorischen Ausbildung spezieller Organe, der Haustorien, zur Aufnahme von Nährstoffen. Haustorien dienen zur Extraktion verschiedener Metabolite aus dem Wirtsgewebe und sind z.B. in diversen *Cuscuta*-Arten vorzufinden (Sitte *et al.*, 1999).

Photosynthese wird mit einem starken, auf das Plastidengenom wirkenden, Selektionsdruck in Verbindung gebracht (vgl. Punkt 1.1.1.4). Die Abwesenheit der Photosynthese in holoparasitischen Spezies führte zu einer Reduktion dieses Selektionsdruckes und mündete in den betroffenen Arten in markante Veränderungen der Größe, des Gengehaltes, und der Funktionalität der Plastome (Krause, 2008), was schließlich zur Entstehung kryptischer Plastome führt, deren tatsächlicher Informationsgehalt oft nur schwer zu bewerten ist. So besitzt *Epifagus virginiana*, ein Parasit, der die Wurzeln von *Fagus grandifolia* befällt, eine Plastomgröße von nur ~70 kb, in dessen Sequenz nur noch 42 Gene kodiert sind (Wolfe *et al.*, 1992). Die restlichen zum Standardgensatz von ~110 Genen fehlenden ~70 Gene sind entweder zu Pseudogenen degeneriert, in den Nukleus transferiert oder fehlen komplett. Die bis heute extremste entdeckte Reduktion wurde in *Rhizanthella gardneri* vorgefunden, einer unterirdisch wachsenden Orchideenart, die auf *Ceratobasidium sp.* parasitiert. Dies sind Pilze, welche ihrerseits eine Ektomykorrhiza mit *Melaleuca unicata*, einem Myrtengewächs, eingehen. Das Plastidengenom weist in *R. gardneri* nunmehr nur noch eine Größe von ~60 kb auf, in welchem nur 33 Gene gespeichert sind (Delannoy *et al.*, 2011).

Eine weitere Gruppe von parasitischen, Plastiden-beinhaltenen Organismen sind die Apicomplexa. Dieses monophyletische Taxon beinhaltet fast nur parasitisch lebende Protozoa, die einen reduzierten Chloroplast, den Apikoplast besitzen, welcher nicht mehr zur Photosynthese eingesetzt wird (Janouskovec *et al.*, 2010). In diesen Spezies fand ein ebenso dramatischer Genverlust statt, wie bei den zuvor beschriebenen parasitisch lebenden Landpflanzen. So besitzen Vertreter dieser Gruppe, wie *Eimeria tenella*, *Theileria parva* oder *Toxoplasma gondii*, reduzierte Plastome von nur geringer Größe. Diese sind ~40 kb groß und kodieren 40, 43 bzw. 44 Gene.

Einige Gene aber sind trotz der starken Reduktion des Gengehaltes selbst in diesen parasitischen Spezies präsent und extrem konserviert. Dazu gehören vor allem Gene, deren Funktion als essentiell betrachtet wird. So finden sich in allen *Cuscuta*-Arten, wie auch in *Epifagus virginiana* und *Rhizanthella gardneri* die Gene *accD* und *trnE*. *accD* kodiert die  $\beta$ -Carboxyl-Transferase-Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase) (Alban *et al.*, 2000). Die ACCase katalysiert die Bildung von Malonyl-CoA, welches zur *de novo*-Synthese von Fettsäuren benötigt wird (Ohlrogge und Browse, 1995; Sasaki und Nagano, 2004). Dies

erklärt, weshalb der Knockout dieses Genes, bzw. essentieller Konstituenten des Translationsapparates in *Nicotiana tabacum* zu nicht überlebensfähigen Mutanten führt. In diesem Fall bilden die einzigen Ausnahmen die Gräser (Han *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1994) und einige Brassicaceae (Zubko und Day, 1998), deren ACCase-Gene im Kerngenom lokalisiert sind und die diesbezüglich nicht auf die Translation in Plastiden angewiesen sind. Für die von *trnE* kodierte Glutamyl-tRNA (tRNA-Glu) ist eine mindestens zweifache Rolle in Plastiden bekannt. tRNA-Glu ist dort sowohl in ihrer Funktion als Transfer-RNA anzutreffen, als auch als Bestandteil des Häm-Biosynthese-Pfades und folglich essentiell (Schön *et al.*, 1986; Barbrook *et al.*, 2006).

Die umfangreichen Reduktionen in den „Parasiten-Plastomen“ machen dennoch auch vor Genen, die Bestandteile des Translationapparates kodieren, keinen Halt. Sehr oft lässt sich in kryptischen Plastomen der Verlust von Genen feststellen, die die Information zur Synthese ribosomaler Proteine beinhalten. Davon sind sowohl Gene betroffen, deren Homologe in *E. coli* essentiell sind, als auch Gene, die nicht-essentiell sind, was vor allem die Frage aufwirft, was mit den essentiellen Homologen geschehen ist. Da diese nicht mehr im Plastom auffindbar sind, existieren nur die beiden Möglichkeiten ihres Transfers in den Kern oder ihrer vollkommenen Abwesenheit. In Tabelle 1.1.1 ist eine Übersicht über alle Gene plastidär kodierter ribosomaler Proteine dargestellt, in der auch Information über die Essentialität des jeweiligen homologen Gens in *E. coli* enthalten sind, als auch Angaben darüber, in welchen parasitischen bzw. nicht-photosynthetisch aktiven Organismen die homologen Gene präsent oder abwesend (bzw. pseudogenisiert) sind.

Tab. 1.1.1: Essentialität und evolutionäre Konservierung von Genen für plastidäre ribosomale Proteine in parasitischen und/oder pathogenen Plastiden-beinhaltenen Gruppen und deren Homologe in *E. coli* (nach Fleischmann *et al.*, 2011).

Gen	Essentiell in <i>E. coli</i>	Präsent in kryptischen Plastomen
<i>rpl2</i>	Ja	Ja
<i>rpl14</i>	Ja	Nicht in <i>E. virginiana</i> Ψ
<i>rpl16</i>	Ja	Ja
<i>rpl20</i>	Ja	Nicht in <i>E. tenella</i> , <i>T. parva</i> , <i>T. gondii</i>
<i>rpl22</i>	Ja	Nicht in <i>E. virginiana</i> , <i>R. gardneri</i> , <i>T. gondii</i>
<i>rpl23</i>	Ja	Nicht in <i>C. reflexa</i>
<i>rpl32</i>	Nein (unbestätigt)	Nicht in <i>R. gardneri</i> , <i>C. reflexa</i> Ψ
<i>rpl33</i>	Nein	Nicht in <i>T. gondii</i> , <i>E. longa</i> , <i>R. gardneri</i> Ψ
<i>rpl36</i>	Nein	Ja
<i>rps2</i>	Ja	Nicht in <i>T. gondii</i>
<i>rps3</i>	Ja	Nicht in <i>R. gardneri</i>
<i>rps4</i>	Ja	Ja
<i>rps7</i>	Ja	Ja
<i>rps8</i>	Ja	Ja
<i>rps11</i>	Ja	Ja
<i>rps12</i>	Ja	Ja
<i>rps14</i>	Ja	Ja
<i>rps15</i>	Nein	Nicht in <i>E. virginiana</i> , <i>R. gardneri</i>
<i>rps16</i>	Ja	Nicht in <i>C. reflexa</i> , <i>R. gardneri</i>
<i>rps18</i>	Ja	Nicht in <i>E. longa</i> , <i>T. gondii</i>
<i>rps19</i>	Ja	Ja

Ψ: Pseudogen; Daten zu *E. coli* aus Baba *et al.* (2006). Die Information zu *rpl32* konnte nicht bestätigt werden (vgl. 4.1.1). Speziesabkürzungen: *E. virginiana*: *Epifagus virginiana*, *E. tenella*: *Eimeria tenella*, *T. parva*: *Theileria parva*, *T. gondii*: *Toxoplasma gondii*, *R. gardneri*: *Rhizanthella gardneri*, *C. reflexa*: *Cuscuta reflexa*, *E. longa*: *Euglena longa*

Da häufig essentielle Homologe in *E. coli* betroffen sind, lassen diese Genverluste Zweifel bezüglich der Funktionalität des plastidären Translationsapparates und in Folge dessen, an der Funktionalität des gesamten parasitischen Plastiden aufkommen. Gleichzeitig werden Fragen über den Verbleib der augenscheinlich „verloren gegangenen“ Gene aufgeworfen. Die Beantwortung eines Teiles dieses Fragenkomplexes stand im Fokus der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.2. Translation in Plastiden höherer Pflanzen

Translation in Plastiden ist notwendig, um die ~80 plastidär kodierten Proteine exprimieren zu können, die, wie in Punkt 1.1.1.4 beschrieben, an den verschiedensten Prozessen beteiligt sind. Ohne plastidäre Translation könnten bspw. keine der in die Photosynthese involvierten Proteinkomplexe gebildet werden. Dies bedeutete, dass auch Photosynthese folglich unmöglich gemacht würde. Ebenso wäre ein wichtiger Abschnitt des Fettsäuresynthesepfades blockiert, da die ACCase nicht mehr produziert werden könnte.

### 1.1.2.1 Knockout plastidär kodierter essentieller Gene

In Tabak, einer höheren Landpflanze, deren Genexpressionsmaschinerie relativ gut erforscht ist und die als Modellpflanze im Fokus dieses Projektes stand, ist die plastidäre Translation essentiell (Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2006; Rogalski *et al.*, 2008b).

Experimente, bei denen Gene, die essentielle Konstituenten des Plastiden-Ribosoms kodieren, in Tabak inaktiviert wurden, führten zur Entstehung heteroplasmatischer Pflanzen, die sowohl Kopien des unveränderten Wildtyp-Plastoms als auch Kopien des Transplastoms besaßen. Dies rührt daher, dass im Falle des Knockouts eines essentiellen Gens, ein balancierender Selektionsdruck von zwei Seiten auf die Plastome wirkt. Auf dem Plasmid, welches zum KO führt, ist ein Antibiotika-Resistenzgen kodiert, welches die Transformante befähigt, das dem Selektionsmedium zugefügte Antibiotikum zu entgiften (vgl. 2.2.1 und 2.2.3). Dies bedeutet, dass zum Überleben einerseits Plastome notwendig sind, die noch das auszuschaltende, essentielle Gen beinhalten, als auch Plastome, welche das Resistenzgen anstelle des essentiellen Gens besitzen. Die zufällige Segregation der Plastome während des Wachstums kann zur Entstehung von Zellen führen, die einen letal hohen Anteil an Transplastomen enthalten. Diese Zellen sterben ab, was in Folge dessen dazu führt, dass ganze Zelllinien und sich daraus ableitende Organe nicht bilden können. Die entstehenden Phänotypen der Pflanzen sind durch starke Blattdeformationen, die bis zum Verlust ganzer Blattsektoren führen können, gekennzeichnet (Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2008b; Fleischmann *et al.*, 2011). Dieser Phänotyp wird auch als Blattverlust-Phänotyp bezeichnet.

Die Kenntnis des zum Blattverlust-Phänotyp führenden Mechanismus ist für das Verständnis der unter 3.1 beschriebenen Experimente wichtig.

### 1.1.2.2 Das Plastiden-Ribosom

An der Translation in Plastiden sind Ribosomen beteiligt, deren bakterieller Ursprung eindeutig zu erkennen ist. Viele Parameter, die zur Charakterisierung von Ribosomen herangezogen werden, weisen auf eine enge Verwandtschaft zwischen beiden Typen hin (Tab. 1.1.2 und Abb. 1.1.3). Deutlich tritt bei der Betrachtung von eukaryotischen oder mitochondrialen Ribosomen die evolutionäre Distanz zu bakteriell/plastidär geprägten Typen zu Tage. So besitzen eukaryotische Ribosomen deutlich höhere Massen und Sedimentationskoeffizienten (4,6 MDa und 80S) als bakterielle Ribosomen und eine RNA zu Protein-Rate von 1 : 1 (Tab. 1.1.2). Mitochondriale Ribosomen von *Mammalia* hingegen sind mit 55S weniger dicht gepackt und besitzen eine RNA zu Protein-Rate von 1 : 2. Die exotischste Abweichung sind mitochondriale Ribosomen von Protisten, die aus der

~2,5fachen Anzahl an ribosomalen Proteinen (133) im Vergleich zu plastidären/bakteriellen Ribosomen (~55) und gleichzeitig aus 60 % weniger RNA als plastidäre/bakterielle Ribosomen bestehen (Rodnina *et al.*, 2011).

Tab. 1.1.2: Vergleich zwischen bakteriellen Ribosomen aus *E. coli* und Plastidenribosomen aus *Spinacia oleracea*. Die Zahlen in Klammern bezeichnen ribosomale Proteine, die keine Homologe in Bakterien haben. (Rodnina *et al.*, 2011)

Eigenschaft	Ursprung: <i>E. coli</i>	Ursprung: Chloroplast
Molekulare Masse	2,3 MDa	2,6 MDa
Durchmesser	~260 Å	~265 Å
Sedimentationskoeffizient	70S	70S
RNA-zu-Protein-Rate	~2:1	~3:2
Untereinheiten	50S + 30S	50S + 30S
SSU: Bestandteile	16S rRNA (1542 nt) + 21 Proteine	16S rRNA (1491 nt) + 25 (4) Proteine
LSU: Bestandteile	23S rRNA + 5S (gesamt: 3024 nt) + 34 Proteine	23S rRNA + 5S + 4,8S (gesamt: 3033 nt) + 33 (2) Proteine
Anzahl: Interuntereinheitenbrücken	13	13

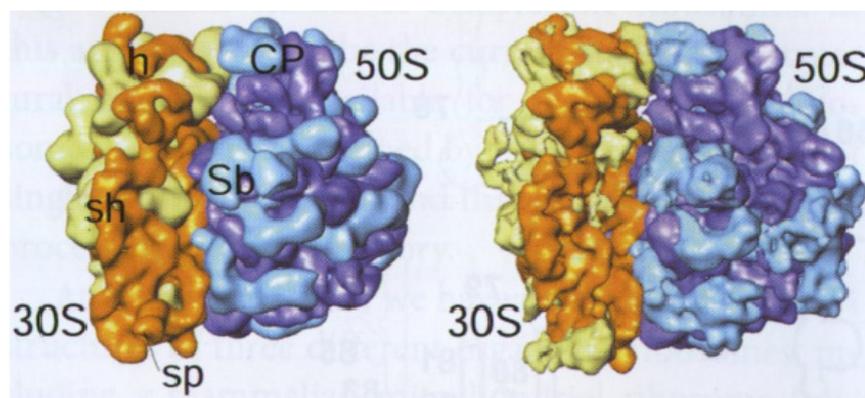


Abb. 1.1.3: Segmentierte Kryo-EM-Karten von bakteriellen und plastidären Ribosomen.

Links ist das 70S-Ribosom von *E. coli* abgebildet, rechts das 70S-Ribosom aus den Chloroplasten von Spinat. Proteine der kleinen Untereinheit sind blassgelb dargestellt, die der großen blassblau. Ribosomale RNAs sind orange und dunkelblau wiedergegeben. Abkürzungen markierter Ribosomenbestandteile: Sp: *spur*, sh: *shoulder*, Sb: *L7/L12 stalk base*, CP: *central protuberance*, h: *head* (Abb. aus Rodnina *et al.*, 2011).

Als strukturelle Besonderheit der plastidären Ribosomen sind sechs Plastiden- bzw. Plastiden- und Cyanobakterien-spezifische ribosomale Proteine (PSRPs) zu nennen, die Bestandteil des plastidären Ribosoms sind. PSRP1,2,4,5 und 6 kommen allein in Plastiden vor, PSRP3 in Cyanobakterien und Chloroplasten (Yamaguchi *et al.*, 2000; Yamaguchi und Subramanian, 2000; Tiller *et al.*, 2012). Drei davon sind der kleinen Unterheit zugehörig (PSRP2-4), während zwei der großen zuzurechnen sind (PSRP5+6). PSRP1 ist kein Bestandteil des Ribosoms und wurde zuletzt als Ribosomen-bindender Faktor identifiziert (Sharma *et al.*, 2010). Diese Proteine, die keine Homologe in *E. coli* besitzen, sind mit für die Verschiebung

der RNA-zu-Protein-Rate im Vergleich zu bakteriellen Ribosomen von 2:1 auf 3:2 verantwortlich.

Chloroplastenribosomen translatieren alle Protein-kodierenden Transkripte, die von den Plastiden-lokalisierten Polymerasen PEP und NEP transkribiert werden. Unter diese ~80 Transkripte fallen 21, die ribosomale Proteine kodieren, welche damit mehr als 25 % der Kodierungskapazität an Proteinen für sich beanspruchen.

### 1.1.2.3 Ribosomenassemblierung

Der Prozess, bei dem es gilt Ribosomen aus ihren Einzelteilen, den ribosomalen Proteinen und den rRNAs, zu funktionalen Stätten der Proteinbiosynthese zusammenzufügen wird als Ribosomenassemblierung bezeichnet. Die Assemblierung findet für beide Untereinheiten getrennt voneinander statt; erst die vollständigen 30S- und 50S-Partikel können zu 70S-Ribosomen vereinigt werden. Im Verlauf des Assemblierungsprozesses ändert sich permanent die Konformation der beteiligten rRNAs. Diese wird maßgeblich durch die Bindung ribosomaler Proteine beeinflusst. Im Normalfall führt die Bindung eines bestimmten ribosomalen Proteins an eine rRNA zu einer Änderung ihrer Sekundärstruktur. Diese Veränderung wiederum ermöglicht es einem oder mehreren weiteren ribosomalen Proteinen an seine/ihre spezifische/n Bindestelle/n auf der rRNA zu binden (Sykes *et al.*, 2010; Talkington *et al.*, 2005; Sykes und Williamson, 2009; Shajani *et al.*, 2011; Mulder *et al.*, 2010). Dies ist für das gesamte Ribosom betrachtet, das aus ~60 Einzelkomponenten besteht, ein sehr komplexer Prozess, der noch nicht vollständig verstanden ist. Dennoch konnten ausgehend von *in vitro*-Rekonstitutionsexperimenten anhand bakterieller Ribosomen Bindungsabhängigkeitskarten der Untereinheiten durch Nomura und Nierhaus erstellt werden (Mizushima und Nomura, 1970; Held *et al.*, 1974; Röhl und Nierhaus, 1982) (Abb. 1.1.4). Aus diesen Karten wird ersichtlich, dass der Bindung eines bestimmten ribosomalen Proteins in vielen Fällen die Bindung eines anderen oder mehrerer anderer ribosomaler Proteine vorausgehen muss. Die am Aufbau der 30S-Untereinheit beteiligten Proteine werden davon abgeleitet in drei Gruppen eingeteilt. Eine primär bindende Gruppe, die nicht von der Bindung anderer Proteine abhängt, eine sekundäre Gruppe, deren Bindung in Abhängigkeit der Bindung der Proteine der ersten Gruppe steht sowie eine tertiär bindende Gruppe, deren Beteiligung vom Vorhandensein ribosomaler Proteine der sekundären und/oder primären Gruppe abhängt (Talkington *et al.*, 2005; Sykes *et al.*, 2010).

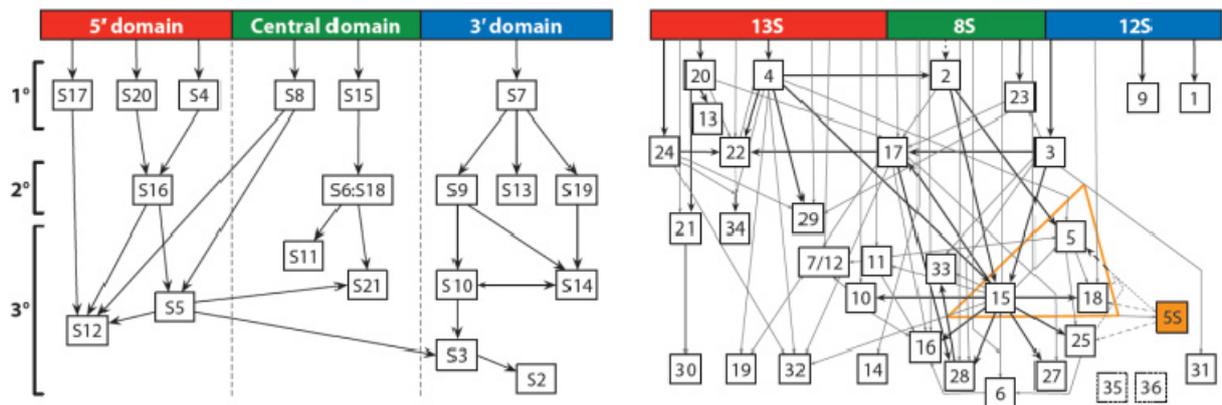


Abb. 1.1.4: Nomura- und Nierhaus-Assemblierungskarten. (Abbildung aus Shajani *et al.*, 2011).

Links: Die Nomura-Assemblierungskarte der SSU, die die Bindeabhängigkeiten ribosomaler Proteine illustriert. Die 16S rRNA befindet sich am oberen Rand, ihre drei Domänen sind farblich abgebildet. Die Rechtecke stehen für die entsprechenden ribosomalen Proteine. Die Pfeile zeigen auf jene Proteine, deren Bindung vom vorhergehenden Element beeinflusst wird.

Rechts: Die Nierhaus-Assemblierungskarte der LSU, die die Bindeabhängigkeiten ribosomaler Proteine illustriert. Die 23S rRNA befindet sich am oberen Rand, ihre drei Domänen sind farblich abgebildet. Die Rechtecke stehen für die entsprechenden ribosomalen Proteine. Die Pfeile zeigen auf jene Proteine, deren Bindung vom vorhergehenden Element beeinflusst wird. Die 5S rRNA wird durch das orange Quadrat symbolisiert. Für L35 und L36 konnten keine Abhängigkeiten ermittelt werden.

Die *in vitro* sehr strikten Bindeabhängigkeiten sind *in vivo* deutlich weniger stringent. Dies bedeutet, dass die Abwesenheit eines einzelnen ribosomalen Proteins nicht zum Abbruch der Assemblierung führt, wie dies *in vitro* der Fall ist, sondern dass dieses meist durch bestimmte (Assemblierungs)-Faktoren kompensiert werden kann und somit trotzdem zu einem, wenngleich oftmals in der Funktion eingeschränkten, Ribosom führt (Mizushima und Nomura, 1970; Held *et al.*, 1974; Bubunenکو *et al.*, 2008). Dazu trägt die Gegenwart von Assemblierungsfaktoren bei, die unterstützend auf die Konformationsänderungen der rRNA wirken und eine korrekte Positionierung der ribosomalen Proteine erleichtern (Wilson und Nierhaus, 2007; Karbstein, 2007; Britton, 2009).

Grundsätzlich kann man aufgrund der Ähnlichkeit zwischen bakteriellen und plastidären Ribosomen für das Chloroplastenribosom, auch wenn damit noch keine *in vitro*-Rekonstitutionsversuche erfolgten, von gleichbleibenden Grundprinzipien der Assemblierung ausgehen. Dies wären z.B. die prinzipiell hierarchische Bindung der ribosomalen Proteine und die sich daraus ableitenden konstanten Konformationsänderungen der rRNAs auf dem Weg zum assemblierten Ribosom. Höchstwahrscheinlich gelten auch für die meisten Proteine dieselben Bindungsabhängigkeiten wie für ihre bakteriellen Homologe.

### 1.1.3 Zielsetzung des Projektes

Die Konzeption des vorliegenden Projektes basiert auf folgenden Beobachtungen:

(1) Die im Plastom kodierten ribosomalen Proteinen sind in grünen Landpflanzen stark konserviert. Dagegen fehlen in vielen parasitischen Spezies häufig einige dieser ansonsten konservierten Gene. Mehrfach sind davon in verschiedenen Spezies dieselben Gene betroffen (Tab. 1.1.1). Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass eine minimale Translationskapazität in den Plastiden der parasitischen Organismen noch vorhanden ist. Es wäre möglich, dass weniger effiziente Ribosomen, denen einzelne oder mehrere ribosomale Proteine fehlen, dem Anspruch parasitischer Pflanzen genügen würden. Die betroffenen Gene, die noch nicht in früheren Studien charakterisiert wurden (*rps3*, *rps15*, *rps16*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl32*), könnten also entweder nicht essentiell für die Funktion des Ribosoms oder in den Nukleus transferiert worden sein, was eine erhöhte Gentransferfrequenz in Parasiten bedeuten würde.

(2) Aus Knockout-Studien in *E. coli* ist bekannt, dass 21 von 54 ribosomalen Proteinen nicht-essentiell sind (Baba *et al.*, 2006; Shoji *et al.*, 2011). Von den im Plastom kodierten Homologen sind davon drei betroffen: *rps15*, *rpl33* und *rpl36* (Tab. 1.1.1). *rpl33* konnte schon als nicht-essentiell charakterisiert werden (Rogalski *et al.*, 2008b). Informationen über die Essentialität von *rps15* und *rpl36* würden weiteres Licht auf die evolutionäre Konservierung der Ribosomenstruktur zwischen Plastiden und Bakterien werfen.

Es wurden im Rahmen des Projektes die in (1) und (2) ausgewählten Kandidatengene (*rps3*, *rps15*, *rps16*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl32*, *rpl36*) ausgeknockt, um Informationen über ihre Essentialität und Funktion zu erhalten. Dies würde eine bessere Beurteilung erlauben, ob in Parasiten tatsächlich mit einem kompletten Verlust der betroffenen Gene zu rechnen ist oder ob eher ein Transfer (EGT) ins Kerngenom stattgefunden hat. Weiterhin können daraus Schlüsse auf den Grad der Konservierung zwischen bakteriellen und plastidären Ribosomen gezogen werden und grundlegende neue Fakten zur Architektur und Plastizität plastidärer Ribosomen geschaffen werden.

Zum Zeitpunkt der Planung des Projektes waren die Plastomsequenzen einiger weiterer parasitischer Spezies noch nicht bekannt, bzw. nicht öffentlich zugänglich und/oder wurden nicht berücksichtigt. Tabelle 1.1.1 listet somit die zum Start des Projektes berücksichtigten Organismen auf. Unter Berücksichtigung aller aktuell bekannten Sequenzen von parasitischen Plastiden-besitzenden Spezies ergeben sich weitere Gene, die die gleiche Bedingung (d.h. Abwesenheit vom Plastom zumindest einiger parasitischer Spezies), wie die

zur Analyse ausgewählten Gene erfüllen und noch nicht untersucht wurden (vgl. Tab. 4.1). Dies sind *rps7*, *rps19* und *rpl36* (vgl. Tab. 4.1), wobei *rpl36* aufgrund seiner Nicht-Essentialität in *E. coli* schon mitberücksichtigt wurde. Weiterhin stellte sich das in *R. gardneri* ursprünglich als fehlend geltende *rps3* im Nachhinein als vorhanden heraus. Dennoch erfüllte der KO von *rps3* weiterhin seine Funktion als Kontrolle des *rpl22*-KOs (vgl. 2.2.3.7).

## **1.2 Detektion und Charakterisierung von miRNAs aus *Chlamydomonas reinhardtii***

miRNAs sind eine Klasse kleiner RNAs (~19-24 nt), denen im Verlauf der letzten 10 Jahre immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt wurde. miRNAs sind in vielen Organismen endogen kodiert und an der Regulation wichtiger biochemischer und Entwicklungs-Vorgänge beteiligt. Korrekt prozessierte miRNAs sind dazu in der Lage, durch Bindung an spezifische Zieltranskripte deren Translation zu verhindern oder zumindest (meist negativ) zu modulieren, was durch eine Zerstörung der mRNA oder durch translationelle Repression erreicht wird (He und Hannon, 2004).

Die erste miRNA, die entdeckt wurde, war das aus *Caenorhabditis elegans* stammende 22 nt lange Transkript *lin-4*, welches während der Transition vom juvenilen Individuum zum adulten regulatorisch aktiv ist (Pasquinelli und Ruvkun, 2002). Man fand heraus, dass *lin-4* das Expressionsniveau der LIN14-kodierenden mRNA durch eine Hemmung der Translation steuern kann, welche in ihrer 3'-UTR mehrere zu *lin-4* komplementäre Sequenzabschnitte besitzt an welche *lin-4* binden kann (Lee *et al.*, 2003; Naqvi *et al.*, 2011). In den folgenden Jahren schloss sich die Entdeckung von miRNAs in nahezu allen eukaryotischen Spezies an, so dass heute mehr als 18000 miRNAs aus verschiedensten Organismen bekannt sind (mirbase.org). Die Entdeckung von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* stach hervor, da es der erste Beweis für die Existenz von miRNAs in Einzellern war (Molnar *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

### **1.2.1 Regulation der Genexpression durch miRNAs**

miRNAs dienen u.a. dazu Anpassungsprozesse an veränderte Umweltgegebenheiten einzuleiten, die von abiotischen oder biotischen externen Verursachern rühren können. So ist aus *Arabidopsis thaliana* bekannt, dass miRNA 399 (miR399) spezifisch unter Phosphatmangel induziert wird und die adäquate Reaktion der Pflanze auf Phosphatmangel

aktiviert (Bari *et al.*, 2006; Pant *et al.*, 2008). Ein weiteres Beispiel dafür ist miR398, welche durch ein breites Spektrum diverser Stressarten hochreguliert wird. Ihre Induktion konnte u.a. unter oxidativem Stress, Kupfer-, Phosphat- und Wassermangel, ultravioletter Strahlung und Salzstress detektiert werden (Abdel-Ghany und Pilon, 2008; Jagadeeswaran *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009a, 2009b; Sunkar *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2011).

Ebenso sind miRNAs in wichtige entwicklungsbiologisch relevante Prozesse involviert. So ist miR156 in *A. thaliana* am Phasenwechsel der vegetativen zur reproduktiven Phase beteiligt. Niedrigere Mengen an miR156 führen zu stärkerer Translation des Ziel-Transkriptes *SPL3*, einem wichtigen Transkriptionsfaktor, der durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren LEAFY (LFY), FRUITFULL (FUL) und APETALA1 (AP1) die Bildung von Blüten einleitet (Yamaguchi *et al.*, 2009; Wu und Poehlig, 2006).

Einige miRNAs sind dagegen ubiquitär in bestimmten Gewebetypen exprimiert, während die spatio-temporale Expression anderer miRNAs starken Restriktionen unterliegt. Bspw. werden in Wurzeln von *A. thaliana* die miRNAs miR162 und miR169 permanent in allen Wurzelzelltypen exprimiert, wohingegen die Expression der oben eingeführten miR156, als auch von miR157, starken Schwankungen der Expressionsstärke in verschiedenen Zelltypen aufweist (Breakfield *et al.*, 2011; Naqvi *et al.*, 2011).

Die in *C. reinhardtii* vorhergesagten Ziele der publizierten miRNA-Sequenzen sind oftmals Flagellen-assoziierte Proteine (Molnar *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Diese miRNAs könnten in die Signaltransduktionsmechanismen der durch die Flagellen perzipierten Signale, involviert sein. Die typischen, mit miRNA-Regulation in Verbindung gebrachten Phänomene, wie Stress-induzierte Reaktionen und entwicklungsbiologisch wichtige Vorgänge, könnten in *C. reinhardtii* genauso Ziel der Regulation durch noch nicht charakterisierte miRNAs sein.

### **1.2.2 Biogenese und Funktionsweise von miRNAs**

Pflanzliche miRNAs sind in miRNA-Genen kodiert, die sich üblicherweise in intergenischen Sequenzen und unannotierten Loci befinden (Rajagopala *et al.*, 2006). Diese Gene werden von der RNA-Polymerase II (RNAPII) transkribiert und führen zur Entstehung von primären miRNAs (pri-miRNA) (Abb. 1.2.1). Diese Transkripte können, wie in *Zea mays* gezeigt wurde, Längen von 250-2000 bp haben. Sie weisen typische Eigenschaften eukaryotischer Transkripte auf, wie eine 5'-Cap und einen Poly-(A)-Schwanz. Ebenso besitzen pri-miRNAs Introns, die herausgespleißt werden (Bartel, 2004; Xie *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Sie beinhalten in dieser Phase der Biogenese schon die für miRNA-Vorläufer typische Stem-Loop-Struktur, die durch einen komplementären Stamm und mehr oder weniger verzweigte

Schleifenstrukturen gekennzeichnet ist (Abb. 1.2.1). Im Anschluss an die Transkription werden pri-miRNAs durch die RNA-bindenden Proteine DCL1, HYL1 und SERRATE erkannt und im Nukleus endonukleolytisch zu Vorläufer-miRNAs (pre-miRNAs) prozessiert (Han *et al.*, 2004; Lobbes *et al.*, 2006), wobei die einzelsträngigen RNA-Sequenzen vom Rest des Moleküls entfernt werden, so dass nur noch die charakteristische Stem-Loop-Struktur erhalten bleibt (Abb. 1.2.1). Die Längen der pre-miRNAs liegen üblicherweise zwischen 50 und 250 bp (May, 2008, unpublizierte Daten; mirbase.org). Pre-miRNAs werden, weiterhin im Nukleus, durch DCL1 und andere akzessorische Proteine zu miRNA-Duplexen prozessiert. Ein Duplex-Molekül besteht aus der Sequenz der reifen miRNA von ~21 nt Länge und einer zu ihr komplementären miRNA\*-Sequenz, die jeweils an ihren 3'-Enden um 2 nt überstehen, welche durch HEN1 methyliert werden, um eine höhere Stabilität des Duplexes zu gewährleisten (Yu *et al.*, 2005). Der methylierte miRNA-Duplex wird vom Exportin-5-Ortholog HASTY1 ins Cytoplasma der Pflanzenzelle transportiert (Bollman *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005). Dort bindet der Duplex an eines der ARGONAUTE-Proteine (AGO), von denen es bspw. in *A. thaliana* zehn verschiedene gibt, welche unterschiedliche und teils redundante Aufgaben wahrnehmen können (Morel *et al.*, 2002; Vaucheret *et al.*, 2006). Der miRNA\*-Strang wird entlassen und die reife miRNA bildet zusammen mit einem AGO-Protein und meist weiteren Proteinen den RNA-induced-silencing-complex (RISC) (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008). Dieser Komplex kann an mRNAs binden, die zur miRNA (partiell) komplementär sind, was im Regelfall zur Zerstörung der mRNA durch die endonukleolytische Aktivität von AGO führt (Palatnik *et al.* 2003; Baumberger und Baulcombe, 2005). In manchen Fällen kann es aber auch zur translationellen Repression des Transkriptes kommen (Broderson *et al.*, 2009).

Zwar sind für *C. reinhardtii* nicht alle Details des Biogenese Pfades bekannt, dennoch sind die Bestandteile der Kern-miRNA-Maschinerie (DCL, AGO, RISC) und die Reihenfolge der Prozessierungsschritte mit nur wenigen Abweichungen generell über alle Reiche sehr ähnlich (Millar und Waterhouse, 2005), so dass auch für Algen provisorisch davon ausgegangen werden kann.

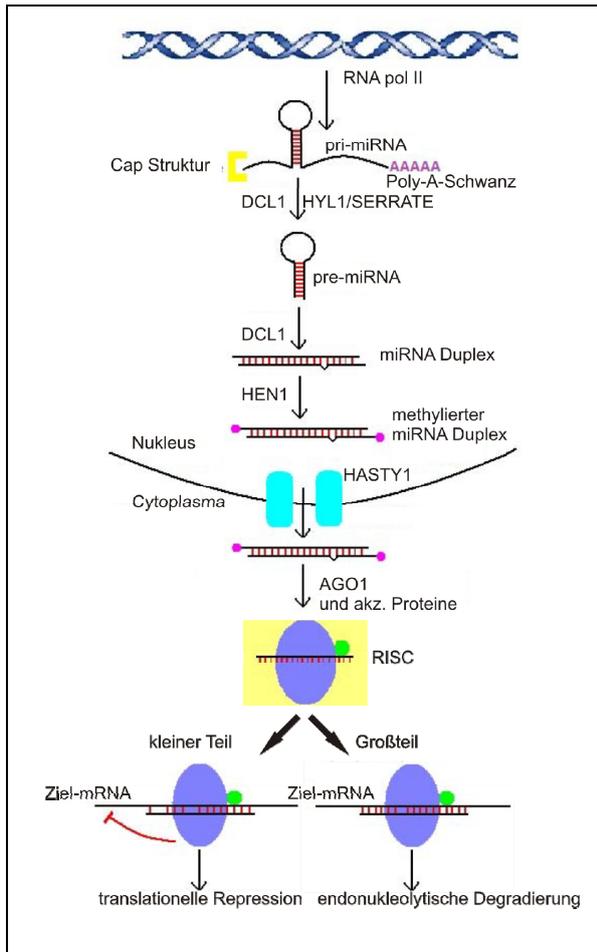


Abb. 1.2.1.: Pflanzlicher miRNA-Biogenese-Pfad. Beginnend mit der Transkription sind neben der Biogenese von miRNAs auch die beiden von Pflanzen bekannten Wirkmechanismen dargestellt. Der Großteil der miRNAs besitzt einen hohen Grad an Komplementarität zu seinen Zielen, was in diesem Fall die *Slicer*-Aktivität von AGO1 aktiviert und zur Zerstörung des Transkriptes führt. Der kleinere Teil der miRNAs führt zu translationeller Repression, bei der das Transkript nicht unmittelbar degradiert wird (Abb. abgeändert aus Naqvi *et al.*, 2011)

### 1.2.3 miRNAs im Kontext der Evolution der Metabionta

Innerhalb des Pflanzenreiches, Algen ausgeschlossen, sind die bislang dort entdeckten miRNAs zwischen den Spezies stark konserviert. Hingegen gibt es zwischen pflanzlichen und tierischen miRNAs, von zwei fragwürdigen Ausnahmen abgesehen, keine Konservierung der Sequenzen (Reinhart *et al.*, 2002; Arteaga-Vasquez *et al.*, 2006; Naqvi *et al.*, 2011), was für eine sehr frühe Entstehung der miRNA-Maschinerie in einem paneukaryoten Organismus noch vor der Aufspaltung in Ophistokonta und Archaeplastida spricht, die aber danach rasch divergierte. D.h., der Mechanismus sollte sich unter Außerachtlassung von HGT noch in einzelligen Organismen entwickelt haben. Dennoch ging man bis ins Jahr 2007 von einem alleinigen Vorkommen von miRNAs in mehrzelligen Organismen aus. Doch durch die beiden Veröffentlichungen von Molnar *et al.* und Zhao *et al.* im Jahr 2007 konnte diese Annahme falsifiziert werden. Die Präsenz von miRNAs wurde mit der höheren Komplexität von Mehrzellern in Verbindung gebracht (Lim *et al.*, 2003; Molnar *et al.*, 2007). Der unerwartete Fund von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* stellte diese Vermutung in Frage. Interessant ist weiterhin die Tatsache, dass alle bekannten miRNA-Sequenzen von *C. reinhardtii* keine Homologe im Pflanzen- und Tierreich besitzen.

Die Expansion des Wissens über miRNAs in *C. reinhardtii* sollte wichtige weitere Anhaltspunkte zur Evolution der RNAi-Maschinerie von Eukaryoten geben.

#### **1.2.4 Zielsetzung des Projektes**

Die von Molnar *et al.* und Zhao *et al.* vorgestellten Daten stellen einen Sequenzierungsdatensatz von relativ geringer Größe und Auflösung dar, der aus nur drei untersuchten Wachstumsbedingungen generiert wurde, und zur Veröffentlichung von nur 50 miRNA-Sequenzen führte (mirbase.org). Es ist bekannt, dass miRNAs als Regulatoren wichtiger zellulärer Stressantworten auftreten können, indem sie die Expression spezifischer Stress-relevanter Gene steuern und wichtige entwicklungsbiologische Veränderungen induzieren (vgl. Punkt 1.2.1).

Um die evolutionäre Tragweite des Vorhandenseins von miRNAs in einzelligen Organismen verstehen zu können und um alle weiteren, noch unentdeckten miRNAs in *C. reinhardtii* zu finden, war es notwendig, ein erheblich größeres Spektrum als nur drei Wachstumsbedingungen einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen. In den, der vorliegenden Arbeit, vorangehenden Untersuchungen wurden unter Verwendung von Next-Generation-Sequenzierungstechniken, ausgehend von 28 unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, ~3700 miRNA-Kandidaten in *C. reinhardtii* identifiziert.

Im Mittelpunkt dieses Teils meiner Doktorarbeit stand die Etablierung einer adäquaten Messmethode zur Bestimmung der Expressionsniveaus möglichst vieler Kandidaten-miRNAs zugleich. Die Anwendung dieser Plattform auf die Untersuchung einzelner Bedingungen sollte signifikant und differenziell regulierte miRNA-Kandidaten identifizieren, die dann in Folgeprojekten intensiv erforscht werden können.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial

Chemikalien, die nur in der Gewebekultur Verwendung fanden, sind mit TC markiert.

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP	Hartmann, Braunschweig, D
Aceton	Roth, Karlsruhe, D
Agarose (Seakem LE Agarose)	Biozym, h.Oldendorf, D
Ammoniumchlorid	Duchefa, Haarlem, NL
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, D
Ammoniumsulfat	Serva, Heidelberg, D
Ammoniumhepta-Molybdat-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D
Borsäure (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Borsäure	Roth, Karlsruhe, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Calciumchlorid-Dihydrat (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Caseinhydrolysat (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Cholinchlorid (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck, Darmstadt, D
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Cycloheximid	Roth, Karlsruhe, D
Diaminoethantetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
dNTPs	Promega, Mannheim, D
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, D
Eisenchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
EDTA, Dinatrium-Salz (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ficoll 400	Roth, Karlsruhe, D
FeNaEDTA (TC)	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd, 37 %	Roth, Karlsruhe, D
Formamid	Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Hybond N Membran	GE-Healthcare, München, D
Hefeextrakt	Duchefa, Haarlem, NL
HEPES	Roth, Karlsruhe, D
IAA (TC)	Sigma-Aldrich, München, D
IBA (TC)	Sigma-Aldrich, München, D
Isopropanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Kanamycinmonosulfat	Duchefa, Haarlem, NL

Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumiodid (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Kaliumnitrat (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kobaltchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, München, D
Kupfersulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Kupferchlorid	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (TC)	Sigma-Aldrich, München, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Manganchlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Mangansulfat-Monohydrat (TC)	Sigma-Aldrich, München, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, München, D
Manganchlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Microagar (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
MOPS	Roth, Karlsruhe, D
Myo-Inositol (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
NAA (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe, D
Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Fluka, Buchs, Schweiz
Nicotinamid (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Pantothenat, Hemicalciumsalz (TC)	Sigma-Aldrich, München, D
Percoll	GE Healthcare, München, D
Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol (Ph/Ch/I) (25/24/1)	Roth, Karlsruhe, D
Phenol:Chloroform 5:1	Sigma-Aldrich, München, D
PMSF	Sigma-Aldrich, München, D
Puromycin-2HCl	Serva, Heidelberg, D
Purolite Ion Exchange Resins (Fe, Cu, Co, B)	Purolite Int., Llantrisant, UK
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel A	Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel B	Roth, Karlsruhe, D
Rubidiumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Salicylat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, D
Salzsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Sorbit	Duchefa, Haarlem, NL
Spectinomycindihydrochlorid (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Saccharose	Duchefa, Haarlem, NL
Streptomycinsulfat (TC)	Duchefa, Haarlem, NL
Sybr Green	ABI, Darmstadt, D

SDS  
Tetracyclin  
TEMED  
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B1) (TC)  
Tris  
Trypsin (aus Schweinepankreas)  
Triton X-100  
Tween 20  
Wasserstoffperoxid, 30 %  
Whatman-Papier  
X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)  
Zinksulfat-Heptahydrat (TC)  
Zinksulfat-Heptahydrat  
Zinkchlorid  
0,5-10 kb DNA Leiter  
1 kb DNA Leiter

Roth, Karlsruhe, D  
Serva, Heidelberg, D  
Roth, Karlsruhe, D  
Sigma-Aldrich, München, D  
Roth, Karlsruhe, D  
Sigma-Aldrich, München, D  
Roth, Karlsruhe, D  
Roth, Karlsruhe, D  
Sigma-Aldrich, München, D  
GE-Healthcare, München, D  
Duchefa, Haarlem, NL  
  
Duchefa, Haarlem, NL  
Duchefa, Haarlem, NL  
Roth, Karlsruhe, D  
Invitrogen, Carlsbad, USA  
Thermo Fisher Scientific,  
Waltham, USA

### 2.1.2 Geräte

ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (96)  
ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System (384)  
Agarosegel Elektrophorese System  
Agilent 2100 Bioanalyzer

Allegra<sup>TM</sup> 25R

Biolistische Kanone, PDS1000He  
Energieversorgung Power Pac Basic<sup>TM</sup>  
Fluorimeter Dual-PAM-100  
Gel-Dokumentationssystem Infinity Video gel  
documentation system  
Hybridisierungsstation HybArray 12<sup>TM</sup>  
LTQ Orbitrap Massenspektrometer

MiniSpin Plus Zentrifuge  
Mörsermühle Retsch MM301  
Nanodrop ND-100

Phosphorschirme

PCR thermocycler Mastercycler EPGradient  
pH meter Ø340 pH/Temp meter  
Pipettierroboter Evolution P3 Precision  
Pipetting Platform  
Radioisotopenbildgeber Typhoon Trio+

Rotor (Ultrazentrifuge) SW 60Ti  
Sorvall RC-6

ABI, Foster City, USA  
ABI, Foster City, USA  
PeqLab, Erlangen, D  
Agilent Technologies, Santa Clara,  
USA  
Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Krefeld,  
D  
BioRad, Hercules, USA  
Bio Rad, Hercules, USA  
Heinz Walz, Effeltrich, D  
PeqLab, Erlangen, D  
  
PerkinElmer, Waltham, USA  
Thermo Fisher Scientific,  
Waltham, USA  
Eppendorf, Hamburg, D  
Retsch, Haan, D  
NanoDrop Technologies,  
Wilmington, USA  
GE Healthcare, Buckinghamshire,  
UK  
Eppendorf, Hamburg, D  
Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Krefeld, D  
PerkinElmer, Waltham, USA  
  
GE Healthcare, Buckinghamshire,  
UK  
Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Krefeld, D  
Thermo Fisher Scientific,  
Waltham, USA

Spektrophotometer Genquant pro

GE Healthcare, Buckinghamshire,  
UK

Thermoblock Thermomixer comfort  
UV BLX-254 crosslinker

Eppendorf, Hamburg, D  
Vilber Lourmat, Marne La Vallee,  
France Biotech

UltraZentrifuge Optima™ L-80 XP  
Wasserbad FBC 620  
Zentrifuge 5415R  
Zentrifuge 5417R

Beckman Coulter™, Krefeld, D  
Fisher Scientific, Schwerte, D  
Eppendorf, Hamburg, D  
Eppendorf, Hamburg, D

### 2.1.3 Enzyme

Antarctic Phosphatase  
Phusion DNA Polymerase  
DNA Polymerase I (Klenow Fragment)  
Go Taq Flexi DNA Polymerase  
RNase A  
Restriktionsenzyme, diverse  
RNaseOut  
Superscript III Reverse Transkriptase  
T4-DNA-Ligase  
T4 Polynukleotid Kinase  
TriFast™ peqGOLD

NEB, Frankfurt a.M., D  
NEB, Frankfurt a.M., D  
NEB, Frankfurt a.M., D  
Promega, Mannheim, D  
Promega, Mannheim, D  
NEB, MBI Fermentas, Roche  
Invitrogen, Karlsruhe, D  
Invitrogen, Karlsruhe, D  
Promega, Mannheim, D  
NEB, Frankfurt a.M., D  
PeqLab, Erlangen, D

Sowie div. Enzympuffer

Invitrogen, NEB, Promega, Roche

### 2.1.4 Kits

Megaprime DNA labeling systems  
miRNeasy Mini Kit  
NucleoSpin Extract II  
NucleoBond Xtra Midi Plus  
NucleoSpin RNA Plant Kit  
TOPO TA cloning Kit  
Turbo DNA-free Kit

Amersham, Buckinghamshire, UK  
Qiagen, Hilden, D  
Macherey-Nagel, Düren, D  
Macherey-Nagel, Düren, D  
Macherey-Nagel, Düren, D  
Invitrogen, Karlsruhe, D  
ABI, Foster City, USA

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration
<b>Analyt. Saccharose Gradient</b>	Saccharose	15%,30%,40%,55% (w/v)
	TKM (10x)	1x
	Chloramphenicol	3 mg/ml
	Heparin	15 mg/ml

0,9 mL einer jeden Saccharosekonzentrationsstufe werden aufeinander geschichtet

<b>Church Puffer</b> (Church und Gilbert, 1984)	BSA	1 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,2	0,5 M
	SDS	7 % (w/v)
	EDTA pH 8	1 mM
<b>CTAB-Extraktionspuffer</b>	CTAB	2 % (w/v)
	NaCl	1,4 M
	EDTA pH 8	20 mM
	Tris-HCl pH 8	100 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM
<b>DNA Ladepuffer</b>	Glycerin	50 % (v/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
	Bromphenol blau	0,1 % (w/v)
	TAE	1x
<b>ES Puffer (2x)</b>	Tris	400 mM
	KCl	400 mM
	MgCl <sub>2</sub>	70 mM
	EGTA	50 mM
	Mit KOH auf pH 9 einstellen	
<b>Lösung I (zur Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i>)</b>	Glucose	50 mM
	EDTA	10 mM
	Tris/HCl pH 8,0	25 mM
<b>Lösung II</b>	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
<b>Lösung III</b> <b>MOPS Puffer (10x)</b>	KAc pH 4,8	3 M
	MOPS	1 M
	NaAc	3 M
	EDTA	10 mM
	ES buffer (2x)	1x
<b>Polysomenextraktionspuffer</b>	Saccharose	200 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
	Polyoxyethylen-10-tridecylether	2 % (v/v)
	Heparin	0,5 mg/mL
	β-Mercaptoethanol	100 mM
	Chloramphenicol	100 µg/mL
	Cycloheximid	25 µg/mL
	Formamide	60 % (v/v)
	Formaldehyd	18 % (v/v)
	MOPS Puffer (10x)	1,5x
<b>RNA Ladepuffer</b>	EtBr	0,1 µg/µL
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
	Bromphenol blau	0,1 % (w/v)
	NaCl	3 M
	Trinatriumcitrat-Dihydrat	0,3 M
	Mit HCl auf pH 7 einstellen	
	SSC (20x)	2x
<b>Southern/Northern Waschlös.</b>	SDS	0,1 % (w/v)
	SSC (20x)	0,5x
<b>Southern/Northern Waschlös.</b>	SDS	0,1 % (w/v)
	HCl	0,25 M
<b>Southern I Lösung</b>	NaOH	0,5 M
<b>Southern II Lösung</b>		

<b>Southern III Lösung</b>	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
<b>Southern IV Lösung</b>	Tris	1 M
	NaCl	3 M
<b>TAE buffer (1x)</b>	Tris	40 mM
	Essigsäure	0,1 % (v/v)
	EDTA	1 mM
<b>TKM (10x)</b>	Tris	400 mM
	KCl	200 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	Mit HCl auf pH 8,5 einstellen	

### 2.1.6 Verwendete Software und Netzlinks:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>

[http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=c\\_reinhardtii](http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=c_reinhardtii)

<http://www.phytozome.net>

<http://www.mirbase.org>

<http://swissmodel.expasy.org/workspace>

<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

[www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

SDS 2.3, ABI

Vector NTI 10.3, Invitrogen

SigmaPlot, Systat Software Inc.

Quantpipe, Arvidsson, S. (MPI-MP)

Corel Draw, Corel

MS Office, Windows

## 2.2 Methoden: Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden

### 2.2.1 Pflanzenmaterial, Wachstumsbedingungen und Phänotypisierung

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana) wurden unter sterilen Bedingungen auf Agar-verfestigtem MS-Medium mit einem Saccharosegehalt von 30 g/L kultiviert (Murashige und Skoog, 1962). Nach den ersten Regenerationsschritten wurden transplastomische

Pflanzenlinien auf dem gleichen Medium, angereichert mit 500 mg Spectinomycin pro Liter, weiterpropagiert.

Samen wurden Oberflächen-sterilisiert, für zwei Tage bei 4 °C vernalisiert und auf sterilen Spectinomycin-haltigen (500 mg/L) MS-Medienplatten zur Keimung gebracht um die Vererbungsmuster sowie die Phänotypen der Keimlinge zu untersuchen.

$\Delta rps15$ - und Wildtyp-Pflanzen wurden unter verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen gehalten. Zur Samenproduktion und zur Analyse der Phänotypen wurden die Pflanzen in Erde bei Standardbedingungen im Gewächshaus kultiviert (relative Luftfeuchtigkeit 55 %, Tagestemperatur 25 °C, Nachttemperatur 20 °C, diurnaler Zyklus mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, Lichtintensität 300-600  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Weitere Bedingungen involvierten Lichtstärken von 50, 100, 350 und 1000  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Kältestressexperimente wurden bei 4 °C auf Erde bei  $\sim 80 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  durchgeführt, Hitzestressexperimente bei 37 °C und 42 °C auf Erde bei  $\sim 100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fleischmann *et al.*, 2011).

## 2.2.2 Konstruktion der Plastidentransformationsvektoren und Herstellung der Hybridisierungs sonden

*rps15* und *rps16* sind beides monocistronische Gene. Die Vektoren, mit welchen diese ausgeknockt worden sind, wurden so konzipiert, dass es durch homologe Rekombination zur Insertion einer *aadA*-Kassette, inklusive Promotor und UTR, jeweils in die kodierenden Regionen kommt (Insertionsmutagenese). Die anderen Gene, die ausgeknockt wurden, liegen in Operons organisiert vor. Die hierfür benutzten Vektoren führen zu einem Austausch der kodierenden Region des Gens mit allein der kodierenden Region des *aadA* Gens, ohne zusätzliche Promotor- und UTR-Elemente. Im Falle von *rpl32*, welches zusammen mit *sprA* transkribiert wird, wurden beide Strategien verwendet.

Die Orientierung und Qualität eines jeden Transformationsvektors wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Anmerkung: Die Vektoren pSA7, pSA15, pSA14, pSA9 und pSA12 wurden von Sibah Alkatib kloniert. Im Gegenzug dazu wurden von mir sieben tRNA-Knockout-Vektoren kloniert, die in Sibah Alkatibs Projekten Verwendung fanden und hier nicht angeführt sind.

### 2.2.2.1 Herstellung der *aadA*-Kassette (pLS1)

Das Plasmid pSK.Kmr (Bateman und Purton, 2000) wurde mit *XhoI* and *PstI* verdaut, um die daraus gewonnene *aphA-6*-Kassette in den, mit denselben Enzymen verdauten Vektor pKCZ

einzufragen (Zou *et al.*, 2003). *aadA* wurde aus dem Plasmid pZS195 (Svab und Maliga, 1993, Sutton *et al.*, 1995) mittels eines Verdauens mit dem Enzym *XbaI* herausgeschnitten. Anschließend wurde das Fragment mit Klenow-Enzym behandelt und abschließend mit *NcoI* verdaut. pKCZaphA-6 wurde mit *PstI* verdaut, ebenfalls mit Klenow-Enzym behandelt und abschließend mit *NcoI* verdaut. Das *aadA*-beinhaltende Fragment wurde in den nun geöffneten Vektor pKCZaphA-6 kloniert. Das neue Plasmid erhielt den Namen pLS1. Die darin enthaltene *aadA*-Kassette wird von einem *psbA*-Promotor, einer *psbA*-5'UTR und einer *rbcL*-3'UTR flankiert, welche aus *Chlamydomonas reinhardtii* stammen.

#### 2.2.2.2 $\Delta rps16$ Vektor (pSA7)

Das Fragment, welches das *rps16*-Gen beinhaltet, wurde per PCR von Wildtyp-DNA ausgehend mit den folgenden Primern amplifiziert: 5'*rps16* (GAATCCACTCATGGG-ACAAG) und 3'*rps16* (CAATTCATACCGGTTCTTAGAG) (Wildtypplastomposition: 3999-6245, (Accession-Nummer: NC\_001879)). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pUC18 kloniert, welcher mit *SmaI* geöffnet wurde, um hiermit das neue Plasmid pSA6 zu erhalten. Das *rps16*-Gen wurde durch einen Verdau mit *BglIII* zerstört und mit einer anschließenden Auffüllreaktion mit Hilfe des Klenowfragmentes, der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, zur Aufnahme des Inserts vorbereitet. Das Insert bestand aus der *aadA*-Kassette aus pLS1, woraus diese mittels *SmaI*-Behandlung gewonnen wurde. Der neue Vektor erhielt den Namen pSA7

#### 2.2.2.3 $\Delta rps15$ Vektor (pSA15 und pTF16)

Das Fragment von Position 124663 bis 126561 des Wildtyp-Plastoms von *Nicotiana tabacum* wurde mit den Primern 5'*ndhH* (ATAAGCTTCGCATACCGGTGGCAGC) und 3'*ycf1* (AGGATCCAGGTATATTGTCTCCTGCTTCGAC) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *BamHI* und *HindIII* behandelt und anschließend in pUC18 inseriert, welches zuvor mit denselben Enzymen verdaut worden war. Dieses neue Plasmid, pSA8, wurde teilweise mit *HincII* verdaut, um den Vektor inmitten des *rps15*-Gens zu öffnen (es gibt eine zweite Restriktionsschnittstelle in *ndhH*). Die gleiche *aadA*-Kassette, wie zuvor für pSA7 beschrieben, wurde in pSA8 eingefügt und somit pSA15 hergestellt. Für den Vektor pTF16 wurde anstelle der *aadA*-Kassette die aus pKCZaphA-6 mit *SmaI* gewonnene *aphA-6*-Kassette inseriert.

#### 2.2.2.4 $\Delta rpl23$ Vektor (pSA14)

Die genomische Region, welche *rpl32* umgibt (88073-88219), wurde per PCR mit den Primern 5'*rpl23* (GATCAAACAATTCCCAATCATG) und 3'*rpl23* (CTAAGGGCATATCG-GTTGAAG) ausgehend von Wildtyp-DNA vervielfältigt. Das PCR-Produkt wurde in pUC18 kloniert, welcher zuvor mit *Sma*I geöffnet worden ist. Im somit erhaltenen Vektor pSA10 wurde die kodierende Sequenz von *rpl23* mittels einer PCR-Strategie durch die kodierende Sequenz von *aadA* ersetzt. Hierzu wurde eine zweite PCR durchgeführt, mit den Primern 5'*rpl2* (ACGGTATAGACGCTTATGACCTC) und 3'*rpl2* (AAAAAAATACTTAAT-AGCATGGCGATACATTTA) auf Wildtyp-DNA durchgeführt. Eine dritte PCR wurde mit den Primern 5'*trnI* (AAATCGATTTTCTTCCCTATGAGTTATAGT) und 3'*trnI* (CGAGGATCCCCGCTAAGC) auf Wildtyp-DNA durchgeführt. Eine vierte PCR amplifizierte das *aadA*-Insert zusammen mit Überhängen, die komplementär zu plastomischen Sequenzen sind. Dies wurde mit den Primern: 5'*rpl2aadA* (TAAATGTATCGCCATGCTATTAAGTATTTTTTTTTTTATTGCGACTACCTTGGTGAT) und 3'*trnIaadA* (ACTATAACTCATAGGGAAGAAAATCGATTTATGGCAGAA-GCGGTGATCG) auf pLS1 durchgeführt (Bereiche die an *aadA*-Sequenzen binden können, sind unterstrichen dargestellt). Die finale PCR wurde ausgehend von den letzten drei PCRs mit den Primern 5'*rpl2* und 3'*trnI* bewerkstelligt. Dieses PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Acc*I und *Xcm*I behandelt und in den Vektor pSA10 kloniert, welcher mit denselben Enzymen vorbereitet wurde. Der neue Vektor erhielt den Namen pSA14.

#### 2.2.2.5 $\Delta rpl36$ Vektor (pSA9)

Die Region, welche *rpl36* umgibt, wurde mittels PCR auf Wildtyp-DNA amplifiziert. Dazu wurden die Primer: 5'*rpl36* (TGATTCGCGTTTCGAACAGG) und 3'*rpl36* (GGAAATCCAAAAGGAACTCG) benutzt (Wildtypplastomposition: 82169-82457). Dieses Fragment wurde in pUC18 kloniert, welcher mit dem Enzym *Sma*I linearisiert wurde. Die in diesem Vektor, pSA8, befindliche kodierende Region von *rpl36* wurde durch *aadA* ersetzt. Dazu wurde eine zweite PCR auf pLS1 mit den Primern 5'*rpl36aadA* (ATTTGTACATCGGCTCTTCTGGCAAGTCTGATTATTTGCGACTACCTTGGTGAT) und 3'*rpl36aadA* (GATTCAGAATTAAGGTAAGGAATGAGAAATATGGCAGAAG-CGGTGATCG) ausgeführt (zu *aadA* gehörige Abschnitte sind unterstrichen, die restlichen binden im Plastom). Ein angrenzender Teil des Plastoms wurde mit den Primern 5'*rpl36infA* (ATTTCTCATTCTTACCTTAATTCTGAATC) und 3'*rpl36infA* (TCCCAACGG-TCTGTTCCGG) auf Wildtyp-DNA amplifiziert. Eine vierte PCR auf die Produkte der 2. und

3. PCR gerichtet, wurde mit den Primern 5'rpl36aadA und 3'rpl36infA durchgeführt. Dieses Produkt wurde mit *Bsr*GI und *Bgl*II verdaut und in pSA8 ligiert, welcher zuvor mit denselben Enzymen behandelt wurde. Der neue Vektor trägt die Bezeichnung pSA9. Für den Vektor pTF17 wurde eine 1. PCR auf den Vektor pKCZaphA-6 mit den Primern: 5'36-aphfor (TTTGTACATCGGCTCTTCTGGCAAGTCTGATTAATTCAATTCATCAAGTTTTTAAAA AATAA) und 3'36-2aphrev (GGAATGAGAAATATGGAATTACCAAATATTATTCAAC) durchgeführt sowie eine 2. PCR mit den Primern: 5'36-2inffor (GGTAATTCCATATTTCTCATTCTTACCTTAATTC) und 3'36-2rps8rev (TCTAATTATCAACGAATTCCG) auf WT-DNA als Template. Eine 3. PCR mit den Produkten der vorherigen beiden PCRs als Template und den Primern 5'36-aphfor und 3'36-2rps8rev ergab das PCR-Fragment, welches mit *Xho*I und *Bsr*GI geschnitten wurde und in den, mit denselben Enzymen geöffneten Vektor, pSA8 inseriert wurde um pTF17 zu erhalten.

#### 2.2.2.6 *Δrpl32* Vektoren (pSA12 und pTF15)

Eine PCR mit den Primern 5'rpl32 (ATGGATCCGTGGGTCGATCAAGTATCCG) und 3'rpl32 (TATCTGCAGCGGACTCGAACCGAGATGC) wurde auf Wildtyp-DNA durchgeführt, um die plastomische Region von 114021 bis 116232 zu vervielfältigen. Das PCR-Produkt sowie pUC18 wurden beide mit *Bam*HI und *Pst*I behandelt und kombiniert zum neuen Vektor pSA11. Die Herstellung des Vektors pSA12, in welchem der kodierende Abschnitt von *rpl32* durch *aadA* ersetzt wurde (Deletionsmutagenese), involvierte mehrere PCR-Schritte. Dazu wurde eine zweite PCR auf pSA11 mit den Primern 5'ndhF (GCTTCTGCCATTTAGAAATTAATAAATTACTCATTG) und 3'ndhF (CGAATTCGAGCTCGGTACCCG) durchgeführt (unterstrichene Sequenzen binden an *aadA*). Die kodierende Sequenz von *aadA* wurde ausgehend von pLS1 mit den Primern 5'aadA (TATTCGAACGTTTTATTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTC) und 3'aadA (CAATGAGTAATTTTTTAATTTCTAAATGGCAGAAGCGGTGATCGCC) amplifiziert (unterstrichene Sequenzen binden *aadA*). Die dritte PCR wurde mit den Primern 5'ndhF (GCTTCTGCCATTTAGAAATTAATAAATTACTCATTG) und 3'ndhF (CGAATTCGAGCTCGGTACCCG) auf pSA11 durchgeführt (unterstrichene Sequenzen binden *aadA*). Mit der vierten PCR wurde *aadA* zusammen mit im Plastom bindenden Überhängen amplifiziert. Hierzu wurden die Primer 5'aadA (TATTCGAACGTTTTATTATTTGCCGACT-ACCTTGGTGATCTC) und 3'aadA (CAATGAGTAATTTTTTAATTTCTAAATGGCAGA-AGCGGTGATCGCC) auf pLS1 als Template benutzt (unterstrichene Sequenzen binden *aadA*). Die letzte PCR-Reaktion wurde auf die Produkte der vierten und dritten PCR mit den

Primern 3'ndhF und 5'aadA durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde mit *Bam*HI und *Bst*BI verdaut und in pSA11 kloniert, welches mit denselben Enzymen verdaut wurde. Dieser Vektor erhielt die Bezeichnung pSA12.

Der alternative Knockout-Vektor pTF15 enthält die komplette *aadA*-Kassette innerhalb des *rpl32*-Gens (Insertionsmutagenese). Dazu wurde pSA11 mit *Ssp*I partiell verdaut, um den Vektor allein inmitten von *rpl32* zu öffnen (zweite Restriktionsschnittstelle im Promotor des Ampicillinresistenzgens). Die *aadA*-Kassette wurde auf dieselbe Weise hergestellt wie für pSA7 beschrieben und in den Vektor ligiert. Das neue Konstrukt wird als pTF15 bezeichnet.

#### 2.2.2.7 $\Delta rpl22$ (pTF12) und $\Delta rps3$ (pTF13) Vektoren

Die Knockoutvektoren für *rpl22* und *rps3* basieren beide auf dem Vektor pTF11. Um diesen herzustellen wurde die plastomische Region des Wildtyps von 84183 bis 87454 mit den Primern 5'Rpl22 (GCTAGAATAGTCAATCTTAAGTTAAG) und 3'Rpl22 (ACGTAATTTTCATAGAGTCATTC) amplifiziert. Das Produkt wurde in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pUC18 inseriert. Das 3'-Ende von *rpl22* überlappt über 16 Nukleotide hinweg mit dem 5'-Ende von *rps3*. Um die Translation von *rps3* im Falle des Knockouts von *rpl22* zu gewährleisten, wurde die Spacer-Region von *psbE/psbF* (GAGGCCCTA) stromabwärts von *aadA* eingefügt. Dies generiert eine Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem *rps3*-Gen sowie ein TAG-Stopp-Codon nach dem *aadA*-Gen. Als eine Kontrolle für den Fall, dass *rpl22* nicht-essentiell sein sollte, wurde der *rps3*-Knockout mit der gleichen Spacer-Region hergestellt. *rps3* ist allerdings gleichzeitig auch ein legitimer und unabhängiger Kandidat zum Knockout aus dem Plastidengenom, wie alle anderen untersuchten Gene auch (vgl. 1.1.3). Zusätzlich wurde das Stopp-Codon von *rpl22* von TAA zu TAG mutiert, um eine Shine-Dalgarno-Sequenz für das stromabwärts gelegene *aadA* zur Verfügung zu stellen.

Die kodierende Region von *rpl22* wurde durch die kodierende Region von *aadA* ersetzt. Jene von *rpl22* wurde per PCR mit den Primern 5'ClaI (GATCAGATC-GATTCTTTTTTGAATC) und 3'ClaI (CAAATAGGAGGCCCTAATGGGACAAAAAAT-AAATCCACTTG) (unterstrichen: *aadA*-bindende Bereiche; kursiv: Spacer-Sequenz; die restlichen Bereiche binden im Plastom) amplifiziert. Die Sequenz stromaufwärts von *rpl22* wurde mit den Primern 5'NcoIfor (CCATAAGGTTTGCCTCCTACTACTGAATC) und 3'NcoIrev (GAACCCTGTAG-ACCATCCCC) amplifiziert. Eine dritte PCR mit pLS1 als Template wurde durchgeführt um die kodierende Region von *aadA* zu erhalten. Dazu wurden die Primer 5'Rpl22aadA (CCCATTAGGGCCTCCTATTGCCGACTACCTTGGTG)

(unterstrichen: *aadA*-bindende Bereiche; kursiv: Spacer-Sequenz; die restlichen Bereiche binden im Plastom) und 3'Rpl22aadA (CAGTAGTAGGAGGCAAACCTT-ATGGGGGAAGCGGTGATC) (unterstrichen: *aadA*-bindende Bereiche; Die restlichen Bereiche binden im Plastom) benutzt. In der vierten PCR-Reaktion wurden die Produkte der vorherigen drei Reaktionen und die Primer 5'ClaI und 3'NcoI eingesetzt. Das Produkt der vierten Reaktion wurde mit *NcoI* und *ClaI* behandelt und in pTF11 kloniert, welcher mit denselben Enzymen verdaut wurde. Der neue Vektor erhielt den Namen pTF12.

Im Knockoutvektor pTF13 wurde *rps3* mit *aadA* ersetzt. Eine erste PCR wurde mit den Primern 5'EagI (CTTCCCCCATTAGGGCCTCTATTTTTTGTCCCATAATCCCCCA) (unterstrichen: *aadA*-bindende Bereiche; kursiv: Spacer-Sequenz; die restlichen Bereiche binden im Plastom) und 3'EagI (TTCGCGGCCGTTCCCTAT) durchgeführt. Die flankierende Sequenz des gegenüberliegenden Endes des Genes wurde mit den Primern 5'BamHI (CTCTAGAGGATCCCCGCTAGAATAGTC) und 3'BamHI (AGGTAGTCGGCAAATAA-TTTACTACTTGTCTTCCCTTCTATCCAATG) (unterstrichen: Bindung an *aadA*; die restliche Sequenz bindet ans Plastom) und derselben Template-DNA amplifiziert. Eine dritte, auf die *aadA*-kodierende Region zielende PCR wurde mit den Primern 5'Rps3aadA (AAAGACAAGTAGTAAAATTATTTGCCGACTAC-CTTGGTGATC) (unterstrichen: *aadA*-bindende Bereiche; die restlichen Bereiche binden im Plastom) und 3'Rps3aadA (AATAGAGGCCCTAATGGGGGAAGCGGTGATC) (unterstrichen: Bindung an *aadA*; kursiv: Spacer-Sequenz; die restliche Sequenz bindet ans Plastom) vom Plasmid pLS1 ausgehend durchgeführt. Für die finale PCR wurden die Produkte der letzten drei PCRs, sowie die Primer 5'BamHI und 3'EagI verwendet. Das daraus entstandene PCR-Produkt, sowie der Vektor pTF11, wurden mit den Restriktionsenzymen *EagI* und *AflIII* behandelt und zum neuen Vektor pTF13 kombiniert.

Die zur Detektion benutzte Sonde wurde per PCR mit Wildtyp-DNA und den folgenden Primern hergestellt: 5'(TGGCTCGAAGCTCTTGATTT), 3'(CAACCCATCA-CTTCGCATTA).

### 2.2.3 Plastidentransformation

Zur Transformation von *Nicotiana tabacum* mit den obig beschriebenen Vektoren wurden junge Blätter mit Plasmid-ummantelten Goldpartikeln (0,6 µm) beschossen. Dazu wurde die Helium-betriebene biolistische Kanone PDS1000He von BioRad verwendet. Die Regeneration erfolgte auf Spectinomycin- und Streptomycin-haltigem Medium. Die weitere

Kultivierung verlief wie unter 2.2.1 beschrieben (Svab und Maliga, 1993; Bock 2001; Fleischmann *et al.*, 2011).

#### **2.2.4 DNA-Isolation**

Gesamt-DNA wurde aus den Pflanzen mittels einer Cetyltrimethylammoniumbromid-basierten Methode extrahiert (Doyle und Doyle, 1990). Dazu wird Blattmaterial von Tabak mittels der Mörsermühle homogenisiert und für 30 min bei 60 °C mit 0,5 mL CTAB-Lösung inkubiert. Mittels Chloroformbehandlung (300 µL Chloroform/Isoamylalkohol) werden die hydrophoben Bestandteile gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 g, 4 °C) wird die in der wässrigen Phase befindliche DNA abgenommen und mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt (Zentrifugation: 20 min, 12000 g, 4 °C). Das Pellet wird bei RT getrocknet und in Wasser gelöst.

#### **2.2.5 RFLP-Analyse**

Zur RFLP-Analyse wurden einige µg DNA mit Restriktionsenzymen behandelt. Es muss der korrekte Puffer gewählt werden und eine genau abgestimmte Enzymmenge verwendet werden. Dies ist je nach Enzym und Anbieter verschieden und entsprechend deren Angaben zu entnehmen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in EtBr-haltigen Agarosegelen von 0,8 bis 1,2 %. Die Fragmente wurden dann auf Hybond N Nylon-Membranen geblottet. Das Gel wurde dazu vorher 15 min in Southern I Lösung geschwenkt, 30 min in Southern II Lösung, 30 min in Southern III Lösung und 15 min in Southern IV Lösung. Das Gel wurde anschließend in ein übliches Kapillarblotsystem integriert. Der Übertrag der DNA-Fragmente auf die Membran erfolgte über die Kapillarkräfte der aufsteigenden SSC-Lösung (20x). Nach dem Blotten wurde die Membran getrocknet und die DNA daraufhin per UV-Licht mit der Oberfläche kovalent verknüpft. Die Sonden wurden mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP per Random-Priming entsprechend den Angaben des Herstellers markiert (Multiprime DNA Labelling Kit). Vor dem Markieren wurden die Sonden nach erfolgter Auftrennung im Agarosegel aus den herausgeschnittenen Gelstückchen mit dem NucleoSpin Extract II Kit isoliert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C in Church-Puffer. Nach der Prähybridisierung des Blots in Church-Puffer über einige Stunden wurden die Sonden hinzugegeben und ü.N. hybridisiert. Nach Abkippen des Church-Puffers musste der Blot 2x 20 min in Southern/Northern-Waschlösung I und 1x 20 min in Southern/Northern-Waschlösung II gewaschen werden. Der Blot wurde anschließend getrocknet und auf Phosphor-Schirme platziert und diese je nach Strahlungsstärke einige Minuten bis Tage exponiert. Die Auswertung erfolgte am Radioisotopenbildgeber Typhoon Trio+.

### 2.2.6 Plasmid-Isolation

Die Präparation von Plasmid DNA aus *Escherichia coli* erfolgte nach Sambrook und Russell, 2001). Übernachtskulturen von *E. coli* (Volumen: 2 mL) wurden durch Zentrifugation (2 min, 10000 g) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 100 µL Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden zur Lyse der Zellen 200 µL Lösung II hinzugefügt. Nach mehrmaligem vorsichtigem Mischen und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden 150 µL von Lösung III hinzugefügt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellreste durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 15000 g, 4 °C). Der DNA-beinhaltende Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion weiter behandelt. Die Fällung der DNA erfolgte letztendlich mit 0,7 Volumen Isopropanol, wonach nochmals zentrifugiert (20 min, 15000 g) wurde. Die Pellets wurden mit 70 % EtOH gewaschen, bei RT getrocknet und in Wasser resuspendiert. Waren größere Mengen an Plasmiden notwendig, wurden 100 mL Kulturen aus Vorkulturen ü.N. angesetzt und mit dem NucleoBond Xtra Midi Plus Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verarbeitet.

### 2.2.7 RNA-Isolation und Hybridisierungsprozeduren

Gesamt-RNA wurde aus den Pflanzen mittels des NucleoSpin RNA Plant Kits isoliert, bzw. mit einer Guanidinisothiocyanat/Phenol-basierten Methode, im Falle der Analyse von RNAs unter einer Größe von 200 Nukleotiden (peqGOLD TriFast), jeweils nach Angaben des Herstellers. RNA-Proben wurden denaturiert, auf denaturierende Formaldehyd-Agarosegele (1-1,2 %) geladen, aufgetrennt und auf Hybond N Nylon Membrane geblottet (GE Healthcare) (gleiches Verfahren wie unter Punkt 2.2.5, nur werden die Gele nicht in Southern Lösungen inkubiert). DNA-Sonden wurde per PCR hergestellt. Die Template-DNA stammte in allen Fällen vom Wildtyp; als Primer wurden folgende Sequenzen verwendet:

4,5S-rRNA-Sonde: 5'4.5S (AGGTCACGGCGAGACGAG),

3'4.5S (TTCAAGTCTACCGGT CTGTTAGGAT).

5S-rRNA-Sonde: 5'5S (TCCTAGGCGTAGAGGAACCA),

3'5S (CTGGCGTCGAGCTATTTTTC).

16S-rRNA-Sonde: 5'16S (GAGAGTTCGATCCTGGCTCA),

3'16S (GCACCTTCCAGTACGGCTAC).

23S-rRNA-Sonde 1: 5'23S1 (CGGAGACCTGTGTTTTTGGT),

3'23S1 (TGCCATACTCCCAGGAAAAG).

23S-rRNA-Sonde 2: 5'23S2 (AGGAAAGGCTTACGGTGGAT),

3'23S2 (TGGGCACGATAACTGGTACA).

Zur Hybridisierung wurden [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP-markierte Sonden durch Random-Priming (Multiprime DNA labelling kit; GE Healthcare) hergestellt und bei 65 °C in Church-Puffer hybridisiert (Church und Gilbert, 1984) (Punkt 2.5.5.).

### 2.2.8 Bestimmung der rRNA-Verhältnisse

RNA-Proben wurden im Agilent 2100 Bioanalyser mit dem Agilent RNA 6000 nano Kit analysiert, wie vom Hersteller gefordert (Agilent Technologies). Die rRNA-Verhältnisse wurden durch Verrechnung der Signalintensitäten der Einzelpeaks miteinander ermittelt.

Hierzu wurden von jeder Blattgeneration jeweils von den transplastomischen *Δrps15* und der Wildtyp-Kontrollpflanzen drei biologische Replikate sowie jeweils zwei technische Replikate zur Messung verwendet. Für die Messungen nach Kältestress wurde nur eine Probe pro Pflanze mit jeweils zwei technischen Replikaten analysiert.

### 2.2.9 Polysomen-Analyse

Polysomen wurden wie in Rogalski *et al.* (2008a) beschrieben isoliert und fraktioniert, abgesehen davon, dass die Fraktionierung in sechs Fraktionen durch eine Fraktionierung in zehn Fraktionen ersetzt wurde. Grundsätzlich wurde immer auf Eis gearbeitet. Pro Probe wurden 0,1 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff fixiert und mit der Mörsermühle pulverisiert. Das Blattpulver wurde dann in 670  $\mu$ L Polysomenextraktionspuffer aufgenommen und für 5 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Im Fall der Puromycinkontrolle (Puromycin bewirkt ein Abfallen der 70S-Ribosomen von mRNAs) wurde KCl auf 0,5 M und Puromycin auf 500  $\mu$ g/mL hinzugefügt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zu allen Proben wird 1/20 Volumen Natriumdesoxycholat gegeben, um verbliebene Mikrosomen zu solubilisieren. Die Proben wurden nochmals bei 13000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Sodann werden 500  $\mu$ L des Überstandes auf analytische Saccharose-Gradienten geladen, die einen Tag zuvor bei 4 °C aufgetaut wurden. Die Gradienten werden bei 200000g für 80 min zentrifugiert, dann fraktioniert (10 Fraktionen). Aus den einzelnen Fraktionen wurde mittels einer Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol-basierten Extraktionsmethode RNA isoliert. Die RNA-Pellets wurden in 30  $\mu$ L Wasser gelöst, wovon 5  $\mu$ L durch Hitze denaturiert und auf ein 1,2 % denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel geladen wurden. Mit den Gelen wurde wie in 2.2.6 beschrieben weiterverfahren. Sonden, die Teile der Transkripte der Gene *psaA* und *psbD* abdecken, wurden per PCR mit den folgenden Primern und Wildtyp-DNA hergestellt: 5' *psaA* (CCAGTTGAGATGGGATATGATTG), 3' *psaA*

(CAGTAACTGGGGGTCTGTGG), 5'psbD (CCTAGGTCAGTTTATGGGCT) 3'psbD (GTGCTTCAGGACCCCATAGTAA).

### **2.2.10 *E. coli*-Stämme**

Der L32-Knockout-*E. coli*-Stamm (JW1075-1) ist Teil der Keio Collection (Baba *et al.*, 2006) und wurde am CGSC, Yale bestellt. Die zur Sequenzierung von *rpmF* benutzten Primer waren: 5'*rpmF* (CGGGGATAAACCGTAATTGA) und 3'*rpmF* (CCTGGGGAAAATCCTCACTA). Zur Klonierung von Vektoren wurde der Stamm TOP10F' von Invitrogen, verwendet sowie SCS-110 von Agilent Technologies.

### **2.2.11 Ribosomenisolation und Massenspektrometrie**

Ribosomen wurden entsprechend des Polysomenisolierungsprotokoll isoliert (vgl. 2.2.9). Die Isolate wurden aber nicht auf Saccharose-Stufengradienten geladen, sondern auf ein 1 M Saccharose-Kissen (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) geschichtet. Die Ribosomen wurden bei 86000 g über 17 h pelletiert. Die Pellets wurden in 0,04 M Tris, 0,02 M KCl, 0,01 M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  resuspendiert (pH: 8,5). Zur Präzipitation über Nacht bei -20 °C wurde die Ribosomen-Lösung mit 3 Volumen 90 % Aceton, 10 % Methanol, 10 mM DDT versetzt. Die Ribosomen wurden bei 14000 g für 15 Minuten zentrifugiert und 2x mit Aceton gewaschen und für 10 Minuten luftgetrocknet. Das Pellet wurde in  $T_{25}K_{100}M_5D_5T$ -Puffer (Rogalski *et al.*, 2008b) resuspendiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. MS/MS-Analysen wurden wie in Rogalski *et al.* (2008b) beschrieben in einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer ausgeführt.

### **2.2.12 Physiologische Messungen**

Die Chlorophyll-Gehalte wurden in 80 % (v/v) Aceton bestimmt (Porra *et al.*, 1989). Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde mittels eines Puls-Amplituden modulierten Fluorimeters (Dual-PAM-100; Heinz Walz) an intakten Pflanzen (angezogen bei  $350 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bei Raumtemperatur nach Dunkeladaptation über 20 min aufgenommen. Die Gehalte von PSII, Cytochrom- $b_6f$ -Komplexen und PSI wurden durch Differenz-Absorptions-Spektroskopie, wie in Schöttler *et al.*, (2007a) und Schöttler *et al.*, (2007b) beschrieben, bestimmt. Signifikanzanalysen wurden mittels einseitiger Varianzanalyse mit einer paarweisen multiplen Vergleichsmethode (Holm-Sidak-Methode) in SigmaPlot durchgeführt (Fleischmann *et al.*, 2011).

## 2.3 Methoden: Detektion und Charakterisierung von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*

### 2.3.1 Wachstumsbedingungen

20 mL Starter-Kulturen mit Standard-TAP-Medium wurden von einer Agar-Platte ausgehend mit *Chlamydomonas reinhardtii* Kulturen angeimpft. Nach 1-2 Tagen wurden davon ausgehend Hauptkulturen zur Generation der speziellen experimentellen Bedingungen auf Dichten von üblicherweise  $\sim 3,5 \times 10^5$  Zellen/mL im jeweiligen Medium inokuliert (Tab. 2.1). Diese wurden je nach Bedingung verschieden lange inkubiert bevor die Zellen geerntet wurden. Bei der Verwendung von Mangelmedien müssen die Zellen der Vorkulturen mindestens 2x im entsprechenden Mangelmedium gewaschen werden. Für die Bedingungen  $\Delta\text{Fe}$ ,  $\Delta\text{Co}$ ,  $\Delta\text{Cu}$  und  $\Delta\text{B}$  waren spezifische Chelatoren erhältlich (Purolite Ion Exchange Resins, Purolite Int., Llantrisant, UK). Dabei wurde je 1 g des Chelators verwendet (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Übersicht aller analysierten Bedingungen. Die Inokulationsdichten sind in Zellen pro mL angegeben. C markiert den Zusatz eines spezifischen Chelators zum Medium. Falls nicht anders angegeben erfolgte die Kultur in Standard-TAP-Medium.

Bedingung	Kulturspezifikation
mt+ Gameten	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h ohne N-Quelle
mt- Gameten	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h ohne N-Quelle
Mixotroph, logarithmische Phase (Standardbedingung)	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 48 h
Mixotroph, stationäre Phase	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> Ernte bei $1,5 \times 10^7$
Heterotroph, logarithmische Phase	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in Dunkelheit
Phototroph, logarithmische Phase	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 48 h in HS-Medium
Fe-Entzug	inokuliert auf $5 \times 10^6$ -> 48 h in TAP- $\Delta\text{Fe}$ + C
Co-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{Co}$ + C
K-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{K}$
Cu-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{Cu}$ + C
Mo-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{Mo}$
Zn-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{Zn}$
Mn-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{Mn}$
B-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{B}$ + C
P-Entzug	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 72 h in TAP- $\Delta\text{P}$
S-Entzug	inokuliert auf $1 \times 10^7$ -> 48 h in TAP- $\Delta\text{S}$
Kältestress	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> bei Erreichen von Dichte $3 \times 10^6$ -> 6 h bei 4 °C
Hitzestress	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> bei Erreichen von Dichte $9,5 \times 10^6$ für 30 min bei 42 °C
Osmotischer Stress	inokuliert auf $6,0 \times 10^5$ -> 24 h in 0,3 M Sorbit
Oxidativer Stress	inokuliert auf $6,0 \times 10^5$ -> 24 h in 2 mM $\text{H}_2\text{O}_2$
Cd-Stress	inokuliert auf $6,0 \times 10^5$ -> 48 h 100 $\mu\text{m}$ Cadmium
Cu-Stress	inokuliert auf $6,0 \times 10^5$ -> 48 h 200 $\mu\text{m}$ Kupfer
Wechsel der N-Quelle: $\text{NH}_3$ -> $\text{KNO}_3$	inokuliert auf $3,5 \times 10^5$ -> 24 h in $\text{KNO}_3$

## 2.3.2 Stämme und Medien

### 2.3.2.1 Stämme

Alle verwendeten *Chlamydomonas*-Stämme sind Wildtypstämme. Zur Generierung des entwicklungsbiologischen Datensatzes wurden die beiden nahezu isogenen Stämme A4+ und A4x5,2- verwendet (Dent *et al.*, 2005). Für die restlichen Bedingungen (Stress, Nährstoffmangel und andere) wurde der Stamm CC1690 verwendet. Insgesamt wurden 23 verschiedene Bedingungen durch qRT-PCR analysiert (Tab. 2.1).

### 2.3.2.2 Medien

Da in vielen der Medien auf spezifische übliche Komponenten verzichtet werden musste, wurden Änderungen an den Medienrezepturen vorgenommen. Die Medienzusammensetzungen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

(Standard)-TAP-Medium (nach Gorman und Levine, 1965)

Tab. 2.2: Grundrezept: TAP-Medium.

<b>TAP-Medium</b>	
1 M Tris	20 mL
Phosphatpufferpuffer	1 mL
Hutner's-Trace-Metals-Lösung	1 mL
Nährstoffkonzentrat	10 mL
Eisessig	1 mL
pH auf 7,0	
Wasser	ad 1 L
<b>Phosphatpuffer</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	108 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 L
<b>Nährstoffkonzentrat</b>	
NH <sub>4</sub> Cl	40 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	10 g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1L

## HS-Medium (Sueoka's high salt medium nach Sueoka, 1960)

Tab. 2.3: Grundrezept HS-Medium.

HS Medium	
NH <sub>4</sub> Cl	2 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,002 g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,001 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,72 g
Hutner's-Trace-Metals-Lösung	1 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1L

## Hutner's-Trace-Metals-Lösung (nach Hutner *et al.*, 1950)

Alle Mikronährstoffe, die nur in geringen Mengen benötigt werden, sind in dieser Spurenelementlösung enthalten (Tab. 2.4). Manche Wachstumsbedingungen erforderten zusätzlich zur Änderung der Hutner-Zusammensetzung auch Änderungen in anderen Medienkomponenten (Tab. 2.5)

Tab. 2.4: Grundrezept für Hutners-Trace-Metals-Lösung. Für verschiedene Nährstoffmangelbedingungen (Spalten) mussten abweichende Hutners-Trace-Metals-Lösungen hergestellt werden. Gelbe Felder sind jene, die von den Änderungen betroffen sind.

Hutner's Trace Metals	Standard	ΔB	ΔZn	ΔMn	ΔFe	ΔCo	ΔCu	ΔMo	ΔK	ΔS
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4 g/L	0	11,4 g/L							
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	22 g/L	22 g/L	0	22 g/L	0					
ZnCl <sub>2</sub>										10,43 g/L
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	5,06 g/L	5,06 g/L	5,06 g/L	0	5,06 g/L					
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	4,99 g/L	4,99 g/L	4,99 g/L	4,99 g/L	0	4,99 g/L	4,99 g/L	4,99 g/L	4,99 g/L	0
FeCl <sub>2</sub>										2,27 g/L
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,61 g/L	0	1,61 g/L	1,61 g/L	1,61 g/L	1,61 g/L				
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	1,57 g/L	0	1,57 g/L	1,57 g/L	0					
CuCl <sub>2</sub>										0,847 g/L
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> *4H <sub>2</sub> O	1,1 g/L	0	1,1 g/L	1,1 g/L						
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O										82,5 g/L
pH auf 6,5 - 6,8	KOH	NaOH	KOH							

Tab. 2.5: Auflistung aller chemischen Komponenten der stärker veränderten Medien. Die Zusammensetzung der hier aufgeführten Medien, wurde stärker als nur durch Weglassen einer Hutner-Komponente verändert. Es sind als Referenz das Standard-TAP-Medium zu sehen, als auch die Angaben zu jenen Medien, welche einzelne Nährstoffe nicht mehr aufweisen, sofern dies eine Auswirkung auch auf andere Komponenten des Mediums hat, die über ein Weglassen der entsprechenden Komponente aus der Hutner-Trace-Metals-Lösung hinausgehen. Beispiel: TAP-ΔB ist nicht aufgelistet, da hierbei nur  $\text{BO}_3\text{H}_3$  aus der Hutner-Lösung gelassen werden muss, der Rest aber normalem TAP-Medium entspricht. In Gelb sind alle Felder markiert die vom Standard-TAP-Rezept abweichen.

Chemische Komponente	TAP		TAP-ΔN		TAP-ΔS		TAP-ΔP		TAP-ΔK		TAP-NO3	
	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$												
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$									137,99	1		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	108	0,62	108	0,62	108	0,62	0	0	0	0	108	0,62
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	56	0,41	56	0,41	56	0,41	0	0	0	0	56	0,41
KCl							111,825	1,5				
$\text{NH}_4\text{Cl}$	400	7,47	0	0	400	7,47	400	7,47	400	7,47	0	0
$\text{KNO}_3$											1010	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100	0,406	100	0,406	0	0	100	0,406	100	0,406	100	0,406
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$					82,5	0,406						
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50	0,34	50	0,34	50	0,34	50	0,34	50	0,34	50	0,34
$\text{BO}_3\text{H}_3$	11,4	0,184	11,4	0,184	11,4	0,184	11,4	0,184	11,4	0,184	11,4	0,184
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22	0,0765	22	0,0765	0	0	22	0,0765	22	0,0765	22	0,0765
$\text{ZnCl}_2$					10,43	0,0765						
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,06	0,0256	5,06	0,0256	5,06	0,0256	5,06	0,0256	5,06	0,0256	5,06	0,0256
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,99	0,0179	4,99	0,0179	0	0	4,99	0,0179	4,99	0,0179	4,99	0,0179
$\text{FeCl}_2$					2,27	0,0179						
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,61	0,0068	1,61	0,0068	1,61	0,0068	1,61	0,0068	1,61	0,0068	1,61	0,0068
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57	0,0063	1,57	0,0063	0	0	1,57	0,0063	1,57	0,0063	1,57	0,0063
$\text{CuCl}_2$					0,847	0,0063						
$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$												
KOH	16	0,28	16	0,28	16	0,28	16	0,28	0	0	16	0,28
NaOH										0,28		
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	50	0,18	50	0,18	50	0,18	50	0,18	50	0,18	50	0,18
Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )	2420	19,977	2420	19,977	2420	19,977	2420	19,977	2420	19,977	2420	19,977

### 2.3.3 Ernte der Zellen

Die Zellen wurden durch Zugabe von Eis (Eiswasser) metabolisch fixiert und in 50 mL Aliquots in Falcon Tubes bei 3500 g für 3 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.3.4 miRNA-Isolation

Zur Isolation der miRNAs wurde das miRNeasy-Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Qualität der RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen bestimmt.

### 2.3.5 Denaturierendes Agarosegel

Zur Qualitätskontrolle wurden RNA-Aliquots in denaturierenden Agarosegelen untersucht. Die RNA wird dazu mit 1,6 Volumen des RNA-Ladepuffers gemischt und zwei Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die RNA in ein Formaldehyd-haltiges 1 % Agarosegel geladen und bei 30-70 Volt über ~2 h aufgetrennt. Als Puffer wurde EtBr-haltiger ( $1,5 \cdot 10^{-4}$  % v/v) 1x MOPS verwendet.

### 2.3.6 miRNA-cDNA-Synthese und PCR-Primerdesign (nach Chen *et al.*, 2005.)

Zur Herstellung der miRNA-cDNA kamen 192 verschiedene Stem-Loop-Primer (SLP) zum Einsatz, die jeweils die spezifische reverse Transkription einer bestimmten miRNA erlauben. Jeder SLP muss nach der Lieferung durch die Zugabe einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 25 µM eingestellt werden. Aus den Einzellösungen müssen zwei 96-Plex-Lösungen (96 verschiedene SLPs im selben Ansatz) mit einer jeweiligen Molarität von 2,5 µM für jeden SLP hergestellt werden. Die erste 96-Plex-SLP-Lösung enthält die SLPs 1-96, die zweite Lösung die SLPs 97-192.

#### 2.3.6.1 cDNA-Synthese Protokoll

Gesamtreaktionsvolumen: 50 µL

1-2 µg gesamt RNA (in einem maximalen Volumen von 24,5 µL )

+ 1 µL 10 mM dNTPs, + 10x 1 µL 2,5 µM 96-Plex-SLP-Lösung, + 1 µL Oligo-dT-Primer  
ad 36,5 µL mit H<sub>2</sub>O

Inkubieren für 5 min bei 65 °C, dann auf Eis

+ 10 µL 5x First Strand Synthesis Buffer + 2 µL 0,1 M DTT,

+ 0,5 µL Ribonuklease Inhibitor,

+ 1 µL Superscript III Reverse Transkriptase

Inkubation in PCR-Cycler: 30 min bei 16 °C, 60 min bei 42 °C, 5 min bei 85 °C, auf Eis.

Nach erfolgter cDNA-Synthese wird der Ansatz auf 500 µL mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt (10x verdünnt).

### 2.3.6.2 Primerdesign

Das Grundgerüst aller Stem-Loop-Primer beinhaltet die Sequenz:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3'

An das 3'-Ende des Grundgerüsts werden 5-8 Nukleotide angefügt, die komplementär zum 3'-Ende der zu amplifizierenden miRNA-Sequenz sind. Die SLPs kommen nur während der cDNA-Synthese zum Einsatz. In der qRT-PCR werden andere Primer verwendet. Es gibt einen universalen Revers-Primer, der aus einem Teil der Grundgerüstsequenz der SLP-Grundgerüsts besteht und für sämtliche miRNA-cDNA-Amplifikationen identisch verwendet wird. Die Sequenz des universalen Revers-Primers ist: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'. Die Spezifität der qRT-PCR-Reaktion für bestimmte miRNA-cDNAs rührt von der Benutzung spezifischer Vorwärts-Primer her. Dazu werden die ersten 12-15 Nukleotide der gewünschten miRNA ausgewählt sowie an den 5'-Terminus dieser Sequenz weitere beliebige Nukleotide angehängt um eine Schmelztemperatur von 60 °C zu erreichen. In manchen Fällen ist es nicht notwendig zusätzliche Nukleotide an das 5'-Ende anzuhängen. Die Primer wurden unter diesen Vorgaben mittels Quantprime erstellt (Abb. 2.1) (Arvidsson *et al.*, 2008).

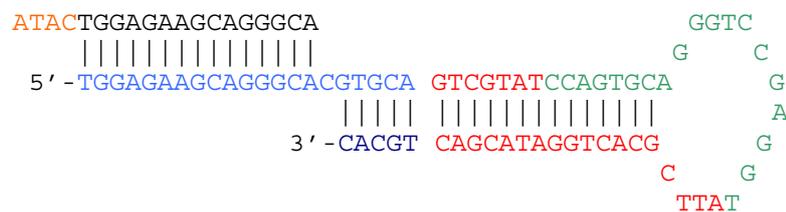


Abb. 2.1: Primer-Schema zur Stem-Loop-qRT-PCR. Hellblau: Sequenz der reifen miRNA, Schwarz und Orange: Sequenz des Vorwärtsprimers bestehend aus der miRNA Sequenz und 4 zusätzlichen Nukleotiden, Rot und Grün: Sequenz des SLP-Grundgerüsts, Dunkelblau: 5 Nukleotide zur spezifischen Erkennung der miRNA, Grün: Sequenz des universalen Revers-Primers.

### 2.3.7 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Grundsätzlich wurde nach den in Udvardi *et al.* (2008) geschilderten Vorgaben verfahren.

Zur Messung der Transkriptabundanzen wurden die 384-Well-qPCR-Maschinen ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System von ABI benutzt. Die Präparation der PCR-Platten erforderte die Nutzung des Pipettierroboters Evolution P3. In jeder Reaktionsvertiefung der 384-PCR-Platten befanden sich zum Zeitpunkt der Messung 2,5 µL Sybr-Green (ABI), 0,5 µL cDNA (aus der 10 x-Verdünnung) und 2 µL Primer (0,5 µM, Universal Reverser und spezifischer Vorwärts-Primer). Es wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

1. 10 min, 95 °C
2. 15 s, 95 °C
3. 60 s, 60 °C

Die Schritte 2. und 3. werden 39x wiederholt

#### 2.3.7.1 Auswertung der qRT-PCR-Daten

Zur Auswertung der Rohdaten wurde das Programm Quantpipe (Arvidsson, nicht publiziert) verwendet. Die statistische Auswertung der Signalintensitäten basiert auf dem Prinzip der Quantil-Normalisierung (Mar *et al.*, 2009).

#### 2.3.7.2 Vorhersage von miRNA-Zieltranskripten

Die Zielvorhersagen wurden von Dr. Juliane Neupert und Dr. Patrick May vorgenommen. Der Vollständigkeit und des Verständnisses der gesamten Arbeit halber sei dieser Punkt daher auch kurz beschrieben.

Um potentielle Ziele der miRNAs zu bestimmen, wurden die Sequenzen unter Verwendung des ptarget-Algorithmus (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>; Dai und Zhao, 2011) auf der Netzseite des Analyseservers gegen die Augustus 5 Transkriptdatenbank (Stahnke *et al.*, 2004) sowie gegen die DFCI EST Datenbank Version 7 ([http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=c\\_reinhardtii](http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=c_reinhardtii)) angewendet. Zusätzlich wurden die miRNA-Sequenzen auf Phytozome (<http://www.phytozome.net>) gegen die dort gespeicherte Chlamydomonasdatenbank getestet.



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden

Durch die gezielte Inaktivierung per biolistischer Transformation der in 1.1.1.5 und 1.1.3 vorgestellten Kandidatengene (Gene für plastidäre ribosomale Proteine: *rps3*, *rps15*, *rps16*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl32* und *rpl36*), sollte eruiert werden, ob diese essentiell sind, um daraus wiederum Rückschlüsse auf die Evolution kryptischer Plastome von Parasiten ziehen zu können, in denen diese Gene oftmals nicht mehr auffindbar sind.

#### 3.1.1 Knockout einzelner ribosomaler Proteine

Im Hauptteil des Projektes wurden einzelne Gene ausgeschaltet, die plastidäre ribosomale Proteine kodieren. In einem sich daraus entwickelnden Folgeprojekt wurden je zwei der identifizierten nicht-essentiellen Gene zugleich inaktiviert. Die Ergebnisse sind in chronologischer Reihenfolge präsentiert.

##### 3.1.1.1 Essentielle Proteine

Die aufgelisteten Ergebnisse sind nach Genname in aufsteigender numerischer Reihenfolge geordnet, beginnend mit der kleinen Untereinheit des Plastidenribosoms.

##### 3.1.1.1.1 Knockout von *rps3*

*rps3* wurde ausgeknockt, indem der Leserahmen des Gens durch die kodierende Sequenz von *aadA* durch homologe Rekombination ersetzt wurde, was eine Resistenz gegenüber Spectinomycin zur Folge hat. *rps3* wird als Teil eines größeren Polycistrons (*rpl23*-Operon) u.a. gemeinsam mit *rpl16*, *rpl22* und *rps19* transkribiert, daher ist keine zusätzliche Promotor-Sequenz zur Expression des *aadA*-Gens notwendig. *rps3* überlappt sogar mit *rpl22* um 16 Nukleotide. Daher wurde die Sequenz des *psbE/psbF*-Spacers, die eine optimale Shine-Dalgarno-Sequenz enthält, zwischen *rpl22* und *aadA* eingefügt, um die Translation von *aadA* sicherzustellen (Punkt 2.2.3.7). Es sind zwei Karten abgebildet, die in Abb. 3.1.1.A die unveränderte Situation im Wildtyp widerspiegeln sowie in Abb. 3.1.1.B die neue transplastomische Sequenz nach erfolgter Transformation. In beiden Karten sind die Längen der Restriktionsprodukte zur RFLP-Analyse als schwarze Linien mit Angabe der Länge des Fragmentes in Kilobasenpaaren, unterhalb der Abbildung dargestellt.

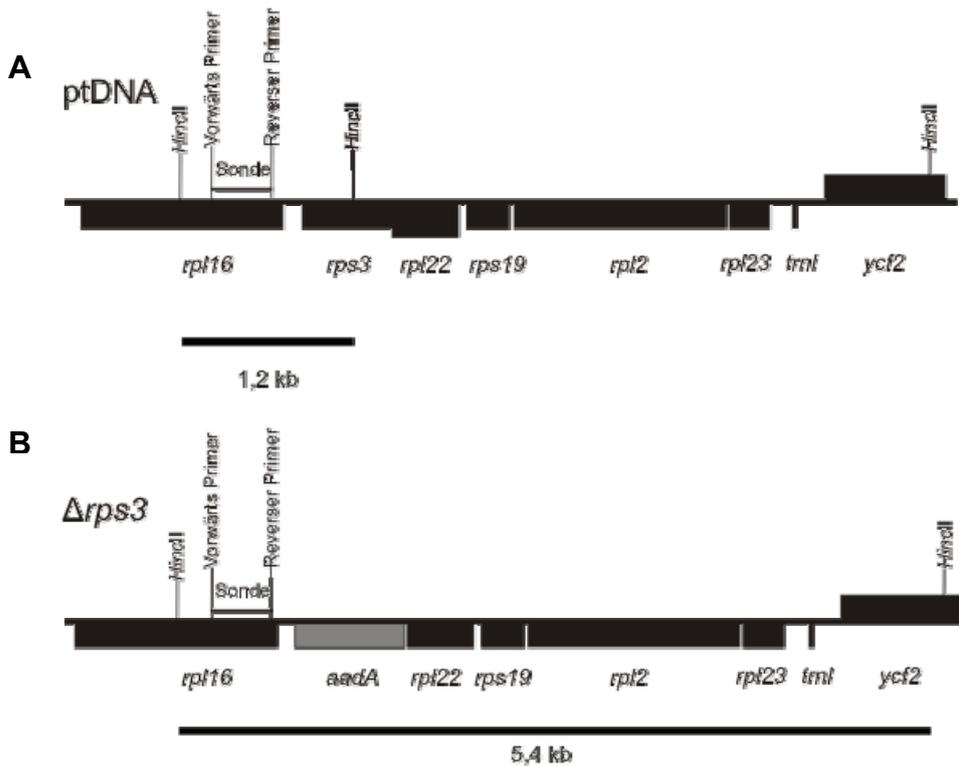


Abb. 3.1.1: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rps3$ -Pflanzen.

- A. Physische Karte des Plastidengenoms von Tabak. Es ist der Ausschnitt des langen *rpl23*-(*rpoA*)-Operons zu sehen, welches *rps3* enthält. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA*, repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt. Als Sonde wurde ein per PCR hergestelltes Fragment benutzt (s. 2.2.3.7).
- B. Physische Karte der transplastomischen Region des Plastidengenoms nach der homologen Rekombination im Anschluss an die Transformation mit dem Vektor pTF13 (Beschriftung wie in A).

Es war während des gesamten Selektionsprozesses nicht möglich homoplasmatische  $\Delta rps3$ -Pflanzen zu erzeugen (Abb. 3.1.2.A). Die Pflanzen blieben heteroplasmatisch und zeigten während der Kultur in Erde typische Segregationen zu Wildtyp-dominierten bzw. Mutantendominierten Pflanzenteilen (Abb. 3.1.2.B) (s. 1.1.2.1; Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2008b). Die Pflanzen produzieren Samen, allerdings besitzen diese nur selten (1-3 %) ausreichend viele Transplastome, um unter Selektionsdruck mit Spectinomycin überleben zu können (Abb. 3.1.2.C). *rps3* ist daher als essentiell einzustufen.

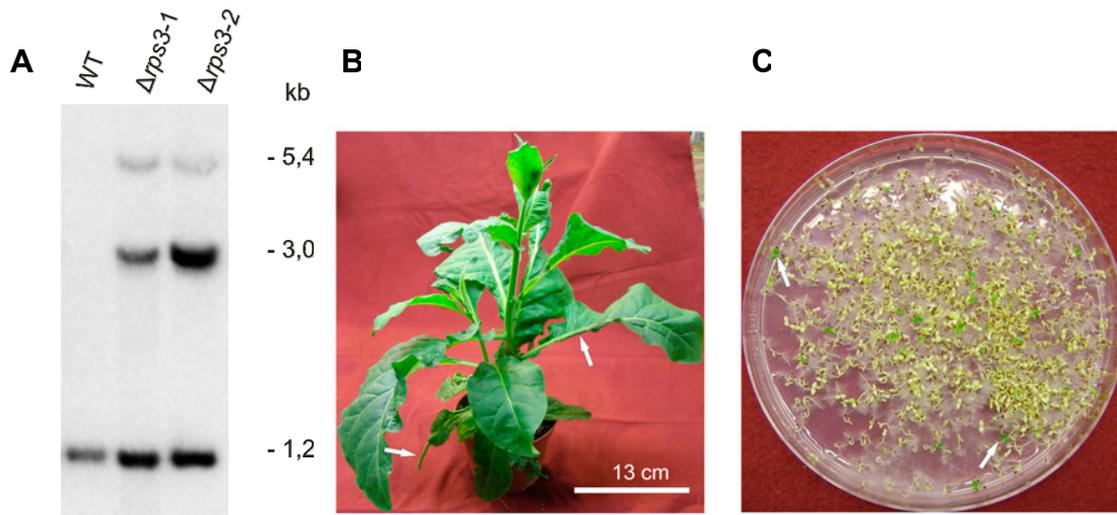


Abb. 3.1.2: Molekularer und optischer Phänotyp der  $\Delta rps3$ -Pflanzen.

- A. RFLP-Analyse zur Bestätigung der korrekten Insertion des Transgens. Es wurde transgenes und Wildtyp-Pflanzenmaterial verwendet. Der Wildtyp zeigt wie erwartet nur eine Bande bei 1,2 kb. Die  $\Delta rps3$ -Pflanzen aber weisen zusätzlich zur erwarteten Bande bei 5,4 kb eine weitere bei 3,0 kb auf, welche höchstwahrscheinlich das Resultat weiterer Rekombinationsereignisse ist und nicht weiter untersucht wurde sowie die Wildtyp-spezifische Bande (Heteroplasmie).
- B. Phänotyp einer typischen  $\Delta rps3$ -heteroplasmatischen Pflanze. Die Blätter weisen den typischen Blattverlust-Phänotyp auf, der typisch für transgene Pflanzen ist, welchen ein essentielles Gen partiell fehlt (Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2008b). Der Phänotyp entsteht durch zufällige Segregation von Wildtyp-Plastomen und transformierten Plastomen, was zum Verlust kompletter Zelllinien führen kann (Stellen mit weißen Pfeilen markiert).
- C. Samenkeimungstest. Von  $\Delta rps3$ -Pflanzen gewonnene Samen wurden auf Spectinomycin-haltigem Medium zur Keimung gebracht. Zum Überleben befähigte heteroplasmatische Keimlinge sind mit weißen Pfeilen markiert, wohingegen Wildtyp-Keimlinge (ohne Transplastom-Kopien) weiß werden und unter diesen Bedingungen nicht überleben können.

#### 3.1.1.1.2 Knockout von *rps16*

*rps16* wurde per Insertionsmutagenese inaktiviert, da es nicht Teil einer Operonstruktur ist. Daher wurde die komplette *aadA*-Kassette, samt eigenem Promotor und Terminator direkt in *rps16* inseriert. Die folgenden zwei Karten sind gleichartig wie die Abbildungen 3.1.1.A und B beschriftet.

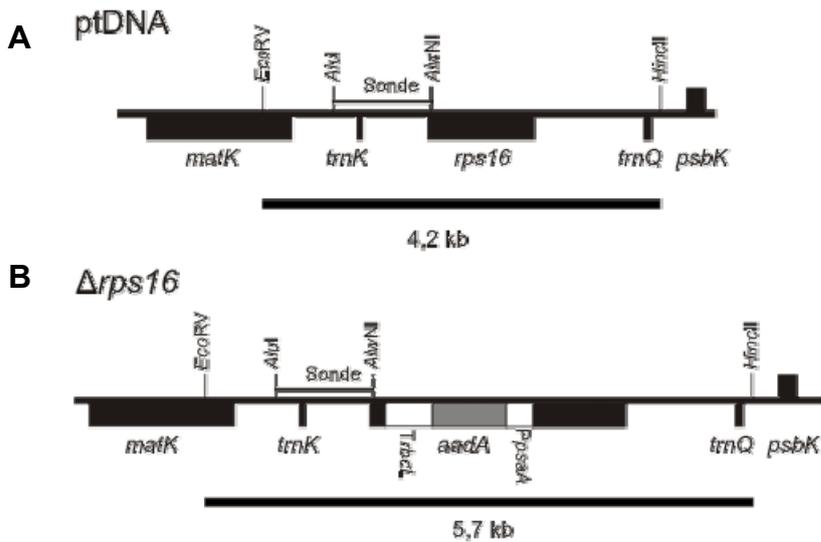


Abb. 3.1.3: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rps16$ -Pflanzen.

- A. Physische Karte der *rps16*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA*, repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymerkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- B. Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pSA7 (Beschriftung wie in A).

Die Transformation führte nicht zu homoplasmatischen Pflanzen. Alle Pflanzenlinien sind heteroplasmatisch geblieben (Abb. 3.1.4.A). Der Phänotyp weist die gleichen Charakteristika auf, die schon in den  $\Delta rps3$ -Pflanzen beobachtet worden sind (Abb. 3.1.4.B) Samenkeimungstests ergaben die gleiche, niedrige Weitergabehäufigkeit des Transplastoms zur nächsten Generation (Abb. 3.1.4.C). Dies lässt auf die Essentialität von *rps16* schließen.

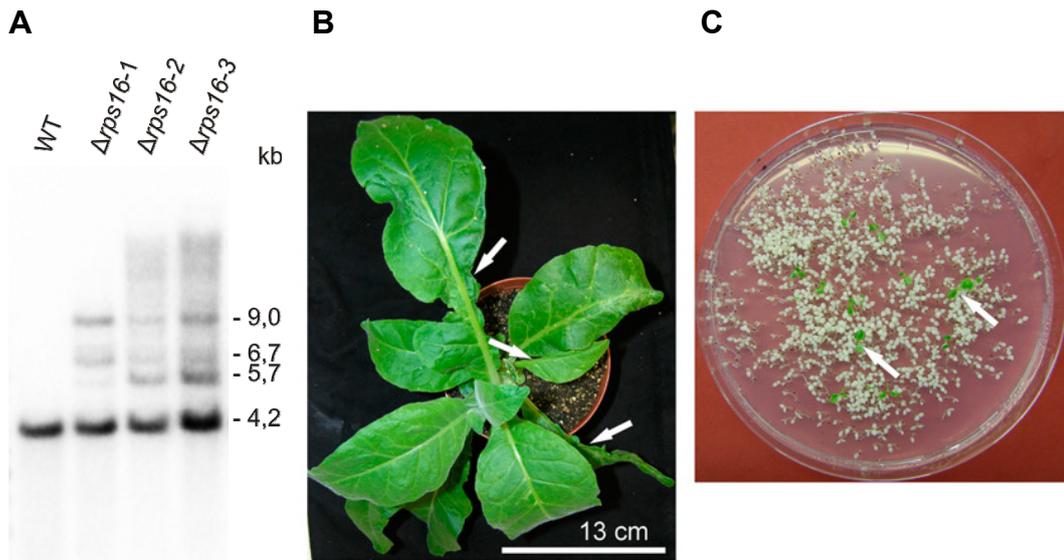


Abb. 3.1.4: Molekularer und optischer Phänotyp der  $\Delta rps16$ -Pflanzen.

- A. RFLP-Analyse transformierter und nicht transformierter Pflanzen. Alle Transformanten waren heteroplasmatisch. Die Bande bei 5,7 kb signalisiert die korrekte Insertion der transgenen Sequenz, aber es sind noch zwei weitere Rekombinationsereignisse bei den Bandengrößen 6,7 und 9,0 kb sichtbar, zusätzlich zur Wildtyp-spezifischen Bande bei 4,2 kb. Die zusätzlichen Banden wurden nicht weiter charakterisiert.
- B. Phänotyp einer typischen heteroplastomischen  $\Delta rps16$ -Pflanze. Pfeile zeigen auf missgestaltete Blätter.
- C. Keimlinge von  $\Delta rps16$ -Pflanzen, die unter der Gegenwart von Spectinomycin zum Keimen gebracht wurden. Heteroplasmatische Individuen sind mit weißen Pfeilen markiert.

### 3.1.1.1.3 Knockout von *rpl22*

*rpl22* wurde via PCR-basierter Substitution von *rpl22* mit der kodierenden Sequenz von *aadA* inmitten des Operons von *rpl22* durch homologe Rekombination ausgeknockt. Wie in 3.1.1.1.1 beschrieben, überlappt dieses Gen mit *rps3* um 16 Nukleotide. Um sicher zu stellen, dass *rps3* nicht ebenfalls inaktiviert wird, wurde ebenfalls die Shine-Dalgarno-Sequenz beinhaltende Spacer-Sequenz aus *psbE/psbF* zwischen *aadA* und *rps3* eingefügt, um die Translation von *rps3* zu ermöglichen. Die zwei Karten zeigen den Bereich des Interesses des Wildtypplastoms sowie der transplastomischen Sequenz (Abb. 3.1.5.A,B).

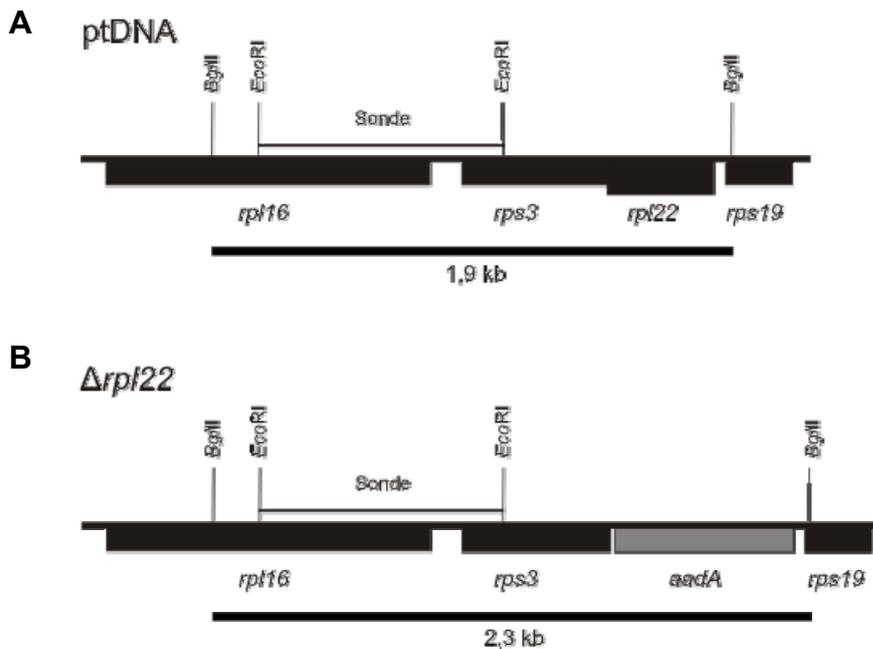


Abb. 3.1.5: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rpl22$ -Pflanzen.

- A. Physische Karte der *rpl22*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak (Ausschnitt des langen *rpl23*-Operons). Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA*, repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- B. Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pTF12. Beschriftung wie zuvor.

Alle  $\Delta rpl22$ -Pflanzen blieben während des gesamten Selektionsprozesses heteroplasmatisch und wiesen alle hierfür typischen Charakteristika auf (Abb. 3.1.6.A,B). Dies weist auf die Essentialität von *rpl22* hin. Keimlinge von  $\Delta rpl22$ -Pflanzen entstammten hauptsächlich aus Samen von Pflanzenteilen die zur Homoplasmie für das Wildtypplastom segregiert waren. Grüne, resistente Keimlinge erschienen zu einem geringen Anteil (Abb. 3.1.6.C).

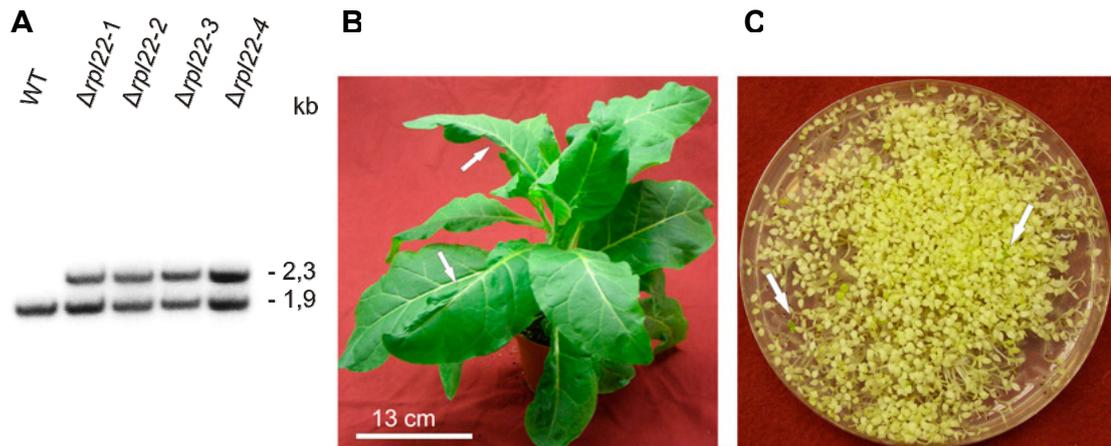


Abb. 3.1.6: Molekularer und optischer Phänotyp der  $\Delta rpl22$ -Pflanzen.

- A. RFLP-Analyse transformierter Pflanzen und von Wildtypkontrollpflanzen. Alle Transformanten waren heteroplasmatisch, was durch die Präsenz der Wildtyp-spezifischen Bande bei 1,9 kb und der Transgen-spezifischen Bande bei 2,3 kb ersichtlich wird.
- B. Typischer Phänotyp einer heteroplasmatischen  $\Delta rpl22$ -Pflanze. Weiße Pfeile indizieren deformierte Blätter.
- C. Keimungstests legen einen geringen Anteil transgener Keimlinge zu Tage (markiert mit weißen Pfeilen).

#### 3.1.1.1.4 Knockout von *rpl23*

*rpl23* ist Teil des *rpoA*-Operons und wird somit als Teil dessen exprimiert. Da deswegen kein eigener Promotor notwendig ist, wurde *rpl23* nur durch die kodierende Region von *aadA* ersetzt.

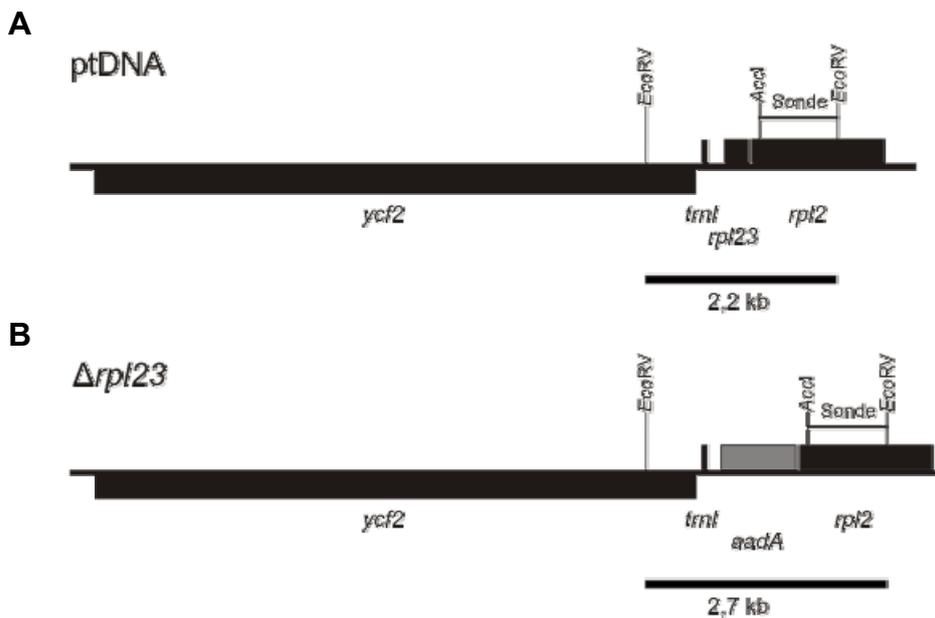


Abb. 3.1.7: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rpl23$ -Pflanzen.

- A. Physische Karte des Beginns des *rpl23*-Operons im Wildtyp-Plastom von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA* repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- B. Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pSA14. Beschriftung wie zuvor.

Die transgenen Pflanzen wiesen konstant Wildtyp- als auch Transplastome auf, woraufhin *rpl23* als essentiell eingestuft wurde. Der für essentielle Gene typische Blattverlust-Phänotyp ist beobachtbar (Abb. 3.1.8.A,B). Heteroplasmatische Keimlinge erschienen mit geringfügig höherer Frequenz (nicht signifikant) als in den vorherigen Fällen (Abb. 3.1.8.C).

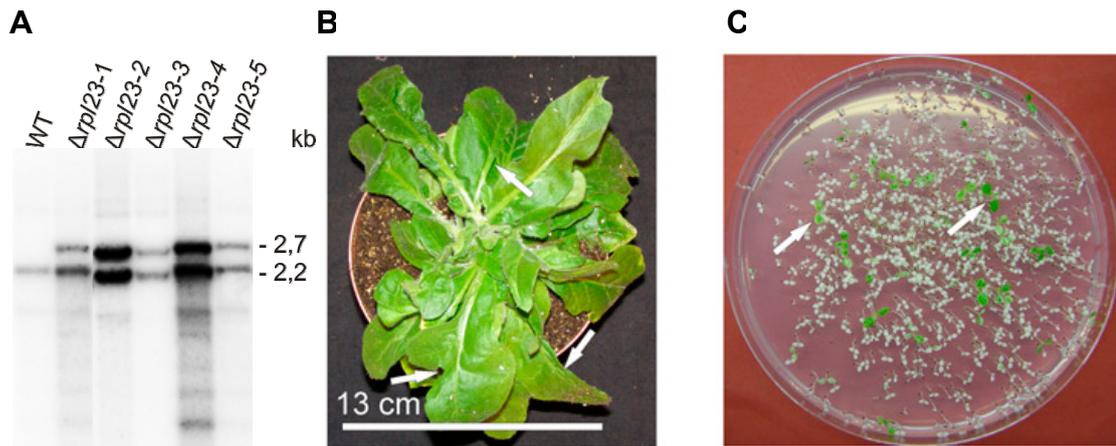


Abb. 3.1.8: Molekularer und optischer Phänotyp der  $\Delta rpl23$ -Pflanzen.

- A. RFLP-Analyse von transformierten Pflanzen und dem Wildtyp. Es sind die Wildtyp- als auch die Transgen-spezifischen Banden in den  $\Delta rpl23$ -Pflanzen bei 2,2 kb bzw. 2,7 kb präsent.
- B. Phänotyp einer typischen heteroplasmatischen  $\Delta rpl23$ -Pflanze. Pfeile verweisen auf missgestaltete Blätter des Blattverlust-Phänotyps.
- C. Keimlinge der Mutante auf Spectinomycin-haltigem Medium. Resistente Pflänzchen sind mit weißen Pfeilen markiert.

#### 3.1.1.1.5 Knockout von *rpl32*

In einem ersten Anlauf wurde *rpl32* einzig durch die *aadA*-kodierende Sequenz ausgetauscht, da *rpl32* einen eigenen Promotor besitzt (Abb. 3.1.9.B). *rpl32* ist laut Baba *et al.* (2006) ein nicht-essentielles Gen in *E. coli*, weswegen die vorgefundene Essentialität unerwartet war. Es konnte den Resultaten folgend nicht ausgeschlossen werden, dass das Expressionssignal des *rpl32*-Promotors nicht stark genug war, um eine erfolgreiche Selektion auf Homoplasmie zu ermöglichen. Um sicher zu gehen, wurde daher ein zweites unabhängiges Knockout-Experiment durchgeführt, bei welchem *rpl32* durch eine komplette *aadA*-Kassette mit eigenem Promotor ersetzt wurde (Abb. 3.1.9.C). Abb. 3.1.9.A zeigt die unveränderte Version des Plastoms.

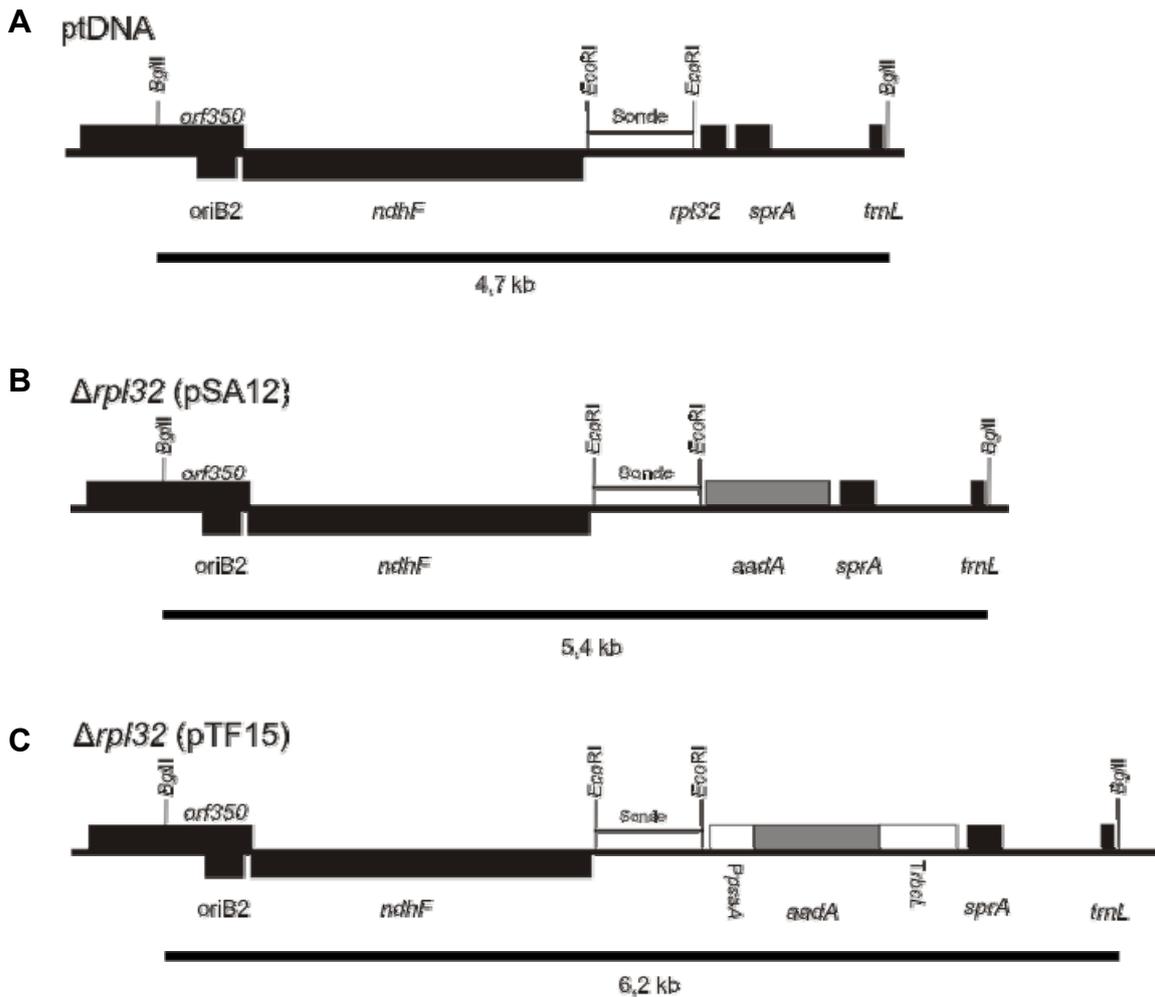


Abb. 3.1.9: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rpl32$ -Pflanzen.

- Physische Karte der *rpl32*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA* repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pSA12. Beschriftung wie zuvor.
- Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pTF15. Beschriftung wie zuvor.

In beiden Knockout-Versuchen stellte sich *rpl32* als essentieller Bestandteil der plastidären Translationsmaschinerie heraus. RFLP-Analysen bestätigten den heteroplasmatischen Status der transformierten Pflanzen (Abb. 3.1.10.A). Beide Versuche *rpl32* auszuknocken resultierten in Pflanzen, die den typischen Blattverlust-Phänotyp besitzen (Abb. 3.1.10.B,C). Abbildung 3.1.10.D zeigt die Ergebnisse eines Keimlingstests.

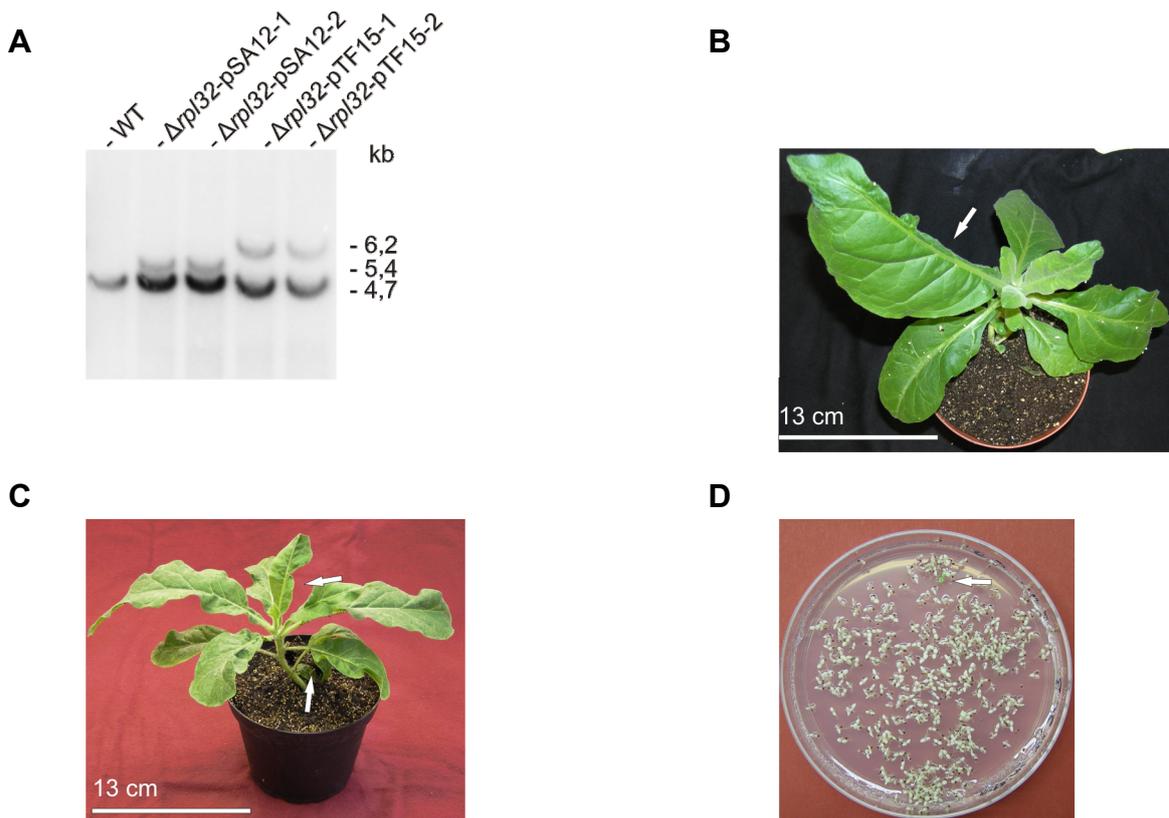


Abb. 3.1.10: Molekularer und optischer Phänotyp der  $\Delta rpl32$ -Pflanzen.

- A. RFLP-Analyse von  $\Delta rpl32$ - und Wildtyp-Pflanzen. Die Wildtyp-spezifische Bande kann bei 4,7 kb gefunden werden, während auf die Transgen-spezifische Bande bei 5,4 (pSA12) bzw. 6,2 kb (pTF15) gestoßen werden kann.
- B. Phänotyp einer typischen  $\Delta rpl32$ -heteroplasmatischen Pflanze, transformiert mit pSA12. Der Pfeil zeigt auf ein missgestaltetes Blatt.
- C. Phänotyp einer typischen  $\Delta rpl32$ -heteroplasmatischen Pflanze, transformiert mit pTF15. Pfeile zeigen auf missgestaltete Blätter.
- D. Keimlinge der Mutante (hier: pSA12; pTF15 nicht gezeigt) auf Spectinomycin-haltigem Medium. Ein resistenter Keimling ist mit einem weißen Pfeil markiert.

### 3.1.1.2 Nicht-essentielle Proteine

Während der Studie wurden zwei plastidäre ribosomale Proteine identifiziert, welche nicht-essentiell sind. In einem der zwei Fälle, beim Knockout von *rps15*, war es möglich, eine sehr detaillierte Analyse mit einem großen Methodenspektrum durchzuführen, während für den anderen Fall, den Knockout von *rpl36*, die Wahl der Methoden aufgrund des starken Phänotyps der Pflanzen eingeschränkt war.

### 3.1.1.2.1 Knockout von *rps15*

Der Knockout von *rps15* zeigte, dass das Gen in Tabak nicht-essentiell ist und resultierte in homoplasmatische Pflanzen, die einen optisch unauffälligen Phänotyp aufwiesen, der aber auf molekularer und physiologischer Ebene, vor allem unter Kältestress, deutlich vom Wildtyp abweichende Eigenschaften besaß.

#### 3.1.1.2.1.1 Physische Karten, RFLP, Keimlingstests und Massenspektrometrie

*rps15* wurde durch Insertionsmutagenese zerstört, da es nicht Teil eines Operons ist. Hierzu wurde die komplette *aadA*-Kassette benutzt, um die kodierende Sequenz von *rps15* zu unterbrechen und eine Translaktion der mRNA zu verhindern. Die *rps15*-beinhaltende Region des Wildtypplastoms ist in Abb. 3.1.11.A dargestellt, die korrespondierende Region der transgenen Pflanzen in Abb. 3.1.11.B.

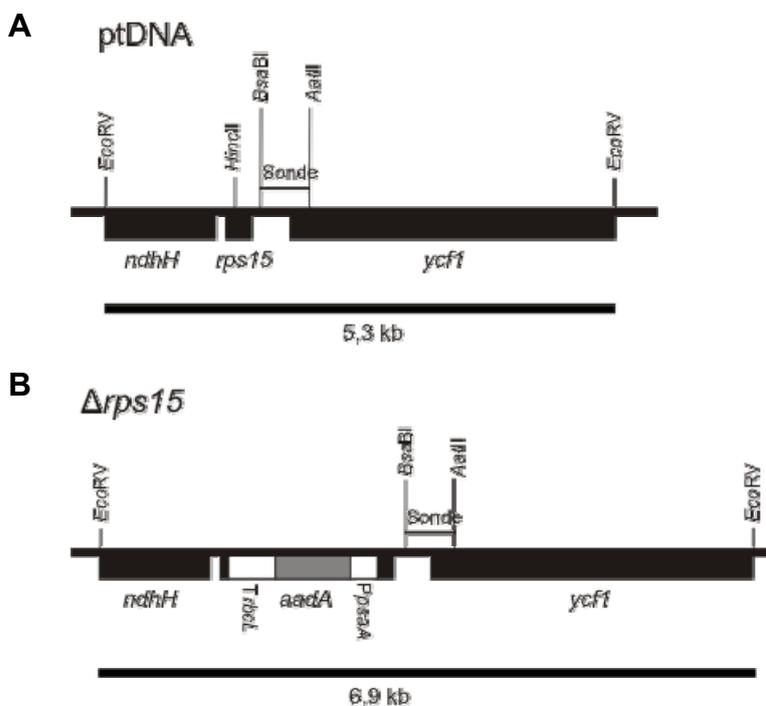


Abb. 3.1.11: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rps15$ -Pflanzen.

- Physische Karte der *rps15*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA*, repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pSA15. Beschriftung wie zuvor.

RFLP-Analysen und Keimungstests bewiesen den homoplasmatischen Zustand der transgenen Pflanzen, die völlig normal geformte Blätter aufwiesen (Abb. 3.1.12.A,B + 3.1.13.A,B). Daher ist *rps15* als nicht-essentieller Bestandteil des Plastoms von *Nicotiana tabacum* einzustufen.

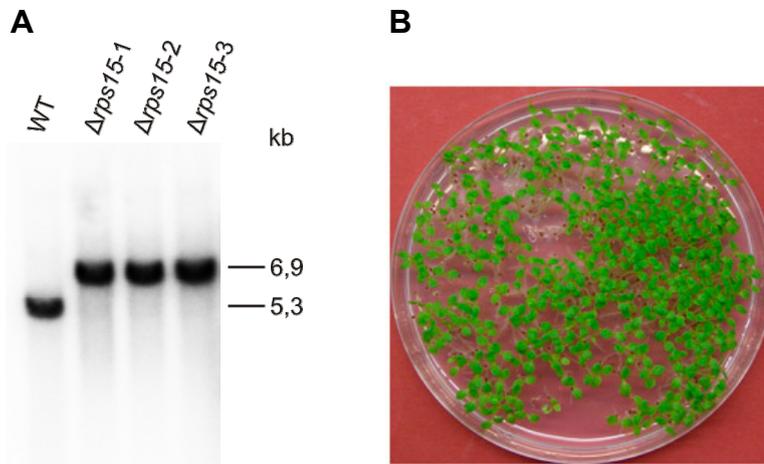


Abb. 3.1.12: RFLP und Keimlingstest.

- A. RFLP-Analyse von transgenen Pflanzenlinien sowie des Wildtyps. Im Southern Blot ist im Falle der  $\Delta rps15$ -Pflanzen nur eine einzige Bande bei 6,9 kb sichtbar, welche im Zuge eines erfolgreichen Transformationsexperimentes zu erwarten ist. Eine Wildtyp-spezifische Bande bei 5,3 kb ist nur im Falle des Wildtyps vorhanden.
- B. Transplastomische Keimlinge, auf Spectinomycin-haltigem Medium angezogen. Die Nachkommen sind gleichfalls homoplasmatisch.

Um zu bestätigen, dass die Ribosomen der transgenen  $\Delta rps15$ -Pflanzen ohne S15 funktional sind, wurden plastidäre Ribosomen aufgereinigt und deren Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert (Tab. 10.1 unter Punkt 10.1) (Rogalski *et al.*, 2008b). S15 konnte in Wildtypkontrollen nachgewiesen werden, aber nicht in den Knockout-Mutanten. Dies bestätigt einerseits den erfolgreichen Knockout von *rps15*, andererseits schließt es auch die Möglichkeit eines Importes einer kernkodierte Version von S15 aus.

#### 3.1.1.2.1.2 Phänotyp der $\Delta rps15$ -Pflanzen

Keimlinge, junge und alte Pflanzen aller  $\Delta rps15$ -Linien bleiben, von zwei Phänomenen abgesehen, optisch von Wildtypen ununterscheidbar. Die erste augenscheinliche Anomalie unter Standardbedingungen ist die leichte Verzögerung des Wachstums (Abb. 3.1.13.A,B).

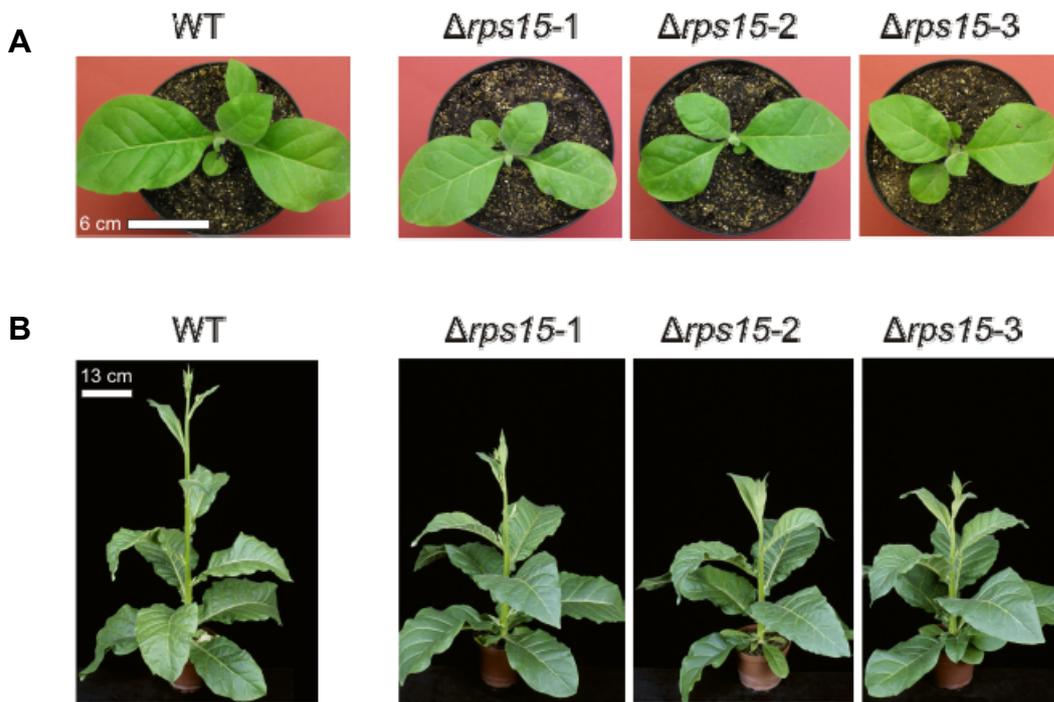


Abb. 3.1.13: Phänotyp der  $\Delta rps15$ -Pflanzen unter Standardbedingungen.

- A. Drei unabhängige Mutantenlinien sowie eine Wildtyppflanze, kultiviert in Erde für drei Wochen. Eine leichte Verlangsamung des Wachstums in den Mutanten ist zu sehen.
- B. Mutanten und eine Wildtyppflanze beim Beginn der Blüte. Die Wachstumsverlangsamung ist immer noch sichtbar.

Der zweite Effekt ist ein leichter Pigmentmangel in den jüngsten Blättern. Diese Anomalie geht aber im Verlauf der Blattexpansion verloren (Abb. 3.1.14). Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung konnten durch fluoreszenzspektroskopische Messungen nachgewiesen werden. Es gibt abweichende Chlorophyll-a/b-Verhältnisse in allen untersuchten Blattgenerationen (Punkt. 3.1.1.2.1.6), wobei aber die Gesamtchlorophyllmenge nicht betroffen war. Die hier abgebildeten Blätter (Abb. 3.1.14) konnten aufgrund ihrer Größe nicht gemessen werden, doch ist die geringere Gesamtmenge an Chlorophyll pro Blattfläche deutlich sichtbar.

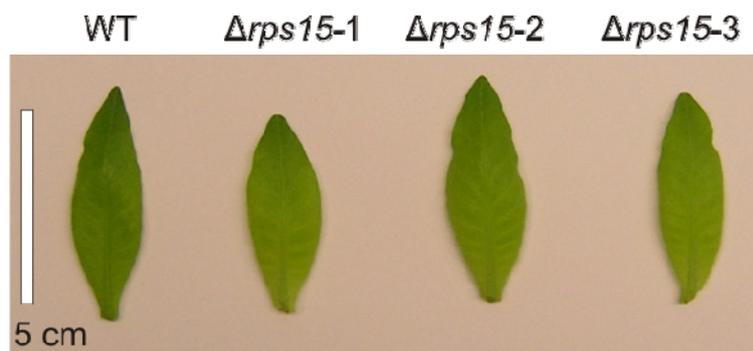


Abb. 3.1.14: Phänotyp junger Blätter des Wildtyps und dreier  $\Delta rps15$ -Knockout-Pflanzen. Die Mutanten ohne S15 sind geringfügig heller als der Wildtyp.

Ein drastischer Effekt auf das Erscheinungsbild der Mutanten wird erreicht, wenn diese über einen längeren Zeitraum hinweg Kältestress ausgesetzt werden. Nach 65 Tagen Kältestress bei 4 °C und  $\sim 100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  in Kultur in Erde ist neu gewachsenes Gewebe weiß und wird nur äußerst langsam an den Blattspitzen grün (Abb. 3.1.15).

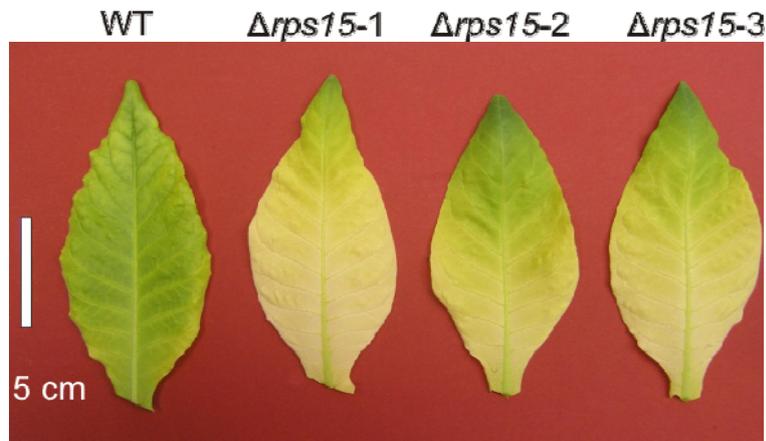


Abb. 3.1.15: Blätter des Wildtyps und der Mutante unter Kältestress. Ein signifikanter Verlust der Pigmentierung in den transgenen Pflanzen tritt im Vergleich zum Wildtyp klar hervor.

#### 3.1.1.2.1.3 Bestimmung der rRNA-Verhältnisse

Um zu bestimmen ob das Verhältnis von SSU zu LSU in den Mutanten gestört ist wurden die rRNA-Verhältnisse untersucht. Dazu wurden sowohl RNA-Proben der *Δrps15*-KO-Linien als auch des Wildtyps im Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert (vgl. 2.2.8). Der Messung liegt die Annahme zu Grunde, dass die cytoplasmatischen rRNA-Mengen in den Mutanten vom ribosomalen Ungleichgewicht in den Plastiden unbeeinflusst bleiben. rRNA-Verhältnisse können als Maß für die Untereinheiten-Stöchiometrie (30S : 50S, 40S : 60S) betrachtet werden, unter der Annahme, dass die rRNAs nur als Bestandteil des Ribosoms stabil vorliegen (Walter *et al.*, 2010).

Unter der Annahme, dass der Effekt des KOs in jüngeren Blättern stärker ist als in älteren, wurden mehrere Blattgeneration untersucht (vgl. Abb. 3.1.13 und 3.1.14). Die Blattnummern 6, 7 und 8 entsprechen den jüngsten Blättern, welche aufgrund ihrer geringen Größe und dem nicht ausreichenden Pflanzenmaterial zusammengefasst werden mussten. Nummer 1 entspricht dem ältesten Blatt.

Die 16S-rRNA-Mengen der KO-Pflanzen sind reduziert, während ihre 23S-rRNA-Mengen im Vergleich zum Wildtyp erhöht sind (Abb. 3.1.16.A,B). Als eine Konsequenz daraus ist das 23S- zu 16S-rRNA-Verhältnis deutlich verschoben (Abb. 3.1.16.C). Plastiden von Pflanzen ohne *rps15*, die unter Kältestress gewachsen sind, besitzen sowohl weniger 16S als auch weniger 23S rRNA als der Wildtyp (Abb. 3.1.16.D).

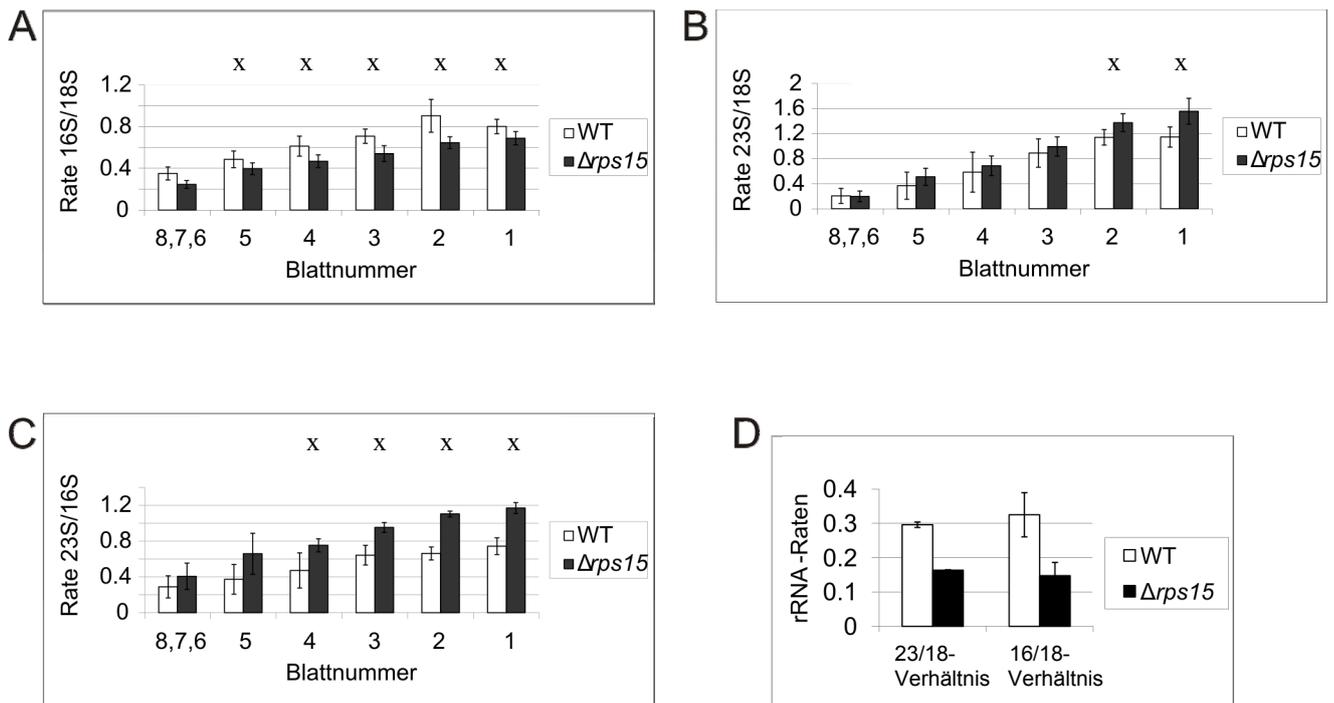


Abb. 3.1.16: Bioanalyzermessungen zur Bestimmung der rRNA-Verteilung der plastidären 70S-Ribosomen (nach Fleischmann *et al.*, 2011)

- A. Alle Blattgenerationen der  $\Delta rps15$ -transplastomischen Pflanzen weisen eine reduzierte Abundanz an plastidärer 16S rRNA, normalisiert zur cytoplasmatischen 18S-rRNA, auf. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Kreuzen markiert (t-Test,  $p < 0,05$ ).
- B.  $\Delta rps15$ -transplastomische Pflanzen zeigen eine Überakkumulation von plastidärer 23S rRNA, normalisiert zur cytoplasmatischen 18S-rRNA. Der Effekt ist stärker in den ältesten Blättern. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Kreuzen markiert (t-Test,  $p < 0,02$ ).
- C. Ein direkter Vergleich der beiden Hauptbestandteile der plastidären rRNA-Fractionen (16S und 23S) zeigt eine Verschiebung der Untereinheiten-Stöchiometrie. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Kreuzen markiert (t-Test,  $p < 0,01$ ).
- D. Blätter der transplastomischen Individuen nach Kältestressbehandlung lassen verringerte Mengen von 16S als auch 23S rRNAs im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Die durch t-Tests bestimmten Signifikanzwerte sind: 23/18-Verhältnis:  $p = 0,002$  und 16/18-Verhältnis:  $p = 0,079$ .

#### 3.1.1.2.1.4 Analyse der plastidären rRNAs per Northern Blot

Aufgrund der bei den rRNA-Verhältnissen beobachteten Anomalien wurde eine detaillierte Analyse der plastidären rRNA-Spezies in transplastomischen Pflanzen und Wildtyp-Kontrollen per Northern Blot vorgenommen, um die durch die Bioanalyzermessungen produzierten Daten zu bestätigen und um mögliche Auswirkungen auf die Prozessierung der ribosomalen RNAs aufzudecken.

Hierzu wurden fünf verschiedene Sonden benutzt, um mögliche Änderungen in den rRNA-Spezies (16S, 23S, 4,5S, 5S) und ihren Vorläufern beobachten zu können. Die Position jeder Sonde ist auf der Karte des plastidären rDNA-Operons vermerkt (Abb. 3.1.17). Es sei

darauf hingewiesen, dass die 23S rRNA innerhalb des funktionellen Ribosoms in drei Stücke fragmentiert wird (Längen: 0,4, 1,1 und 1,3 kb) (Kössel *et al.*, 1985; Bellaoui *et al.*, 2003; Bisanz *et al.*, 2003; Bollenbach *et al.*, 2005), was zur Entstehung verschiedener Prozessierungsintermediate führt (Abb. 3.1.17).

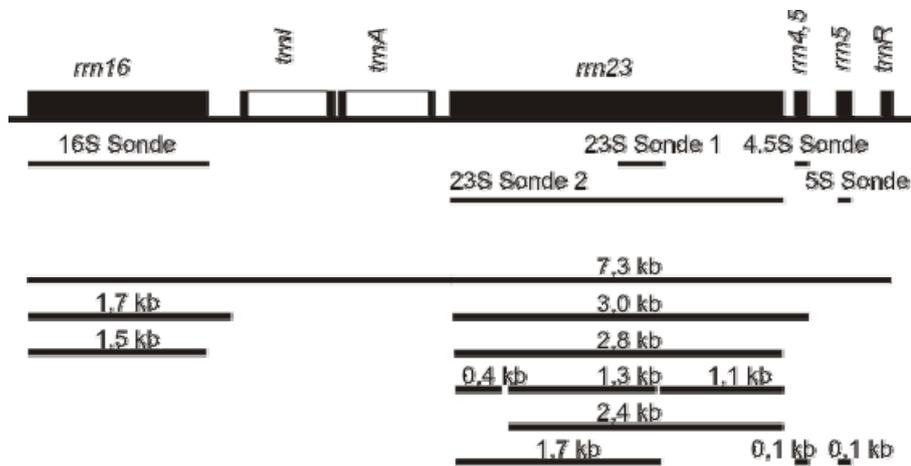


Abb. 3.1.17: Physische Karte des plastidären rDNA-Operons in Tabak und Positionen der verwendeten Sonden. Die von oben nach unten betrachtet in den ersten beiden Reihen unterhalb des Gen-Arrangements befindlichen schwarzen Linien geben die Positionen der Sonden an, die zur Markierung in Northern-Blot-Hybridisierungen benutzt worden sind. Die schwarzen Linien darunter stellen alle Vorläufertranskripte, Prozessierungsintermediate und reife rRNAs der 16S, 23S, 4,5S und 5S rRNA dar.

Gleiche RNA-Mengen, die aus jungen Blättern (Generation 8,7,6) und alten Blättern (Generation 1) extrahiert wurden, wurden auf denaturierende Formaldehyd-Agarosegele geladen. Per Northern Blot konnte eine Änderung der 16S-rRNA-Menge in den Mutanten nachgewiesen werden. In jungen, wie auch alten Blättern unter Standardbedingungen, als auch in Kälte-gestresstem Material, ist dort der Gehalt an reifen 16S rRNAs reduziert, während die Vorläufertranskripte in größerer Menge vorhanden sind (Abb. 3.1.18.B). Im Falle der 23S rRNA sind zwei Effekte des Knockouts von *rps15* auf die größte rRNA der großen Untereinheit des plastidären Ribosoms im Northern Blot zu erkennen. Erstens ist zu sehen, wie im Verlauf des Alterungsprozesses des Blattes die übermäßige Anreicherung an 50S-Untereinheiten durch zunehmende Mengen der reifen 23S rRNA abgebildet wird. Die 23S-rRNA-Sonde 1 ist nur in Lage das größte Fragment von 1,3 kb zu binden. Die beiden kleineren Fragmente von 1,1 und 0,4 kb werden nicht erkannt. Zweitens kann eine Zunahme der Menge der Vorläufertranskripte als auch der Prozessierungsintermediate festgestellt werden (Abb. 3.1.18.C). Die 23S-rRNA-Sonde 2, die alle Vorläufer und Intermediate sowie reife 23S-Fragmente markieren kann, bestätigt diesen Befund (Abb. 3.1.18.D). Kälte-gestresstes Material weist eine Reduktion der reifen 23S rRNA auf, als auch eine

Anreicherung der Vorläufertranskripte (3,0 und 2,8 kb) sowie eine Reduktion der Abundanz der Prozessierungsintermediate (2,4 und 1,7 kb) (Abb. 3.1.18.E).

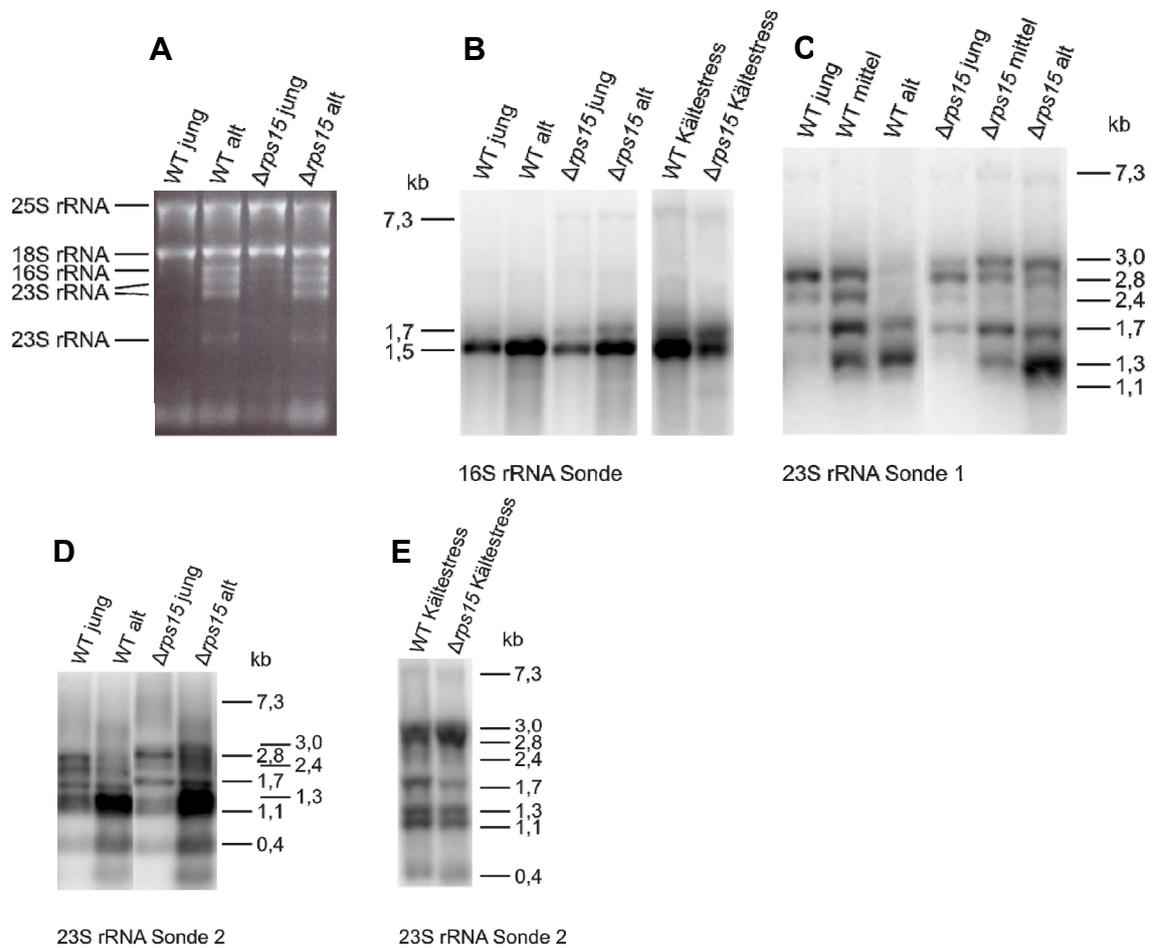


Abb. 3.1.18: Northern-Blot-Analysen der 16S und 23S rRNAs.

- Mit Ethidiumbromid angefärbte RNA des Wildtyps und der transplastomischen  $\Delta rps15$ -Pflanzen, die in einem 1,2% denaturierenden Agarosegel aufgetrennt wurde. Das Gel ist mit RNA aus jungen und alten Blättern beladen. Die Positionen der cytosolischen rRNAs (25S und 18S) und der plastidären rRNAs (23S, 16S, 4,5S and 5S) sind eingezeichnet.
- Hybridisierung mit 16S-Sonden zeigt eine verringerte Abundanz des reifen 1,5 kb-Produktes und eine erhöhte Akkumulation des 1,7 kb-Vorläufers in beiden Entwicklungsstufen der transgenen Pflanzen. Ein stärkerer Verlust der 16S-rRNA-Menge wird in Material beobachtet, welches unter Kältestressbedingungen erzeugt wurde. Die Vorläufer sind in Wildtyp und Mutante sichtbar.
- Die 23S-rRNA-Sonde 1 macht die Überakkumulation der 23S-Vorläufer deutlich (7,3 kb, 3,0 kb, 2,8 kb, 2,4 kb, 1,7 kb), gemeinsam mit erhöhten Mengen an reifen 23S-Fragmenten. Beide Phänomene werden mit zunehmendem Alter der Blätter stärker.
- Die zur Komplementation der Ergebnisse eingesetzte Sonde 2 bestätigt die zuvor aufgedeckten Überakkumulationen aller 23S-verwandten RNAs. Die Menge der 1,3 und 1,1 kb-Fragmente sowie der Vorläufertranskripte ist stark erhöht im Vergleich zum Wildtyp.
- In bei 4 °C kultiviertem Pflanzenmaterial der Mutante ist eine Zunahme der Menge an Vorläufertranskripten, wie auch eine Abnahme der Intermediate und reifen 23S rRNAs im Vergleich zum WT zu beobachten.

Eine Reduktion der beiden kleinen ribosomalen RNAs in jungen Blättern der  $\Delta rps15$ -Pflanzen (4,5S und 5S) lässt sich mittels Northern Blot nachweisen. In jungen Blättern der Mutante ist weniger reife 4,5S rRNA zu finden als in jungen Wildtypkontrollen. Im weiteren Verlauf der Alterung der Blätter zeigt sich eine Umkehr des Effektes und eine stärkere Akkumulation an 4,5S rRNAs in alten Blättern ist zu verzeichnen (Abb. 3.1.19.A). Dieselbe Beobachtung wurde für die 5S rRNA gemacht (Abb. 3.1.19.B). Allgemein konnte durch die Northern-Blot-Analysen eine Anreicherung an 50S-Untereinheiten sowie eine Abreicherung an 30S-Untereinheiten in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen festgestellt werden.

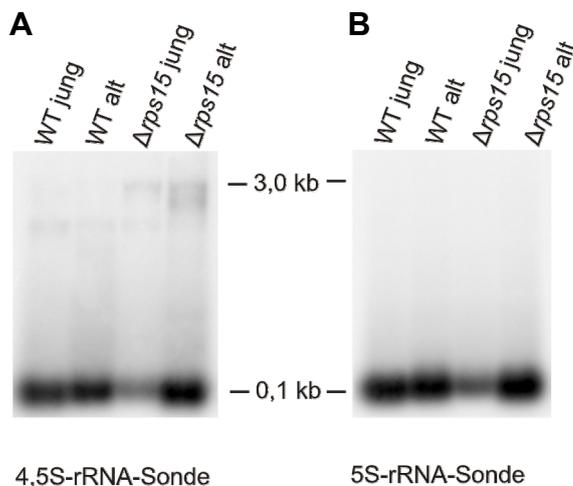


Abb. 3.1.19: Northern-Blot-Analysen der 4,5S und 5S rRNAs.

- A. Gesamt-RNA von Mutanten und Wildtyppflanzen aus verschiedenen Blattstadien, hybridisiert mit 4,5S-rRNA-Sonden. In den jungen  $\Delta rps15$ -Pflanzen sind weniger 4,5S rRNAs vorhanden, in den älteren Blättern mehr als im WT.
- B. Gesamt-RNA von Mutanten und Wildtyppflanzen aus verschiedenen Blattstadien, hybridisiert mit 5S-rRNA-Sonden. In den jungen  $\Delta rps15$ -Pflanzen sind weniger 5S rRNAs vorhanden, in den älteren Blättern mehr als im WT.

Um einen sekundären Effekt durch eine globale Beeinflussung des plastidären RNA-Metabolismus als Grund für die Prozessierungsdefekte der rRNAs auszuschließen, wurde zur Kontrolle die mRNA des zufällig gewählten Genes *ycf3* auf abweichende mRNA-Prozessierung und Akkumulation untersucht. Es wurde Kälte-behandeltes Material für die Analyse gewählt, da unter dieser Bedingung die bisher beobachteten Effekte am stärksten sichtbar geworden waren. Dennoch konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Abb. 3.1.20), woraus zu schließen ist, dass es sich bei den für die rRNA-Populationen beobachteten Prozessierungsdefekten um einen spezifischen Effekt handelt, der direkt mit den mutierten Ribosomen im Zusammenhang steht, und nicht um einen generellen RNA-Prozessierungsdefekt.

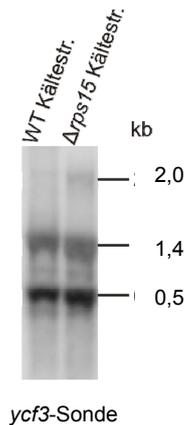


Abb. 3.1.20: Gesamt-RNA der Mutante und des Wildtyps. Sichtbar gemacht sind alle *ycf3*-Transkripte. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu sehen (Die Transkripte bei 2,0 und 1,4 kb enthalten noch ein bzw. zwei Introns, bei 0,5 kb ist das vollends maturierte Transkript sichtbar (Petersen *et al.*, 2011)).

### 3.1.1.2.1.5 Polysomen-Analyse

Um den Effekt der Abwesenheit des S15-Proteins auf die Translationsaktivität zu messen, wurden Polysomenanalysen durchgeführt. Dabei wird die Beladung von mRNAs mit translatierenden Ribosomen bestimmt und diese Analyse stellt daher ein Maß für die translationelle Aktivität dar (Barkan, 1988; Barkan, 1998; Kahlau und Bock, 2008). Es wurde die Polysomen-Assoziation zweier plastidärer Transkripte untersucht: die tricistronische *psaA/psaB/rps14*-mRNA sowie die dicistronische *psbC/D*-mRNA, deren Genprodukte in beiden Fällen Untereinheiten von Photosynthesekomplex I bzw. II sind, von S14 (einem ribosomalen Protein) abgesehen. Um eine mögliche altersbedingte Korrelation aufzudecken, wurden die Analysen jeweils für junge (Generation 8,7,6) und voll expandierte Blätter (Generation 1) durchgeführt (vgl. Punkt 3.1.1.2.1.3).

Der Vergleich der Blots, die die Polysomen-Assoziation in jungen Blättern des Wildtyps und der Mutante widerspiegeln, zeigt, dass die plastidäre Translation in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen weniger effizient abläuft. Anhand beider untersuchter Transkripte konnte eine Verschiebung im Maximum der mRNA-Verteilung der transgenen Pflanzen in Richtung der leichteren Fraktionen des Saccharosegradienten nachgewiesen werden, d.h. in jenen Fraktionen, in denen weniger Ribosomen aktiv translatieren. So ist das Maximum der *psaA/B/rps14*-mRNA-Verteilung im Wildtyp in den Fraktionen 8 bis 10 zu finden, in den transplastomischen Pflanzen aber in den Fraktionen 6 bis 8 (Abb. 3.1.21.B, obere Hälfte). Konsistent zur beobachteten Milderung des Phänotyps in älterem Gewebe (vgl. Abb. 3.1.13 und 3.1.14; weniger Pigmente in sehr jungen Blättern), ist die Auswirkung dort weniger stark ausgeprägt (Abb. 3.1.21.B obere und untere Hälfte). Da unter Kältestress der Phänotyp extremer ausgebildet ist, wurde die Polysomen-Assoziation derselben mRNAs ebenso in Kälte-behandeltem Material untersucht. Wie erwartet beeinträchtigt Kältestress die Translationsaktivität sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante. Beide Verteilungsmaxima sind nach links verschoben, in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen aber noch weiter als im Wildtyp (Abb.

3.1.21.D). Die Kontrolle in C zeigt in Gegenwart von Puromycin isolierte Fraktionen, welches als tRNA-Analogon zur verfrühten Termination und damit zum Abfallen der plastidären Ribosomen führt. Dies führt zur starken Verschiebung der Maxima zu leichteren Fraktionen.

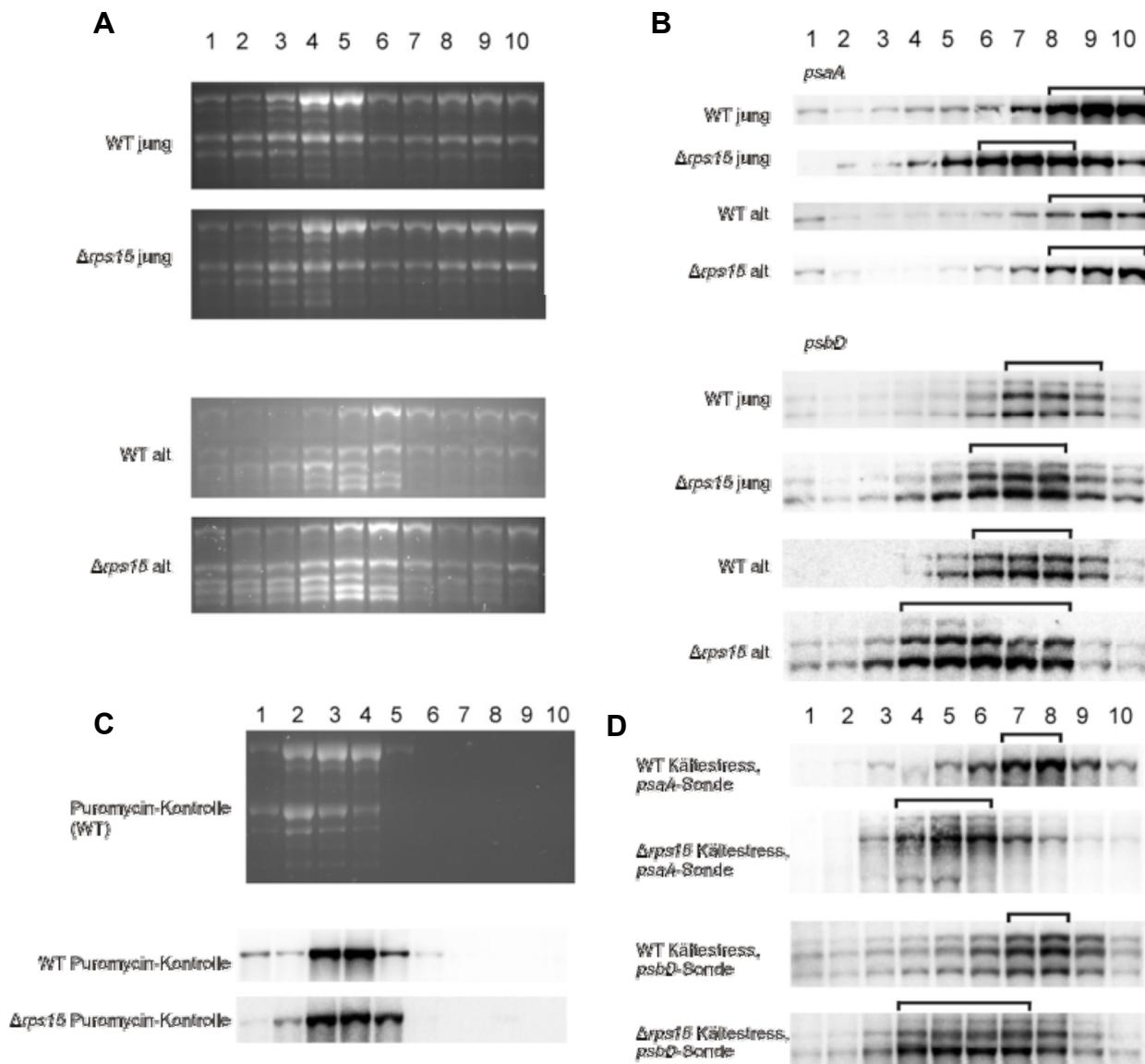


Abb. 3.1.21: Northern Blots von Polysomen-Analysen von *Δrps15*- und Wildtyp-Pflanzen.

Analyse der RNA-Verteilung in Polysomen-Präparationen aus jungen Blättern (Generation 8,7,6; vgl. Punkt 3.1.1.2.1.3), alten Blättern (Generation 1, vgl. Punkt 3.1.1.2.1.3) und Kälte-behandeltem Material des Wildtyps und der Mutante. Polysomen wurden in Saccharosegradienten separiert und jeder Gradient in 10 Fraktionen fraktioniert, die Nummerierung beginnend mit der leichtesten Fraktion, wie über den Gelen beschriftet. Die Gradientenfraktionen, welche den Großteil der mRNAs beinhalten, sind mit Klammern markiert.

A. Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel, beladen mit der aus den Fraktionen isolierten RNAs vor dem Blot-Vorgang.

B. Vergleich der Polysomen-Assoziation der *psaA*- und *psbD*-Transkripte im Wildtyp und den transgenen Pflanzen. Es wurden jeweils junge und alte Blätter analysiert. Das Maximum in den jungen Blättern ist jeweils nach links verschoben. Im alten Gewebe ist kein Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle zu sehen.

C. Als Kontrolle wurden Polysomen in Gegenwart des Polysomen-dissoziierenden Antibiotikums Puromycin isoliert. Die RNA wurde gebロットet und mit der *psaA*-Sonde hybridisiert. Die Maxima befinden sich in den monosomalen und nicht den polysomalen Fraktionen.

D. Analyse der Polysomen-Assoziation von *psaA*- und *psbD*-Transkripten in Blättern von Pflanzen, die unter Kältestress angezogen wurden. Die Maxima in den Mutanten sind jeweils deutlich nach links verschoben.

Generell konnte eine geringere Translationsaktivität für beide Transkripte in der Mutante festgestellt werden. Die Translationskapazität allgemein liegt in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen niedriger als im Wildtyp und ist insbesondere unter Kältestress stark reduziert.

#### 3.1.1.2.1.6 Fluoreszenzspektroskopische Messung von Photosyntheseparametern

Diese Messungen wurden von Dr. Mark Aurel Schöttler, Sebastian Hasdorf und Wolfram Thiele (MPI-MP) durchgeführt. Diese Daten unterstützen das Verständnis des  $\Delta rps15$ -Phänotyps, weshalb diese Messergebnisse hier mit angeführt sind (Fleischmann *et al.*, 2011).

Aufgrund des äußerst milden Phänotyps der  $\Delta rps15$ -Pflanzen (vgl. Abb. 3.1.13), wurde die photosynthetische Leistungsfähigkeit von Mutanten und Wildtyp-Pflanzen mit sensitiven spektroskopischen Methoden gemessen, um nicht sofort offenbare Beeinträchtigungen der Mutanten feststellen zu können. Zwei photosynthetische Parameter eignen sich besonders zur Untersuchung der plastidären Translationskapazität. Dies sind die Effizienz des photosynthetischen Elektronentransportes und die Akkumulationsmengen der Proteinkomplexe der Thylakoidmembran (Rogalski *et al.*, 2008b; Fleischmann *et al.*, 2011). Junge Blätter erfordern aufgrund der *de novo*-Synthese der Photosynthesekomplexe eine besonders hohe Translationskapazität des Chloroplasten (Albrecht *et al.*, 2006; Rogalski *et al.*, 2008a; Rogalski *et al.*, 2008b), da aber der Bedarf an Proteinen des Photosyntheseapparates mit zunehmendem Alter der Blätter abnimmt, wurden sowohl junge Blätter (Blätter 7+8), mittel-expandierte Blätter (Blätter 5+6) als auch voll expandierte Blätter (Blätter 3+4) zur Untersuchung herangezogen (Abb. 3.1.22).

Obwohl sich die Gesamtchlorophyllmenge der transplastomischen Pflanzen nicht signifikant von der des Wildtyps unterscheidet, besitzen diese doch ein niedrigeres Chlorophyll-a/b-Verhältnis (Abb. 3.1.22). Dies weist auf eine reduzierte Akkumulation der plastidenkodierten Proteine des Reaktionszentrums hin, wohingegen die kernkodierten Antennenproteine keine Reduktion erfahren, sondern sogar überakkumulieren können. Dies erklärt somit die relativ ausgeglichene Gesamtchlorophyllmenge. Es erscheint, als könnten während der Photosynthesekomplexbiogenese aufgetretene Defizite im weiteren Entwicklungsprozess nicht mehr kompensiert werden.

Die maximale Quanteneffizienz des Photosystems II (PSII),  $F_V/F_M$ , ist in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen, unabhängig vom Entwicklungsstadium der Blätter, ebenfalls signifikant reduziert (Abb. 3.1.22). Die durch Differenz-Absorptions-Spektroskopie (Schöttler *et al.*, 2007a) bestimmten Mengen des PSII und des Cytochrom- $b_6/f$ -Komplexes sind signifikant reduziert, die Menge des PSI jedoch kaum (Abb. 3.1.22). Da die meisten Bestandteile der

Reaktionszentren der in den Elektronentransport involvierten Proteinkomplexe im Plastom kodiert sind, können diese Daten als Hinweis auf eine reduzierte Translationskapazität der plastidären Ribosomen in der Abwesenheit von S15 interpretiert werden. PSII benötigt eine konstant hohe Translationskapazität, da das Protein D1 (Bestandteil von PSII) permanent Schaden durch photooxidativen Stress, besonders in Form von Sauerstoffradikalen, erleidet und durch neu synthetisiertes D1 ersetzt werden muss (Takahashi und Badger, 2011). Im Gegensatz dazu ist PSI stabiler, was die schwächere Auswirkung auf PSI in den Mutanten erklären kann.

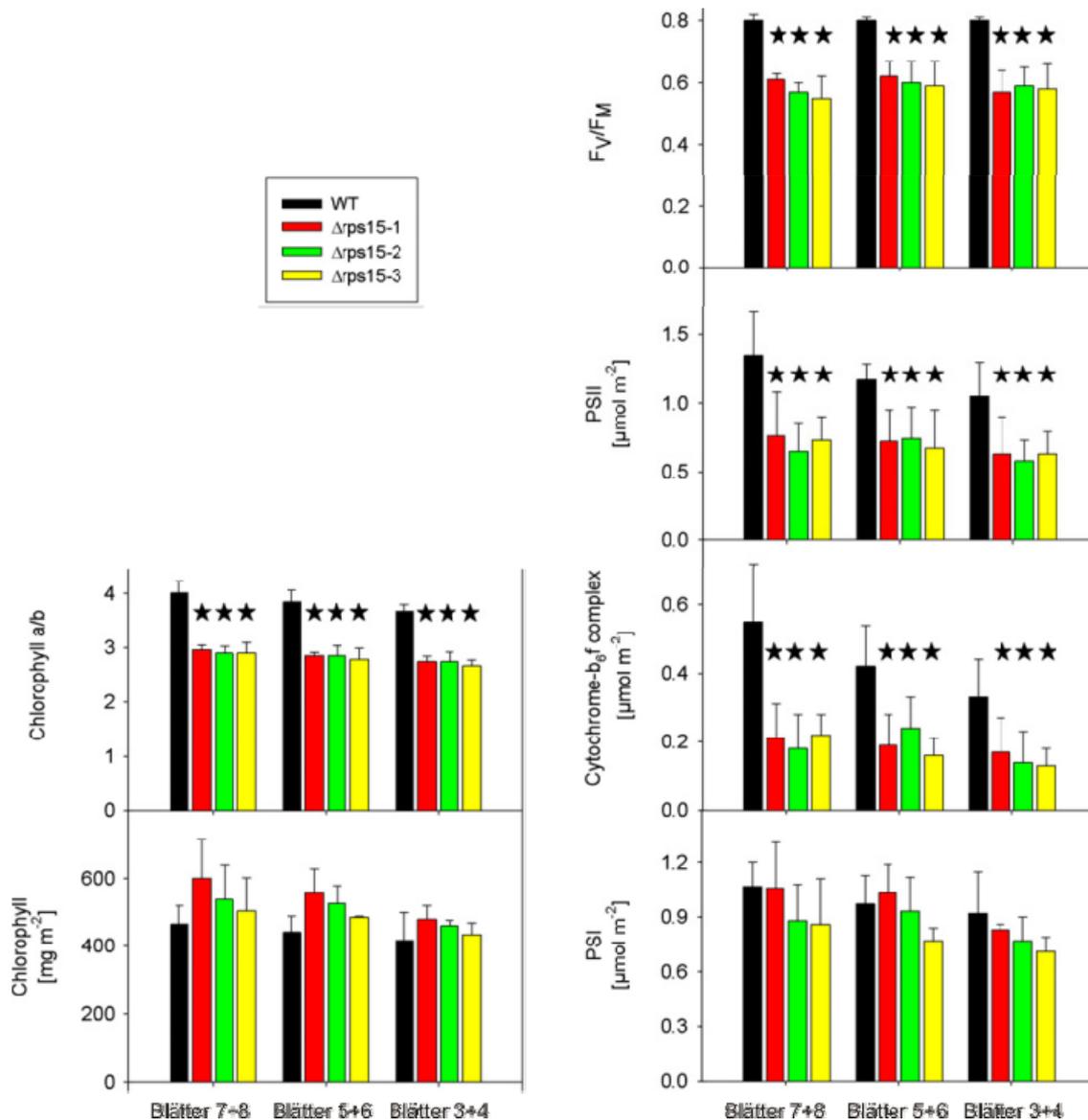


Abb. 3.1.22: Analyse des Chlorophyllgehalts und diverser photosynthetischer Parameter in  $\Delta rps15$ - und Wildtyp-Pflanzen. Alle Pflanzen wurden für acht Wochen bei  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  angezogen und zwei Wochen vor der Messung in  $350 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  transferiert. Um mögliche Entwicklungsstadium-bedingte Veränderungen abzudecken, wurden jeweils Paare von Blättern verschiedener Generationen analysiert (von unten nach oben nummeriert: ältestes Blatt 3, jüngstes Blatt: 8). Von jeder Pflanzenlinie wurden jeweils drei verschiedene Pflanzen untersucht. Die Daten wurden mittels einseitiger Varianzanalyse nach Holm-Sidak in SigmaPlot analysiert. Hoch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert ( $p < 0,001$ ). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.  $F_v/F_M$  stellt die maximale Quanteneffizienz von PSII im dunkel-adaptierten Zustand dar. Die Photosynthesekomplexe wurden über Differenz-Absorptions-Messungen von Cytochrom b559 (PSII), des Cytochrom- $b_6f$ -Komplexes und P700 (PSI) quantifiziert (aus Fleischmann *et al.*, 2011)

### 3.1.1.2.2 Knockout von *rpl36*

*rpl36* stellte sich als nicht-essentiell heraus. Das Gen ließ sich in allen Plastomkopien ausschalten. Die resultierenden homoplasmatischen Pflanzen besaßen eine sehr geringe Translationskapazität und wiesen einen sehr starken optischen Phänotyp auf. Ein Teilaspekt der phänotypischen Veränderungen kann auf ein retrogrades Signal der Plastiden zum Nukleus zurückgeführt werden.

#### 3.1.1.2.2.1 Physische Karten und RFLP

Trotz experimenteller Nachweise, die zeigten, dass *rpl36* in *E. coli* ein nicht-essentielles Gen ist, ist dieses Gen in allen in der Studie berücksichtigten nicht-grünen, parasitischen Spezies konserviert (Tab. 1.1.1). Um zu testen, ob *rpl36* einen essentiellen Bestandteil des plastidären Ribosoms darstellt, wurde *rpl36* durch eine PCR-basierte Methode über homologe Rekombination durch die kodierende Sequenz von *aadA* ausgetauscht. Demzufolge ist das Transgen Teil des *rpoA*-Operons (Abb. 3.1.23.A,B).

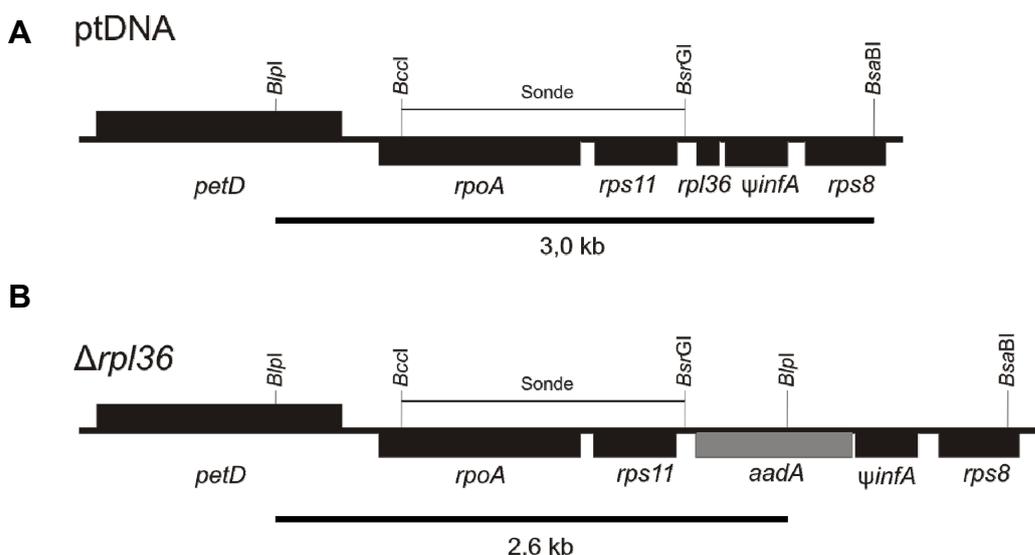


Abb. 3.1.23: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rpl36$ -Pflanzen.

- Physische Karte der *rpl36*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aadA* repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pSA9. Beschriftung wie zuvor.

Die Homoplasmie der Pflanzen konnte für alle analysierten transgenen  $\Delta rpl36$ -Pflanzen durch RFLP bestätigt werden (Abb. 3.1.24).

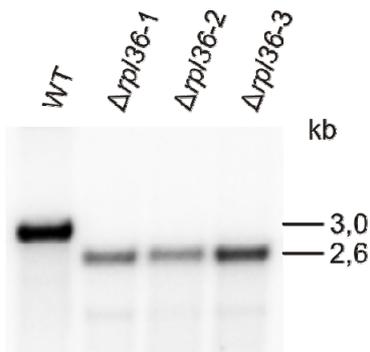


Abb. 3.1.24: RFLP-Analyse von drei Plastidentransformanten und eines Wildtyps. Alle transplastomischen Linien sind homoplasmatisch und zeigen exklusiv die erwartete Bande bei 2,6 kb.

### 3.1.1.2.2.2 Phänotypen der $\Delta rpl36$ -Pflanzen

Während des Wachstums in Sterilkultur weisen  $\Delta rpl36$ -Pflanzen einen starken Phänotyp auf. Die Blätter der Mutante sind weiß und stärker elongiert als Wildtypblätter. Die Kultur unter sehr geringem Schwachlicht ( $5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) führt zu einem partiellen Wiederergrünen der Blätter, an der Spitze beginnend (Abb. 3.1.25.A,B), was zusammengenommen auf eine hohe Suszeptibilität der Mutanten für photooxidative Schäden hinweist.



Abb. 3.1.25: Phänotypen der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen in Sterilkultur.

- Phänotyp einer  $\Delta rpl36$  transplastomischen Pflanze nach drei Monaten Wachstum auf Saccharosehaltigem Medium unter Schwachlichtbedingungen ( $5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Der Balken entspricht 6 cm.
- Ergrünen von  $\Delta rpl36$ -Pflanzen nach dem Transfer von mittelstarker Beleuchtung in schwache Beleuchtung. Das linke und mittlere Blatt stammen jeweils von einer Pflanze, vier Wochen nach dem Transfer von  $55$  zu  $5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Das rechte Blatt stammt von einer Pflanze, welche kontinuierlich bei  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  kultiviert wurde. Der Balken entspricht 3 cm.

In Erde transferierte Pflanzen wachsen sehr langsam und sind trotz schwacher Beleuchtung ( $50-70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) durch einen massiven Pigmentverlust gekennzeichnet (Abb. 3.1.26.A). Die Pflanzen haben keine Samen produziert. Weiterhin fallen die Pflanzen durch einen buschartigen Wuchs auf, welcher durch die extensive Ausbildung von Seitentrieben hervorgerufen wird, einer Eigentümlichkeit, die normalerweise nicht bei Tabak beobachtet werden kann und eine Involvierung von plastidenlokalisierten Signalwegen in die Kontrolle der

Apikaldominanz vermuten lässt (Abb. 3.1.26.B). Für eine Involvierung von Phytohormonen spricht ebenfalls die sehr langsame Wurzelbildung der Mutanten, die durch ein gestörtes Auxin zu Cytokinin-Verhältnis behindert werden kann (Sitte *et al.*, 1999).



Abb. 3.1.26: Phänotypen der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen im Gewächshaus.

- A. Phänotyp einer  $\Delta rpl36$ -transplastomischen Pflanze nach zwei-monatigem Wachstum in Erde im Gewächshaus. Der Balken entspricht 6 cm.
- B. Eine gleichartige Pflanze nach 1,3 Jahren. Es sei auf die atypischen abundanten Verzweigungen hingewiesen. Der Balken entspricht 13 cm.

Der schwerwiegendste Aspekt des Phänotyps der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen ist die stark vom Wildtyp abweichende Blattmorphologie. Die Blätter sind in allen Stadien schmäler und generell kleiner als jene des Wildtyps (Abb. 3.1.27).



Abb. 3.1.27: Stark veränderte Blattformen in  $\Delta rpl36$ -Pflanzen. Zur Linken wird eine Wildtyppflanze mit einer transplastomischen Knockout-Pflanze zur Rechten verglichen, die sich in etwa demselben Entwicklungsstadium befindet. Die Balken entsprechen 13 cm (links) bzw. 6 cm (rechts).

Photosynthesemutanten haben diesen Phänotyp nicht (Bock *et al.*, 1994; Hager *et al.*, 2002), was bedeutet, dass die hier auftretenden Effekte auf die Blattmorphologie auf die Translationsaktivität in den Plastiden zurückzuführen sind.

### 3.1.1.2.2.3 Analyse der plastidären rRNAs per Northern Blot

Plastidäre rRNAs sind in den transgenen Knockout-Pflanzen nur zu einem geringen Anteil an der Gesamt-RNA vorzufinden. Da die RNA-Mengen zur Analyse der plastidären rRNAs im Bioanalyser nicht ausreichten, wurden die Auswirkungen des Fehlens von L36 auf die ribosomalen RNAs wie auf die Abundanz der plastidären Ribosomen per Northern Blot überprüft. In denaturierenden Agarosegelen die mit Gesamt-RNA aus weißen Blättern beladen wurden ist zu erkennen, dass die Mengen an sämtlichen 16S- und 23S-rRNA-Spezies extrem reduziert sind (Abb. 3.1.28.A). Eine Hybridisierung der geblotteten RNA mit spezifischen Sonden bestätigt die deutliche Verminderung der Abundanz der reifen 23S-rRNA-Spezies als auch sämtlicher Prozessierungsintermediate. Einzig der 3,0 kb-Vorläufer wird in den Mutanten angereichert (Abb. 3.1.28.B, vgl. Abb. 3.1.17). Dieselbe Beobachtung, eine Reduktion der reifen rRNA sowie eine geringfügige Anreicherung des 17S-Vorläufers, ist für die 16S rRNA zu machen (Abb. 3.1.28.C). In allen Northern-Blot-Analysen fällt der Schweregrad der RNA-Reduktion für unter Schwachlicht ergrüntes Material milder aus (Abb. 3.1.28.A,B,C).

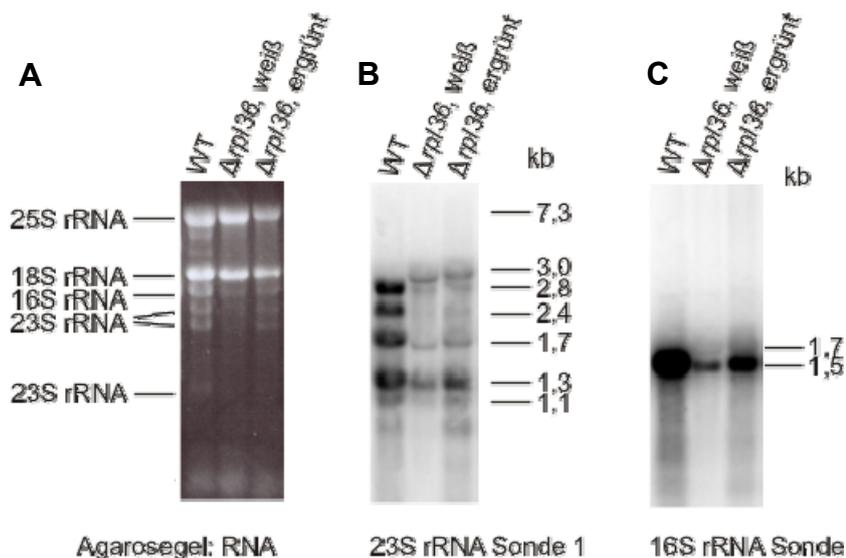


Abb. 3.1.28: Northern Blots zur Analyse der 16S und 23S rRNAs.

- Mit Ethidiumbromid angefärbte Gesamt-RNA von Wildtyp-Tabak, transplastomischen weißen Blättern und transplastomischen ergrüntem Blättern aufgetrennt im denaturierenden Agarosegel. Die Reduktion der plastidären rRNAs sticht hervor.
- Hybridisierung mit der 23S-rRNA-Sonde 1 (Abb. 3.1.17). Alle damit detektierbaren 23S-rRNA-Spezies samt der Prozessierungsintermediate sind in den  $\Delta rpl36$ -Pflanzen reduziert; der Vorläufer wird angereichert. Der Phänotyp ist stärker in weißem Blattmaterial, milder in ergrüntem.
- Hybridisierung mit 16S-rRNA-Sonde. Eine mehr als 10x Reduktion der 16S-rRNA-Menge in weißem Material und eine ~5x Reduktion in ergrüntem Material wird sichtbar. Der Vorläufer wird in der Mutante angereichert.

### 3.1.2 Doppelknockout plastidärer ribosomaler Proteine

Nach der Identifikation der beiden nicht-essentiellen ribosomalen Proteine S15 und L36 im Rahmen des ersten Projektes waren zusammen mit dem schon zuvor identifizierten, als nicht-essentiell eingestuften Protein L33 (Rogalski *et al.*, 2008b) insgesamt drei nicht-essentielle Untereinheiten des plastidären Ribosoms von Tabak bekannt. Um das Vermögen der Ribosomen zu bestimmen einen simultanen Knockout von zwei nicht-essentiellen Proteinen zu kompensieren, wurden alle drei möglichen Kombinationen in einer zweiten Knockout-Studie generiert, wobei in jeder Pflanze jeweils zwei der nicht-essentiellen Proteine ausgeschaltet wurden. Insbesondere stellte sich die Frage, inwieweit es möglich ist, gleichzeitig Proteine aus der großen und kleinen Untereinheit auszuschalten. Es wurden Spectinomycin-resistente  $\Delta rps15$ - und  $\Delta rpl33$ -Pflanzen mit Kanamycinresistenz-vermittelnden Plasmiden übertransformiert, um die Knockout-Kombinationen  $rps15-rpl36$ ,  $rps15-rpl33$  und  $rpl33-rpl36$  zu erhalten.

#### 3.1.2.1 Knockout von $rpl36$ auf der Basis von $\Delta rps15$

Transplastomische, Spectinomycin-resistente  $\Delta rps15$ -Pflanzen wurden mit dem Plasmid pTF17 transformiert, um zusätzlich zu  $rps15$  auch  $rpl36$  auszuschalten.  $rpl36$  wurde über eine PCR-basierte Strategie exakt über homologe Rekombination durch die kodierende Sequenz des Kanamycin-Resistenz-Gens *aphA-6* (Huang *et al.*, 2002) ersetzt, welches in Tabak eine bessere Selektion ermöglicht, da es niedrigere Expressionsstärken benötigt, als das ebenfalls Kanamycin-Resistenz-vermittelnde Gen *nptII* (Abb. 3.1.29.A,B) (Carrer *et al.*, 1993; Scharff und Koop, 2007).

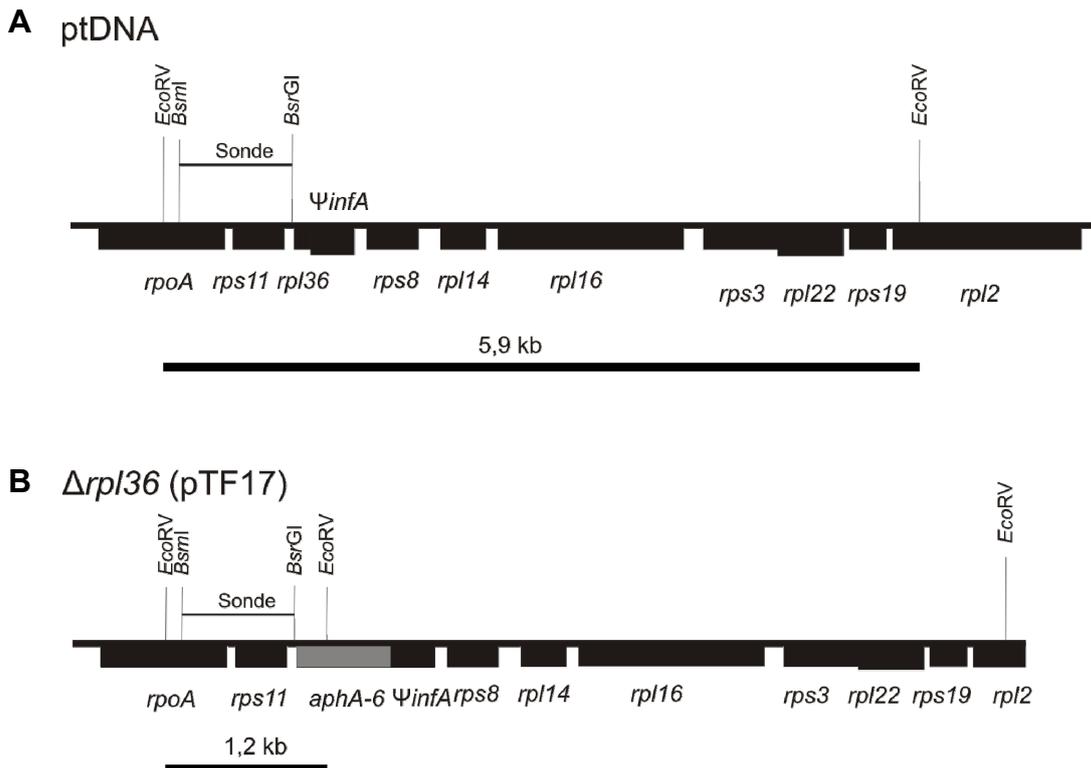


Abb. 3.1.29: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rpl36$  (pTF17).

- A. Physische Karte der *rpl36*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aphA-6*, repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymerkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- B. Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pTF17. Beschriftung wie zuvor.

Dieses Projekt ist noch nicht abgeschlossen, aber es gelang den RFLP-Analysen zu Folge kleine homoplasmatische Pflanzen zu regenerieren (Abb. 3.1.30). Der Phänotyp der Pflanzen gleicht sehr stark dem der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen (vgl. Abb. 3.1.30 und Abb 3.1.25).

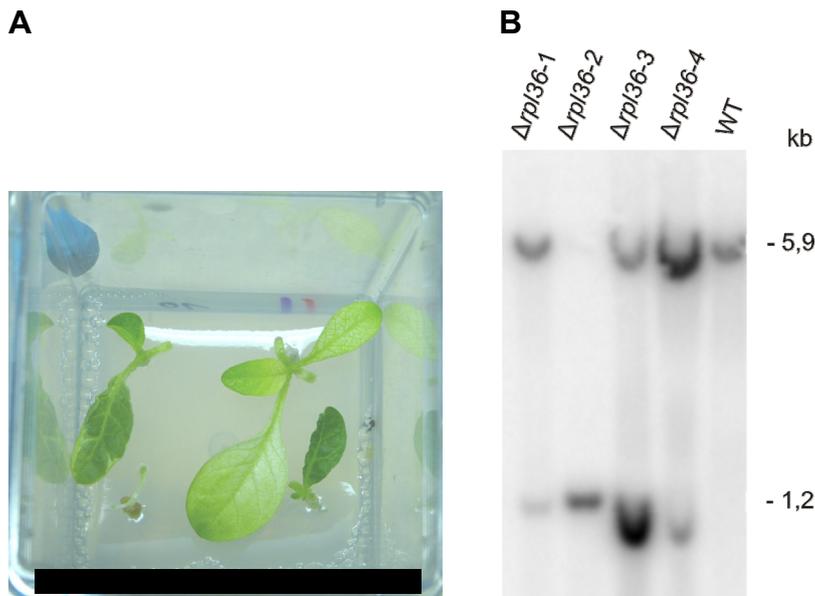


Abb. 3.1.30: Phänotyp und RFLP-Analyse der *rps15-rpl36*-Doppelknockout-Pflanzen.

- A. Der Phänotyp der Pflanze oben rechts (dieses Exemplar wurde nicht per RFLP untersucht) gleicht dem einer typischen  $\Delta rpl36$ -Pflanze. Die Pflanzen oben links, unten links und unten rechts sind heteroplasmatisch, sie weisen grüne als auch weiße Sektoren auf. Der Balken entspricht 6 cm.
- B. RFLP der transplastomischen und Wildtyp-DNA. Die obere Bande mit 5,9 kb indiziert den Wildtyp, die Bande bei 1,2 kb das Transplastom. Beim Wildtyp ist nur die 5,9 kb-Bande zu sehen, in Pflanze  $\Delta rpl36-2$  nur die Bande des Transplastoms. Die restlichen untersuchten Pflanzen besitzen beide Banden und sind somit heteroplasmatisch.

Die Untersuchungen der Linien sind noch nicht abgeschlossen, aber offensichtlich ist es möglich  $\Delta rpl36$  in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen auszuschalten. Plastidäre Ribosomen, welchen gleichzeitig Proteine der kleinen (S15) sowie der großen Untereinheit (L36) fehlen, sind demnach prinzipiell funktionell und ermöglichen eine ausreichende Translation unter heterotrophen Bedingungen in Tabak (vgl. 3.1.2.3).

### 3.1.2.2 Knockout von *rpl36* auf der Basis von $\Delta rpl33$

$\Delta rpl33$ -Pflanzen sind homoplasmatisch und im Rahmen eines früheren Projektes entstanden (Rogalski *et al.*, 2008b). *rpl33* wurde ausgeknockt und durch eine *aadA*-Kassette substituiert, womit die transformierten Pflanzen ebenso Spectinomycin-resistent sind wie die  $\Delta rps15$ -Pflanzen. Der Phänotyp ist dem der transplastomischen  $\Delta rps15$ -Pflanzen sehr ähnlich und resultiert in normalwüchsige grüne Tabakpflanzen, die einzig nach Kältestress einen starken Phänotyp zeigen. Diese Pflanzen wurden herangezogen, um in ihnen durch Übertransformation mit dem Vektor pTF17 *rpl36* zu inaktivieren, welcher gleichzeitig Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, dem Antibiotikum, das zur Selektion herangezogen wurde.

Dem Phänotyp nach zu schließen gelang es erfolgreich *rpl36* im genetischen Hintergrund von  $\Delta rpl33$  zu inaktivieren und homoplasmatische Pflanzen zu produzieren (Abb. 3.1.31.A). Dies konnte durch RFLP-Untersuchung bestätigt werden (Abb. 3.1.31.B).

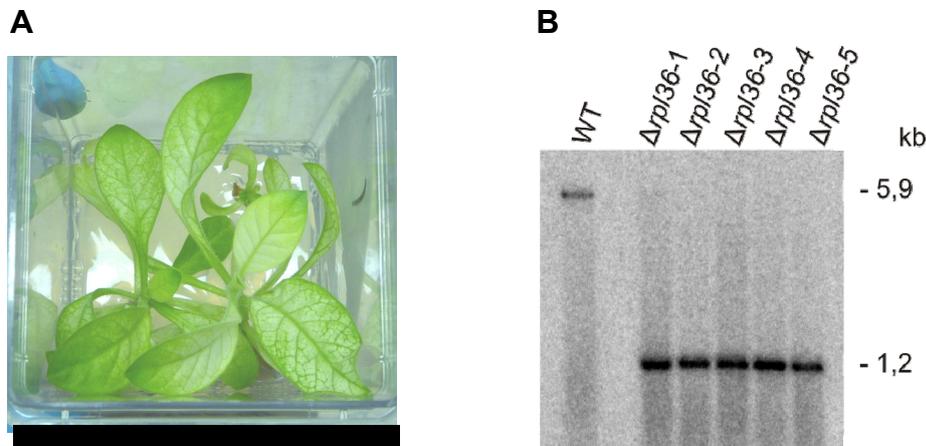


Abb. 3.1.31: Phänotyp und RFLP-Analyse der *rpl33-rpl36*-Doppelknockout-Pflanzen.

- A. Blattfarbe und Form des transformierten Pflanzen gleichen denen der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen (Abb. 3.1.25). Der Balken entspricht 6 cm.
- B. RFLP-Analyse der transplastomischen und Wildtyp-DNA. Die obere Bande mit 5,9 kb indiziert den Wildtyp, die Bande bei 1,2 kb das Transplastom. In den KO-Pflanzen ist nur eine Bande bei 1,2 kb zu sehen.

Die mit pTF17 transformierten  $\Delta rpl33$ -Pflanzen gleichen, wie auch die Kombination *rps15-rpl36*, dem Äußeren nach  $\Delta rpl36$ -Pflanzen (vgl. Abb. 3.1.30 und Abb. 3.1.25). Es gelang bei dieser KO-Kombination mit höherer Frequenz als bei der Kombination *rps15-rpl33* transplastomische Pflanzen zu regenerieren.

### 3.1.2.3 Knockout von *rps15* auf der Basis von $\Delta rpl33$

Der gleichzeitige Knockout der Proteine L33 und S15 wurde erreicht, indem  $\Delta rpl33$ -Pflanzen mit dem Plasmid pTF16 transformiert wurden. *rps15* wurde in diesem Vektor durch die Insertion einer kompletten *aphA-6*-Kassette zerstört (Abb. 3.1.32).

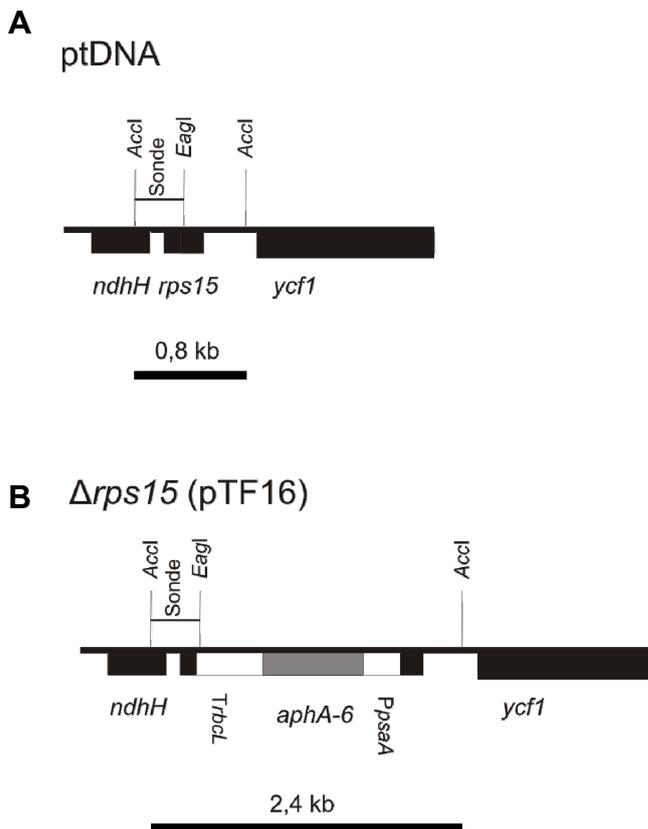


Abb. 3.1.32: Physische Karten der Wildtyp-ptDNA und der transformierten ptDNA von  $\Delta rps15$  (pTF16).

- A. Physische Karte der *rps15*-beinhaltenden Region des Wildtyp-Plastoms von Tabak. Die schwarzen Rechtecke, bzw. das graue Rechteck im Falle von *aphA-6*, repräsentieren Gene. Gene, die sich oberhalb der dünnen Linie befinden, werden von links nach rechts transkribiert, Gene darunter, von rechts nach links. Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur RFLP-Analyse und der Herstellung der Sonde benutzt wurden, sind ebenfalls mit dem Namen des Enzyms vermerkt.
- B. Physische Karte derselben Region des Plastidengenoms nach der Transformation mit dem Vektor pTF16. Beschriftung wie zuvor.

Per RFLP konnte nachgewiesen werden, dass die selektierten Pflanzen homoplasmatisch sind (Abb. 3.1.33.B). Die Pflanzen sind hellgrün und besitzen gleichmäßig geformte Blätter (Abb. 3.1.33.A).

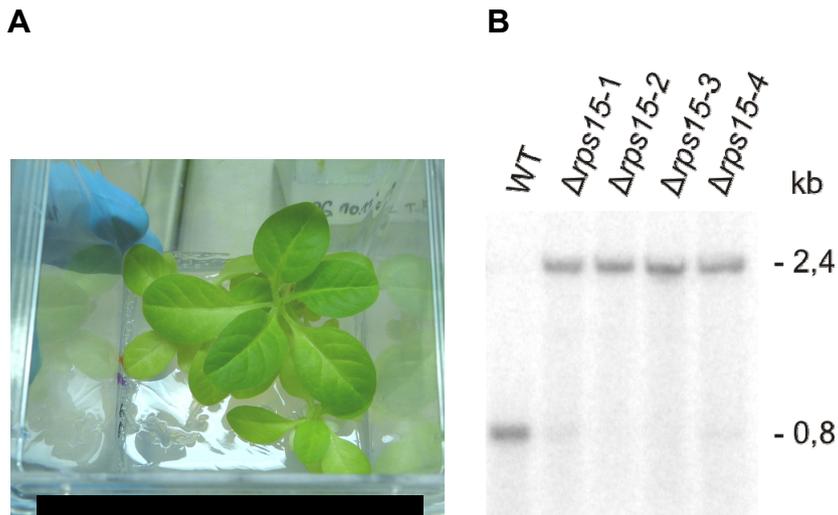


Abb. 3.1.33: Phänotyp und RFLP-Analyse der  $\Delta rps15$ - $\Delta rpl33$ -Doppelknockout-Pflanzen.

- A. Phänotyp der Mutanten. Hellgrüne, gleichförmige Blätter bestimmten das Aussehen der Transformanten. Der Balken entspricht 6 cm.
- B. RFLP-Analyse. Die 2,4 kb-Bande bestätigt die korrekte Insertion der *aphA-6*-Kassette, die 0,8 kb-Bande stammt von Wildtyp-Plastomen. Der Genotyp der untersuchten Pflanzen weist im Fall von  $\Delta rps15-2$  und  $\Delta rps15-3$  auf homoplasmatische Individuen hin. Die schwachen Wildtyp-spezifischen Banden bei  $\Delta rps15-1$  und  $\Delta rps15-4$  indizieren noch nicht homoplasmatisches Gewebe in diesen Individuen.

Die Untersuchungen zu den drei Doppel-Knockout-Kombinationen sind noch nicht abgeschlossen und der Selektionsprozess ist zum Teil gerade erst abgeschlossen. Dennoch lässt sich der Schluss ziehen, dass alle drei Kombinationen ( $\Delta rps15$ - $\Delta rpl36$ ,  $\Delta rps15$ - $\Delta rpl33$  und  $\Delta rpl33$ - $\Delta rpl36$ ) die Herstellung lebensfähiger Pflanzen ermöglichen. Die Phänotypen reichen von hellgrünen bis zu weißen Pflanzen.

## 3.2 Detektion und Charakterisierung von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*

### 3.2.1 Identifikation von miRNA-Kandidaten zur genaueren Analyse

Die zum Punkt 3.2.1 gehörigen Abschnitte 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.3 basieren auf Analysen, die von Dr. Patrick May (MPI-MP) durchgeführt wurden und noch nicht publiziert sind. Sie förderten sehr interessante Fakten zu Tage, die nicht ausgespart bleiben sollen und wiederum dem Verständnis des Gesamtprojektes dienlich sind.

Viele miRNAs werden unter anderem unter Stress oder während entwicklungsbiologisch wichtiger Veränderungen sowohl in Tieren als auch in Pflanzen induziert (Punkt 1.2.1). Ziel des Projektes war es, ein möglichst großes Spektrum von miRNAs nachzuweisen, im besten Falle alle in *Chlamydomonas reinhardtii* vorkommenden miRNAs. Dazu war es notwendig Kulturen der Algen unter so vielen unterschiedlichen Bedingungen wie möglich anzulegen, in der Annahme, in jeder Kulturbedingung würde ein spezifisches Spektrum an miRNAs exprimiert. Aus unter 28 verschiedenen Bedingungen (mt+-Gameten, mt- Gameten, CC1690-Stamm Gameten, mixotroph log. Phase, mixotroph Stationäre Phase, heterotroph, phototroph, Fe-Mangel, Co-Mangel, K-Mangel, Cu-Mangel, Mo-Mangel, Zn-Mangel, B-Mangel, P-Mangel, S-Mangel, Kältestress, Hitzestress, osmotischer Stress, oxidativer Stress, Cd-Stress, Cu-Stress, Gameten-Stämme vegetative log. Phase, Gameten-Stämme, vegetative stationäre Phase, Wechsel der N-Quelle:  $\text{NH}_3 \rightarrow \text{KNO}_3$  und  $\text{KNO}_3 \rightarrow \text{NH}_3$ ) angezogenen Algenkulturen wurden kleine RNAs (<50 nt) isoliert und in zwei separaten Ansätzen vereinigt (um die Anzahl an Sequenzierungsläufen niedrig zu halten). Eine der beiden RNA-Bibliothek, mit der Bezeichnung A4, enthielt RNA aller entwicklungsbiologisch relevanten Bedingungen, die andere RNA-Bibliothek, CC, enthielt RNA aus den restlichen Bedingungen. Die beiden Ansätze wurden nach entsprechender vorbereitender Prozessierung per NGS (Illumina/Solexa) von GATC-Biotech, Konstanz, sequenziert. Die Ausgabe dieser Methode sind kurze Nukleotidsequenzen, die als Reads bezeichnet werden. Die bis zu diesem Punkt notwendigen Laborarbeiten wurden von Dr. Christin Albus durchgeführt. Ich habe das Projekt im Anschluss an das NGS und die bioinformatische Auswertung der Rohdaten übernommen und die Hochdurchsatz-Analyse-Plattform entwickelt.

### 3.2.1.1 Gesamtzahl der Reads und Anzahl diskontinuierlicher Reads

Insgesamt ergaben sich aus den beiden Sequenzierläufen ~90 Millionen Reads. Diese setzen sich vor allem aus Degradationsprodukten der zellulären RNA-Spezies zusammen und nur zu einem geringen Teil aus echten miRNA-Sequenzen. Damit die tatsächlichen miRNA-Sequenzen identifiziert werden konnten, mussten offensichtliche Kontaminanten wie rRNA- und tRNA-Sequenzen aus dem Datensatz entfernt werden. Ebenso wurden Sequenzen nicht weiter analysiert, die außerhalb des für miRNAs zu erwartenden Größenspektrums (~16-25 nt) lagen.

Der Schlüsselschritt zur Identifikation putativer miRNAs liegt in der Anwendung des folgenden Prinzips: Eine Sequenz des Datensatzes, die alle obig genannten Ausschlusskriterien nicht erfüllt, wird auf Komplementarität zu genomischen Sequenzen von *Chlamydomonas* untersucht. Stimmt die Sequenz zu 100 % überein, werden die angrenzenden 100 Nukleotide beiderseits dieses Locus, desselben Stranges, (bioinformatisch) extrahiert. Diese Sequenz von nun 216-225 nt wird auf die Fähigkeit untersucht, die für miRNA-Vorläufer typische Stem-Loop-Konformation einnehmen zu können (Punkt 1.2.2). Ist die Möglichkeit der Faltung dieser Sequenz in diese spezielle Sekundärstruktur gegeben, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um den kodierenden Locus der miRNA. Nach Anwendung dieses Suchalgorithmus gelang es 3710 putative miRNA-Vorläufer-Moleküle zu identifizieren.

### 3.2.1.2 Konsistenz der NGS-Daten mit publizierten Daten

Zum Zeitpunkt der Analyse waren 84 miRNA-Sequenzen über die mirbase.org-Datenbank des Sanger-Institutes zugänglich, die aus den Datensätzen von Molnar und Zhao stammen (Molnar *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Um die Qualität unseres Datensatzes zu überprüfen wurde verglichen, ob die publizierten Sequenzen auch in diesem Datensatz zu finden sind. Von jenen 84 Sequenzen konnten in unserem Datensatz 78 miRNAs mit 100 % Identität gefunden werden. Mit weniger stringenten Kriterien (90 % Identität) konnten 82 Sequenzen bestätigt werden. Generell spricht diese hohe Abdeckung der publizierten miRNAs für eine hohe Qualität des Datensatzes. Die Abweichungen lassen sich durch Sequenzierartefakte und die genetische Diversität der verwendeten Stämme erklären, die durchaus auch SNPs in miRNAs beinhalten kann.

### 3.2.1.3 miRNA-Vorläufer-Vorhersagen

Nach der bioinformatischen Auswertung der Sequenzinformationen lagen 3710 putative miRNA-Vorläufer-Moleküle vor. Der unter 3.2.1.1. beschriebene Algorithmus konnte in vielen Fällen während der Analyse im Hinblick auf die extrahierte Länge der angrenzenden

Sequenzen verändert werden. In einigen Fällen war es möglich diese Länge auf 300-400 nt beiderseits der miRNA-Sequenz auszudehnen. Damit sticht *Chlamydomonas reinhardtii* unter allen (miRNA-kodierenden) Organismen hervor. Die hier gefundenen miRNA-Vorläufer sind die längsten Vorläufer-Moleküle, die bisher bekannt sind (mirbase.org). Der Median der Vorläuferlänge liegt bei 185 Nukleotiden, der Durchschnitt bei 250 nt, im Kontrast zum Median von 125 nt und einem Durchschnitt von 144 nt bei höheren Pflanzen (alle Arten mit miRNAs) (Abb. 3.2.2). Das längste jemals vorhergesagte Einzelmolekül ist mit 932 nt ebenfalls im *Chlamydomonas*-Datensatz zu finden.

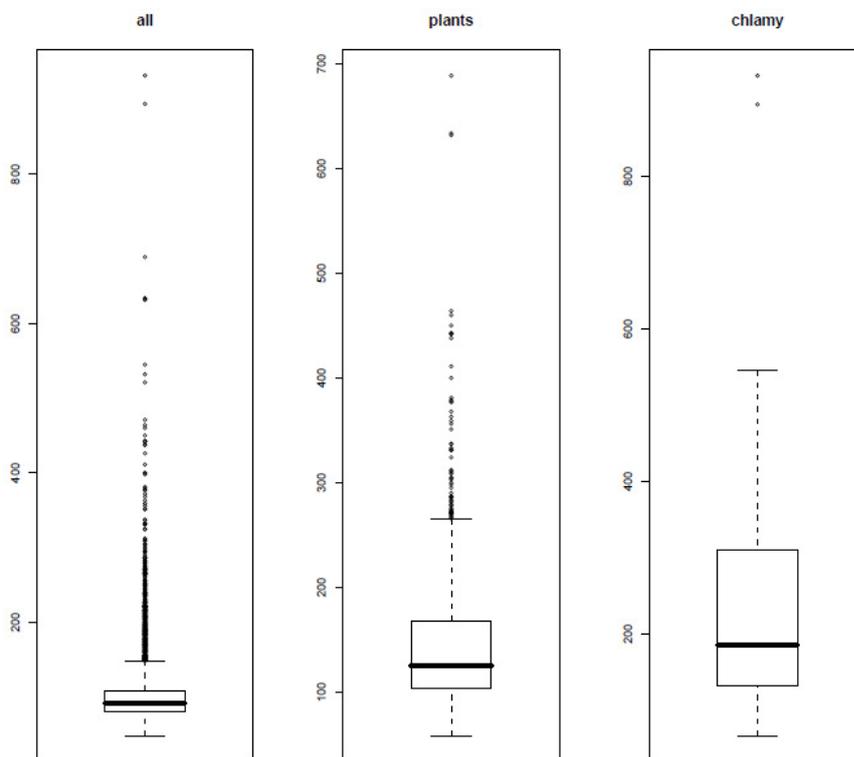


Abb. 3.2.2: Boxplots der Längen von miRNA-Vorläufern. Links: alle Vorläufer aller Spezies, Mitte: Vorläufer aus Pflanzen, rechts: Vorläufer aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Des Formats wegen sind unterschiedliche Achsenmaßstäbe gewählt (Abb. von May, unpublizierte Daten).

Grafische Beispiele für vorhergesagte Vorläufer sind in Abb. 3.2.3 abgebildet. Sie geben einen Eindruck von der Gesamtstruktur der miRNA-Vorläufermoleküle, die durch lange und nahezu durchgehend komplementäre Stammbereiche und zuweilen stark verzweigte Schleifenbereiche gekennzeichnet sind.

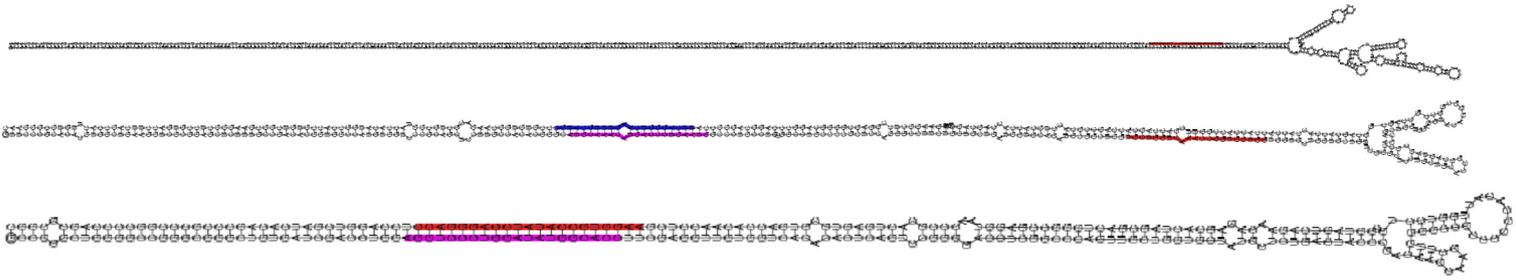


Abb. 3.2.3: Beispiele für lange miRNA-Vorläufer. Im untersten Vorläufer sind die reife miRNA und ihr korrespondierender Star-Strand rot und violett markiert, im mittleren Vorläufer sind miRNA und Star-Strand blau und violett gekennzeichnet. Im mittleren sowie im obersten Vorläufer sind in roter Farbe miRNA-Sequenzen markiert, bei denen kein Star-Strand nachgewiesen werden konnte (Abb. von P. May, unpublizierte Daten).

### 3.2.2 Analyse einzelner Bedingungen

Da die cDNA-Bibliotheken aus vereinigten RNA-Isolationen verschiedener Bedingungen stammten (nach der RNA-Isolation und vor der cDNA-Synthese wurden die Proben vereinigt), war es nicht möglich, ausgehend von den Ergebnissen der Sequenzierung und der bioinformatischen Analyse, quantitative oder qualitative Aussagen über das Vorkommen einer bestimmten miRNA in einer bestimmtem Wachstumsbedingung zu treffen. Es galt fortan eine Methode zu entwickeln, die genau dieses ermöglicht. In Frage kommende Technologieplattformen sind NGS, Microarrays und qRT-PCR. Aus Gründen der aufwändigen bioinformatischen Analyse und der langwierigen Herstellung von miRNA-cDNA-Libraries wurde NGS ausgeschlossen. Der erste Versuch, die Expressionsniveaus der Kandidaten-miRNAs zu messen, wurde mit Microarrays gestartet (bei febit biotech GmbH). Hierbei traten erhebliche technische Probleme auf, sodass diese Methode ebenfalls ausgeschlossen werden musste. So war es febit biotech nicht möglich, mit ein und derselben RNA-Sonde, reproduzierbare Hybridisierungen zu tätigen (Daten nicht gezeigt). Durch eine zu späte Information über die bestehenden Probleme wurde ca. ein halbes Jahr Laborarbeit verschwendet.

Die verbleibende realisierbare Option war die Entwicklung einer qRT-PCR-Plattform. Um die technische Machbarkeit und Reproduzierbarkeit der Methode zu testen, wurde die Anzahl der Kandidaten-miRNAs vorläufig stark reduziert, auf die 192 miRNAs, die am abundantesten in den Sequenzierungsdatensätzen vorlagen.

### 3.2.2.1 Etablierung der Stem-Loop-qRT-PCR

qRT-PCR bietet den Vorteil einer jederzeit möglichen Erweiterung der Plattform um weitere miRNA-Sequenzen und eine hohe Flexibilität, da alle Arbeitsschritte ohne Involvierung dritter durchgeführt werden können. Da standardmäßige qRT-PCR-Systeme mit Amplikongrößen um 70–100 nt arbeiten, miRNAs aber Längen um 21 nt aufweisen, musste ein spezieller qRT-PCR-Typ, die Stem-Loop-qRT-PCR verwendet werden, um diese damit messen zu können (Chen *et al.*, 2005; Carroll *et al.*, 2006; Mestdagh *et al.*, 2008). Bei dieser Methode werden miRNA-Sequenzen über einen Zwischenschritt auf übliche Amplikongrößen verlängert und somit messbar gemacht (Punkt 2.3.6). Mit dieser Methode wurde die relative Abundanz von 192 verschiedenen miRNAs in *Chlamydomonas*-Zellen untersucht, die unter 23 verschiedenen Bedingungen kultiviert worden waren. Zur Analyse der Daten wurde das Programm Quantpipe von Dr. Samuel Arvidsson (MPI-MP) verwendet (Arvidsson, unpubl.).

### 3.2.2.2 Ergebnisse der Stem-Loop-qRT-PCR

#### 3.2.2.2.1 Qualitätsmerkmale der qRT-PCR

Die einzelnen PCR-Reaktionen müssen mehrere Qualitätsprüfungen überstehen, um nicht von der Auswertung ausgeschlossen zu werden. Dazu gehört bspw. die Schmelzkurve des amplifizierten Amplikons. Liegt nur ein PCR-Produkt vor, sollte nur ein Peak sichtbar sein, liegen zwei oder mehr Peaks vor, wurden weitere Sequenzen mitvervielfältigt. Oft handelt es sich dabei um Primerdimere oder unspezifisch amplifizierte DNA-Sequenzen. Bei Betrachtung der Schmelzkurven der miRNA-Plattform fällt der teilweise sehr hohe Hintergrund auf (Abb. 3.2.4). Messungen anderer Arbeitsgruppen am Institut, die die gleiche Stem-Loop-qPCR-Technik an anderen Organismen und miRNAs benutzten, wiesen die gleichen hohen Hintergrundfluoreszenzen auf (M. Devers, persönl. Komm., MPI-MP). Generell mussten aufgrund der bestehenden Fakten, die Schmelzkurven-betreffenden Qualitätskriterien aufgeweicht werden, da dies sonst zum Ausschluss zu vieler Messungen geführt hätte. Praktisch bedeutet dies, dass die vielen bei niedrigeren Temperaturen auftretenden kleineren Nebenpeaks ignoriert werden (die normalerweise zum Ausschluss des Messwertes führen). Generell scheint das Problem von Resten der Stem-Loop-Primer (SLPs) herzurühren, die bei niedrigeren Temperaturen in ihre Stem-Loop-Konformation übergehen und so zusätzliche Fluoreszenzsignale erzeugen können.

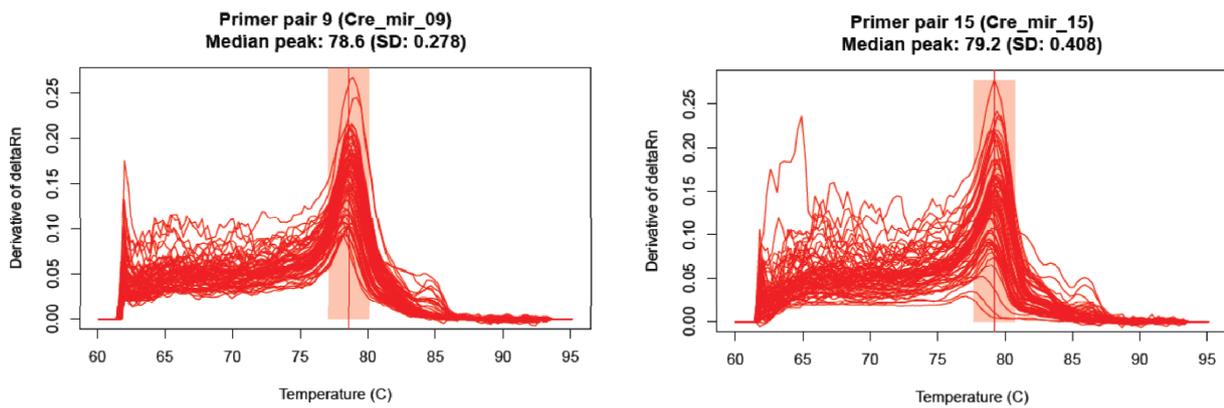


Abb. 3.2.4: Schmelzkurvenanalyse von zwei ausgewählten untersuchten miRNAs. Jede einzelne PCR-Reaktion ist durch eine rote Linie repräsentiert. Neben dem Hauptpeak treten viele kleinere Signale auf, deren genaue Herkunft nicht geklärt werden konnte.

Auffallend ist die hohe Reproduzierbarkeit der Messwerte der verwendeten biologischen Replikate, denn von einigen Ausreißern abgesehen, ergaben sich nur moderate Standardabweichungen (vgl. kompletter Datensatz in 10.2). Jede miRNA wurde anhand von zwei biologischen Replikaten gemessen, die ihrerseits aus je zwei technischen Replikaten bestanden. Die biologischen Replikate aller 23 Bedingungen, von vier abgesehen, deren Messungen aufgrund schlechter Qualität wiederholt werden müssen, korrelieren sehr stark miteinander und kommen qualitativ technischen Replikaten sehr nahe (Abb. 3.2.5).

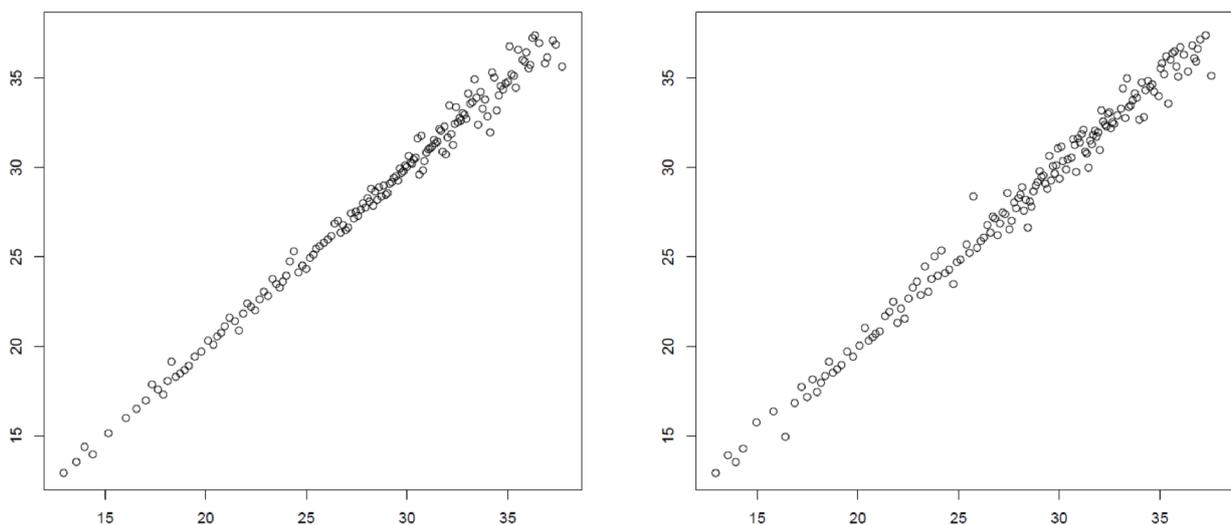


Abb. 3.2.5: Qualität der biologischen Replikate. Es sind auf beiden Abbildungen jeweils die Ct-Werte der zwei untersuchten biologischen Replikate gegeneinander aufgetragen (dazu wurde der Mittelwert der technischen Replikate verwendet). Replikum 1 auf der X-Achse, Replikum 2 auf der Y-Achse. Links: Untersuchte Bedingung: Schwermetallstress mit 200 mM Cu. Rechts: Untersuchte Bedingung: Wechsel der N-Quelle von Ammonium zu Nitrat.

Von den ungewöhnlichen zusätzlichen Schmelzkurvenpeaks abgesehen, entsprachen alle Messungen den üblichen qPCR-Standards.

#### 3.2.2.2 Messergebnisse der qRT-PCR

In ~17500 Einzelmessungen konnten erfolgreich spezifische miRNAs gemessen werden. Probesequenzierungen anhand von zehn ausgewählten Reaktionen zum Nachweis verschiedener miRNAs bestätigten die spezifische Amplifikation der erwünschten miRNAs (Daten nicht gezeigt).

Die Messungen erfolgten semiquantitativ, so dass ein relativer Vergleich zwischen verschiedenen Bedingungen auf eine miRNA bezogen möglich sind, jedoch können keine Aussagen über die absolute Menge getroffen werden. Alle gestesteten Haushaltsgene (acht verschiedene; Daten nicht gezeigt) wiesen in den verschiedenen Bedingungen zu hohe Varianzen auf, so dass die Expression der miRNAs nicht auf Haushaltsgene normalisiert werden konnte. Mit ~17500 Einzelmessungen ist der Datensatz aber ausreichend groß, um ihn mit der für große Datensätze geeigneten Quantilnormalisierungsmethode (Mar *et al.*, 2009) normalisieren zu können. Die Expressionsstärken sind insgesamt weit gestreut: es konnten sowohl sehr hoch abundante miRNAs nachgewiesen werden, als auch nur äußerst gering exprimierte (Abb. 3.2.6).

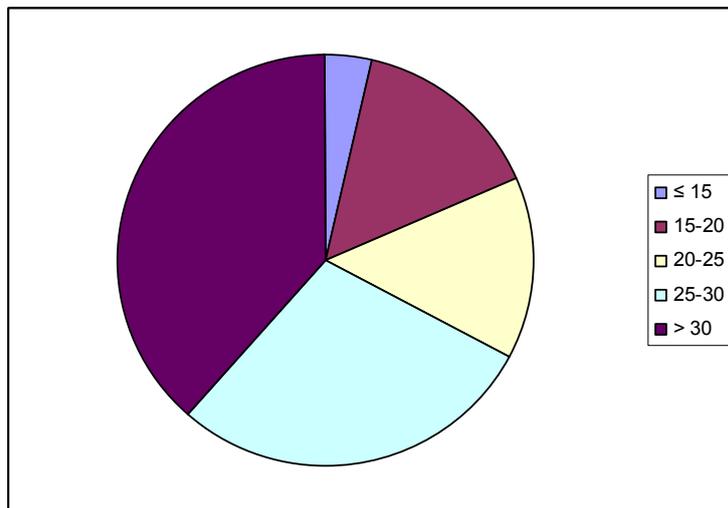


Abb. 3.2.6: Verteilung der im Durchschnitt erreichten Ct-Werte. Die am stärksten exprimierten miRNAs wiesen Ct-Werte von 15 oder weniger auf. Diese machten 3,6 % aller untersuchten miRNAs aus. Hohe Ct-Werte von mehr als 30 besaßen 38,6 % der miRNAs.

Grundsätzlich ist zu beobachten, dass, je höher die Expressionsstärke liegt, um so eindeutiger der Schmelzkurvenpeak wird und die Hintergrundpeaks verschwinden. Der hohe Hintergrund betrifft damit vor allem die niedrig abundanten miRNAs (Ct-Werte > 30). Dies bedeutet, dass erst ab dem 30. Zyklus der PCR der Schwellenwert vom Fluoreszenzsignal des Amplifikationsproduktes erreicht, bzw. gerade überschritten wird. Auch ist in diesem Bereich

viel häufiger der Ausschluss eines Wertes aufgrund von nicht bestandener Qualitätsprüfungen zu verzeichnen sowie deutlich höhere Standardabweichungen als bei stärker exprimierten Transkripten. Generell befinden sich die Standardabweichungen in einem tolerablen Rahmen, der üblicherweise unter einer Ct-Wert-Einheit bleibt, wie an dem in Abb. 3.2.7 gezeigten Beispiel ersichtlich wird.

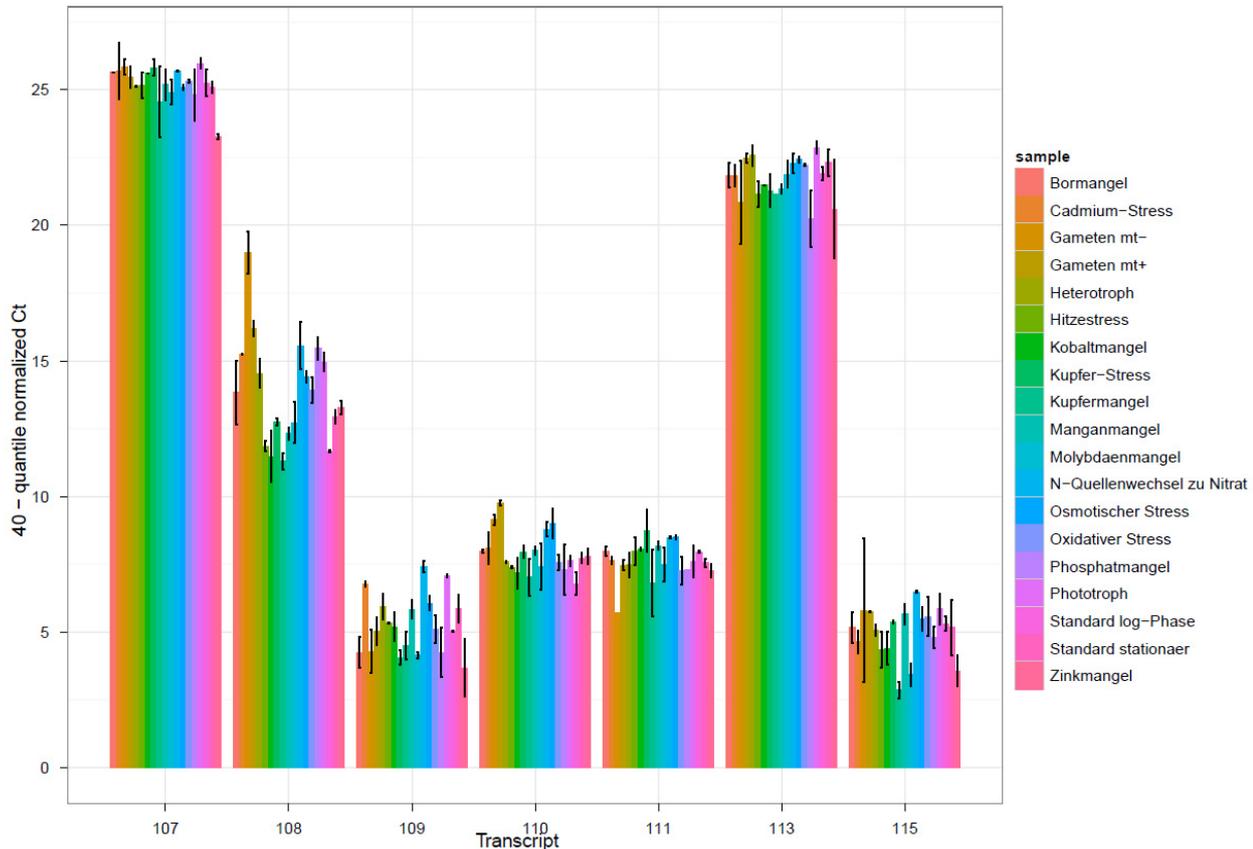


Abb. 3.2.7: Grafische Darstellung der Expressionswerte von sieben verschiedenen miRNAs.

Auf der X-Achse sind die miRNAs 107, 108, 109, 110, 111, 113 und 115 dargestellt. Die Einheit der Y-Achse ist aus dem Ct-Wert abgeleitet (40 minus Ct-Wert) und somit binärlogarithmisch. Eine Veränderung um eine Skaleneinheit entspricht einer Verdopplung/Halbierung des Expressionswertes. Stark exprimierte miRNAs, wie Nummer 107 und 113 besitzen in dieser Darstellungsweise die höchsten Werte. Gering exprimierte, die geringsten Werte (Nummer 109 und 115). (Bedingungen: Cd-Stress: Cadmiumstress, Cu-Stress: Kupferstress, dB: Borentzug, dCo: Kobaltentzug, dCu: Kupferentzug, dMn: Manganentzug, dMo: Molybdänentzug, dP: Phosphorentzug, dZn: Zinkentzug, osmotischer Stress: Sorbitstress, oxidativer Stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress, Kältestress: 4°C, Hitzestress: 42°C, Phototroph: keine C-Quelle im Medium, Standard log-Phase: Referenz 1, Stamm CC1690 in Standard-TAP-Medium in log. Phase, Standard stationär: Referenz 2, Stamm CC1690 in Standard-TAP-Medium in stationärer Phase, N-Quellenwechsel zu Nitrat, Gameten mt-, Gameten mt+: selbsterklärend)

Es treten sowohl stark differenziell exprimierte (58 von 192) (Abb. 3.2.8.), als auch konstant bleibende miRNAs (6 von 192) auf (Abb.3.2.8). Die restlichen miRNAs (128 von

192) weisen mittelstarke differenzielle Expressionen auf bzw. sind nach der Qualitätsprüfung ausgeschlossen worden. Sämtliche Expressionsdaten befinden sich im Anhang unter 10.2.

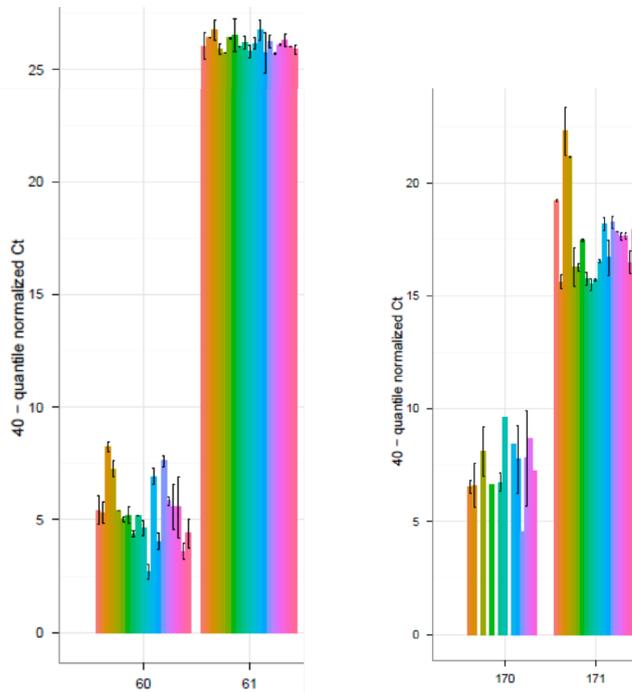


Abb. 3.2.8: Konstant bleibende und veränderliche miRNAs. Links: Die stark exprimierte miRNA Nummer 61 ist in allen Bedingungen mit nahezu gleichbleibender Stärke exprimiert. Die schwach exprimierte miRNA Nummer 60 muss aufgrund verfehlter Qualitätsprüfungskriterien außen vor bleiben. Rechts: miRNA Nummer 171 wird differenziell reguliert. Die beiden höchsten Messwerte bei 21 und 22 gehören zu den beiden Gametentypen (mt+ und mt-), der dritthöchste Wert gehört zur Bedingung „Wechsel der N-Quelle von Ammonium zu Nitrat“. Die Expressionswerte in den anderen Bedingungen befinden sich zwischen 15 und 18. Dies bedeutet eine  $\sim 128x$  Differenz der Expressionsstärken zwischen der schwächsten

und der stärksten Expression. Die miRNA 170 hat die Qualitätskontrollen ebenfalls nicht bestanden.

Knapp 40 % aller bis zum jetzigen Zeitpunkt untersuchten miRNAs befinden sich auf einem sehr niedrigen Expressionsniveau und besitzen keine sauber trennbaren Schmelzkurven. Der Rest der Messungen besitzt grundsätzlich gute Qualitätsmerkmale und weist auf zum Teil interessante differenzielle Regulationen der Transkriptabundanz unter verschiedenen Bedingungen hin. Um aber eine Aussage über die regulative Kapazität einer bestimmten miRNA treffen zu können, muss zuerst deren Ziel-mRNA identifiziert werden und deren Regulation durch die miRNA in weiteren Experimenten validiert werden. Im Fall der Degradierung der mRNA durch die Slicer-Aktivität von AGO-Proteinen könnte nach spezifischen Degradierungsprodukten gesucht werden, im Fall einer translationellen Repression ohne Zerstörung der mRNA müsste die Menge des in der mRNA kodierten Proteins oder die Assoziation der mRNA mit aktiv translatierenden Ribosomen bestimmt werden.

### **3.2.3 Zielvorhersagen für einzelne miRNAs**

Vorläufige Vorhersagen (Daten nicht gezeigt) für von den miRNAs regulierte Transkripte weisen auf einige interessante Kandidaten hin, die es in Zukunft exakter zu analysieren gilt, wie bspw. die Transkripte Flagellen-assoziiierter Proteine (vgl. Diskussion unter 4.3).

## 4. Diskussion

### 4.1 Essentielle und nicht-essentielle ribosomale Proteine in Tabakplastiden

#### 4.1.1 Essentielle Konstituenten des Chloroplastenribosoms

Nicht alle Bestandteile des Ribosoms sind essentiell, wie man unter anderem von *E. coli* weiß (Baba *et al.*, 2006; Shoji *et al.*, 2011). Im Plastom vieler parasitischer Pflanzen fehlen die Gene einiger ribosomaler Proteine. Es galt die Frage zu beantworten, ob diese fehlenden Proteine generell für die Funktion des Ribosoms verzichtbar sind, oder in den Parasiten eher mit einem EGT der Gene zum Kern gerechnet werden muss. Die für die durchgeführten KO-Experimente ausgewählten Kandidaten wurden wie folgt bestimmt: (1) nicht-essentiell in *E. coli*, und/oder (2) abwesend vom Plastom parasitischer Spezies. Diese Gene ribosomaler Proteine wurden per biolistischer Transformation durch Antibiotika-Resistenzgene ersetzt. Fünf stellten sich als essentiell heraus, zwei als nicht-essentiell.

Der Knockout der Gene *rps3*, *rps16*, *rpl22*, *rpl23* und *rpl32* führte zu heteroplasmatischen Pflanzen. Es konnten für keines der Konstrukte homoplasmatische Individuen erzeugt werden. Die ausgeschalteten Gene, allesamt essentiell, besitzen Homologe in *E. coli*, die ebenfalls essentiell sind, was neben den in 1.1.2.2 aufgezeigten Eigenschaften ein weiterer Hinweis auf die Ähnlichkeit bakterieller und plastidärer Ribosomen ist.

L32 ist laut Baba *et al.* (2006) ein nicht-essentieller Bestandteil des Ribosoms von *E. coli*. Nachdem die Transformation mit beiden Knockout-Vektoren (Abb. 3.1.1.1.5) nicht zu den erwarteten Ergebnissen führte, wurde der entsprechende *E. coli*-Stamm der Keio-Kollektion (Baba *et al.*, 2006; CGSC, Yale) bestellt, um zu überprüfen, ob der Knockout von *rpmF* (- Homolog von *rpl32* in *E. coli* -) dort tatsächlich stattgefunden hat. Die Sequenzierung des bakteriellen *rpmF* Genlocus allerdings erbrachte den Nachweis, dass das Gen nicht ausgeknockt wurde. Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob L32 in Bakterien essentiell oder nicht-essentiell ist. Angesichts der sonstigen Konsistenz der in dieser Studie erbrachten Daten, erscheint es allerdings wahrscheinlicher, dass es sich bei L32 um ein auch für *E. coli* essentielles Protein handelt.

## 4.1.2. Nicht-essentielle Konstituenten des Chloroplastenribosoms

### 4.1.2.1 *rps15*:

Anders als bei den oben genannten Genen gelang es im Falle von *rps15* erfolgreich Knockout-Mutanten herzustellen. Die erzeugten  $\Delta rps15$ -Pflanzen blieben unter Standardwachstumsbedingungen optisch unauffällig und sind vom Wildtyp, von ihrem etwas langsameren Wachstum abgesehen, nicht zu unterscheiden. Dennoch weisen sie eine signifikante Reduktion von Photosynthesekomplexen und translatierenden Ribosomen auf (Abb. 3.1.13, 3.1.22, 3.1.21). Diese Effekte treten vor allem in sehr jungen, sich erst entwickelnden Blättern auf und sind unter Kältestress nochmals in deutlich stärkerer Ausprägung zu beobachten (Abb. 3.1.13 und 3.1.14). Bezogen auf die Merkmale junger Blätter der KO-Pflanzen decken sich diese Beobachtungen mit der Erwartung, denn der Bedarf der Translationskapazität ist in jungen Blättern am höchsten, da zu jenem Entwicklungsstand die gesamte Photosynthesemaschinerie *de novo* synthetisiert und assembliert wird (M. Hojka, Dissertation; M.A. Schöttler und M. Hojka, pers. Komm, (beide MPI-MP)). Der Phänotyp lässt darauf schließen, dass die über Ribosomen ohne S15 verfügbare Translationskapazität dem Bedarf der jungen Blätter nicht entspricht und nur eine geringere Dichte an Photosynthesekomplexen produziert werden kann. In ausgewachsenen Blättern Menge hingegen geringere Translationskapazitäten zur Aufrechterhaltung der Photosynthesefunktionen. So müssen im Wesentlichen nur noch beschädigte Komplexe repariert werden, indem einzelne Komplexproteine ersetzt werden, was weitaus weniger Translationskapazität einfordert, als die Neusynthese aller Komponenten des Komplexes (Betroffen ist vor allem PSII; die anderen Komplexe sind stabiler). Auch dies stimmt überein mit dem beobachteten unauffälligen optischen Phänotyp, als auch mit der Polysomenbelastung in älteren Blättern, die weniger stark vom Knockout betroffen sind als junge Blätter (Abb. 3.1.21). Der dramatische Phänotyp der Kälte-gestressten  $\Delta rps15$ -Pflanzen rührt von einer starken Reduktion der Translationskapazität her, die den Effekt der in jungen Blättern registrierten Reduktion bei Weitem übertrifft. Dies liegt u.a. daran, dass unter Kältestress wird neben den anderen PSII-Komplexproteinen vor allem das Photosyntheseprotein D1, welches auch unter Standardbedingungen konstantem photooxidativem Schaden ausgesetzt ist, noch schneller als üblich degradiert, weshalb dieses permanent durch neu synthetisierte Proteine ausgetauscht werden muss beansprucht (Asada und Takahashi, 1987; Asada, 2006; Schöttler *et al.*, 2011). Außerdem kommt es bei niedrigen Temperaturen auf der PSI-Akzeptorseite zur verstärkten Bildung von Hydroxylradikalen, die normalerweise im Mehler-Asada-Zyklus

entgiftet würden, der aber bei tiefen Temperaturen eine geringere Kapazität besitzt. Dies wirkt sich destabilisierend auf das gesamte PSI aus, welches folglich ebenfalls eine hohe Rate an zu synthetisierenden Proteinen für sich beansprucht (Asada und Takahashi, 1987; Asada, 2006; Schöttler *et al.*, 2011).

Welche Erklärungen können Anhaltspunkte über die aufgetretenen Phänomene liefern? Die Nachteile im Wachstum und in der Kältetoleranz, die die  $\Delta rps15$ -Pflanzen gegenüber dem Wildtyp haben, lassen sich auf zwei grundlegende Erklärungsmöglichkeiten reduzieren. Entweder sind die Probleme auf eine reduzierte Translations(initiations)effizienz des assemblierten Ribosoms zurückzuführen, und/oder sie rühren von grundlegenden Fehlern während der Ribosomenassemblierung her, die zu einer geringeren Abundanz von (funktionellen) Ribosomen führen. Diese Betrachtungsweise lässt drei mögliche Phänomene hervortreten, die dazu im Stande sind, die Translationskapazität zu beeinträchtigen. Dies sind:

- (1) Reduzierte Abundanz an funktionellen Ribosomen
- (2) Reduzierte Funktionalität der assemblierten 30S-Untereinheit
- (3) Reduzierte Stabilität des 70S-Komplexes

Diese Erklärungsmöglichkeiten werden im Folgenden erläutert.

#### 4.1.2.1.1 Reduzierte Abundanz funktioneller Ribosomen

S15 spielt eine wichtige Rolle während der Assemblierung der 30S-Untereinheiten (Talkington *et al.*, 2005; Kaczanowska und Rydén-Aulin, 2007; Woodson, 2008; Connolly und Culver, 2009; Sykes *et al.*, 2010). Der Nomura-Assemblierungs-Karte (Mizushima und Nomura, 1970) für *E. coli*-Ribosomen zufolge ist S15 eines der ersten Proteine, welches ko-transkriptionell an die 16S rRNA bindet (Abb. 4.1.1). Von seiner Bindung werden unmittelbar die ribosomalen Proteine S6 und S18 beeinflusst, die als Dimer auftreten, mittelbar auch die Proteine S11 und S21 (Abb. 4.1.1).

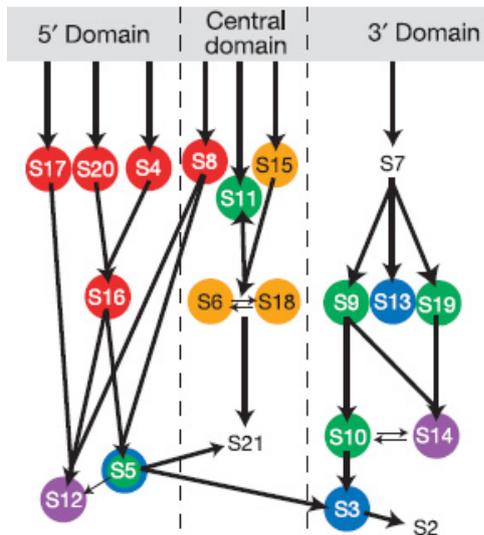


Abb. 4.1.1: Die Nomura-Assemblierungskarte zeigt die Bindungshierarchien und Abhängigkeiten der ribosomalen Proteine. Die Pfeile symbolisieren die Bindungsabhängigkeiten. Farblich sind dabei die durchschnittlichen Bindeggeschwindigkeiten während des *in vitro*-Assemblierungsprozesses dargestellt. Rot: sehr schnelle Bindung, Orange: schnelle Bindung, Grün: mittlere Bindeggeschwindigkeit, Blau: langsame Bindung, Violett: sehr langsame Bindung. Nicht farbig markiert: Keine Daten vorliegend (Talkington *et al.*, 2005; Mizushima und Nomura, 1970; Sykes und Williamson, 2009) (Abb. aus Talkington *et al.*, 2005).

Meist bewirkt die Bindung eines ribosomalen Proteins eine Konformationsänderung in der Struktur der rRNA, die daraufhin die Bindung weiterer Proteine und in Folge dessen weitere Konformationsänderungen zulässt (vgl. 1.1.2.3). Zum Beispiel ist von S4 und S7 bekannt, dass sie einen starken Einfluss auf die Sekundärstruktur der 16S rRNA ausüben, S20 und S17 hingegen aber zu kaum detektierbaren Veränderungen der Struktur führen (Sykes und Williamson, 2009). Dies liegt daran, dass die 5'-Domäne der 16S rRNA selbständig dazu fähig ist, ohne die Hilfe ribosomaler Proteine ihre finale Form einzunehmen und S17 und S20 bei diesem Vorgang nur unterstützend wirken. S8 als auch S15 sind zwischen diesen beiden Extremen anzusiedeln. Sie üben einen mittelstarken Einfluss auf die Konformation der rRNA, vor allem auf ihre zentrale Domäne aus (Sykes und Williamson, 2009). Gleichzeitig ist S15 auch eines der abundantesten ribosomalen Proteine während der frühen Assemblierungsphasen des Ribosoms (Abb. 4.1.2) (Talkington *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2010). Die finale Position von S15 befindet sich auf der den funktionellen Zentren abgewandten Seite, an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten (Abb. 4.1.2).

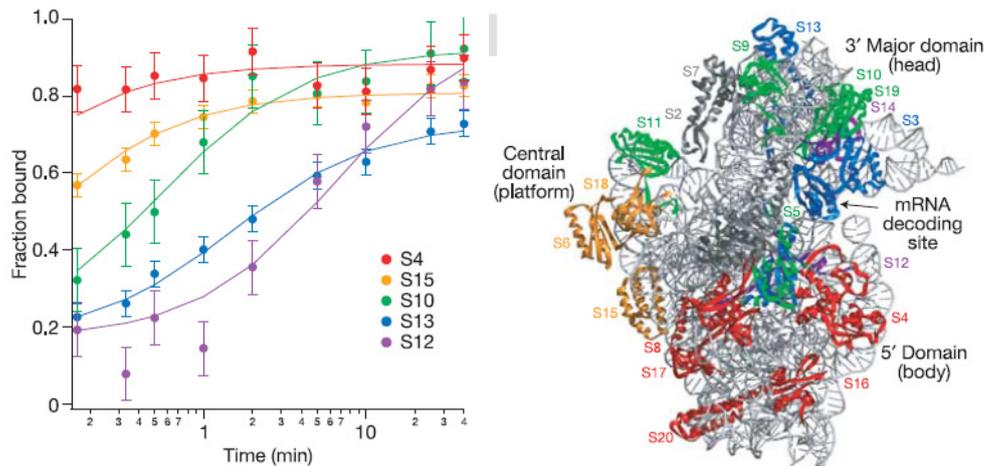
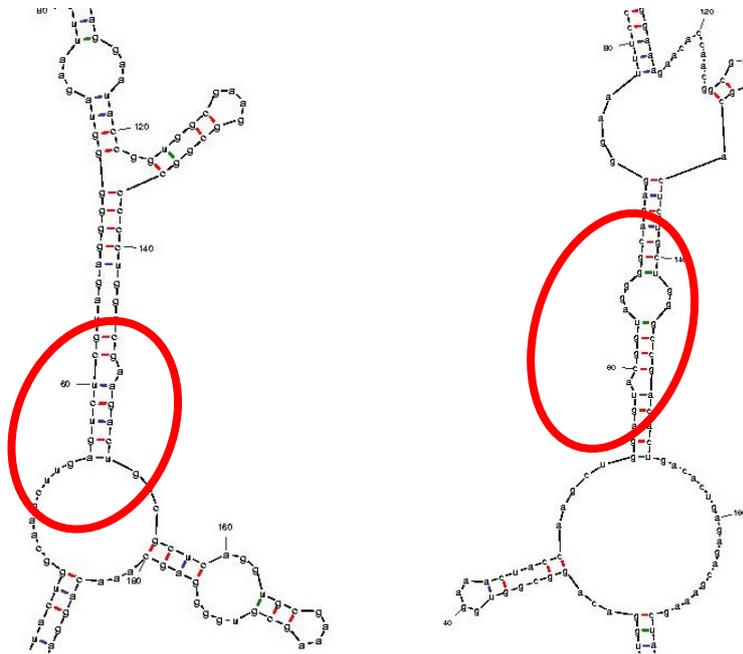
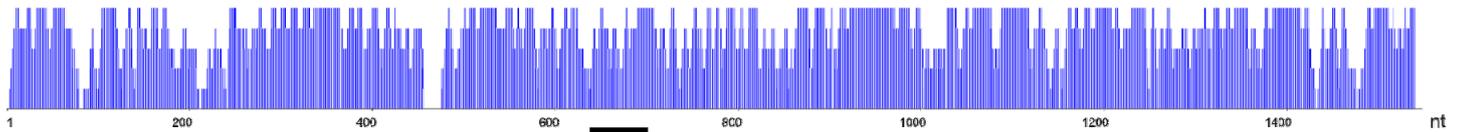


Abb. 4.1.2: Bindevverhalten und Lokalisation der Proteine der SSU. Linkes Bild: Diagramm der gebundenen Proteinfraktion über die Zeit. Exemplarisch sind für jede der fünf Gruppierungen (Abb. 4.1.1) einzelne Proteine, u.a. S15, herausgegriffen, um deren Anreicherung im Ribosom im Verlauf seiner Assemblierung zu visualisieren. Rechtes Bild: Die Positionen der Proteine der kleinen Untereinheit, markiert in der final assemblierten kleinen Untereinheit in der Draufsicht. S15 ist am linken Rand zu erkennen. Die nicht dargestellte große Untereinheit befände sich unter der abgebildeten Untereinheit (Talkington *et al.*, 2005; Mizushima und Nomura, 1970; Sykes and Williamson, 2009) (Abb. aus Talkington *et al.*, 2005).

Es ist davon auszugehen, dass S15 in Tabak die gleiche oder zumindest eine seinem bakteriellen Homolog in *E. coli* sehr ähnliche Funktion erfüllt. Diese Annahme wird unter anderem dadurch begründet, dass sehr viele Charakteristika von bakteriellen und plastidären Ribosomen geteilt werden, wie Tabelle 1.1.2 der Einleitung zu entnehmen ist. Ebenso liegt die Übereinstimmung, die Essentialität der ribosomalen Proteine betreffend, zwischen *E. coli* und Tabakplastiden bisher bei 100 % (alle untersuchten Proteine betrachtend). Darüber hinaus ist die Sequenz der 16S rRNA zwischen Bakterien (*E. coli*) und Tabakplastiden zu ca. 75 % konserviert. Die Nukleotide, welche von S15 gebunden werden, sind sogar zu über 80 % identisch (Svensson *et al.*, 1988). Dies führt in beiden Organismen zur Ausbildung sehr ähnlicher Sekundärstrukturen, was diese These weiter untermauert (Abb. 4.1.3).



*E. coli*

Tabak, Chloroplast

Abb. 4.1.3: Vergleich der 16S-Sequenzen von *E. coli* und Chloroplasten.

Oberer Bildteil: Vergleich der gesamten rRNA-Sequenz zwischen *E. coli* und Tabak-Plastiden. Die blauen Flächen stellen den Grad der Übereinstimmung zwischen beiden Sequenzen dar (Vector NTI 10.3.0, Invitrogen). Auf der X-Achse ist die 16S-Sequenz in Nukleotiden aufgetragen, auf der Y-Achse der Grad der Übereinstimmung, der mehrfach das Maximum von 100 % erreicht. Schwarzer Balken: siehe unten.

Unterer Bildteil: Links: Ausschnitt der Sekundärstruktur der 16S rRNA von *E. coli*. Rechts: Ausschnitt der Sekundärstruktur der 16S rRNA von Plastiden aus *Nicotiana tabacum*. Im roten Kreis befindet sich jeweils der für die Bindung von S15 relevante Bereich (M-Fold Webserver; Svensson *et al.*, 1988). Dieser Bereich ist im oberen Bildteil als schwarzer Balken markiert.

Die Primärstruktur von S15 selbst ist zwischen beiden Spezies zwar nur zu 44 % identisch, die Sekundär- und Tertiärstrukturen allerdings, die generell weitaus bessere Indikatoren der Funktionalität eines Proteins sind, weisen eine große Ähnlichkeit u.a. in der Organisation der vier (drei)  $\alpha$ -Helices auf (Abb. 4.1.4).



und damit verbundener zu langsamer Prozessierung. Einzig eine Anreicherung an 17S-Vorläufern wird erreicht, jedoch werden nicht-inkorporierte 16S rRNAs rasch degradiert (Abb. 3.1.18.B) (Walter *et al.*, 2010). Diese Anreicherung an 17S-Vorläufern wurde auch in der korrespondierenden *E. coli*-Knockoutmutante festgestellt (Bubunenko *et al.*, 2006). Da sämtliche plastidäre rRNAs im gleichen Operon kodiert sind, führt der kompensatorische Versuch der „Überexpression“ des rDNA-Operons auch zu einer Überakkumulation von rRNAs der LSU und in Folge dessen zu einer übermäßigen Anreicherung großer ribosomaler Untereinheiten, deren Assemblierung unabhängig von der der kleinen Untereinheiten abläuft (sofern die ribosomalen Proteine nicht limitierend sind). Parallel dazu findet eine Akkumulation von Vorläufern der 23S rRNA statt (Abb. 3.1.18.C,D). Diese beiden Effekte führen wahrscheinlich gemeinsam zu dem stark verschobenen stöchiometrischen Verhältnis von kleinen zu großen Untereinheiten in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen. Insgesamt liegt schlussendlich somit eine reduzierte Menge an 70S-Ribosomen vor, da sich der Flaschenhals auf dem Weg zur Produktion von 70S-Ribosomen bei der in geringerer Abundanz vorkommenden Untereinheit, d.h. im Falle der  $\Delta rps15$ -Pflanzen, den 30S-Untereinheiten, befindet.

Unter Kältestress bei 4 °C sind die Auswirkungen des Fehlens von S15 sehr schwerwiegend (Abb. 3.1.15). Daher ist anzunehmen, dass bei 4 °C Assemblierungsfaktoren nur noch in minimalem Ausmaß in der Lage sind, den Ausfall von S15 auszugleichen. Der Grund hierfür ist in thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten zu suchen. Bei niedrigeren Temperaturen befindet sich das System „unassembliertes Ribosom“ in einem ungünstigen, da energieärmeren, thermodynamischen Zustand. Aktivierungsenergien die notwendig sind, um eine korrekte Assemblierung zu gestatten, können nunmehr nur mit geringerer Wahrscheinlichkeit aufgebracht werden (Talkington *et al.*, 2005; Sykes und Williamson, 2009). In Abwesenheit von S15 kann die sich normalerweise an die Bindung von S15 an die 16S rRNA anschließende Konformationsänderung, selbst in Gegenwart von Assemblierungsfaktoren, wahrscheinlich nur noch mit geringer Wahrscheinlichkeit zutragen. Ein zweites Problem kann die Bildung von kinetischen Faltungsfällen sein. Die Konformationen, die von großen RNA-Molekülen eingenommen werden, sind, selbst wenn es sich dabei um falsch gefaltete rRNAs handelt, relativ stabil. Unter energetisch günstigeren Umständen, wie Standardbedingungen, ist es möglich, falsch gefaltete rRNAs wieder in die korrekte Form zurückzuführen. Bei geringeren Temperaturen aber können einmal falsch gefaltete rRNAs nicht mehr aus der inkorrekten Sekundärstruktur befreit werden, sie befinden sich in einer sogenannten kinetischen Faltungsfalle (Talkington *et al.*, 2005; Sykes und Williamson, 2009). Die Abwesenheit von S15 erhöht die Wahrscheinlichkeit der Bildung von

inkorrekt gefalteten Assemblierungsintermediaten, die eine Sackgasse auf dem Pfad zur Ribosomenbildung darstellen. Die Anreicherung von 17S-Vorläufern (Abb. 3.1.18) ist hierfür ein Indiz. Trotzdem ist es nicht völlig unmöglich, dass funktionsfähige 30S-Untereinheiten gebildet werden (Mulder *et al.*, 2010), wie an der Beladung von mRNAs mit translatierenden Ribosomen aus weißem, bei 4 °C gewachsenem Blattmaterial und dem langsamen Ergrünen der Spitzen Kälte-gestresster Blätter zu schließen ist (Abb. 3.1.15). Auch wäre ein gänzlich Fehlen plastidärer Ribosomen mit dem Leben von Tabakpflanzen nicht vereinbar (Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2006).

Vorläufige, unter Hitzestress bis 42 °C durchgeführte fluoreszenzspektroskopische Messungen (hier nicht gezeigt) lassen den Schluss einer Angleichung der Translationskapazität der Mutanten an den Wildtyp bei Temperaturen über 40 °C zu. Dies kann unter einem thermodynamischen Gesichtspunkt betrachtet mit einer erleichterten rRNA-Faltung durch den erhöhten Energiegehalt des Systems erklärt werden. Die damit verbundene Verringerung der notwendigen Aktivierungsenergie begünstigt die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten und könnte somit die Abwesenheit von S15 größtenteils kompensieren.

#### 4.1.2.1.2 Reduzierte Funktionalität der Ribosomen

Der limitierende Schritt der Translation ist die Translationsinitiation (Ray und Pearson, 1975; Jaques und Dreyfus, 1990). Weist eine Probe in der Polysomen-Analyse Anomalien auf, so sind die Ursachen hierfür großteils in Problemen während der Initiationsphase zu suchen, was aber Probleme während der Elongationsphase nicht ausschließt (Rogalski *et al.*, 2008b). Zwar trifft dies auch auf die untersuchten  $\Delta rps15$ -Pflanzen zu, die eine Verschiebung zu leichteren Fraktionen aufweisen, dennoch kann dieser Effekt genauso gut der geringeren Gesamtmenge an Ribosomen geschuldet sein. Eine reduzierte Funktionalität kann damit weder ausgeschlossen, noch bestätigt werden. Um dies zu klären, müsste ein *in vitro*-Translationssystem etabliert werden, in dem äquimolare Mengen an 70S-Ribosomen der Mutanten und zum Vergleich, des Wildtyps, untersucht werden können. Dies würde Aufschluss darüber geben, ob die Initiation/Elongation ebenfalls beeinträchtigt ist oder tatsächlich nur geringere Ribosomenmengen für die Verschiebung des Maximums im Polysomengradienten verantwortlich zu machen sind.

#### 4.1.2.1.3 Reduzierte Stabilität der Ribosomen

In bakteriellen Ribosomen erfüllt S15 eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des 70S-Komplexes (Bubunenko *et al.*, 2006). S15 befindet sich direkt an der Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten des 70S-Ribosoms (Abb. 4.1.2.). An dieser Stelle ist die interribosomale Brücke B4 lokalisiert, eine von insgesamt 13 interribosomalen Brücken, die die Komplexierung der 30S- und 50S-Untereinheiten zu 70S-Ribosomen ermöglichen. S15 nimmt direkten Kontakt mit der Domäne II der 23S rRNA am Stem-Loop 715 auf. Es wurde gezeigt, dass S15 sogar dazu in der Lage ist, die LSU in Abwesenheit der SSU zu binden. Dies trägt zum Schutz der 23S rRNA vor Nukleasen und eventuell sogar zu ihrer Strukturierung bei (Culver *et al.*, 1999).

Die 23S rRNA ist insgesamt zu 66 % zwischen *E. coli* und Tabak konserviert. Am für die Bindung von S15 relevanten Stem-Loop 715 beträgt die Übereinstimmung 100 % (Abb. 4.1.5) (Culver *et al.*, 1999).

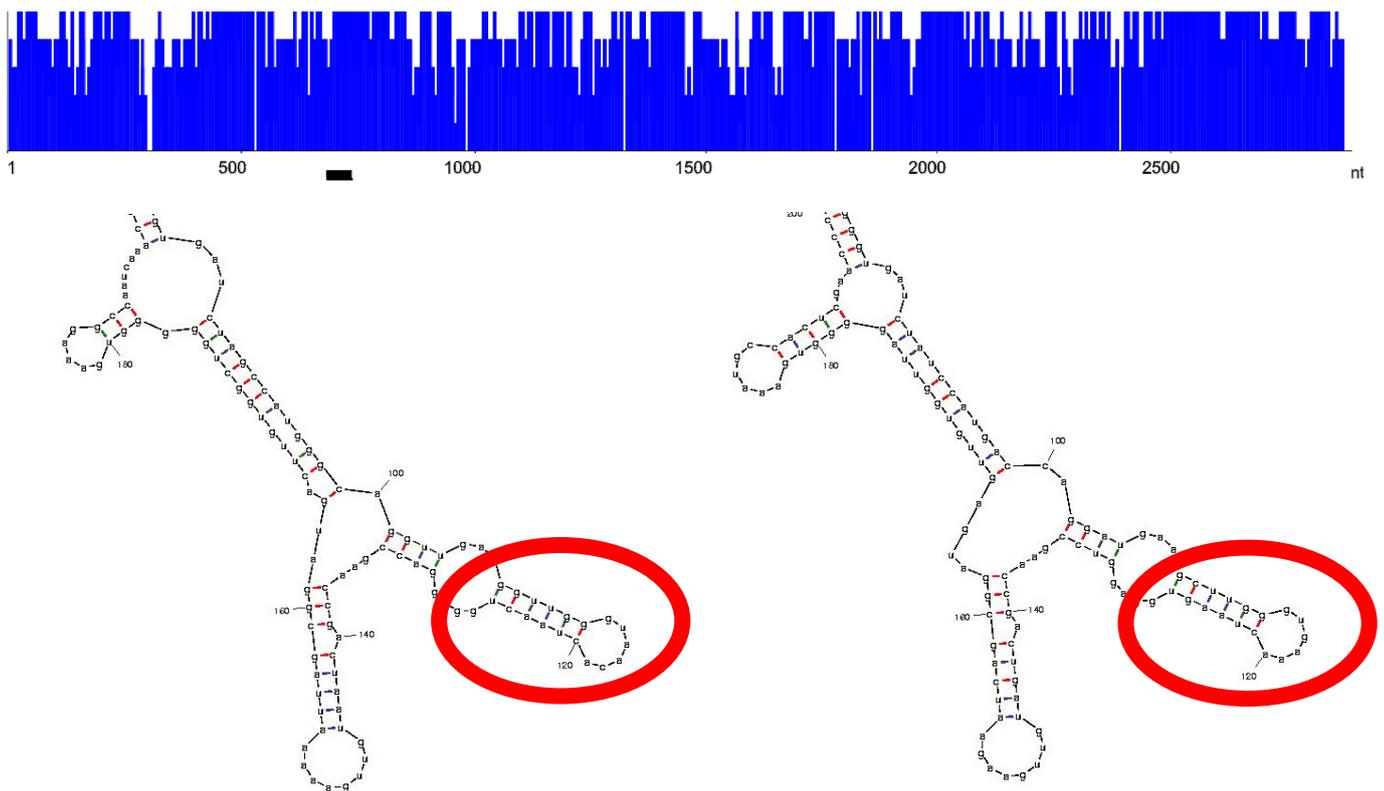


Abb. 4.1.5: Vergleich der 23S-Sequenzen von *E. coli* und Chloroplasten.

Oberer Bildteil: Vergleich der 23S-Sequenzen. Die blauen Flächen stellen den Grad der Übereinstimmung zwischen beiden Sequenzen dar (Vector NTI 10.3.0, Invitrogen). Auf der X-Achse ist die 23S-Sequenz in Nukleotiden aufgetragen, auf der Y-Achse der Grad der Übereinstimmung, der mehrfach das Maximum von 100% erreicht. Schwarzer Balken: siehe unten.

Unterer Bildteil: Links: Ausschnitt der Sekundärstruktur der 23S rRNA von *E. coli*. Rechts: Ausschnitt der Sekundärstruktur der 23S rRNA von Plastiden aus *Nicotiana tabacum* (M-Fold Webserver; Culver *et al.*, 1999). Der von S15 gebundene Bereich ist rot umrandet. Dieser Bereich ist im oberen Bildteil als schwarzer Balken markiert.

30S-Untereinheiten aus *E. coli* ohne S15 sind *in vitro* nicht in der Lage mit 50S-Untereinheiten zu assoziieren (Culver *et al.*, 1999). *In vivo* ist dies noch möglich, allerdings sind die resultierenden 70S-Ribosomen weniger stabil (Bubunenکو *et al.*, 2006). Aufgrund der Ähnlichkeit der Brückenstrukturen in Ribosomen von *E. coli* und Chloroplasten kann von einem ähnlichen Effekt auf die plastidären Ribosomen ausgegangen werden. Dies führe zu einer Destabilisierung auch aktiv translatierender Ribosomen, welche während der Elongationsphase mit höherer Wahrscheinlichkeit von mRNAs dissoziierten und somit weniger Protein bildeten. Gegen diese Erklärung sprechen allerdings die vorläufigen Ergebnisse der bei höheren Temperaturen durchgeführten fluoreszenzspektroskopischen Messungen, in denen sich die Photosynthesekapazität der Mutanten verbesserte (Daten nicht gezeigt). Denn prinzipiell nimmt die Instabilität eines Komplexes unter höheren Temperaturen nach den Gesetzen der Thermodynamik zu, was deshalb eher zu einer stärkeren Translationsdefizienz in den  $\Delta rps15$ -Pflanzen bei höheren Temperaturen führen sollte. Da jedoch das Gegenteil zu beobachten ist, spricht dies nur für einen minimalen Einfluss des plastidären Proteins S15 auf die Brücke B4 und die Stabilität der plastidären Ribosomen insgesamt. Eine detailliertere Versuchsreihe über einen Temperaturgradienten bis max. 45 °C, der Temperatur, die bei Tabak, dieser ausgesetzt, über einen längeren Zeitraum zum Absterben führt, könnte finalen Aufschluss darüber geben.

#### 4.1.2.2 *rpl36*

Das zweite Gen, welches vollständig aus allen Plastomen der Ziel-Pflanzen ausgeknockt wurde, war *rpl36*. Der Knockout von *rpl36*, einem Gen, das in keinem Plastom der betrachteten parasitischen Spezies fehlt (Fleischmann *et al.*, 2011), führte zu Pflanzen, deren plastidäre Translationsaktivität massiv beeinträchtigt wurde. Der sehr starke Phänotyp äußert sich in Form weißer Blätter, einer schwachen Wurzelbildung und einer extrem langsamen Wuchsgeschwindigkeit sowie diverser morphologischer Veränderungen (Abb. 3.1.26 und 3.1.27). Trotz der offensichtlich schwerwiegenden Beeinträchtigungen ist L36 nicht-essentiell. Dies lässt vermuten, dass in Abwesenheit von L36 die nur geringe Translationseffizienz nicht ausreicht, um selbst dem voraussichtlich niedrigen Translationsbedarf photosynthetisch inaktiver Plastiden von Parasiten gerecht zu werden.

#### 4.1.2.2.1 Die Funktion von L36 im Ribosom

L36 ist stark konserviert in Bakterien, kommt aber nicht in den Ribosomen von Eukaryoten oder Archaeen vor. Die Sequenz von L36 ist zwischen *E. coli* und den Plastiden von Tabak zu 60,5 % identisch, die Ähnlichkeit der Proteinstrukturen ist ebenfalls hoch (Abb. 4.1.6).

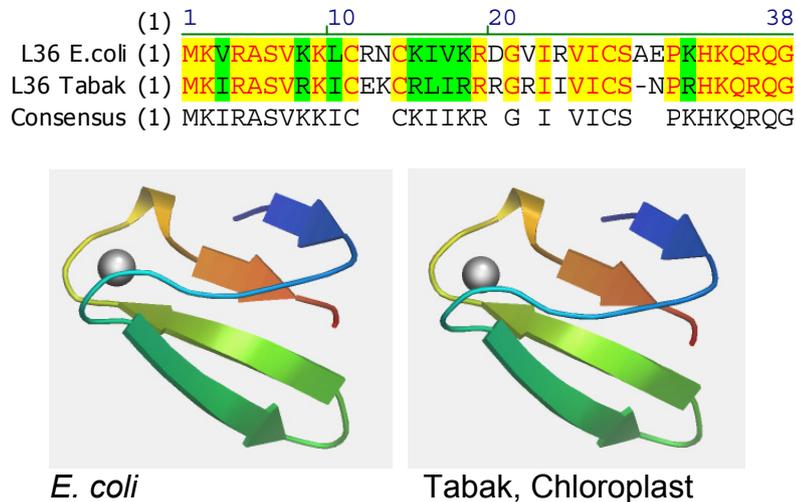


Abb. 4.1.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen von L36 von *E. coli* und Chloroplasten.

Oben: Sequenzvergleich zwischen *E. coli* und plastidärem L36 (Vector NTI 10.3.0, Invitrogen).

Unten: Proteinmodelle von L36 von *E. coli*, links, und Tabak, rechts. Die vier Domänen sind gleichartig ausgerichtet, ebenso besitzen vermutlich beide Proteine einen Metallliganden (mit SWISS-MODEL Workspace, erstellt).

In der Assemblierung der Ribosomen scheint L36 eine untergeordnete Rolle zu spielen (Röhl und Nierhaus, 1982). Zur Bedeutung von L36 in der Translation existieren widersprüchliche Daten. Die Publikation von Ikegami *et al.* (2005) bescheinigt L36 keine tragende Rolle, da die erhaltenen Transformanten (*E. coli*) keinen Phänotyp aufweisen. Die im selben Jahr veröffentlichte Studie von Maeder und Draper lässt den gegenteiligen Schluss zu. In diesem KO-Experiment besaßen die transformierten Bakterien eine deutlich verringerte Wachstumsgeschwindigkeit und wiesen eine Reduktion der Translationsaktivität um 40 % auf, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass L36 eine signifikante Funktion in der Organisation der Tertiärstruktur der 23S rRNA besitzt. In *E. coli* wirkt sich der Verlust von L36 vermutlich nicht auf die Assemblierung des Ribosoms aus, sondern hauptsächlich auf dessen Funktionalität. Fehlt L36, wird ein 60 Å tiefer Pfad geöffnet, was zur Freilegung von Nukleotiden führt, die Teil des Peptidyl-Transferase-Zentrums sind und somit viel stärker durch Hydrolyse gefährdet sind (Abb. 4.1.7) (Maeder und Draper, 2005). Die hier vorliegenden Daten unterstützen die Ergebnisse der Untersuchung von Maeder und Draper.

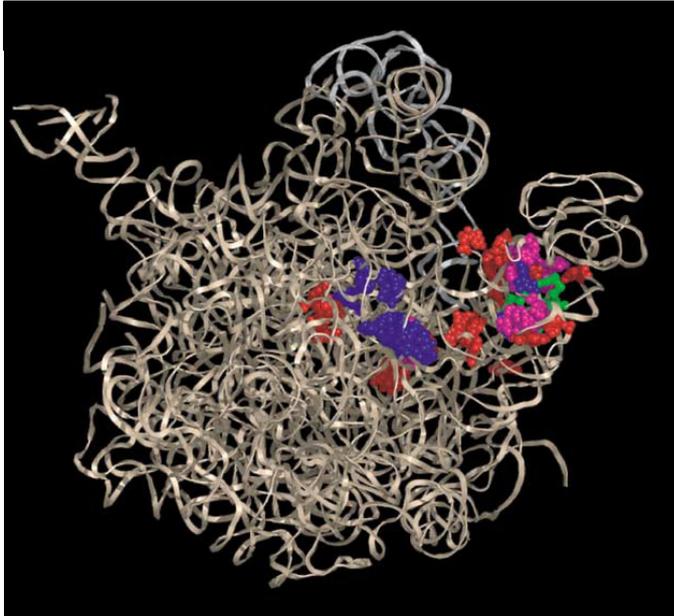


Abb. 4.1.7: Auswirkung der Absenz von L36 auf die LSU von *Deinococcus radiodurans* projiziert. Die Effekte sind bis tief in die Struktur der 50S-Untereinheit nachweisbar. Im Falle des Fehlens von L36 (grün markiert) zeigen die rot, cyan und violett markierten Nukleotide eine erhöhte Reaktivität auf DMS (rot), Hydroxyl-Radikale (cyan) oder beides (violett) (Abb. aus Maeder und Draper, 2005).

#### 4.1.2.2.2 Anomalien der Wuchs- und Blattform

Zwei Merkmale des Phänotyps der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen sind in besonderer Weise zu betrachten, da diese sehr unerwartet auftraten und normalerweise nicht mit der Funktion von Plastiden in Verbindung gebracht werden. Zuerst ist der Verlust der Apikaldominanz zu nennen (Abb. 3.1.26 und 3.1.27). Die Apikaldominanz wird normalerweise durch einen Konzentrationsgradienten des Phytohormons Auxin aufrechterhalten, der sich vom Ort der Synthese in der Sprossspitze, entlang der Sprossachse abnehmend nach unten erstreckt und Seitentriebe in ihrem Wachstum hemmt (Sitte *et al.*, 1999). In der Auxinsynthese spielen Plastiden in einem von zwei Synthesepfaden eine Rolle (Normanly *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 2003; Woodward und Bartel, 2005). Einer der beiden Synthesewege, der Trp-abhängige Syntheseweg, ist gut untersucht und unabhängig von Chloroplasten. Der zweite Syntheseweg ist Trp-unabhängig und noch nicht intensiv erforscht. Dennoch existieren Hinweise auf eine zentrale Involvierung von Plastiden in den Trp-unabhängigen Syntheseweg (Rapparini *et al.*, 1999; Rapparini *et al.*, 2002). Daher erscheint es möglich, dass die durch den KO von *rpl36* stark in Mitleidenschaft gezogene Translationskapazität nicht ausreichend groß ist, um direkt oder indirekt die Funktion der an diesem Synthesepfad beteiligten Enzyme zu garantieren. Eine Hemmung würde sich durch niedrigere Auxinmengen bemerkbar machen. Zwei Szenarien sind hierzu denkbar: (1) Ein plastomkodierte Protein moduliert die Aktivität und/oder die Enzymmenge der betroffenen kernkodierten Auxinsyntheseenzyme im Chloroplast. (2) Ein retrogrades Signal aus dem Plastiden ist in die Regulation der Genexpression der betroffenen kernkodierten Enzyme involviert (Larkin und Ruckle, 2008; Pogson *et al.*, 2008; Kleine *et al.*, 2009). Konsistent mit einer möglichen Behinderung der

Auxinsynthese ist das Problem in der Wurzelbildung der Mutanten, die selbst unter heterotrophen Bedingungen nur sehr zögerlich Wurzeln ausbilden.

Das zweite unerwartete Merkmal, welches die  $\Delta rpl36$ -Pflanzen ausbildeten, ist die ungewöhnliche Blattform. Diese ist meist schmaler als im Wildtyp und kann in frühen Stadien bis hin zu nadelartigem Aussehen reichen (Abb. 3.1.26). Diese Formen werden höchster Wahrscheinlichkeit nach durch ein retrogrades Signal hervorgerufen. Studien aus den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts befassten sich erstmals mit der Rolle von Plastiden in der Morphogenese von Blättern. In diesen Studien wurden zwei Arten von Nachtkerzen als Untersuchungsobjekte verwendet: *Oenothera odorata* und *Oenothera berteriana*. Diese sind sexuell kompatibel, unterscheiden sich aber deutlich in ihrer jeweiligen Blattform, wie den unterschiedlichen Blattbreiten und dem Ausmaß der Einkerbungen am Spreitenrand (Schwemmler, 1941; Schwemmler, 1943) (Abb. 4.1.8). Eine für genetische Studien besonders entgegenkommende Eigenschaft von Nachtkerzen ist der Sachverhalt, dass die Vererbung der Chloroplasten biparental stattfindet. Daher gelang es, Hybride der beiden Arten zu züchten, die jeweils ein identisches Kerngenom aufwiesen, aber entweder nur von *O. odorata* oder nur von *O. berteriana* stammende Plastiden besaßen. Das Resultat waren Pflanzen die sich deutlich in der Blattform unterschieden: Hybride mit „*odorata*-Plastiden“ waren schmaler als diejenigen mit „*berteriana*-Plastiden“. Insgesamt glich der Blattphänotyp der Hybriden sehr dem Phänotyp des Elternteils, von dem die Plastiden stammten (Schwemmler, 1941; Schwemmler, 1943) (Abb. 4.1.8).

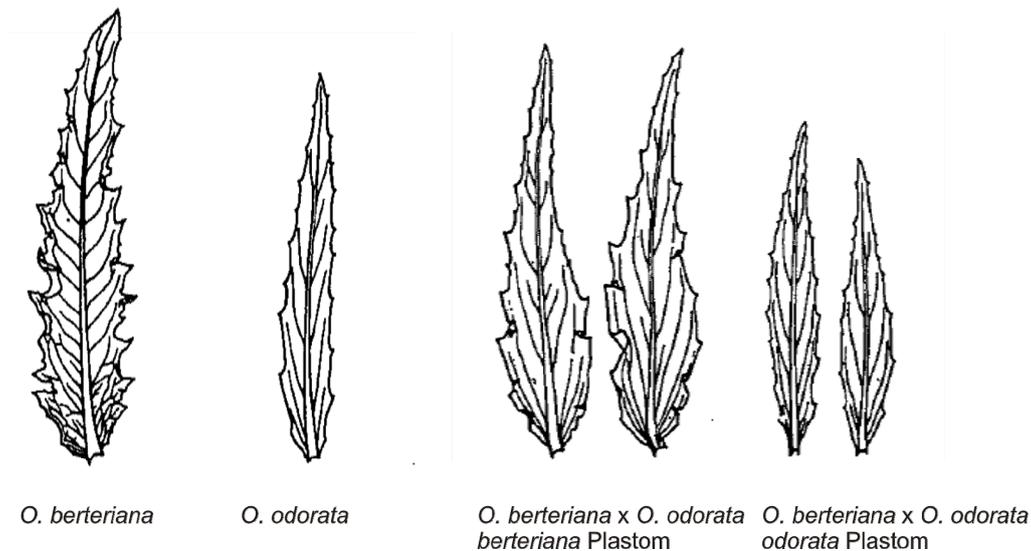


Abb. 4.1.8: Biparentale Vererbung von Plastiden im Genus *Oenothera*. Zur Linken sind jeweils ein Blatt von *Oenothera berteriana* und *Oenothera odorata* abgebildet. *O. berteriana* Blätter sind größer, breiter und stärker gezackt als *O. odorata* Blätter. Hybride beider Spezies sind rechts, mit jeweils zwei Blättern abgebildet. Diese besitzen das gleiche Kerngenom aber entweder nur *berteriana*- oder nur *odorata*-Plastiden. Die Blätter weisen je nach vorkommenden Plastiden andere Formen auf. Der sich ausprägende Blattphänotyp gleicht jeweils stark dem des „Plastiden-Elternteils“ (1964, Schwemmler 1941, Schwemmler 1941) (Abb. verändert nach Hagemann 1964).

Im Plastom befinden sich keine bekannten Gene, deren Genprodukte in direkter Manier die Blattform zu beeinflussen vermögen. Alle bekannten Faktoren, die Bestandteil der Signaltransduktionswege sind, die dazu im Stande sind, die Blattform zu beeinflussen, sind cytosolisch bzw. nukleär lokalisiert (Poethig und Sussex, 1985; Tsukaya, 2003). Da dennoch die plastidäre Translation in diesen Prozess involviert ist, erscheint die Existenz eines retrograden Signals als sinnvolle Erklärung. Es könnte sein, dass die Erzeugung des vom Plastiden ausgehenden (retrograden) Signales in direkter oder indirekter Weise von der Translationskapazität des Plastiden abhängt. Bisher konnte in anderen Arbeiten zwar nachgewiesen werden, dass die plastidäre Translationsaktivität Einfluss auf die Expression kernkodierter Gene ausübt (Börner *et al.*, 1986; Hess *et al.*, 1994b; Koussevitzky *et al.*, 2007). Es konnten aber keine morphologischen Veränderungen damit in Verbindung gebracht werden. Diese Verbindung konnte erstmals in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Fleischmann *et al.*, 2011).

### 4.1.3 Doppelknockout plastidärer ribosomaler Proteine

Die Daten zu den Doppel-KOs von *rps15-rpl36*, *rps15-rpl33* und *rpl33-rpl36* lassen darauf schließen, dass das plastidäre Ribosom von Tabak dazu in der Lage ist, den Verlust zweier ribosomaler Proteine simultan zu verkraften. Je nach Kombination der ausgeknockten Gene sind die unterschiedlichen Phänotypen zu deuten.

Der alleinige Knockout von *rpl36* hatte einen gravierenden Phänotyp zur Folge (Abb. 3.1.26). Wird *rpl36* und zeitgleich noch ein anderes ribosomales Protein (bzw. dessen Gen) ausgeknockt, ist davon auszugehen, dass der entstehende Phänotyp mindestens die Schwere des alleinigen *rpl36*-KOs besitzt. Dies ist für die Kombinationen *rps15-rpl36* und *rpl33-rpl36* auch der Fall (Abb. 3.1.30 und 3.1.31). Beide Kombinationen führen zu Pflanzen, die weiß bis leicht grün sind, also von massiven Pigmentverlusten geprägt sind. Ob die Translationsdefizite und Veränderungen der rRNA-Spezies stärker als jene von  $\Delta rpl36$ -Pflanzen sind, muss in späteren Experimenten eruiert werden. Die beiden Kombinationen hatten kein reales Spiegelbild in den zum Studienstart berücksichtigten (parasitischen) Organismen. Zwischenzeitlich konnte aber im Plastom von *Babesia bovis*, einer parasitischen Apicomplexa-Spezies, der gleichzeitige Verlust von *rpl33* und *rpl36* gezeigt werden (Tab. 4.1) (Brayton *et al.*, 2007).

Die Phänotypen von  $\Delta rps15$ - als auch von  $\Delta rpl33$ -Pflanzen waren jeweils für sich betrachtet sehr mild und unter Standardbedingungen, bzw. in der Gewebekultur, nicht von normalen Pflanzen zu unterscheiden (Abb. 3.1.13 und Rogalski *et al.*, 2008b). Im Fall des Doppel-KOs von *rps15* und *rpl33* ist der prävalente Phänotyp durch blassgrüne Blätter charakterisiert (Abb. 3.1.33). Dieser, aus den Einzelphänotypen kumulierende Phänotyp, ist unter heterotrophen Bedingungen immer noch relativ mild, ist aber klar vom Wildtyp zu unterscheiden und muss noch unter autotrophen Wachstumsbedingungen getestet werden. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Kombinationen besitzt die Kombination *rps15-rpl33* eine Entsprechung im Plastom einer parasitischen Pflanze. In *Rhizanthella gardneri*, jener parasitischen Orchidee mit den meisten Genverlusten im Plastiden-Genom, fehlen sowohl *rps15* als auch *rpl33* (Delannoy *et al.*, 2011). Der kumulative Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass beide Untereinheiten in geringerer Menge vorliegen. Bindet eine, selbst schon in ihrer Abundanz reduzierte 30S-Untereinheit eine zu translatierende mRNA, wird dieser Komplex mit wiederum verringerter Wahrscheinlichkeit auf eine ebenfalls seltenere 50S-Untereinheit treffen (Hypothetisches Beispiel: 30S-Menge beträgt 70 % des WT, 50S-Menge

beträgt 70 % des WT => Translationseffizienz um mindestens Faktor  $0,7 \times 0,7 = 0,49$  reduziert).

Zusammenfassend erscheint die Plastizität der bakterienartigen Ribosomen von Plastiden sehr hoch zu sein. Sie können das Fehlen von zwei ribosomalen Proteinen in gewissem Grade kompensieren und ermöglichen den Zellen das Überleben. Der nächste logische Schritt, die kompensatorischen Grenzen des Plastidenribosoms auszutesten, wäre der KO aller drei Gene zur gleichen Zeit, unter zu Hilfenahme von Chloramphenicol als drittem Selektionsmarker (Li *et al.*, 2011).

## 4.2 Plastomevolution in Parasiten

Die Existenz des plastidären Translationsapparates ist essentiell für das Überleben von Tabak (Ahlert *et al.*, 2003). Was in seiner Gesamtheit für die daran beteiligten Ribosomen und anderen Faktoren gilt, gilt mit Nichten gleichermaßen für jede einzelne Komponente des Systems. Ein degeneriertes, nicht mehr optimales Translationssystem reicht aus, um das Überleben zu gewährleisten, was aber mehr oder minder starke Effekte auf die Lebensfähigkeit des Stammorganismus hervorruft. In vorhergehenden Forschungen konnte L33 als nicht-essentieller Konstituent identifiziert werden (Rogalski *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten zwei weitere Bestandteile des plastidären Ribosoms, S15 und L36, die zum Überleben von *Nicotiana tabacum* unter heterotrophen Bedingungen nicht notwendig sind, bestimmt werden. Beim zuvor charakterisierten Protein L33 trat ein mit dem Auge sichtbarer Phänotyp des KOs des Gens erst unter Kältestress auf, was bei den beiden neu identifizierten ribosomalen Proteinen nicht der Fall ist:  $\Delta rps15$ -Pflanzen wuchsen schon unter Standardbedingungen etwas langsamer und zeigten leicht hellere Färbungen junger Blätter, während die Pigmentierung der  $\Delta rpl36$ -Pflanzen praktisch nicht vorhanden war. Darüber hinaus konnten in der aktuellen Studie fünf weitere ribosomale Proteine als essentiell charakterisiert werden: S3, S16, L22, L23 und L32. Zusammen mit früheren Publikationen ergibt sich daraus eine umfassende Übersicht über die Essentialität der plastidär kodierten Proteinbestandteile des Chloroplastenribosoms, die in plastomischen Sequenzen parasitischer Spezies nicht mehr nachweisbar sind (Tab. 4.1). Die hier abgebildete Tabelle enthält ebenfalls Informationen über die für plastidäre ribosomale Proteine kodierenden Gene der zu Beginn der Studie nicht berücksichtigten Spezies (Parasiten und nicht-parasitische Organismen mit stark reduziertem Plastom) *Babesia bovis* (Apicomplexa) (Brayton *et al.*, 2007), *Micromonas sp.* und *Micromonas pusilla* (Mamiellaceae) (Worden *et al.*, unpubl.), *Cryptomonas*

*paramecium* (Cryptomonadae) (Donaher *et al.*, 2009), *Helicosporidium sp.* (Trebouxiophyceae) (deKoning und Keeling, 2006), *Ostreococcus tauri* (Prasinophyceae) (kein Parasit, dennoch reduziertes Plastom) (Robbens *et al.*, 2007), *Pycnococcus provasolii* (Pycnococcaceae) (Turmel *et al.*, 2009), *Aureococcus anophagefferens* und *Aureoumbra lagunensis* (Pleagophyceae) (Ong *et al.*, 2010).

Tab. 4.1: Übersicht über die Essentialität und die Konservierung der ribosomalen Proteine in *E. coli*, Tabak-Plastiden und div. parasitischen/nicht-photosynthetischen Spezies.

Gen	Essentiell in <i>E.coli</i>	Essentiell in Plastiden von <i>Nicotiana tabacum</i>	Präsent in kryptischen Plastomen
<i>rpl2</i>	Ja	NA	Ja
<i>rpl14</i>	Ja	NA	Nicht in <i>E.v.</i> Ψ
<i>rpl16</i>	Ja	NA	Ja
<i>rpl20</i>	Ja	Ja <sup>a</sup>	Nicht in <i>E.t.</i> , <i>T.p.</i> , <i>T.g.</i> , <i>M.p.</i> , <i>B.b.</i>
<i>rpl22</i>	Ja	Ja <sup>b</sup>	Nicht in <i>E.v.</i> , <i>R.g.</i> , <i>T.g.</i> , <i>M.p.</i> , <i>M.sp.</i> , <i>B.b.</i> , <i>H.sp.</i> , <i>O.t.</i> , <i>P.p.</i>
<i>rpl23</i>	Ja	Ja <sup>b</sup>	Nicht in <i>C.r.</i> , <i>B.b.</i> , <i>H.sp.</i>
<i>rpl32</i>	Nein (unbestätigt)	Ja <sup>b</sup>	Nicht in <i>R.g.</i> , <i>C.r.</i> Ψ, <i>M.p.</i> , <i>B.b.</i> , <i>C.p.</i> , <i>P.p.</i> , <i>A.a.</i> , <i>A.l.</i>
<i>rpl33</i>	Nein	Nein <sup>a</sup>	Nicht in <i>T.g.</i> , <i>E.l.</i> , <i>R.g.</i> Ψ, <i>M.p.</i> , <i>M.sp.</i> , <i>B.b.</i> , <i>H.sp.</i> , <i>O.t.</i> , <i>P.p.</i> ,
<i>rpl36</i>	Nein	Nein <sup>b</sup>	Nicht in <i>M.p.</i> , <i>M.sp.</i> , <i>B.b.</i>
<i>rps2</i>	Ja	Ja <sup>a</sup>	Nicht in <i>T.g.</i> , <i>M.p.</i> , <i>H.sp.</i> ,
<i>rps3</i>	Ja	Ja	Nicht in <i>R.g.</i>
<i>rps4</i>	Ja	Ja <sup>a</sup>	Nicht in <i>M.p.</i> , <i>B.b.</i>
<i>rps7</i>	Ja	NA	Nicht in <i>B.b.</i>
<i>rps8</i>	Ja	NA	Ja
<i>rps11</i>	Ja	NA	Ja
<i>rps12</i>	Ja	NA	Ja
<i>rps14</i>	Ja	Ja <sup>a</sup>	Nicht in <i>M.p.</i> , <i>B.b.</i>
<i>rps15</i>	Nein	Nein <sup>b</sup>	Nicht in <i>E.v.</i> , <i>R.g.</i> , <i>M.p.</i> , <i>M.sp.</i> , <i>B.b.</i> , <i>C.p.</i> , <i>H.sp.</i> , <i>O.t.</i> , <i>P.p.</i> , <i>A.a.</i> , <i>A.l.</i>
<i>rps16</i>	Ja	Ja <sup>b</sup>	Nicht in <i>C.r.</i> , <i>R.g.</i> , <i>M.p.</i> , <i>M.sp.</i> , <i>B.b.</i> , <i>H.sp.</i> , <i>O.t.</i> , <i>P.p.</i>
<i>rps18</i>	Ja	Ja <sup>a</sup>	Nicht in <i>E.l.</i> , <i>T.g.</i> , <i>B.b.</i> , <i>H.sp.</i> ,
<i>rps19</i>	Ja	NA	Nicht in <i>B.b.</i>

NA: nicht untersucht; Ψ: Pseudogen; Daten zu *E. coli* aus Baba *et al.* (2006). Die Nicht-Essentialität von *rpl32* konnte nicht bestätigt werden (Punkt 4.1.1). <sup>a</sup> Daten aus früheren Studien (Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2006; Rogalski *et al.*, 2008b); <sup>b</sup> Daten aus der aktuellen Studie. Speziesabkürzungen: *E.v.*: *Epifagus virginiana*, *E.t.*: *Eimeria tenella*, *T.p.*: *Theileria parva*, *T.g.*: *Toxoplasma gondii*, *R.g.*: *Rhizanthella gardneri*, *C.r.*: *Cuscuta reflexa*, *E.l.*: *Euglena longa*, *B.b.*: *Babesia bovis*, *M.sp.*: *Micromonas sp.*, *M.p.*: *Micromonas pusilla*, *C.p.*: *Cryptomonas paramecium*, *H.sp.*: *Helicosporidium sp.*, *O.t.*: *Ostreococcus tauri*, *P.p.*: *Pycnococcus provasolii*, *A.a.*: *Aureococcus anophagefferens*, *A.l.*: *Aureoumbra lagunensis*.

Es gibt zwei mögliche Betrachtungsweisen, die eine Erklärung für die Abwesenheit der genannten Gene liefern können. Zum einen können die Gene permanent aus dem Parasiten-Plastom verloren gegangen sein, da die nicht-photosynthetisch aktiven Plastiden höchstwahrscheinlich eine viel geringere Translationskapazität benötigen, als die grüner, photosynthetisch aktiver Pflanzen. Nur geringe Translationsaktivität in Plastiden ist bekannt aus Chromoplasten von Tomatenfrüchten, in welchen einzig das zur Fettsäuresynthese benötigte Gen *accd* auf niedrigem Niveau exprimiert wird (Kahlau und Bock, 2008) sowie

aus Kartoffelknollen, die prinzipiell das gleiche Verhalten zeigen und nur *accd*-Transkripte in nennenswertem Ausmaß translatieren (Valkov *et al.*, 2009). Es könnte somit auch die Translationskapazität suboptimaler, degenerierter Ribosomen ausreichen, um die notwendige biologische Translationsgrundlast zu erfüllen. Somit wäre ihre Funktion aufgrund der niedrigen benötigten Translationskapazität verzichtbar geworden. Zum anderen ist es denkbar, dass EGT in der Etablierung der reduzierten Gensätze einen wichtigen Beitrag geleistet hat. Es könnten, wie zuvor während der Evolution des konservierten Plastoms photosynthetisch aktiver Pflanzen, die Gene vom Plastom der parasitischen Organismen auf das Kerngenom übertragen worden sein. Alle bisher erhobenen Daten ergeben keinen starken Hinweis auf eine Korrelation der Abwesenheit bestimmter Gene, die plastidäre ribosomale Proteine parasitischer Pflanzen und Protozoa kodieren und der Nicht-Essentialität derselben unter heterotrophen Bedingungen in *Nicotiana tabacum*, unter welchen die benötigten Translationskapazitäten bei Tabak den von Parasiten ähnlich sein sollten. Fünf Proteine sind in Parasiten mit Abstand am Häufigsten nicht mehr anzutreffen. Dies sind L22, L32, L33, S15 und S16, wovon sich nur L33 und S15 als nicht-essentiell herausstellten. Angesichts der Tatsache, dass der Großteil der untersuchten Proteine sowohl in *E. coli* als auch in Plastiden essentiell ist, erscheint es wahrscheinlicher, dass die entsprechenden Gene in das Kerngenom transferiert wurden, dort exprimiert und in die Plastiden transportiert werden, als dass sie „verloren“ gegangen sind (Timmis *et al.*, 2004; Bock und Timmis, 2008). Weiterhin sind auch in den parasitischen Spezies immer noch ein Großteil der plastomischen Gene ribosomaler Proteine und ihrer Genprodukte hochgradig konserviert (NCBI-Datenbank; Krause, 2008), von den untersuchten pseudogenisierten oder abwesenden Ausnahmen abgesehen. Zusammengefasst lässt dies vermuten, dass die Erfolgsrate des Transfers, bzw. die Transferrate von Genen für ribosomale Proteine in Parasiten generell erhöht ist (Fleischmann *et al.*, 2011).

Es scheint als wäre der verringerte Bedarf an plastidärer Translationsaktivität die mit dem Verlust der Photosynthese einhergeht die evolutionäre Triebkraft hinter dieser Entwicklung. Allerdings gibt es unter parasitischen Spezies auch zwei Beispiele, die keinerlei Verluste ihrer Kodierungskapazität für ribosomale Proteine hinnehmen mussten. Dies sind *Neottia nidus-avis* (Orchidaceae) und *Aneura mirabilis* (Aneuraceae) (Wickett *et al.*, 2008; Logacheva *et al.*, 2011). Eventuell sind diese beiden Spezies auf eine grundsätzlich höhere Translationsaktivität ihrer Plastiden angewiesen, was zu einer Aufrechterhaltung des evolutiven Druckes auf den Verbleib der Gene des Translationsapparates im Plastom führt.

Es konnte gezeigt werden, dass Plastiden-DNA relativ häufig in den Zellkern transferiert und dort integriert wird (Huang *et al.*, 2003; Stegemann *et al.*, 2003). Wird ein Gen vom Plastom in den Nukleus transferiert, ist es mit hoher Wahrscheinlichkeit zunächst transkriptionell inaktiv, aufgrund der bakteriellen Struktur seiner Expressionssignale, die von der eukaryotischen Expressionmaschinerie nicht erkannt werden. Ihre Reaktivierung ist abhängig von weiteren Mutationen, die die prokaryotischen Signale in eukaryotische transformieren, z.B. durch Einfangen eines Promotors (*promoter capture*; Stegemann und Bock, 2006; Bock und Timmis, 2008). So erscheint es, als könnte ein niedrigeres benötigtes Expressionsniveau die Erfolgsrate positiv beeinflussen mit der eine durch die eukaryotische Genexpressionsmaschinerie exprimierbare Genversion im Kern etabliert werden kann, noch bevor die neu-integrierte DNA durch mutationsbedingte Zerstörung inaktiviert werden kann (Stegemann und Bock, 2006; Bock und Timmis, 2008; Fleischmann *et al.*, 2011). Dies würde schlussendlich den Verlust der Gene aus dem Plastom parasitischer Pflanzen erleichtern.

Generell erscheint die Essentialität der Proteine ein wichtiger Faktor zu sein, der zur Etablierung des konservierten Gensatzes ribosomaler Proteine geführt hat, der im Plastom grüner Landpflanzen zu finden ist. Wie Tabelle 1.1.2 zu entnehmen ist, besitzen bakterielle und plastidäre Ribosomen viele Gemeinsamkeiten, was durch die vorliegende Studie weiter bestätigt werden konnte. Ende 2011 gelang es, KO-Mutanten für alle jene ribosomalen Proteine in *E. coli* anzufertigen, die in Baba *et al.* (2006) nicht angefertigt worden waren. Der KO der Proteine S15, L33 und L36 führte in *E. coli* zu lebensfähigen Kolonien (Baba *et al.*, 2006; Shoji *et al.*, 2011). Exakt dieselben Proteine erwiesen sich auch in plastidären Ribosomen als nicht-essentiell. Diese Übereinstimmung erfährt eine Erweiterung ihrer Bedeutung beim Vergleich des Anteils der im Plastom kodierten Proteine, deren Homologe in *E. coli* nicht-essentiell sind, mit dem Anteil der kernkodierten Proteine, deren Homologe in *E. coli* nicht-essentiell sind. Insgesamt stellten sich 21 von 54 Proteinen (38,9 %) in *E. coli* als nicht-essentiell heraus (L32 als essentielles Protein gezählt). Im Plastom von Tabak sind 14 ribosomale Proteine mit bakteriellen Homologen kodiert, von denen drei nicht-essentiell sind (14,3 %). Hingegen sind im Kerngenom von Tabak 31 plastidäre ribosomale Proteine mit bakteriellen Homologen kodiert, von denen in *E. coli* 18 nicht-essentiell sind (58,1 %). In Pflanzen wurde deren Nicht-Essentialität in *Arabidopsis* für L11, S21 und L24 schon bestätigt (Morita-Yamamuro *et al.*, 2004; Pesaresi *et al.*, 2001; Tiller *et al.*, 2012). Dieser starke Gegensatz zwischen 14,3 % im Plastom und prognostizierten 58,1 % im Kerngenom lässt darauf schließen, dass primär jene Gene erfolgreich im Kern etabliert werden, deren Funktion nicht-essentiell ist, was die zuvor geäußerte Hypothese weiter untermauert. Außerdem muss

berücksichtigt werden, dass der KO von L36 nur sehr schwer zu etablieren war und der Phänotyp unter allen Bedingungen sehr stark war. Der Phänotyp von S15 und L33 ist zwar unter Standardbedingungen nur schwach, bis nicht vorhanden, aber ebenfalls sehr stark unter Kältestress. Es wäre daher sehr interessant, die Stärke der Phänotypen von Knockouts von putativ nicht-essentiellen, kernkodierten plastidären ribosomalen Proteinen in Tabak in Erfahrung zu bringen, allerdings ist die Sequenz des Kern-Genoms von Tabak zum Einen nur in Ansätzen bekannt, zum Anderen ist das Kerngenom allotetraploid, was eine herausfordernde Knockout-Strategie notwendig machen würde.

### **4.3 Detektion und Charakterisierung von miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii***

miRNAs sind wichtige Regulatoren vieler zellulärer Prozesse. Sie können in Tieren als auch Pflanzen essentielle Funktionen besitzen, die zur Steuerung entwicklungsbiologischer Vorgänge als auch zur Induktion von Stressantworten notwendig sind (vgl. Punkt 1.2). Bis zur Entdeckung von miRNAs in *C. reinhardtii* und *Dictyostelium discoidea* ging man davon, dass es diese nur in mehrzelligen Organismen gibt. Durch Molnar *et al.*, und Zhao *et al.*, konnte der Gegenbeweis durch die Entdeckung von 50 miRNAs in *C. reinhardtii* angetreten werden. Diese wiesen keinerlei Homologie zu miRNAs anderer Spezies auf. Da 2007 nur drei Wachstumsbedingungen untersucht wurden (vegetative Zellen: heterotrophes und mixotrophes Wachstum; sowie Gameten) ist zu erwarten, dass bisher mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle potentiell in *C. reinhardtii* vorkommenden miRNAs entdeckt worden sind. Unter dieser Prämisse wurde die Kultur von *C. reinhardtii* unter 28 verschiedenen Wachstumsbedingungen gestartet, um so viele weitere miRNA-Sequenzen wie möglich aufzufinden. Christin Albus und Patrick May (MPI-MP) konnten dabei ~3700 putative miRNA-Sequenzen nachweisen. Im Anschluss daran sollte eine Technik etabliert werden, die es ermöglicht, das miRNA-Expressionsprofil einer bestimmten Wachstumsbedingung genau zu charakterisieren, um dabei Kandidaten-miRNAs zu finden, die interessante Expressionswerte zeigen, um später die zu Grunde liegenden Regulationsprozesse exakt zu untersuchen.

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit, eine Methode zur semi-quantitativen Messung der Abundanz von miRNAs aus *Chlamydomonas reinhardtii* auf Basis der qRT-PCR zu entwickeln. Vorhergehende Versuche mit Microarrays ergaben unbefriedigende Ergebnisse

(hier nicht gezeigt) und wurden zugunsten einer anderen Technologie-Plattform aufgegeben. Als Alternative kamen NGS oder qRT-PCR in Betracht. Unter anderem aus Gründen der Flexibilität wurde der qRT-PCR der Vorzug gegeben. 192 unterschiedliche Transkripte können in der etablierten Plattform simultan untersucht werden, was für 23 unterschiedliche Wachstumsbedingungen durchgeführt wurde.

#### 4.3.1 Etablierung der SL-qRT-PCR

qRT-PCR ermöglicht die quantitative Ermittlung von Transkriptmengen, deren Sequenzen (zumindest zum Teil) bekannt sind. Übliche Amplikongrößen liegen im Bereich von 70-150 nt, und damit weit über der Länge von miRNAs von ~21 nt. Normale PCR-Techniken sind nicht in der Lage so kurze Transkriptstücke zu amplifizieren. Eine Möglichkeit trotzdem Informationen über die Abundanz vom miRNA zu erlangen, besteht in der Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden.

Da miRNAs auf langen Stem-Loop-Vorläufern kodiert sind, ermöglicht dieser Umstand die reverse Transkription dieser ~120 nt langen Vorläufertranskripte. Eine direkte Messung von komplett prozessierten miRNAs ist hiermit allerdings nicht möglich. Vielmehr geht man bei Anwendung dieser Technologie von der Annahme aus, dass reife miRNAs stöchiometrisch 1 : 1 aus ihren Vorläufern prozessiert werden. Dies ist zwar möglich, allerdings können weitere regulatorische Pfade nicht ausgeschlossen werden, die diese lineare Umsetzung verhindern und erheblich weniger miRNA-Moleküle entstehen lassen, als es Vorläufer gibt. So könnten die Prozessierungsgeschwindigkeiten und Effizienzen für solche miRNAs stark unterschiedlich sein. Weiterhin ist diese Methode speziell zur Anwendung bei *C. reinhardtii* nicht geeignet, da auf den miRNA-Vorläufer-Molekülen dieser Alge jeweils mehrere separate miRNAs kodiert sein können. Eine putativ differenzielle Regulierung dieser miRNAs könnte mittels einer Messung des gemeinsamen Vorläufers somit nicht detektiert werden.

Eine abgeänderte Form der qRT-PCR ist die Stem-Loop-qRT-PCR (Punkt 2.3.6). Die Spezifität der reversen Transkriptionsreaktion rührt allein von den letzten 5-8 Nukleotiden des 3'-Endes der miRNA her. Der Stem-Loop-förmige Primer zur cDNA-Synthese ist komplementär zu eben jenem Endstück der miRNA und bietet der reversen Transkriptase den benötigten Ansatzpunkt, um an ihn die restliche, zur miRNA komplementäre DNA-Sequenz anzufügen. Die miRNA-Sequenz wird somit um 44 nt verlängert (Länge des SLP), was deren Amplifikation in einer üblichen PCR-Reaktion ermöglicht (als Vorwärts-Primer fungiert die Sequenz des 5'-Endes der miRNA, als reverser Primer eine universale Sequenz im Stamm des

Stem-Loop-Primers). Die einzigen Einschränkungen erfährt die Methode durch zwei Punkte. Die Annealingtemperatur der Reaktion wird durch den reversen Primer bestimmt, dessen Sequenz durch die Stukturanforderung des Stem-Loop-Primers fest vorgeschrieben ist. Der Vorwärtsprimer sollte das gleiche Annealingtemperaturoptimum aufweisen (60 °C). Durch zufällige hohe Extrema im Gehalt von hauptsächlich Purin- oder hauptsächlich Pyrimidin-Basen in der miRNA-Sequenz kann es schwierig sein, einen Primer mit der notwendigen Temperatur zu generieren. Für ca. 1/3 der in Frage kommenden miRNAs konnte somit kein passender Vorwärtsprimer synthetisiert werden. Ein zweiter, sehr seltener Ausschluss einer miRNA-Sequenz kann dadurch zu Stande kommen, dass zwei miRNAs die gleiche 5-8 Nukleotide lange Sequenz am 3'-Ende besitzen. Dies führte im vorliegenden Datensatz zum Ausschluss von zwei Sequenzen, die jene Charakteristika aufwiesen und damit zwar prinzipiell gemessen werden können, deren Signale aber nicht voneinander unterschieden werden können.

Die Anwendung dieser Messmethode ermöglichte die Generierung eines Datensatzes aus ~17500 einzelnen Messpunkten und führte zu einem detaillierten Überblick über die Expressionsstärken der berücksichtigten miRNAs unter den untersuchten Bedingungen. Dazu war es nötig ein hohes Maß an Automatisierung zu implementieren. Praktisch bedeutete dies die Nutzung eines Pipettierroboters, mehrerer 384-qPCR-Maschinen und eine automatisierte Datenanalyse durch das Programm Quantpipe (S. Arvidsson, MPI-MP, nicht publiziert).

#### **4.3.2 Zielvorhersagen**

Der weitere Ablauf des Projektes sieht vor, nach erfolgter Bestimmung der möglichen Ziele der miRNAs, einzelne Ziel-Transkripte auszuwählen und deren Abundanzen experimentell zu bestimmen, um die Korrektheit der Vorhersagen zu überprüfen. Im Folgenden soll exemplarisch genauer auf die Bedingung „Gameten“ sowie auf zwei aus dem Datensatz herausgegriffene Vorhersagen eingegangen werden.

#### **4.3.3 Beispielhafte Analyse Gameten-spezifisch regulierter miRNAs**

Während des Wechsels vom vegetativen Lebensstil in den generativen treten in *C. reinhardtii* signifikante morphologische und biochemische Änderungen auf (Harris, 2009). Diese Veränderungen werden ausgelöst durch eine differenzielle Genexpression bestimmter entwicklungsbiologisch relevanter Gene. Die unterschiedliche Expression dieser Transkripte wiederum kann durch die hoch- oder herunterregulierte Expression von komplett oder teilweise komplementären miRNAs begleitet oder eingeleitet werden. Im Falle der Gameten,

wovon sowohl mt<sup>+</sup> als auch mt<sup>-</sup> -Gameten untersucht wurden, konnte eine differenzielle Expression von 35 von 192 miRNA-Transkripten festgestellt werden (logarithmische Phase vegetativer Zellen als Referenz). Die Gametenbildung wird durch einen selektiven Entzug von Stickstoff aus dem Medium eingeleitet, daher ist es äußerst interessant, aber auch logisch, dass bei einem Wechsel der Stickstoffquelle von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Standardmedium) auf NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (alternative Stickstoffquelle), insgesamt 28 Transkripte differenziell exprimiert werden, wobei in allen Fällen dieselben miRNAs betroffen sind, wie beim Entzug der Stickstoffquelle, die zur Bildung von Gameten führt. Von diesen 28 werden 20 gemeinsam stärker exprimiert, sechs gemeinsam schwächer exprimiert und zwei entgegengesetzt reguliert. Diese Ko-Regulation erscheint sinnvoll, da mit beiden Bedingungen massive Änderungen des Stickstoffmetabolismus einhergehen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselben Stoffwechselfade betreffen.

Die Ziel-Transkripte der differenziell exprimierten miRNAs gehören zu verschiedenen Gruppen und weisen auf miRNAs als integralen Bestandteil zellulärer Prozesse hin, wie bspw. der Signaltransduktion. Es seien im Folgenden zwei konkrete Beispiele vorgestellt. Die Nummerierung der miRNAs entstammt einer internen Nomenklatur und erfolgte nach der Positionierung der miRNA auf der qPCR-Platte.

Die miRNA 171 (Abb. 3.2.8) mit der Sequenz 5'TGGGTAGTGTGGCGG-CAGGCAG-3' konnte einem potentiellen Zieltranskript zugeordnet werden, welches seinen Ursprung in der Position Chromosom 10:300155-307389 (+) hat. Diese miRNA besitzt in Gameten eine ~32-fach stärkere Expression als in vegetativ wachsenden Zellen. In dem potentiellen Ziel-Lokus ist ein Protein kodiert, welches Homologie zu einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase zeigt. Dieses besitzt eine evolutionär konservierte SAM-Domäne, die in vielen Eukaryoten an entwicklungsbiologischen Steuerungsprozessen beteiligt ist (Qiao und Bowie, 2005). Es liegt nahe zu spekulieren, dass miRNA 171 in die genetischen Umschaltungsprozesse während der Gameteninduktion involviert ist, bzw. an der Aufrechterhaltung dieses Zustandes teil hat.

Die miRNA 38, mit der Sequenz 5'TGCTGGTCAAACCGGTGGTGG-3' bindet potentiell an ein Transkript das von Chromosom 15:570271-573245 (+) stammt. Das Produkt dieses Lokus ist ein Flagellen-assoziiertes Protein. In Gameten ist diese miRNA gegenüber vegetativ gewachsenen Zellen um das ca. fünffache höher exprimiert. Flagellen dienen nicht nur die Fortbewegungs der Algen, sondern auch der Signalperzeption, bzw. der Einleitung der Bildung einer Zygote durch die Fusion zweier Gameten. Während der Paarung von *Chlamydomonas reinhardtii* lagern sich jeweils ein mt<sup>+</sup> und mt<sup>-</sup> Typ mit ihren Flagellen

aneinander. Die Interaktion zwischen Agglutininen auf der Flagellenoberfläche führt zu einer Reihe physiologischer Veränderungen (Anstieg der intrazellulären cAMP-Menge, Modifikation der extrazellulären Matrix, Ausbildung von Mating-Strukturen) in den beiden Zellen, die schlussendlich in die Fusion zu einer Zygote münden (Friedmann *et al.*, 1968; Goodenough und Jurivich, 1978; Goodenough und Weiss, 1978; Detmers *et al.*, 1983; Pijst *et al.*, 1984; Pasquale und Goodenough, 1987; Kooijman *et al.*, 1990; Zhang und Snell, 1994). Das Flagellen-assoziierte Ziel-Transkript von miRNA 38 könnte Teil dieses Mechanismus sein, doch ist zu wenig über das Ziel und das Ausmaß der Regulation bekannt, als dass fundierte Annahmen geäußert werden können.

Insgesamt konnten einige vielversprechende miRNA-Kandidaten mit dieser Methode identifiziert werden, die spezifisch unter bestimmten Wachstumsbedingungen differenzielle Expressionsmuster zeigen und nun in Folgeprojekten analysiert werden können. Problematisch kann dabei die Tatsache werden, dass eine Änderung vielleicht nur auf Proteinebene detektierbar sein könnte, sollten die Zieltranskripte nicht zerstört, sondern nur in ihrer Translation inhibiert werden. Grundsätzlich ließen sich die Änderungen auf Transkriptebeine durch Northern-Blot-Experimente bzw. qRT-PCR nachweisen. Zugleich könnten durch Western Blots oder massenspektrometrische Methoden die Proteinmengen der entsprechenden Transkripte bestimmt werden.



## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen des ersten Teils der vorliegenden Doktorarbeit konnten zwei nicht-essentielle (*rps15*, *rpl36*) und fünf essentielle (*rps3*, *rps16*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl32*) im Plastom von *Nicotiana tabacum* kodierte Proteine des plastidären Ribosoms bezüglich ihrer Essentialität charakterisiert werden. Diese Gene wurden durch gezielte Knockout-Experimente inaktiviert und die resultierenden Effekte untersucht.

Die Ergebnisse lassen einen Rückschluss auf die Lokalisation der Gene der insgesamt sieben untersuchten ribosomalen Proteine zu, die im Plastom mehrerer parasitischer, Plastiden-besitzender Spezies nicht mehr nachweisbar sind. Im Fall von *rps15* könnte tatsächlich ein Verlust des Genes stattgefunden haben, im Fall der restlichen Gene ist eher mit einem Transfer in den Nukleus zu rechnen (*rpl36* ausgenommen). Dies würde bedeuten, dass die Geschwindigkeit der erfolgreichen Etablierung eines Gentransfers in vielen parasitischen Spezies gegenüber grünen Pflanzen stark erhöht ist.

Alle in *E. coli* nicht-essentiellen Proteine mit Homologen in Plastiden (*rps15*, *rpl33*, *rpl36*) sind auch dort, trotz ~1,5 Milliarden Jahren getrennter Evolution, nicht essentiell. Dieses Ergebnis bestätigt den schon früher festgestellten hohen Konservierungsgrad der bakteriellen und plastidären Translationsmaschinerien.

Die Phänotypen der KO-Pflanzen der nicht-essentiellen Gene (*rps15*, *rpl36*) weisen auf eine interessante Rolle von S15 während der Ribosomenassemblierung hin und im Fall von L36 auf eine wichtige funktionelle Rolle im Plastiden-Ribosomen sowie auf eine Involvierung der Plastidentranslation in der Generierung eines retrograden Signals, welches die Blattform zu beeinflussen im Stande ist. Des Weiteren konnte eine Verbindung der Translationsaktivität mit der Ausbildung von Seitentrieben hergestellt werden, die vermutlich auf veränderte Auxinsynthese im Chloroplast zurückzuführen ist. Aus dem Folgeprojekt, bei dem Doppel-KO-Pflanzen nicht-essentieller ribosomaler Proteine erzeugt wurden, lässt sich auf eine relativ große Plastizität der Architektur von Plastidenribosomen schließen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte erfolgreich ein Hochdurchsatz-Screeningsystem zur semiquantitativen Analyse von 192 verschiedenen miRNAs aus *Chlamydomonas reinhardtii* etabliert werden. Es gelang durch die Untersuchung von 23 verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen sowie Entwicklungsstadien mehrere miRNAs zu identifizieren, die eine differenzielle Expression zeigen sowie unter allen untersuchten Bedingungen konstant bleibende miRNAs nachzuweisen. Dadurch konnten mehrere vielversprechende Kandidaten-miRNAs ausgemacht werden, die nun eingehender untersucht werden können.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abdallah, F.,** Salamini, F., Leister, D. (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 5:141–142.
- Abdel-Ghany, S.E. and Pilon, M.** (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283:15932–15945.
- Ahlert, D.,** Ruf, S., Bock, R. (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15730–15735.
- Alban, C.,** Job, D., Douce, R. (2000) Biotin metabolism in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:17–47.
- Albrecht, V.,** Ingenfeld, A., Apel, K. (2006) Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of Arabidopsis thaliana: The impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. *Plant Mol Biol* 60:507–518.
- Archibald, J.M.** (2009) The puzzle of plastid evolution. *Current biology* 19(2):81-8.
- Arvidsson, S.,** Kwasniewski, M., Riaño-Pachón, D.M., Mueller-Roeber, B. (2008) QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9:465.
- Arnold, K.,** Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201.
- Asada, K. and Takahashi, M.** (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam, pp 227–287
- Asada, K.** (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions 1. *Plant Physiology* 141:391-396.
- Baba, T.,** Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H. (2006) Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:0008 10.1038/msb4100050.
- Barbrook, A.C.,** Howe, C.J., Purton, S. (2006) Why are plastid genomes retained in nonphotosynthetic organisms? *Trends Plant Sci* 11:101–108.
- Barkan, A.** (1988) Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J* 7:2637–2644.

- Barkan, A.** (1998) Approaches to investigating nuclear genes that function in chloroplast biogenesis in land plants. *Methods Enzymol* 297:38–57.
- Bari, R.,** Datt, P.B., Stitt, M., Scheible, WR. (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* 141(3):988-99.
- Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Barkman, T.J.,** McNeal, J.R., Lim, S-H., Coat, G., Croom, H., Young, N., dePamphilis, C.W. (2007) Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evol Biol* 7:248.
- Bateman, J.M., and Purton, S.** (2000) Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: Expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet* 263:404–410.
- Baumann, L.,** Thao, M. L., Hess, J. M., Johnson, M.W., Baumann, P. (2002) The genetic properties of the primary endosymbionts of mealybugs differ from those of other endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Appl Environ Microbiol* 68:3198–3205.
- Baumann, L. and Baumann, P.** (2005) Cospeciation between the primary endosymbionts of mealybugs and their hosts. *Curr Microbiol* 50:84–87.
- Baumberger, N. and 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.
- Bellaoui, M.,** Keddie, J.S., Gruissem, W. (2003) DCL is a plant-specific protein required for plastid ribosomal RNA processing and embryo development. *Plant Mol Biol* 53:531–543.
- Bisanz, C.,** Bégot, L., Carol, P., Perez, P., Bligny, M., Pesey, H., Gallois, J.-L., Lerbs-Mache, S., Mache, R. (2003) The Arabidopsis nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol Biol* 51:651–663.
- Bock, R.** (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* 312:425–438.
- Bock, R.** (2007) Plastid biotechnology: Prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* 18:100–106.
- Bock, R.** (2007) Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In: Bock R (ed) *Cell and Molecular Biology of Plastids*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 29–63
- Bock, R., and Timmis, J.N.** (2008) Reconstructing evolution: Gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays* 30:556–566.

- Bock, R.** (2010) The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. *Trends in Plant Science* 15(1):11-22.
- Bock, R., Kössel, H., and Maliga, P.** (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: The lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J* 13:4623–4628.
- Bollenbach, T.J., Lange, H., Gutierrez, R., Erhardt, M., Stern, D.B., Gagliardi, D.** (2005) RNR1, a 3'–5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' maturation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 33:2751–2763.
- Bollman, K.M., Aukerman, 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.
- Brayton, K.A., Lau, A.O., Herndon, D.R., Hannick, L., Kappmeyer, L.S., Berens, S.J., Bidwell, S.L., Brown, W.C., Crabtree, J., Fadrosch, D., Feldblum, T., Forberger, H.A., Haas, B.J., Howell, J.M., Khouri, H., Koo, H., Mann, D.J., Norimine, J., Paulsen, I.T., Radune, D., Ren, Q., Smith, R.K. Jr, Suarez, C.E., White, O., Wortman, J.R., Knowles, D.P. Jr, McElwain, T.F., Nene, V.M.** (2007) Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathog* 3: e148, pp.1401–1413.
- Breakfield, N.W., Corcoran, D.L., Petricka, J.J., Shen, J., Sae-Seaw, J., Rubio-Somoza, I., Weigel, D., Ohler, U., Benfey, P.N.** (2011). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome Res* DOI 10.1101/gr.123547.111.
- Britton, R.A.** (2009) Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. *Annu Rev Microbiol* 63:155–76.
- 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.
- Börner, T., Mendel, R.R., Schiemann, J.** (1986) Nitrate reductase is not accumulated in chloroplast-ribosome-deficient mutants of higher plants. *Planta* 169:202–207.
- Bubunenko, M.G., Schmidt, J., Subramanian, A.R.** (1994). Protein substitution in chloroplast ribosome evolution. A eukaryotic cytosolic protein has replaced its organelle homologue (L23) in spinach. *J Mol Biol* 240:28–41.
- Bubunenko, M., Korepanov, A., Court, D. L., Jagannathan, I., Dickinson, D., Chaudhuri, B. R., Garber, M. B.,** (2006) 30S ribosomal subunits can be assembled in vivo without primary binding ribosomal protein S15. *RNA* 12(7):1229-39.

- Cai, X.,** Fuller, A.L., McDougald, L.R., Zhu, G. (2003) Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene* 321:39–46.
- Carrer H.,** Hockenberry T.N., Svab, Z., Maliga P., (1993) Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Molecular and General Genetics* 241(1-2):49-56.
- Carroll, O.,** Lee, C., Lao, K., Tang, F., Hajkova, P., Barton, S.C. (2006) 220-plex microRNA expression profile of a single cell. *Nature Protocols* 1:1154-1159.
- Chen, C.,** Ridzon, D., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucl Acids Res* 33(20):e179.
- Cohen, J.D.,** Slovin, J.P., Hendrickson, A.M. (2003) Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: More redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8:197–199.
- Connolly, K. and Culver, G.** (2009) Deconstructing ribosome construction. *Trends Biochem Sci* 34:256–263.
- Culver G.,** Cate, J.H., Yusupov, M.M., Noller, H.F. (1999) Identification of an RNA-Protein Bridge Spanning the Ribosomal Subunit Interface. *Science* 285(5436):2133-2135.
- Delannoy, E.,** Fujii, S., Colas des Francs-Small, C., Brundrett, M., Small, I. (2011) Rampant gene loss in the underground orchid *Rhizanthella gardneri* highlights evolutionary constraints on plastid genomes. *Mol Biol Evol* 28:2077–2086.
- Dai, X. and Zhao, P.** (2011) psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server, *Nucl Acids Res* 39:155–159.
- deKoning, A.P. and Keeling, P.J.** (2006) The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. *BMC Biol* 4:12
- Dent, R.M.,** Haglund, C.M., Chin, B.L., Kobayashi, M.C., Niyogi, K.K. (2005) Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 137(2):545-56.
- Donaher, N.,** Tanifuji, G., Onodera, N.T., Malfatti, S.A., Chain, P.S., Hara, Y., Archibald, J.M. (2009) The complete plastid genome sequence of the secondarily nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium*: reduction, compaction, and accelerated evolutionary rate. *Genome Biol Evol* 1:439-448
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.** (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13–15.

- Drescher, A.**, Ruf, S., Calsa, T., Jr., Carrer, H., Bock, R. (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* 22:97–104.
- Fleischmann, T.T.**, Scharff, L.B., Alkatib, S., Hasdorf, S., Schöttler, M.A., Bock, R. (2011) Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell* 23:3137-3155.
- Friedmann, I.**, Colwin, A.L., Colwin, L.H. (1968) Fine-structural aspects of fertilization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Sci* 3:115-128.
- Funk, H.T.**, Berg, S., Krupinska, K., Maier, U.G., Krause, K. (2007) Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *BMC Plant Biol* 7:45.
- Gantt, J.S.**, Baldauf, S.L., Calie, P.J., Weeden, N.F., Palmer, J.D. (1991). Transfer of rpl22 to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO J* 10:3073–3078.
- Gardner, M.J.**, Bishop, R., Shah, T., de Villiers, E.P., Carlton, J.M., Hall, N., Ren, Q., Paulsen, I.T., Pain, A., Berriman, M., Wilson, R.J., Sato, S., (2005) Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* 309:134–137.
- Gockel, G.**, Hachtel, W., Baier, S., Fliss, C., Henke, M. (1994) Genes for components of the chloroplast translational apparatus are conserved in the reduced 73-kb plastid DNA of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Curr Genet* 26:256–262.
- Goodenough, U.W. and Jurivich, D.** (1978) Tipping and mating structure activation induced in *Chlamydomonas* gametes by flagellar membrane antisera. *J Cell Biol* 79:680-693.
- Goodenough, U.W. and Weiss, R.L.** (1978) Interrelationships between microtubules, a striated fiber, and the gametic mating structures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 76:430-438.
- Gorman, D.S. and Levine, R.P.** (1965) *Proc Natl Acad Sci USA* 54:1665-1669.
- Gould, S.B.**, Waller, R.F., McFadden, G.I. (2008) Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology* 59:491-517.
- Gray, M.W.**, Burger, G., Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481.
- Hagemann, R.** (1964) Plasmatische Vererbung. In: Genetik - Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellung (ed. Stubbe H), vol 4, 1st edn. Gustav Fischer, Jena.
- Hager, M.**, Biehler, K., Illerhaus, J., Ruf, S., Bock, R. (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. *EMBO J* 18:5834–5842.

- Hager, M.**, Hermann, M., Biehler, K., Krieger-Liszkay, A., Bock, R. (2002) Lack of the small plastid-encoded PsbJ polypeptide results in a defective water-splitting apparatus of photosystem II, reduced photosystem I levels, and hypersensitivity to light. *J Biol Chem* 277: 4031–14039.
- Hajdukiewicz, P.T.J.**, Allison, L.A., Maliga, P. (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids, *EMBO Journal* 16(13):4041-4048.
- Han, C.D.**, Coe, E.H., Jr., Martienssen, R.A. (1992) Molecular cloning and characterization of iojap (ij), a pattern striping gene of maize. *EMBO J* 11:4037–4046.
- Han, J.**, Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027.
- Harris, E.**, (2009) The Chlamydomonas Sourcebook. 2. Edition. Academic Press, Elsevier, Oxford, Burlington, San Diego.
- He, L., and Hannon, G.J.** (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* 5(7):522-31.
- Held, W.A.**, Mizushima, S., Nomura, M. (1973) Reconstitution of *Escherichia coli* 30 S Ribosomal Subunits from Purified Molecular Components *J Biol Chem* 248:5720–5730.
- Hess, W.R.**, Hoch, B., Zeltz, P., Hübschmann, T., Kössel, H., Börner, T. (1994a) Inefficient rpl2 splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* 6:1455–1465.
- Hess, W.R.**, Müller, A., Nagy, F., Börner, T. (1994b) Ribosomedeficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: Genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol Gen Genet* 242:305–312.
- Hinas, A.**, Reimegard, J., Wagner, E.G., Nellen, W., Ambros, V.R., 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.
- Huang F.C.**, Klaus, S., Herz, S., Zou, Z., Koop, H.U., Golds, T. (2002) Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection. *Molecular Genetics and Genomics* 268(1):19-27.
- Huang, C.Y.**, Ayliffe, M.A., Timmis, J.N. (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422:72–76.
- Hutner et al.**, (1950) *Proc Am Philos Soc* 94:152-170
- Ikegami, A.**, Nishiyama, K., Matsuyama, S., Tokuda, H. (2005) Disruption of rpmJ encoding ribosomal protein L36 decreases the expression of secY upstream of the spc operon and inhibits protein translocation in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:1595–1602.

- Jacques, N. and Dreyfus, M.** (1990) *Translation initiation in Escherichia coli: old and new questions. Mol Microbiol* 4:1063–1067.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A., Sunkar, R.** (2009) Biotic and abiotic stress downregulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta* 229:1009–1014.
- Jansen, R.K., Cai, Z., Raubeson, L.A., Daniell, H., dePamphilis, C.W., Leebens-Mack, J.H., Müller, K.F., Guisinger-Bellian, M., Haberle, R.C., Hansen, A.K., Chumley, T.W., Lee, S.B., Peery, R., McNeal, J.R., Kuehl, J.V., Boore, J.L.** (2007) Analysis of 81 genes from 64 plastid genomes resolves relationships in angiosperms and identifies genome-scale evolutionary patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19369–19374.
- Janouskovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukes, J., Keeling, P.J.** (2010) A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(24):10949–54.
- Jia, X., Wang, W.X., Ren, L.G., Chen, Q.G., Mendu, V., Willcut, B., Dinkins, R., Tang, X.Q., Tang, G.L.** (2009a) Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 71:51–59.
- Jia, X., Ren, L., Chen, Q.J., Li, R., Tang, G.** (2009b) UV-B-responsive microRNAs in *Populus tremula*. *J Plant Physiol* 166:2046–2057.
- Kaczanowska, M. and Rydén-Aulin, M.** (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol Biol Rev* 71:477–494.
- Kahlau, S. and Bock, R.** (2008) Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: Chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *Plant Cell* 20:856–874.
- Karbstein, K.** (2007) Role of GTPases in ribosome assembly. *Biopolymers* 87:1–11.
- Keeling, P.J. and Palmer, J.D.** (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* 9(8):605–18.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T.** (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources *Nucl Acids Res* 37:387–392.
- Kitazaki, K. and Kubo, T.** (2010) Cost of Having the Largest Mitochondrial Genome: Evolutionary Mechanism of Plant Mitochondrial Genome. *Journal of Botany*, 1:12.
- Kleine, T., Voigt, C., Leister, D.** (2009) Plastid signalling to the nucleus: Messengers still lost in the mists? *Trends Genet* 25:185–192.
- Kode, V., Mudd, E.A., Iamtham, S., Day, A.** (2005) The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J* 44:237–244.

- Kooijman, R.**, de Wildt, P., Beumer, S., van der Vliet, G., Homan, W., Kalshoven, H., Musgrave, A., van den Ende, H. (1989) Wheat germ agglutinin induces mating reactions in *Chlamydomonas eugametos* by cross-linking agglutinin-associated glycoproteins in the flagellar membrane. *J Cell Biol* 109:1677-1687.
- Koussevitzky, S.**, Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., and Chory, J. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316:715–719.
- Kössel, H.**, Natt, E., Strittmatter, G., Fritzsche, E., Gozdicka-Jozefiak, A. Przybyl, D. (1985) Structure and expression of rRNA operons from plastids of higher plants. In *Molecular Form and Function of the Plant Genome* (van Vloten-Doting, L., Groot, G.S.P. and Hall, T.C., eds). New York: *Plenum Press* pp.183–198.
- Krause, K.** (2008) From chloroplasts to “cryptic” plastids: Evolution of plastid genomes in parasitic plants. *Curr Genet* 54:111–121.
- Krause, K.** (2011) Piecing together the puzzle of parasitic plant plastome evolution. *Review Planta* 234(4):647-56.
- Kuroda, H. and Maliga, P.** (2003) The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development. *Nature* 425:86–89.
- Lang, B.F.**, Gray, M.W., Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33:351-397.
- Larkin, R.M. and Ruckle, M.E.** (2008) Integration of light and plastid signals. *Curr Opin Plant Biol* 11:593–599.
- Liere, K. and Link, G.** (1995) RNA binding activity of the matK protein encoded by the chloroplast trnK intron from mustard (*Sinapis alba*). *Nucl Acids Res* 23:917–921.
- Logacheva, M.D.**, Schelkunov, M.I., Penin, A.A. (2011) Sequencing and Analysis of Plastid Genome in Mycoheterotrophic Orchid *Neottia nidus-avis*. *Genome Biol Evol* 3:1296-1303.
- Li, W.**, Ruf, S., Bock, R. (2011) Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. *Plant Molecular Biology* 76:443-451.
- Lim, L.P.**, Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2003) Vertebrate MicroRNA Genes. *Science* 299:2142-2142.
- Lobbes, D.**, Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C., Clarke, J. (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep* 7:152-158.
- Maeder, C. and Draper, D.E.** (2005) A small protein unique to bacteria organizes rRNA tertiary structure over an extensive region of the 50 S ribosomal subunit. *J Mol Bio* 354:436–446.

- Maier, R.M.**, Neckermann, K., Igloi, G.L. Kossel, H. (1995) Complete Sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* 251(5):614-628 .
- Mar, J. C.**, Kimura, Y., Schroder, K., Irvine, K. M., Hayashizaki, Y., Suzuki, H., Hume, D., (2009) Data-driven normalization strategies for high-throughput quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics*, 10:110.
- Maliga, P.** (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 55:289–313.
- Maliga, P. and Bock, R.** (2011) Plastid biotechnology: Food, fuel, and medicine for the 21st century. *Plant Physiol* 155:1501–1510.
- Manuell, A.L.** Quispe, J., Mayfield, S.P. (2007) Structure of the chloroplast ribosome: Novel domains for translation regulation. *PLoS Biol* 5: e209.
- Marchetti, A.**, Parker, M.S., Moccia, L.P., Lin, E.O., Arrieta, A.L., Ribalet, F., Murphy, M. E. P., (2009) Ferritin is used for iron storage in bloom-forming marine pennate diatoms. *Nature*, 457(7228):467-70.
- Mereschkowsky, C.** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. In: *Biologisches Centralblatt* Bd. 25, S. 593-604.
- Mestdagh, P.**, Feys, T., Bernard, N., Guenther, S., Chen, C., Speleman, F., Vandesompele, J. (2008) High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucl Acids Res* 36(21), e143.
- 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 5' terminal nucleotide. *Cell* 133:116-127.
- Millar, A.A. and Waterhouse, P. M.** (2005) Plant and animal microRNAs : similarities and differences. *Genes & Development* 129-135.
- Mizushima, S. and Nomura, M.** (1970) Assembly mapping of 30S ribosomal proteins in *E. coli* *Nature* 226:1214–1218.
- Moran, N.**, McCutcheon, J. P., Nakabachi, A. (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics* 42:165-90.
- Morel, J.B.**, Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H. (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in posttranscriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14:629-639.
- Montgomery, T.A.**, Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., Carrington, J.C. (2008) Specificity of

ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133:128-141.

**Morita-Yamamuro, C.,** Tsutsui, T., Tanaka, A., & Yamaguchi, J. (2004) Knock-out of the Plastid Ribosomal Protein S21 Causes Impaired Photosynthesis and Sugar-Response during Germination and Seedling Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 45(6):781-788.

**Mulder, M.,** Yoshioka, C., Beck, H., Bunner, E., Milligan, R., Potter, C. S., Carragher, B., (2010) Visualizing Ribosome Biogenesis: Parallel Assembly Pathways for the 30S Subunit. *Science* 330(6004):673-677.

**Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.

**Nakabachi, A.,** Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A., Hattori, M. (2008) The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science* 13:314.

**Naqvi, A.R.,** Sarwat, M., Hasan, S., & Choudhury, N. R. (2012) Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. *Journal of cellular physiology* 1-23.

**Neuhaus, H.E. and Emes, M.J.** (2000) Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:111-14.

**Normanly, J.,** Cohen, J.D., Fink, G.R. (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10355-10359.

**Ohyama, K.,** Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuch, H., Oreki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572-574.

**Ohlrogge, J. and Browse, J.** (1995) Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* 7:957-970.

**Ong, H.C.,** Wilhelm, S.W., Gobler, C.J., Bullerjahn, G., Jacobs, M.A., McKay, J., Sims, E.H., Gillett, W.G., Zhou, Y., Haugen, E., Rocap, G. Cattolico, R.A. (2010) Analyses of the complete chloroplast genome sequences of two members of the Pelagophyceae: *Aureococcus anophagefferens* CCMP1984 and *Aureoumbra lagunensis* CCMP1507. *J Phycol* 46(3):602-615.

**Palmer, J.D.** (1991) Plastid chromosomes: structure and evolution. In: Bogorad L, Vasil IK (eds) *Cell Culture and Somatic Genetics of Plant*, vol 7A. *Molecular Biology of Plastids*, Academic Press, San Diego, pp 5-53.

- Palmer, J.D.**, Soltis, D.E., Chase, M.W. (2004) The plant tree of life: an overview and some points of view. *Am J Bot* 91:1437–1445.
- Pant, B.D.**, Buhtz, A., Kehr, J., Scheible, W.R. (2008) Long-distance movement and differential targeting of microRNA399s. *Plant Signal Behav* 3(9):730–732.
- Park, M.Y.**, Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., Poethig, R.S. (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3691–3696.
- Pasquinelli, A. E. and Ruvkun, G.** (2002) Control of developmental timing by micrnas and their targets. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:495–513.
- Pasquale, S.M. and Goodenough, U.W.** (1987) Cyclic AMP functions as a primary sexual signal in gametes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 105:2279-2292.
- Peitsch, M.C.** (1995) Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13:658-660.
- Pesaresi, P.**, Varotto, C., Meurer, È., Jahns, P., Salamini, F., Leister, D., Str, M., (2001) Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in Arabidopsis : effects on mRNA translation and photosynthesis. *Science* 27:179-189.
- Petersen, K.**, Karcher, D., Thiele, W., Schöttler, M. A., Bock, R., (2011) Elimination of a group II intron from a plastid gene causes a mutant phenotype. *Nucl Acids Res* 49(0)
- Pijst, H.L.A.**, van Driel, R., Janssens, P.M.W., Musgrave, A., and van den Ende, H. (1984) Cyclic AMP is involved in sexual reproduction of *Chlamydomonas eugametos*. *FEBS Lett* 174:132-136.
- Pierce, S.K.**, Curtis, N.E., Hanten, J., Boerner, S.L., Schwartz, J.A. (2007) Transfer, integration and expression of functional nuclear genes between multicellular species. *Symbiosis* 43:57–64.
- Poethig, R.S. and Sussex I.M.** (1985) The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta* 165:158-169.
- Pogson, B.J.**, Woo, N.S., Förster, B., Small, I.D. (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci* 13:602–609.
- Porra, R.J.**, Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975:384–394.
- Qiao, F. and Bowie, J. U.** (2005) The many faces of SAM. *Sc. STKE*, re7.
- Rajagopal, R.**, Vaucheret, H., Trejo, J., Bartel, D.P. (2006) A diverse evolutionary fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 20:3407-3425.

- Rapparini, F.,** Cohen, J.D., Slovin, J.P. (1999) Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Lemna gibba* studied using stable isotope labeled anthranilate and tryptophan. *Plant Growth Regul* 27:139–144.
- Rapparini, F.,** Tam, Y.Y., Cohen, J.D., Slovin, J.P. (2002) Indole-3-acetic acid metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiol* 128:1410–1416.
- Ray, P. and Pearson, M.,** (1975) Functional inactivation of bacteriophage  $\lambda$  morphogenetic gene mRNA. *Nature* 253:647 – 650.
- Reyes-Prieto, A.,** Weber, A. P. M., Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annual Review of Genetics* 41:147-168.
- Robbens, S.,** Derelle, E., Ferraz, C., Wuyts, J., Moreau, H., Van de Peer, Y. (2007) The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol Biol Evol* 24(4):956-968.
- Rodnina, M.,** Wintermeyer, W., Green, R. (2011) In: Ribosomes: Structure, Function and Dynamics, 1. Auflage, Springer-Verlag, Wien.
- Rogalski, M.,** Ruf, S., Bock, R. (2006) Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Res* 34:4537–4545.
- Rogalski, M.,** Karcher, D., Bock, R. (2008a) Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets. *Nat Struct Mol Biol* 15:192–198.
- Rogalski, M.,** Schöttler, M.A., Thiele, W., Schulze, W.X., Bock, R. (2008b) Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *Plant Cell* 20:2221–2237.
- Röhl, R. and Nierhaus, K.H.** (1982) Assembly map of the large subunit (50S) of *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(3):729-33.
- Ruf, S.,** Kössel, H., Bock, R. (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol* 139:95–102.
- Rumpho, M.E.,** Worful, J.M., Lee, J., Kannan, K., Tyler, M.S., Bhattacharya, D., Moustafa, A. (2008) Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *PNAS* 105:17867-17871
- Sambrook, J. and Russel, D.** (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laborator.

- Sasaki, Y. and Nagano, Y.** (2004) Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1175–1184.
- Sato, S.,** Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Tabata, S. (1999) Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 6(5):283-290.
- Scharff, L.B. and Koop, H.U.** (2007) Targeted inactivation of the tobacco plastome origins of replication A and B. *Plant J.* 50(5):782-94.
- Schimper, F.W.** (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. In: *Bot Z* 41:102-113.
- Schön, A.,** Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C.G., Söll, D. (1986) The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* 322:281–284.
- Schöttler, M.A.,** Flügel, C., Thiele, W., Bock, R. (2007a) Knockout of the plastid-encoded PetL subunit results in reduced stability and accelerated leaf age-dependent loss of the cytochrome b6f complex. *J Biol Chem* 282:976–985.
- Schöttler, M.A.,** Flügel, C., Thiele, W., Stegemann, S., Bock, R. (2007b) The plastome-encoded PsaJ subunit is required for efficient Photosystem I excitation, but not for plastocyanin oxidation in tobacco. *Biochem J* 403:251–260.
- Schöttler, M.A.,** Albus, C.A., Bock, R. (2011) Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 168:1452-1461.
- Schwemmler, J.** (1941) Weitere Untersuchungen an *Eu-Oenotheren* über die genetische Bedeutung des Plasmas und der Plastiden. *Z. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre* 79: 321–333.
- Schwemmler, J.** (1943) Plastiden und Genmanifestation. *Flora* 137:61–72.
- Shajani, Z.,** Sykes, M. T., Williamson, J. R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. *Annual Review of Biochemistry* 80:501-26.
- Sharma, M.R.,** Wilson, D.N., Datta, P.P., Barat, C., Schluenzen, F., Fucini, P., Agrawal, R.K. (2007) Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19315–19320.
- Sharma, M.R.,** Do, A., Barat, C., Marquez, V., Datta, P. P., Fucini, P., Wilson, D. N., (2010) PSRP1 Is Not a Ribosomal Protein , but a Ribosome-binding Factor That Is Recycled by the Ribosome-recycling Factor ( RRF ) and Elongation Factor G ( EF-G ). *Journal of Biological Chemistry* 285(6):4006-4014.

- Sheppard, A.E. and Timmis, J.N.** (2009) Instability of plastid DNA in the nuclear genome. *PLoS Genet* 5:e1000323.
- Shikanai, T.,** Shimizu, K., Ueda, K., Nishimura, Y., Kuroiwa, T., Hashimoto, T. (2001) The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol* 42:264–273.
- Shinozaki, K.,** Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugital, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J* 5:2043–2049.
- Sitte, P.,** Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1999) In: Strasburger Lehrbuch der Botanik, 34. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Stanke, M.,** Steinkamp, R., Waack, S., Morgenstern, B. (2004) AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucl Acids Res* 32:309-312.
- Stegemann, S. and Bock, R.** (2006) Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. *Plant Cell* 18:2869–2878.
- Stegemann, S.,** Hartmann, S., Ruf, S., Bock, R. (2003) Highfrequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8828–8833.
- Sueoka, N.** (1960) *Proc Natl Acad Sci USA* 46:83-91.
- Sugiura, M.** (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* 19:149–168.
- 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* 18:2051–2065.
- Svab, Z. and Maliga, P.** (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:913–917.
- Svensson, P.,** Craven, G.R., Noller, H.F. (1988) Interaction of Ribosomal Proteins, S6, S8, S15 and S18 with the Central Domain of 16 S Ribosomal RNA. *Methods* 301-308.
- Sykes, M.T. and Williamson, J. R.** (2009) A complex assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Annual Review of Biophysics* 38:197-215.
- Sykes, M.T.,** Shajani, Z., Sperling, E., Beck, A.H., Williamson, J.R. (2010) Quantitative proteomic analysis of ribosome assembly and turnover in vivo. *J Mol Biol* 403:331–345.
- Takahashi, S. and Badger, M.R.** (2011) Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci* 16:53–60.

- Talkington, M.W.T.,** Siuzdak, G., Williamson, J.R. (2005) An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature* 438:628–632.
- Tamames, J.,** Gil, R., Latorre, A., Peretó, J., Silva, F. J., & Moya, A. (2007) The frontier between cell and organelle: genome analysis of *Candidatus Carsonella ruddii*. *BMC Evolutionary Biology* 7:181.
- Tiller, N.,** Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schöttler, M. A., Bock, R. (2012) The plastid specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant J* 69(2):302-16.
- Timmis, J.N.,** Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5:123–135.
- Tsukaya, H.** (2003) Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 6(1): 57-62.
- Turmel, M.,** Gagnon, M.C., O'Kelly, C.J., Otis, C., Lemieux, C. (2009) The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol Biol Evol* 26(3):631-648.
- Ueda, M.,** Fujimoto, M., Arimura, S., Murata, J., Tsutsumi, N., Kadowaki, K. (2007) Loss of the *rpl32* gene from the chloroplast genome and subsequent acquisition of a preexisting transit peptide within the nuclear gene in *Populus*. *Gene* 402:51–56.
- Udvardi, M.K.,** Czechowski, T., Scheible, W.-R. (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20(7):1736-7.
- Valkov, V.T.,** Scotti, N., Kahlau, S., Maclean, D., Grillo, S., Gray, J. C., Bock, R. (2009) Genome-Wide Analysis of Plastid Gene Expression in Potato Leaf Chloroplasts and Tuber Amyloplasts : Transcriptional and Posttranscriptional Control. *Plant Physiology* 150:2030–2044.
- Vaucheret, H.,** Mallory, A.C., Bartel, D.P. (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol Cell* 22:129-136.
- Walter, M.,** Piepenburg, K., Schöttler, M.A., Petersen, K., Kahlau, S., Tiller, N., Drechsel, O., Weingartner, M., Kudla, J., and Bock, R. (2010) Knockout of the plastid RNase E leads to defective RNA processing and chloroplast ribosome deficiency. *Plant J* 64:851–863.
- Wang, D.,** Wu, Y.-W., Shih, A. C.-C., Wu, C.-S., Wang, Y.-N., Chaw, S.-M. (2007) Transfer of chloroplast genomic DNA to mitochondrial genome occurred at least 300 MYA. *Molecular Biology and Evolution* 24(9):2040-8.

- Wicke, S.,** Schneeweiss, G. M., Depamphilis, C. W., Müller, K. F., Quandt, D. (2011) The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Molecular Biology* 76(3-5):273-97.
- Wickett, N.J.,** Zhang, Y., Hansen, S.K., Roper, J.M., Kuehl, J.V., Plock, S.A., Wolf, P.G., DePamphilis, C.W., Boore, J.L., Goffinet, B. (2008) Functional gene losses occur with minimal size reduction in the plastid genome of the parasitic liverwort *Aneura mirabilis*. *Mol Biol Evol* 25(2):393-401.
- Wilson, D.N. and Nierhaus, K.H.** (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit Rev Biochem Mol* 42:187–219.
- Wilson, R.J.M.** (2002) Progress with parasite plastids. *J Mol Biol* 319:257–274.
- Wilson, R.J.M. and Williamson, D.H.** (1997) Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Mol Biol Rev* 61:1–16.
- Wolfe, K.H.,** Morden, C.W., Palmer, J.D. (1992) Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10648–10652.
- Woodson, S.A.** (2008) RNA folding and ribosome assembly. *Curr Opin Chem Biol* 12:667–673.
- Woodward, A.W. and Bartel, B.** (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95:707–735.
- Worden, A.Z.,** Lee, J.-H., Mock, T., Rouze, P., Simmons, M.P., Aerts, A.L., Allen, A.E., Cuvelier, M.L., Derelle, E., Everett, M.V., Foulon, E., Grimwood, J., Gundlach, H., Henrissat, B., Napoli, C., McDonald, S.M., Schnitzler, X., Parker, M., Rombauts, S., Salamov, A., Von Dassow, P., Badger, J.H., Coutinho, P.M., Demir, E., Dubchak, I., Gentemann, C., Eikrem, W., Gready, J.E., John, U., Lanier, W., Lindquist, E.A., Lucas, S., Mayer, K.F.X., Moreau, H., Not, F., Otiillar, R., Panaud, O., Pangilinan, J., Paulsen, I., Piegu, B., Poliakov, A., Robbens, S., Schmutz, J., Toulza, E., Wyss, T., Zelensky, A., Zhou, K., Armbrust, E.V., Bhattacharya, D., Goodenough, U.W., Van de Peer, Y., Grigoriev, I.V. (nicht publiziert) Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas* (Sequence submitted to NCBI in 2009).
- Wu, G. and Poethig, R. S.** (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133(18):3539-47.
- 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.

- Yamaguchi, K. and Subramanian, A.R.** (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem* 275:28466–28482.
- Yamaguchi, K.,** von Knoblauch, K., Subramanian, A.R. (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem* 275:28455–28465.
- Yamaguchi, K. and Subramanian, A.R.** (2003) Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *Eur J Biochem* 270:190–205.
- Yamaguchi, A.,** Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R.S., Wagner, D. (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Dev Cell* 17:268–278.
- Yamasaki, H.,** Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Pilon, M. (2007) Regulation of copper homeostasis by microRNA in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282:16369–16378.
- Zhang, L.,** Chia, J.-M., Kumari, S., Stein, J.C., Liu, Z., (2009) A Genome-Wide Characterization of MicroRNA Genes in Maize. *PLoS Genet* 5:e1000716.
- Zhang, Y. and Snell, W.J.** (1994) Flagellar adhesion-dependent regulation of Chlamydomonas adenylyl cyclase in vitro: a possible role for protein kinases in sexual signalling. *J Cell Biol* 125:617-624.
- Zhu, C.,** Ding, Y., Liu, H. (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum* 143(1):1-9.
- Zimmer, C.,** On the Origin of Eukaryotes. (2009) *Science* 325(5941):666-668.
- Zou, Z.,** Eibl, C., Koop, H.-U. (2003) The stem-loop region of the tobacco psbA 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Mol Genet Genomics* 269:340–349.
- Zubko, M.K. and Day, A.** (1998) Stable albinism induced without mutagenesis: A model for ribosome-free plastid inheritance. *Plant J* 15:265–271.



## 7. Publikationsliste

**Fleischmann, T.T.**, Scharff, L.B., Alkatib, S., Hasdorf, S., Schöttler, M.A., Bock, R. (2011) Nonessential Plastid-Encoded Ribosomal Proteins in Tobacco: A Developmental Role for Plastid Translation and Implications for Reductive Genome Evolution. *Plant Cell* 23:3137-3155.

Manuskript, eingereicht bei Nucleic Acids Research Februar 2012:

Alkatib, S., **Fleischmann, T.T.**, Scharff, L.B., Bock, R. (2012) Evolutionary constraints on the plastid tRNA set decoding methionine and Isoleucine (Arbeitstitel) (geteilte Erstautorenschaft mit S. Alkatib)

Manuskript in Vorbereitung:

Alkatib S., **Fleischmann T.T.**, Scharff L.B., Rogalski M., Ruf, S., Seeger, S., Bock, R. (2012) Arbeitstitel: Superwobbling in plastids

Konferenzen:

miRNA world congress, Boston, 2011: Posterpräsentation: Detection and characterization of miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*, **Fleischmann, T.T.**, May, P., Albus, C., Scharff, L.B., Bock, R.

ISEG, Berlin, 2009: Posterpräsentation: Knockout of plastid ribosomal protein genes, **Fleischmann, T.T.**, Alkatib, S., Scharff, L.B., Bock, R.

Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, 2010: Posterpräsentation: Knockout of plastid ribosomal protein genes, **Fleischmann, T.T.**, Alkatib, S., Scharff, L.B., Bock, R.



## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit selbstständig von mir angefertigt wurde, und dabei keine weiteren Quellen, Hilfsmittel, sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Texte verwendet wurde, als jene, die als solches kenntlich gemacht sind.

Potsdam, den



## 9. Danksagung

Ich möchte allen Danken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Dazu gehören vor allem Ralph Bock, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesen Projekten zu arbeiten und Lars Scharff, der mich über die vergangenen 3 Jahre im Labor betreut hat.

Dank geht ebenso an Sibah Alkatib und Marcelo Rogalski, für die zum Teil gemeinsame Arbeit an sich gegenseitig durchflechtenden Projekten. Der Pflanzentransformationsgruppe um Stephanie Ruf und ihrer unermüdlichen Arbeit in der Gewebekultur bin ich zu Dank verpflichtet, genauso wie den Gärtnern Britta Hausmann und Helga Kulka für ihre Arbeit im Gewächshaus. Außerdem sei Mark Aurel Schöttler, Wolfram Thiele und Sebastian Hasdorf für ihre „Photosynthesemessungen“ gedankt. Auch danke ich Patrick May, Christin Albus, Dirk Walther, Juliane Neupert und Samuel Arvidsson für ihre Vor- und Mitarbeit am miRNA-Projekt.

Ich loser Reihenfolge seien alle weiteren Personen genannt, die mir durch größere oder kleinere Hilfestellungen zur Seite standen: Ina Talke, Zouhair Elghabi, Oliver Drechsel, Annemarie Matthes, Maria Piques, Ian Small, Claudia Hasse, Pierre Endries, Stefanie Seeger, Yvonne Weber, Thomas Thomik, Emanuel Devers, Anja Klevesath, Daniel Karcher, Jens Rupprecht, Michael Schroda, Ning Shao, Daniela Strenkert, Stefan Schmollinger, Flavia Vischi-Wink, Fred Sommer, Sabeeha Merchant, Björn Usadel, Federico Giorgi, Armin Schlereth, Nadine Tiller, Rodrigo Caroca, Grit Rubin, Wolf Scheible, Magdalena Musialak-Lange, Umesh Prasad Yadav, Ellen Zuther, Muhammad Waqar Hameed, Michael Schroda, Wolf-Rüdiger Scheible, Hirofumi Ishihara, die Hiwis.

Daneben möchte ich allen Menschen danken, die mir ihre zwischenmenschliche Unterstützung zukommen ließen, und nicht zuletzt Gott, der mir immer wieder aufs neue die Kraft gegeben hat weiterzumachen.



## 10. Anhang

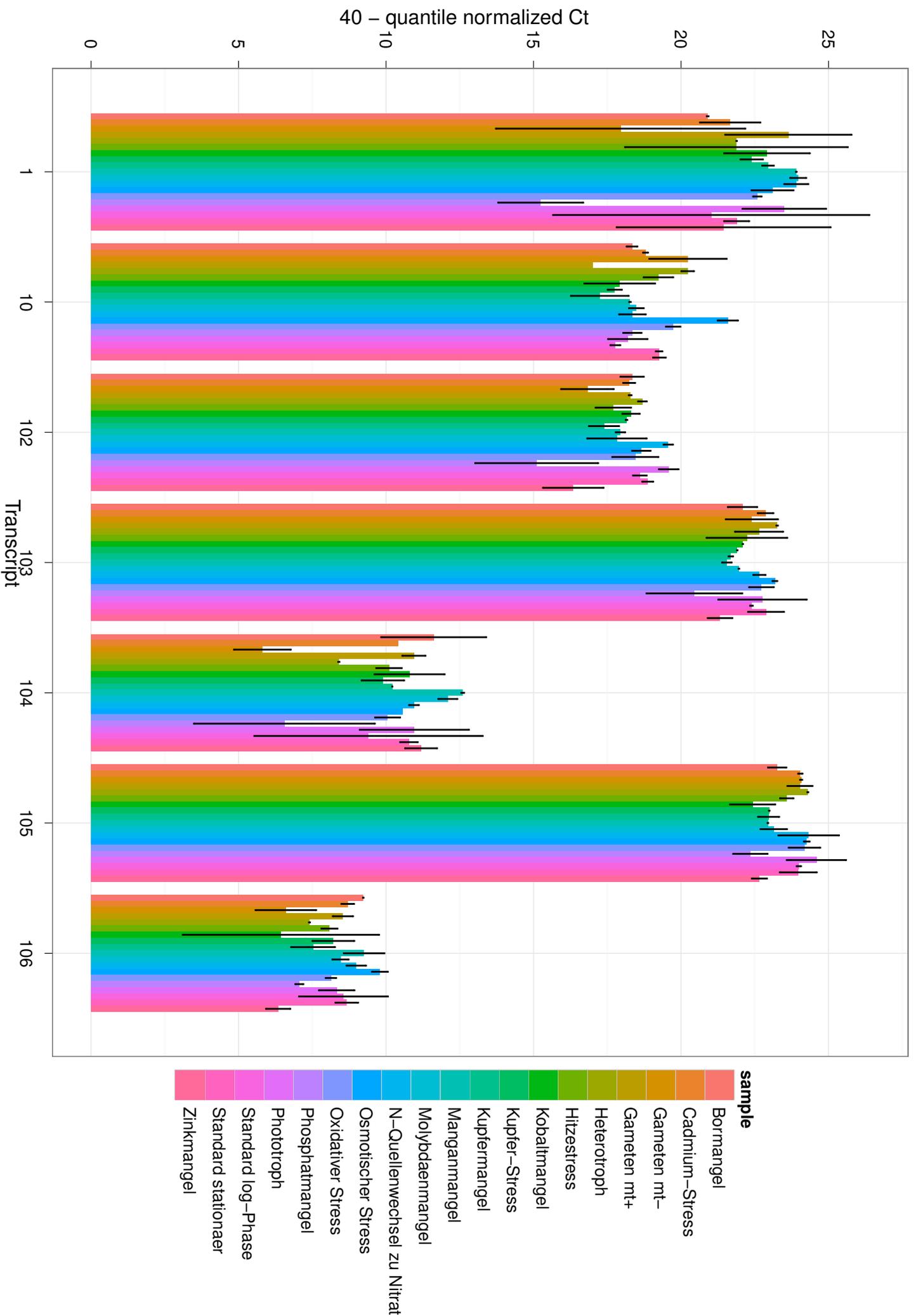
### 10.1 Untersuchungsergebnisse der Massenspektrometrie

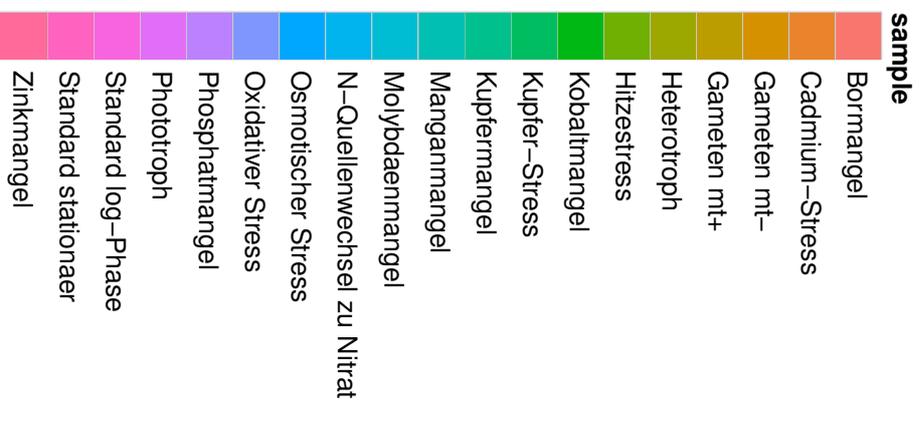
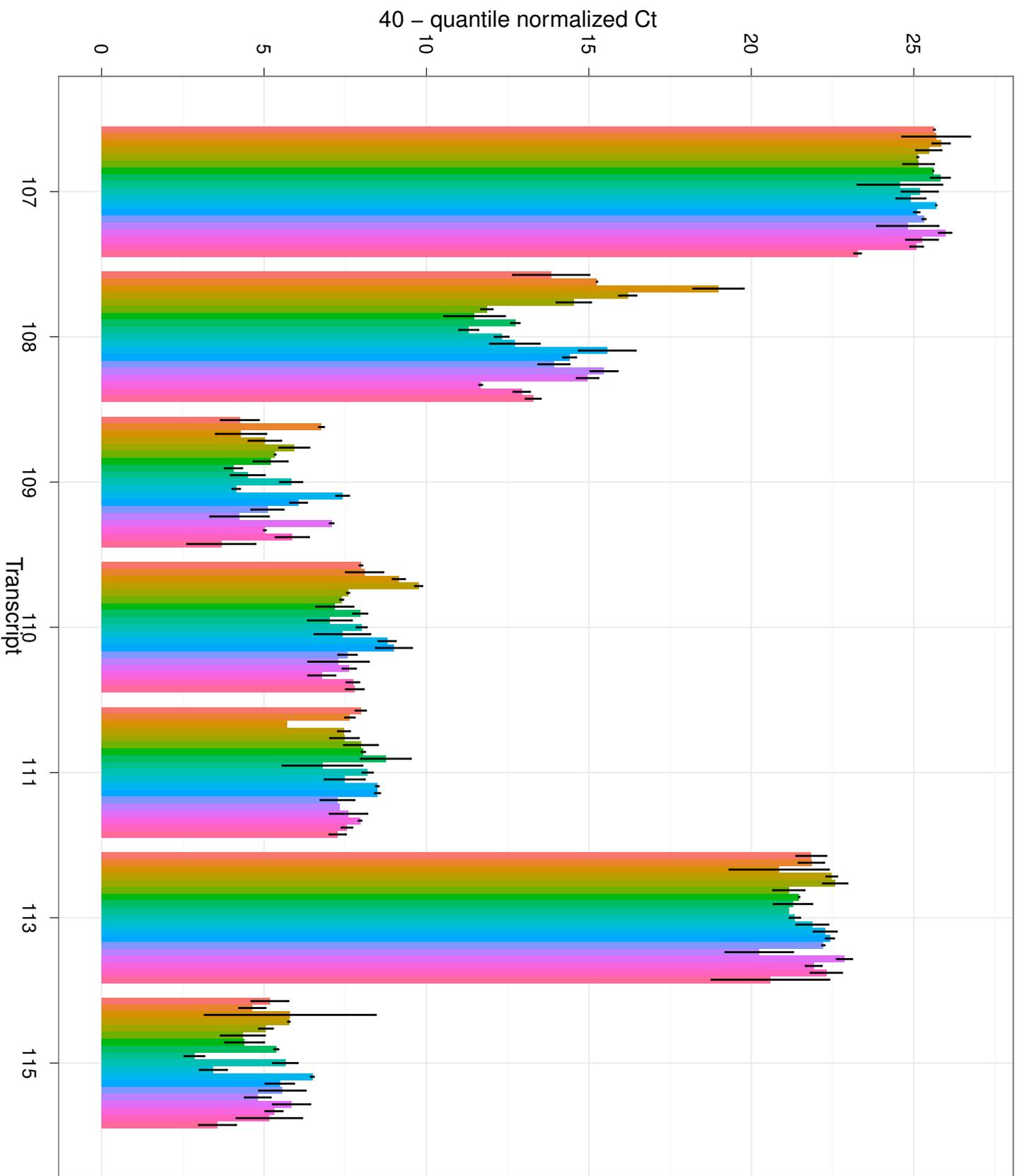
Tab. S1: Vergleichende massenspektrometrische Analyse von plastidären ribosomalen Proteinen des Wildtyps und der  $\Delta rps15$ -Pflanzen. *Score*: Protein score, der sich aus der Anwendung des Mascot-Algorithmus ergibt (www.matrixscience.com); *Distinct peptides*: Anzahl der nachgewiesenen distinkten Peptide desselben Proteins. Im Wildtyp und in der Mutante konnten die aufgelisteten Proteine nachgewiesen werden. S15 fehlt in der Mutante (aus Fleischmann *et al.*, 2011).

Small subunit				
	Score		Distinct peptides	
Ribosomal protein	WT	$\Delta rps15$	WT	$\Delta rps15$
S1	59	66	1	1
S3	242	443	1	2
S5	133	66	1	1
S6	117	281	1	2
S7	72	116	1	2
S9	83	113	1	1
S11	63	52	1	1
S12	44	29	1	1
S15	260	n.d.	2	n.d.
S16	235	416	1	2
S18	75	39	1	1
Large subunit				
	Score		Distinct peptides	
Ribosomal protein	WT	$\Delta rps15$	WT	$\Delta rps15$
L3	1189	1939	5	6
L4	429	380	3	3
L10	72	134	2	3
L11	397	2018	3	3
L12	997	1437	5	5
L14	243	224	2	2
L16	235	56	1	1
L19	596	490	1	1
L24	785	738	3	3
L28	297	230	1	1

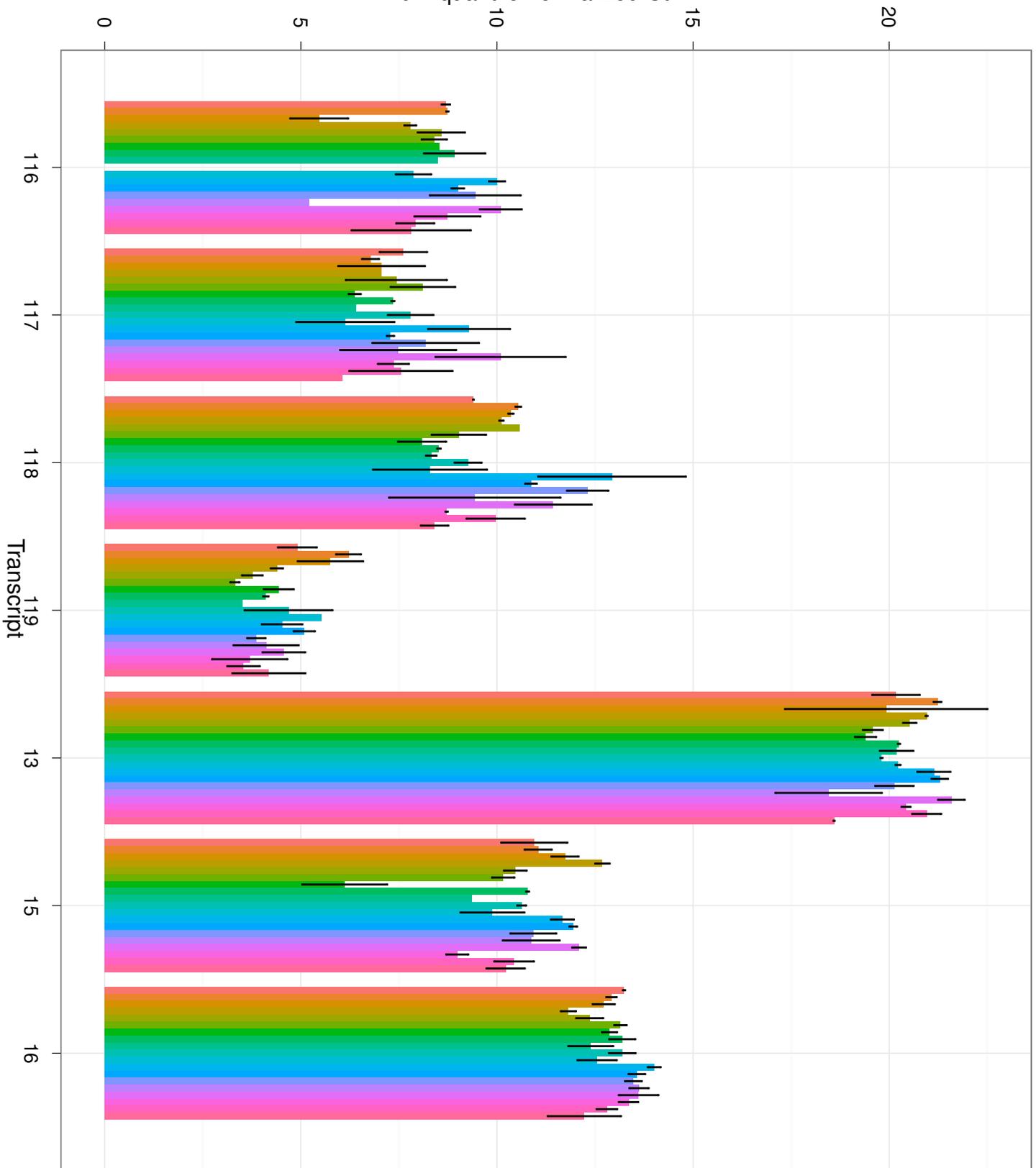
## **10.2 Messergebnisse der SL-qRT-PCR**

Von den 23 analysierten Bedingungen sind hier nur 19 abgedruckt, da die Qualität der restlichen vier (Kaliumentzug, Eisenentzug, Schwefelentzug, Kältestress) nicht ausreichend war, und diese wiederholt werden müssen.



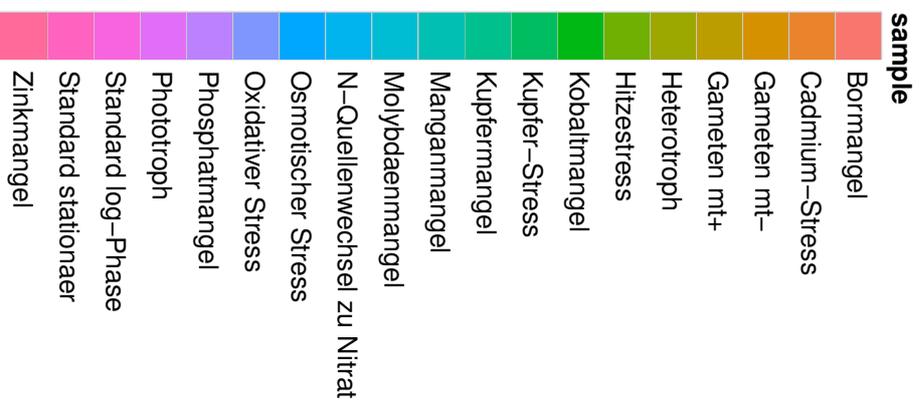
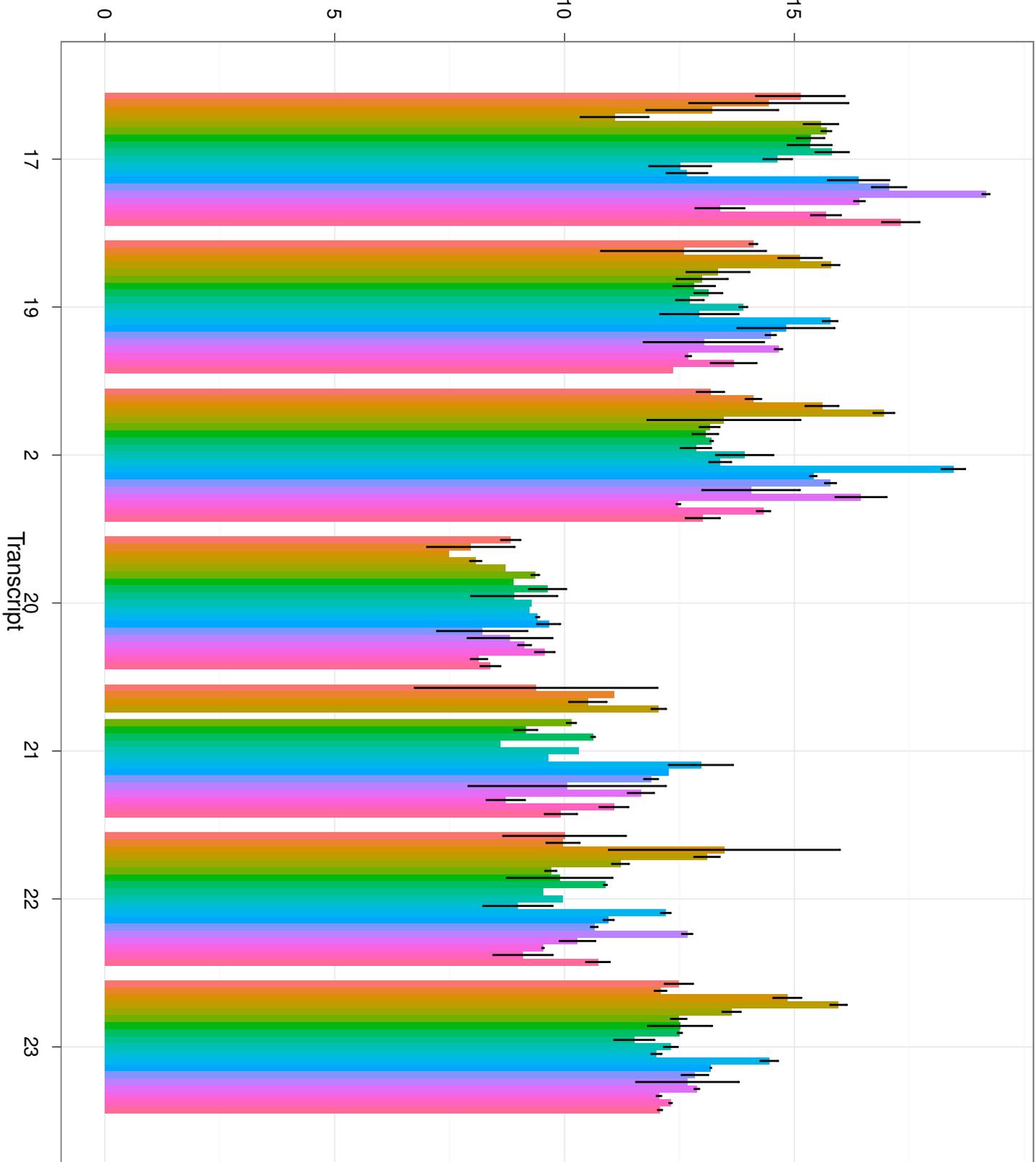


40 – quantile normalized Ct

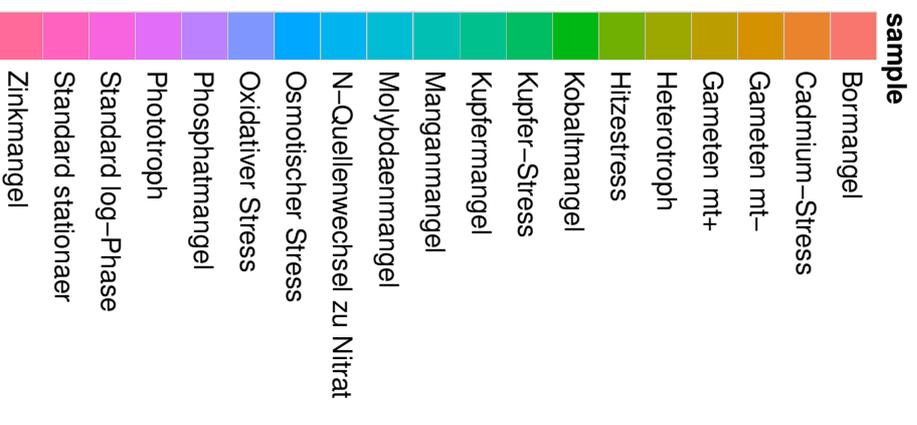
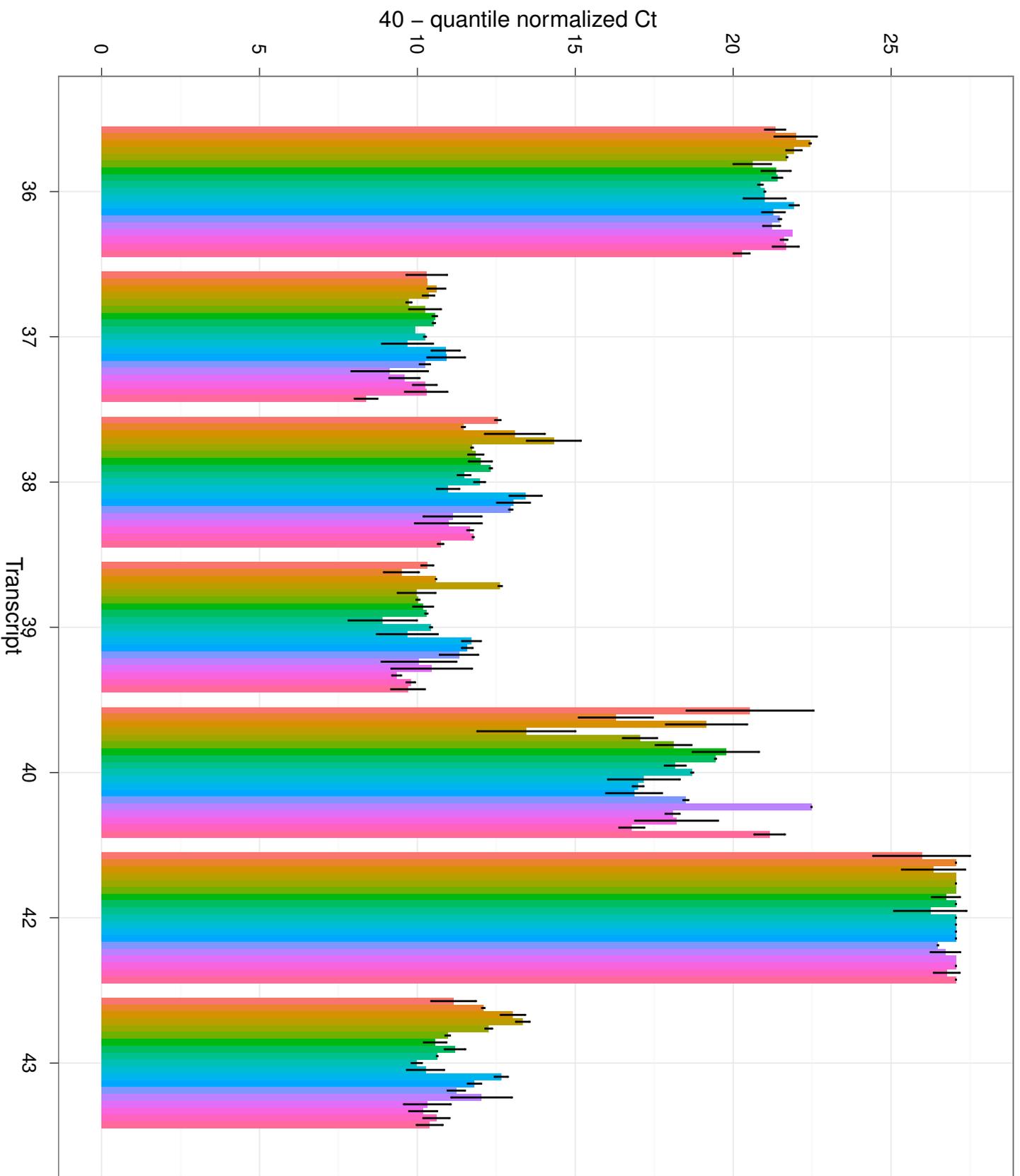


- sample**
- Borrmangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel

40 – quantile normalized Ct

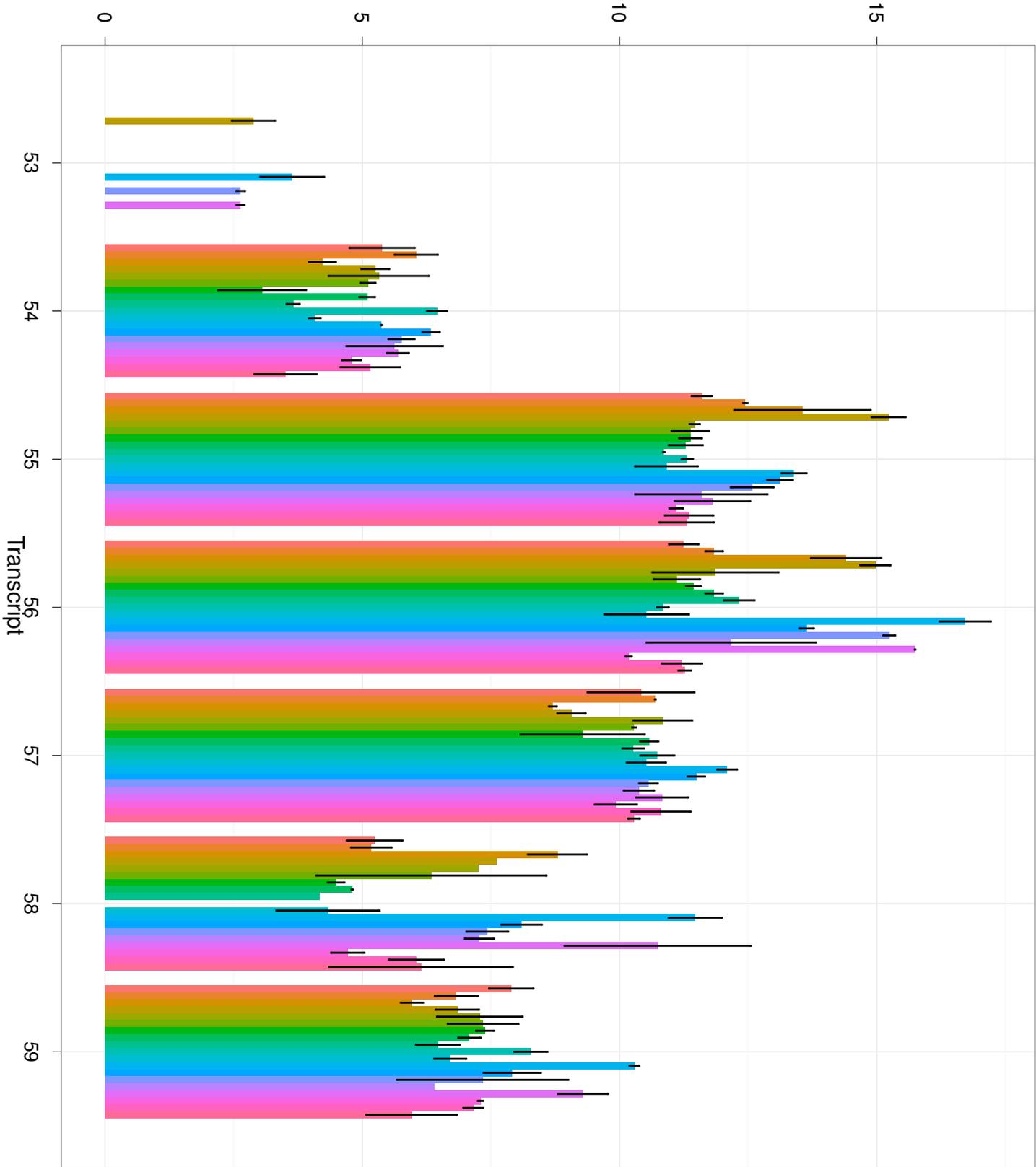






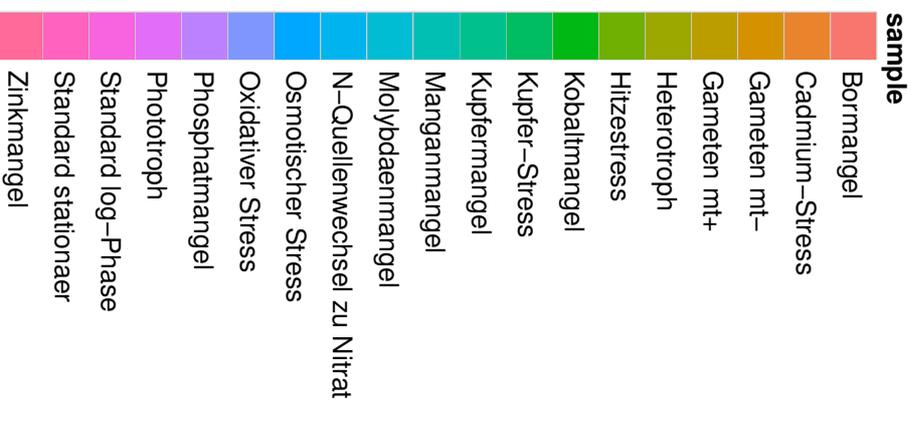
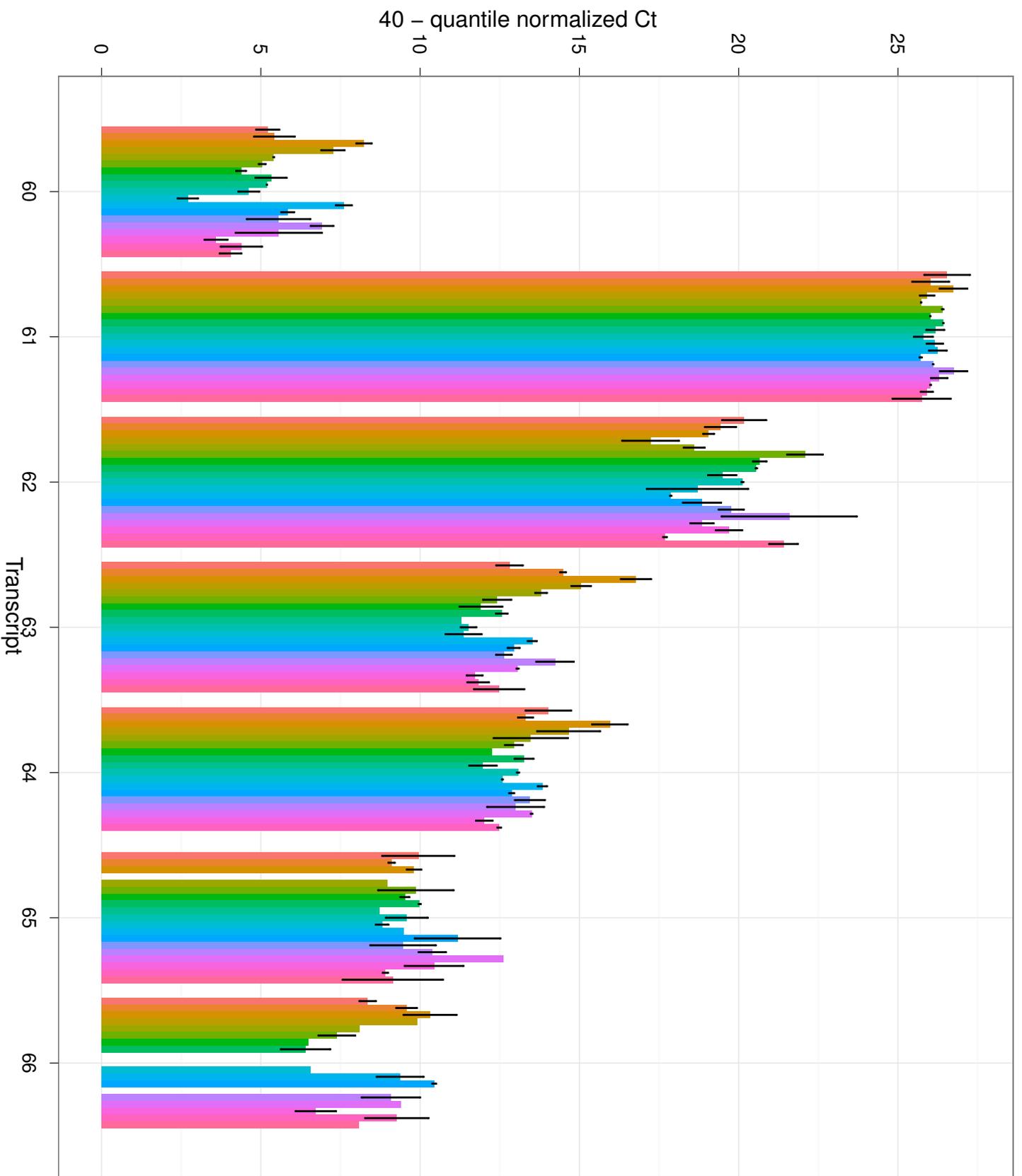


40 – quantile normalized Ct

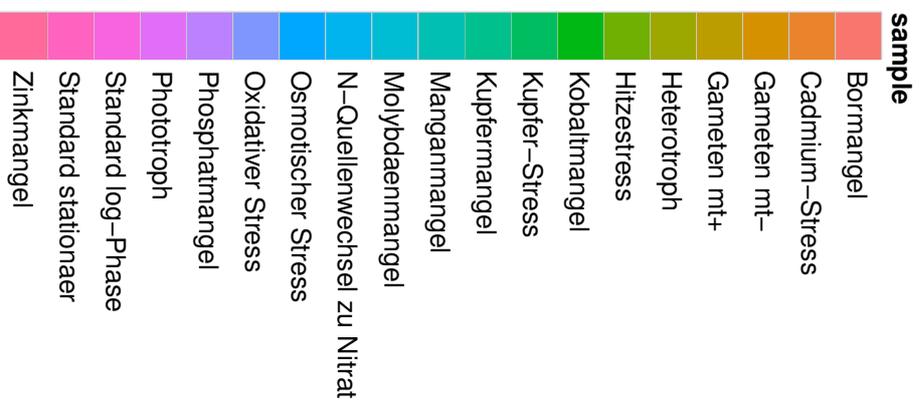
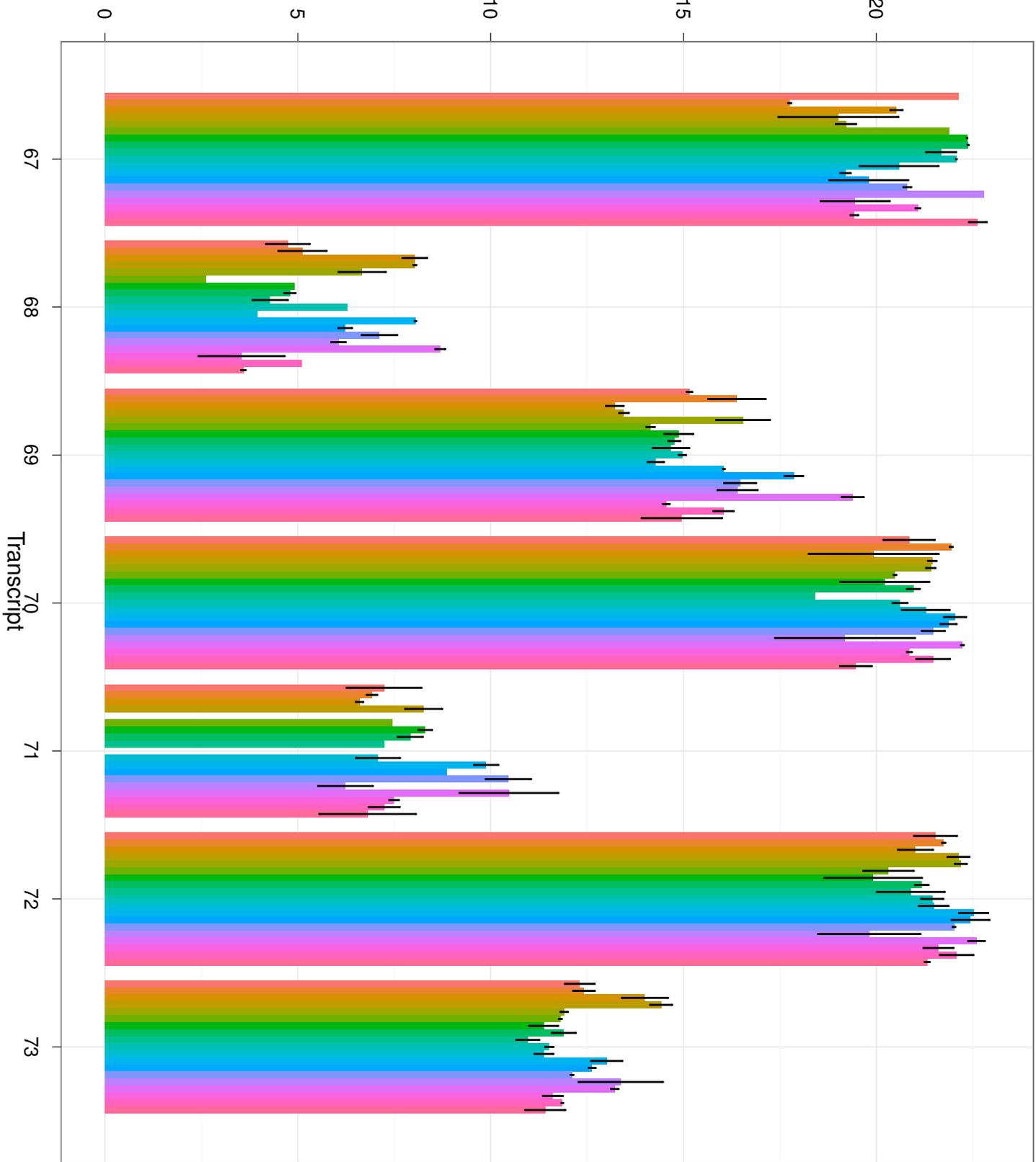


sample

- Borrmangel
- Cadmium-Stress
- Gameten mt-
- Gameten mt+
- Heterotroph
- Hitzestress
- Kobaltmangel
- Kupfer-Stress
- Kupfermangel
- Manganmangel
- Molybdaemangel
- N-Quellenwechsel zu Nitrat
- Osmotischer Stress
- Oxidativer Stress
- Phosphatmangel
- Phototroph
- Standard log-Phase
- Standard stationaer
- Zinkmangel



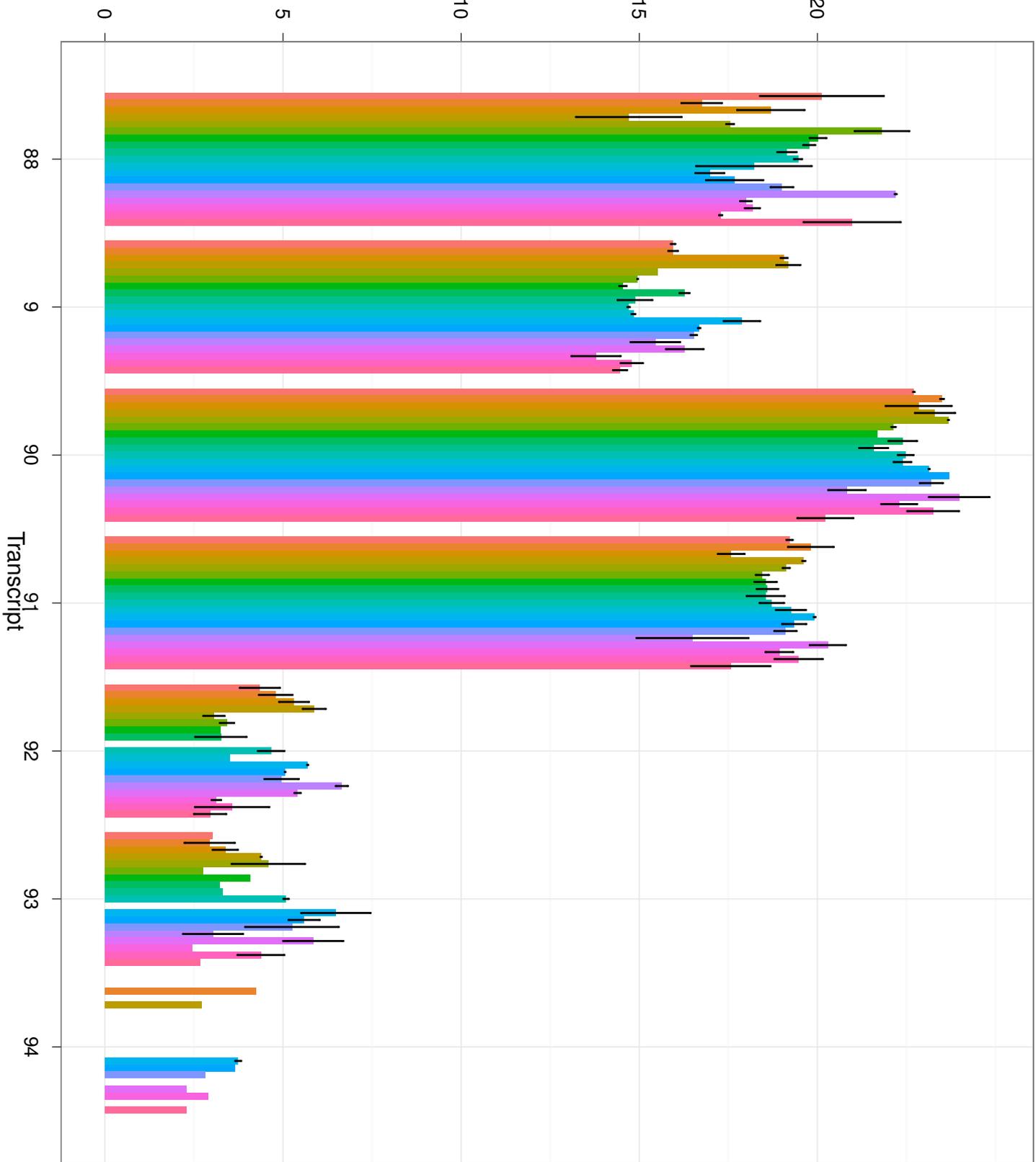
40 – quantile normalized Ct





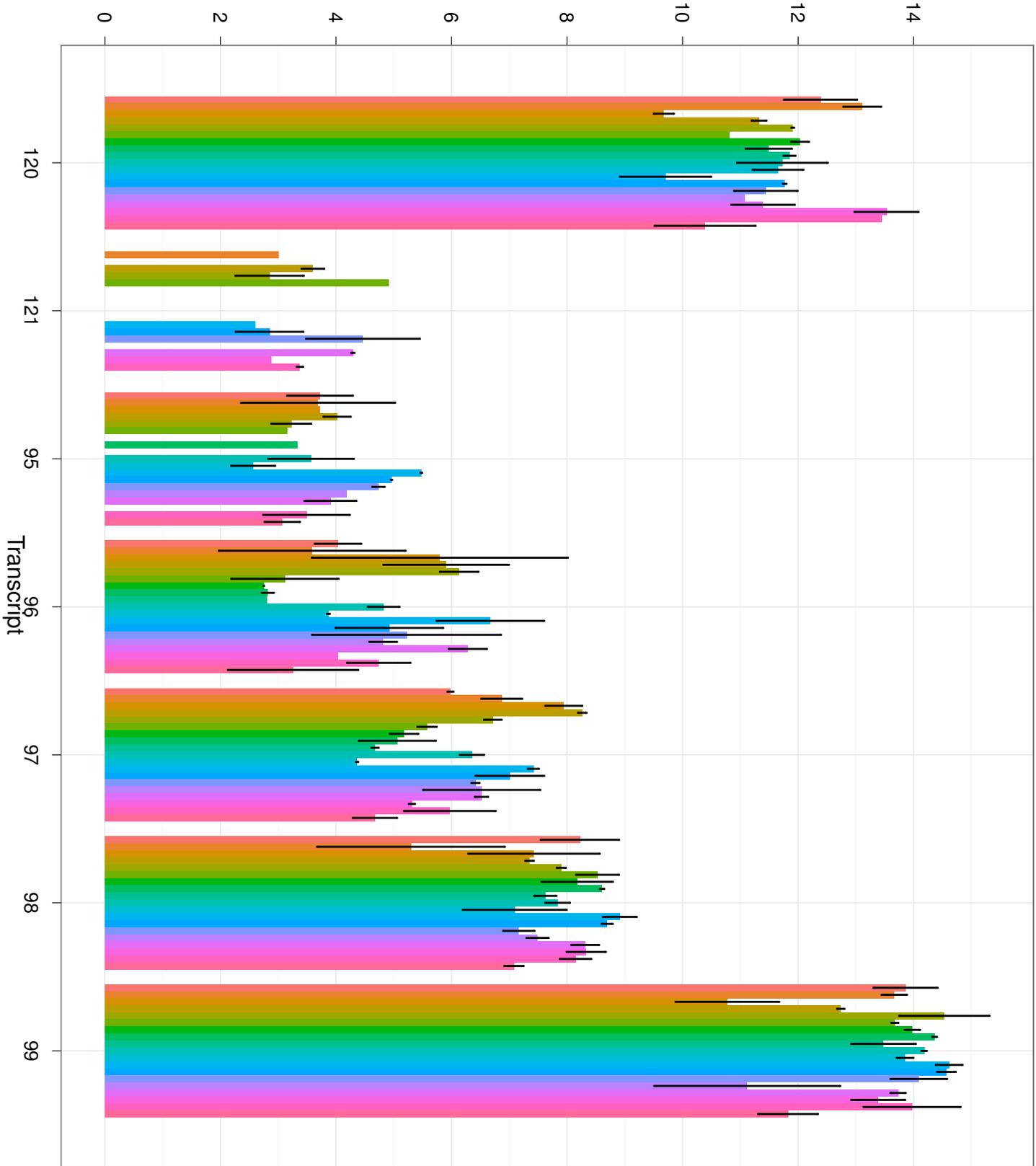


40 – quantile normalized Ct



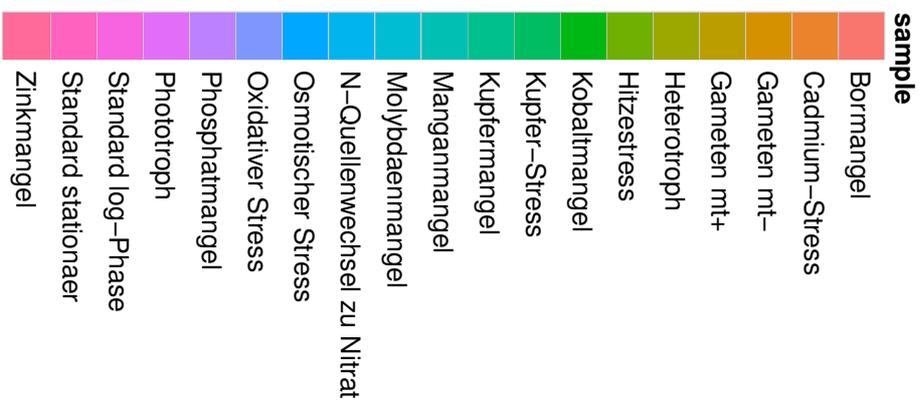
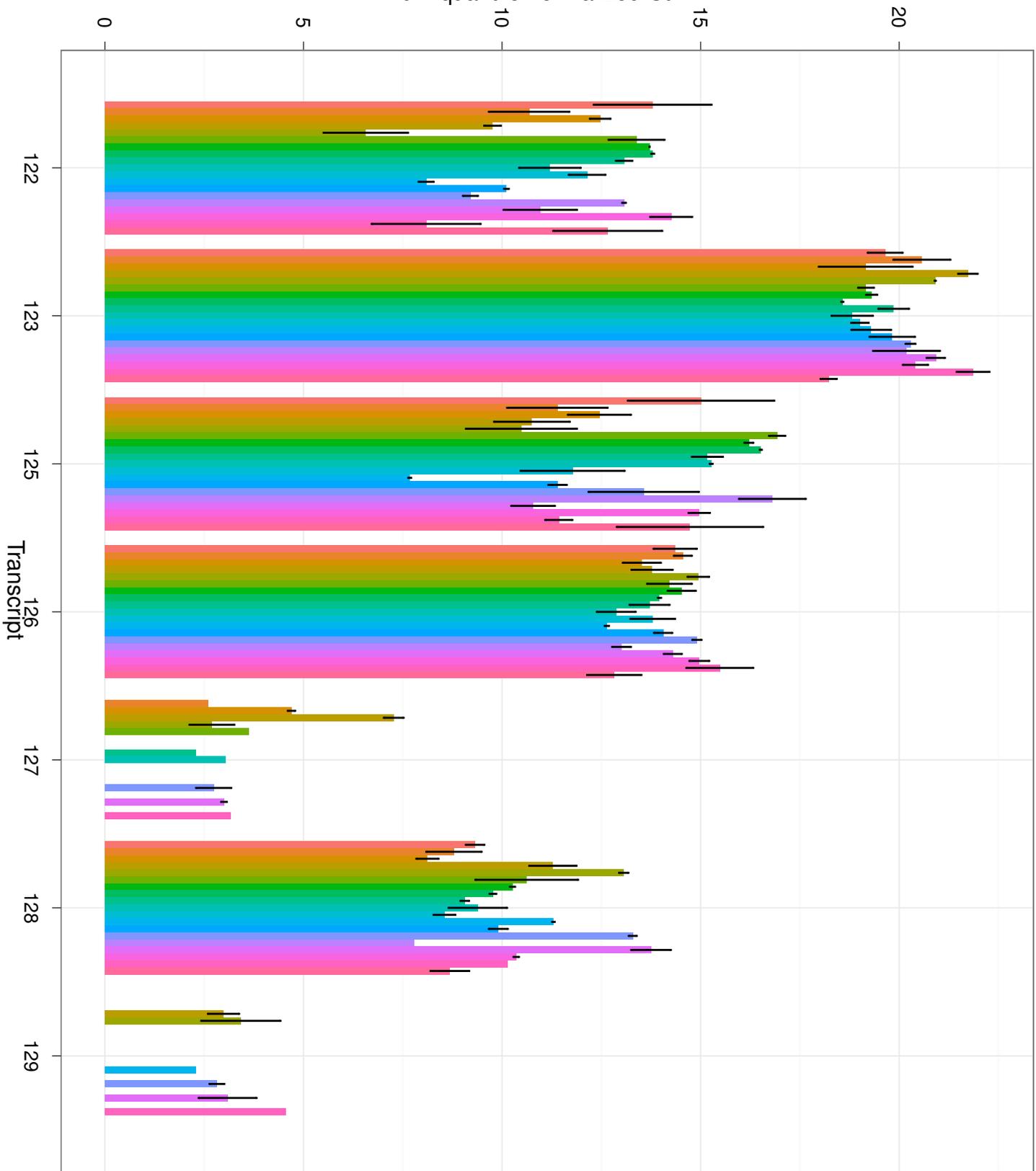
- sample**
- Bormangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaemangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel

40 – quantile normalized Ct



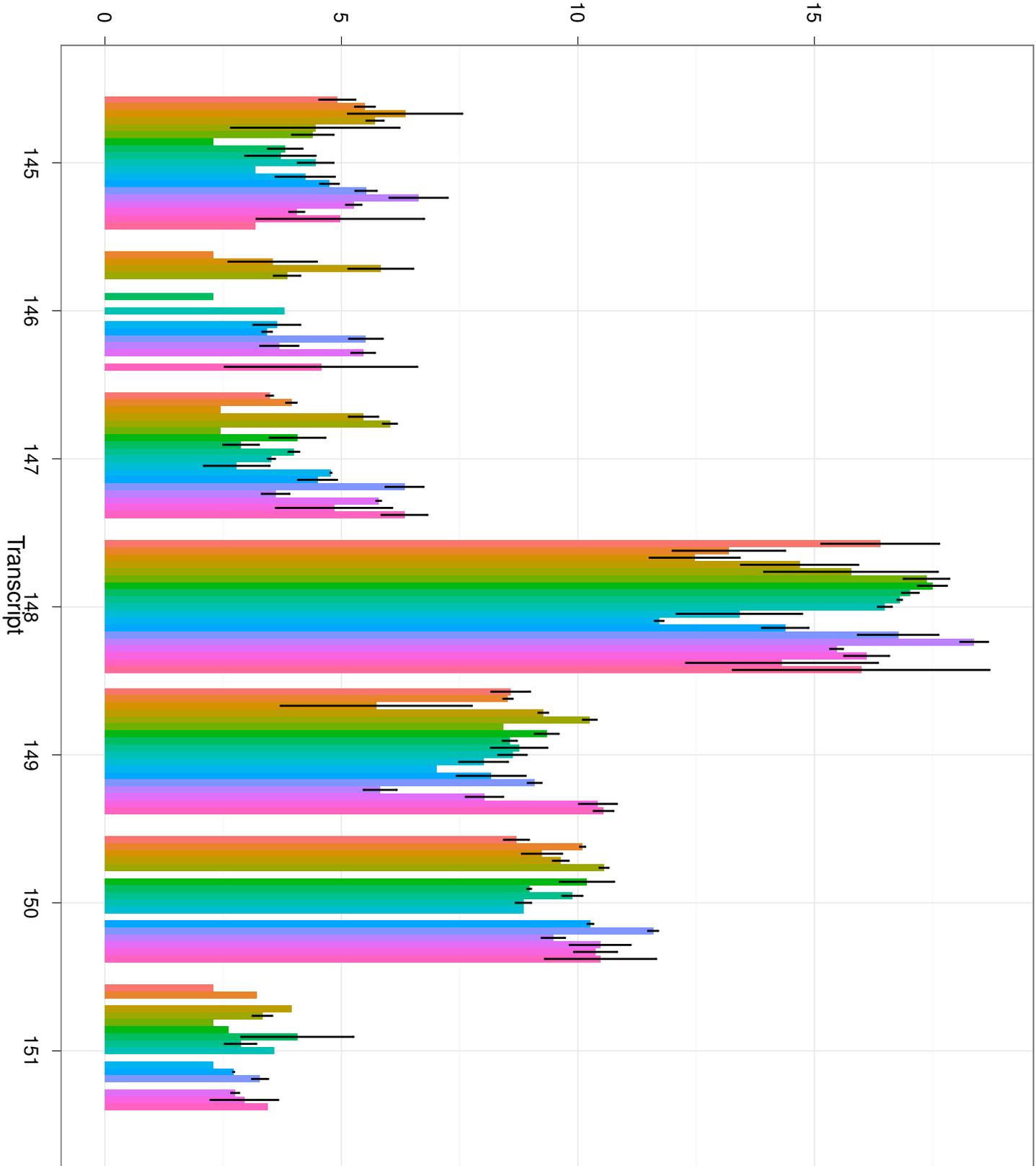
- sample**
- Borrmangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel

40 – quantile normalized Ct





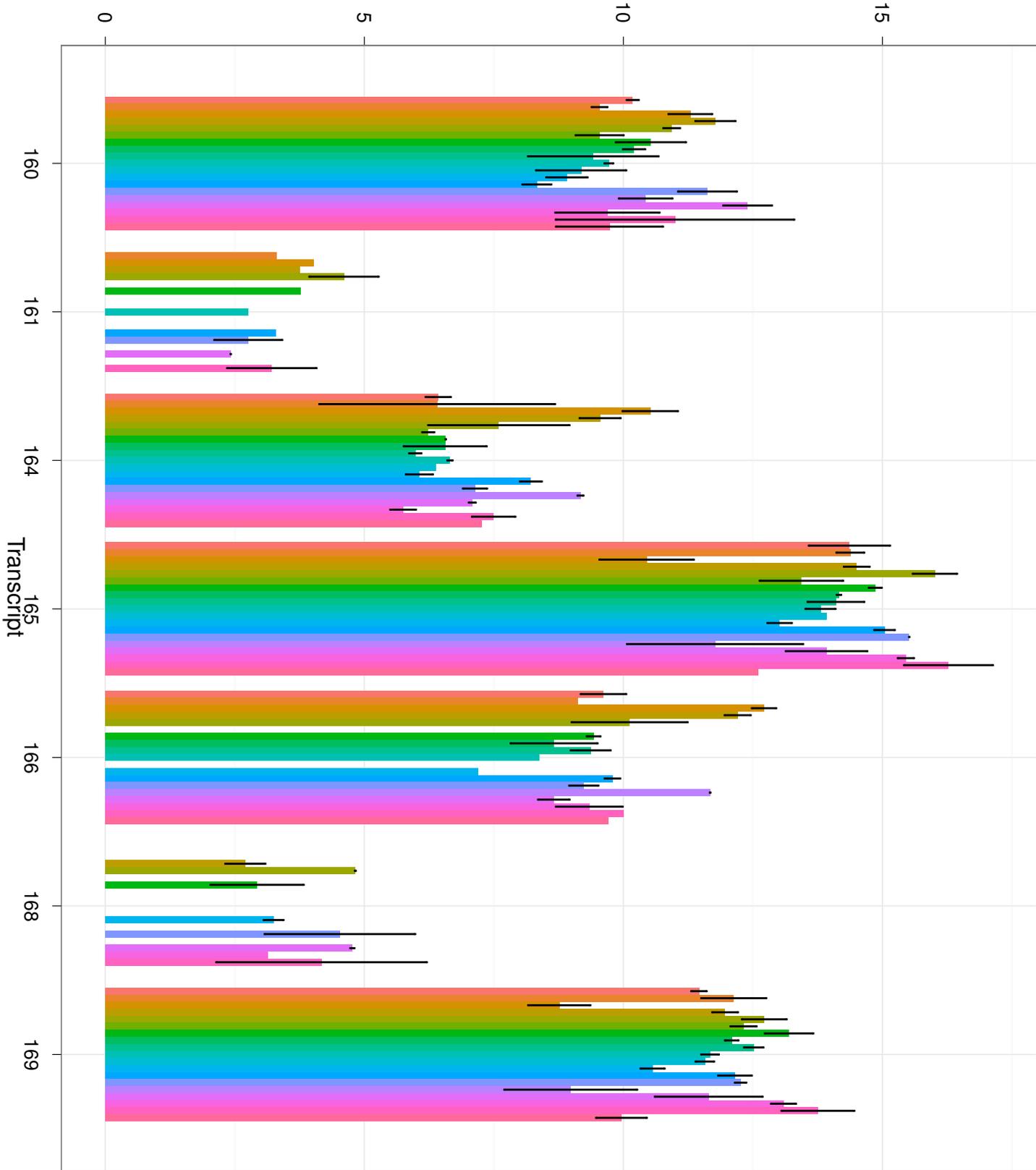
40 – quantile normalized Ct



- sample**
- Bormangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel



40 – quantile normalized Ct

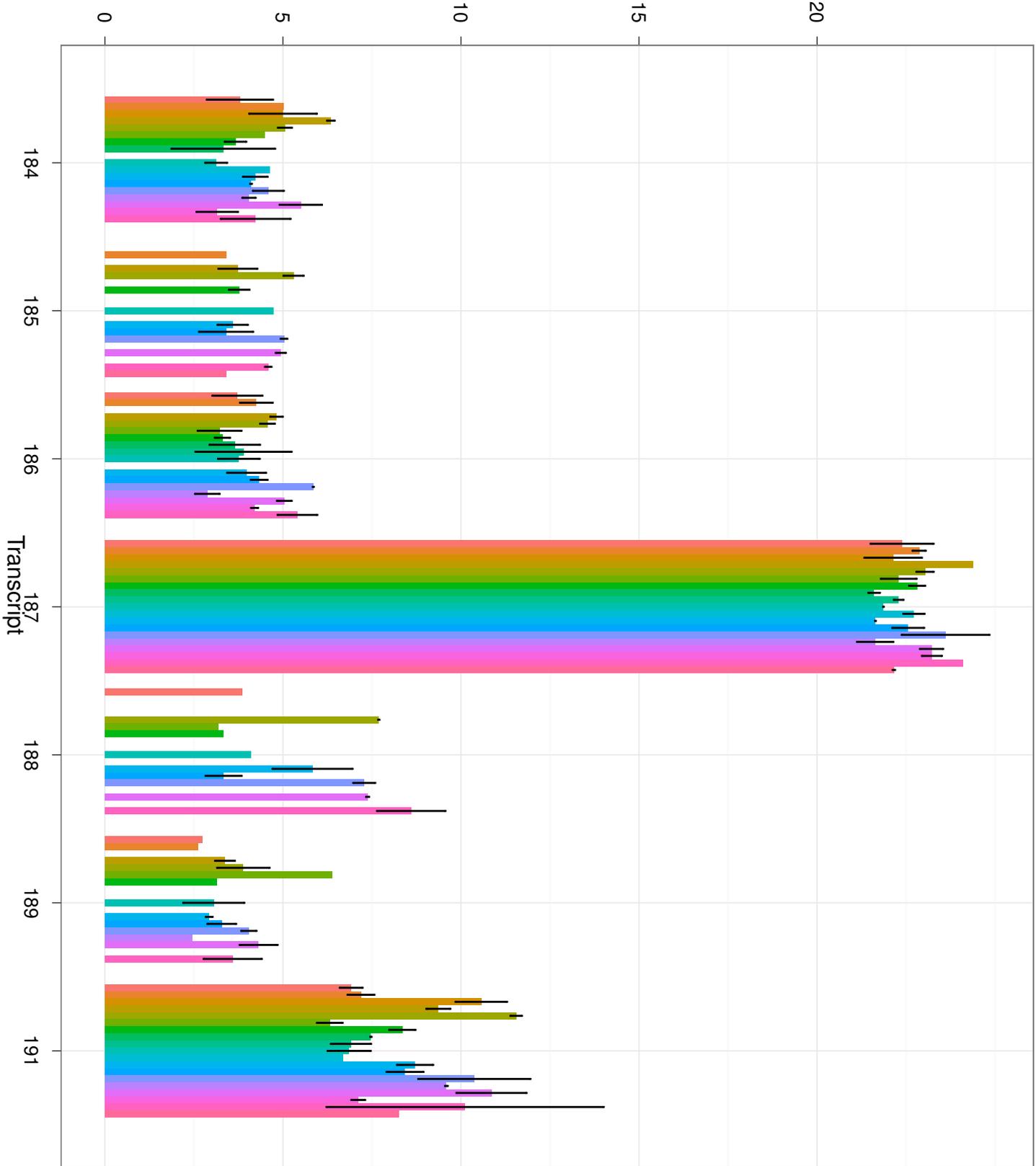


- sample**
- Borrmangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel

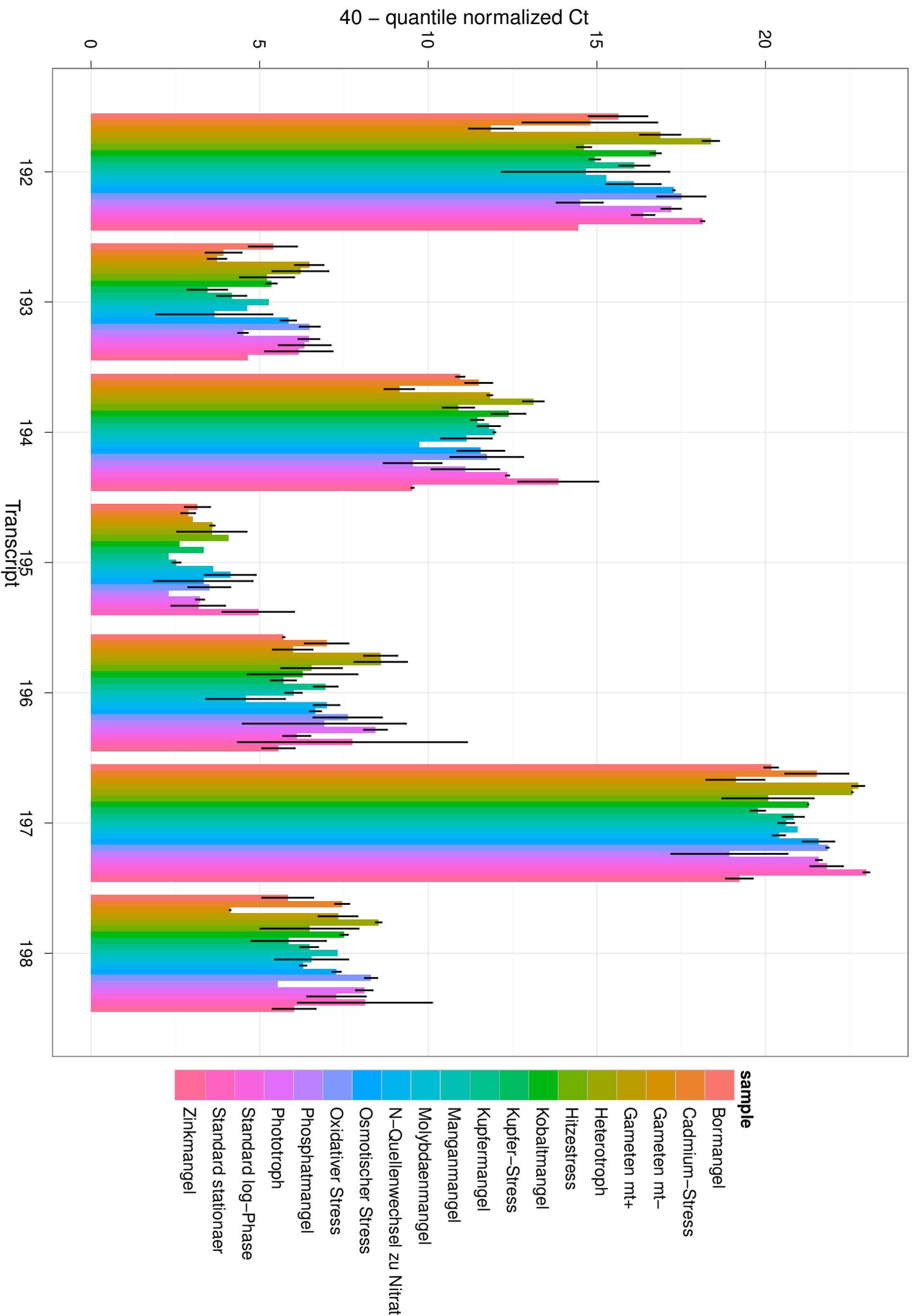




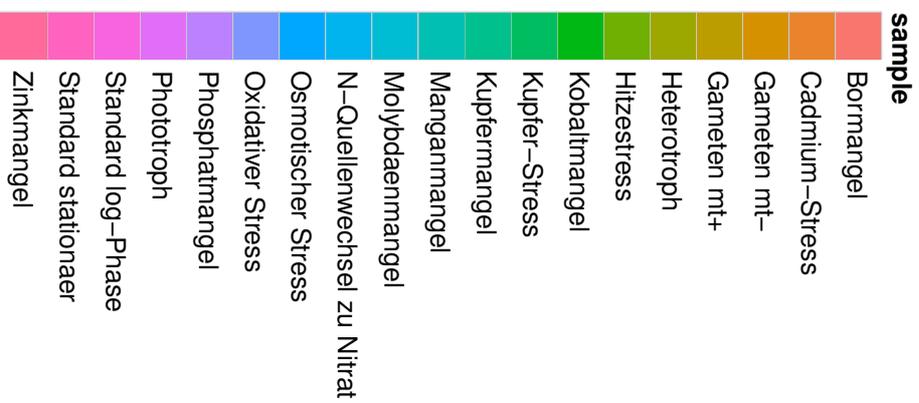
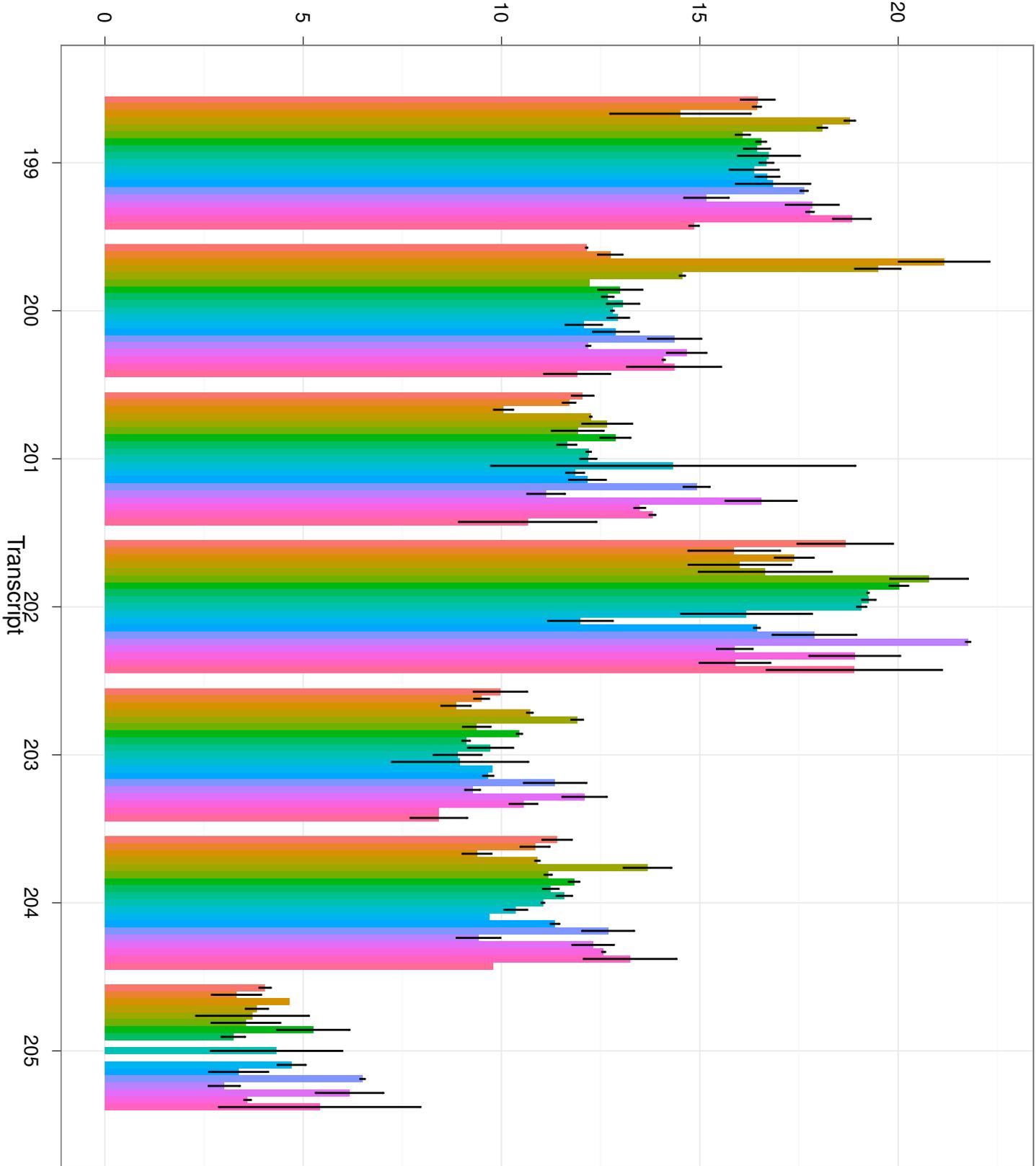
40 – quantile normalized Ct



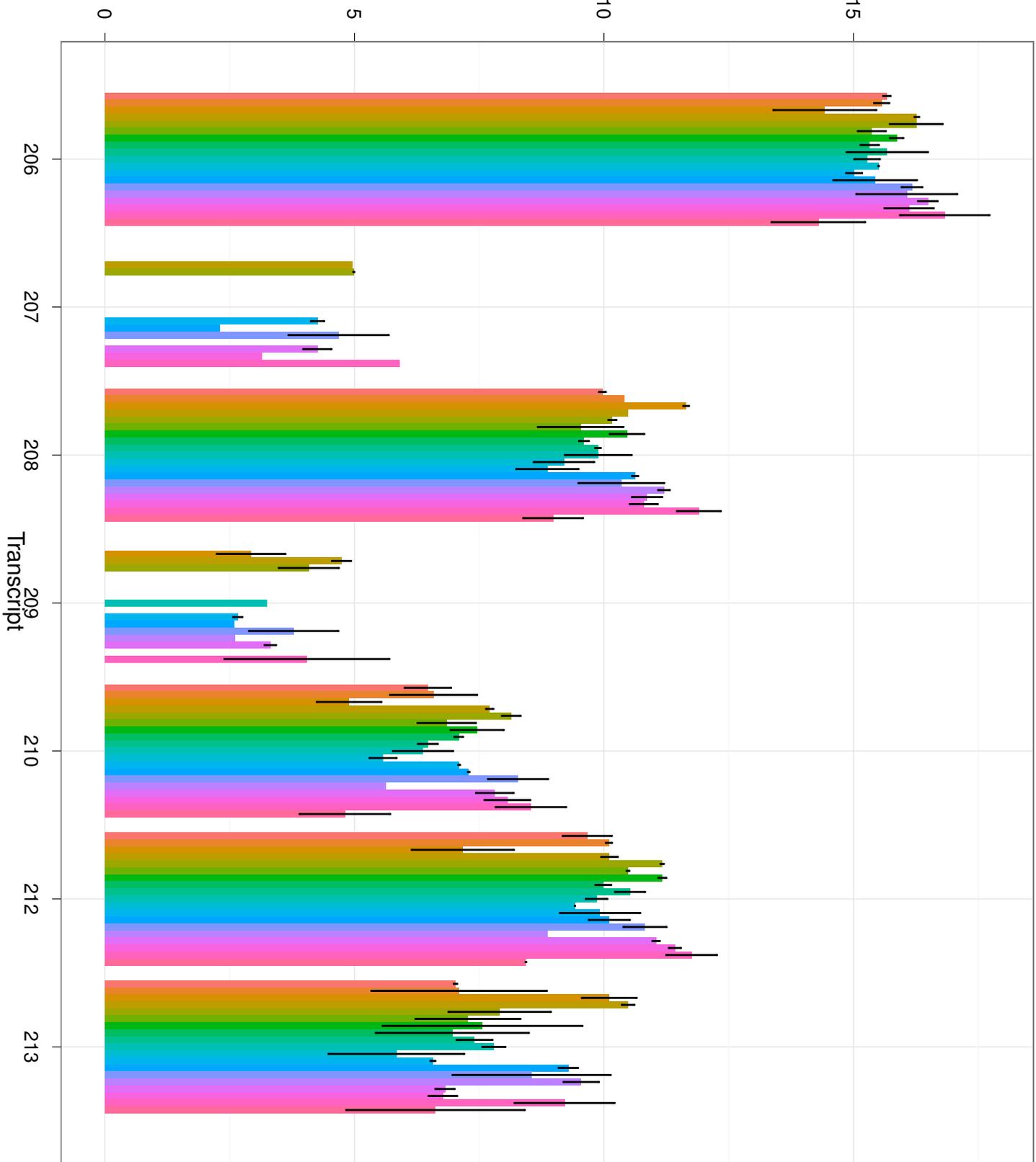
- sample**
- Bormangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel



40 – quantile normalized Ct

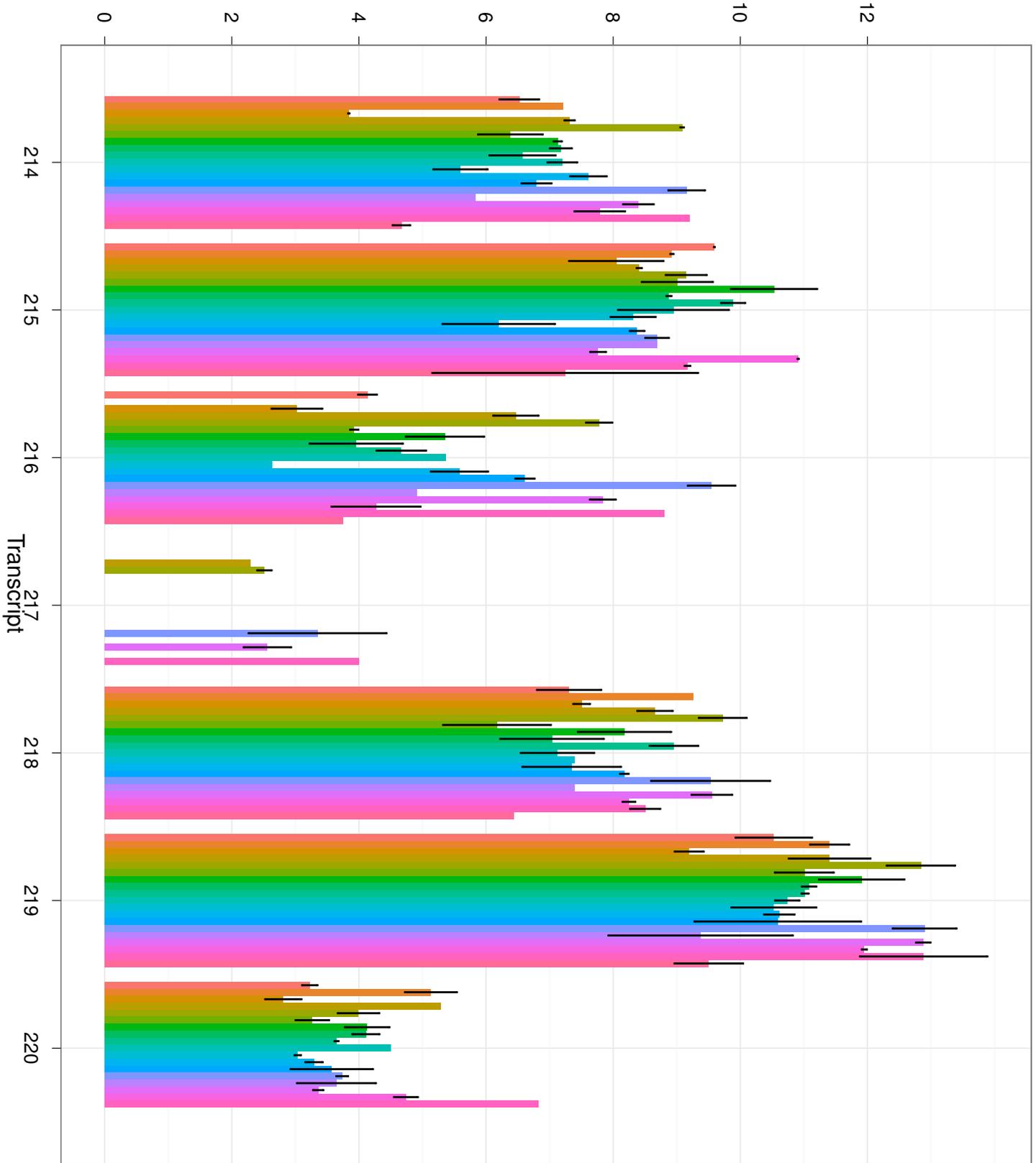


40 – quantile normalized Ct



- sample**
- Bormangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel

40 – quantile normalized Ct



- sample**
- Borrmangel
  - Cadmium-Stress
  - Gameten mt-
  - Gameten mt+
  - Heterotroph
  - Hitzestress
  - Kobaltmangel
  - Kupfer-Stress
  - Kupfermangel
  - Manganmangel
  - Molybdaenmangel
  - N-Quellenwechsel zu Nitrat
  - Osmotischer Stress
  - Oxidativer Stress
  - Phosphatmangel
  - Phototroph
  - Standard log-Phase
  - Standard stationaer
  - Zinkmangel

