

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen
der SBP-Box Gene
in *Physcomitrella patens***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Maik Riese
aus Stuttgart

Köln, 2006

Berichterstatter:

Prof. Dr. Heinz Saedler

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2006

Glücklich ist der, der Dingen auf den Grund gehen konnte
(Die purpurnen Flüsse)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 DIE SBP-BOX GENE	1
1.2 DAS MODELLSYSTEM <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i>	6
1.3 ZIEL DER ARBEIT	8
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 MATERIAL	9
2.1.1 VERWENDETE ORGANISMEN	9
2.1.2 VERWENDETE VEKTOREN	10
2.1.3 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	10
2.1.3 ENZYME, CHEMIKALIEN UND SONSTIGE MATERIALIEN	10
2.2 METHODEN	11
2.2.1 PRÄPARATION VON GENOMISCHER DNA	11
2.2.2 SOUTHERN-TRANSFER UND RADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG	12
2.2.3 SEQUENZIERUNG, SEQUENZANALYSEN UND DATENBANKSUCHE	13
2.2.4 RT-PCR (REVERSE TRANSKRIPTION PCR)	13
2.2.5 LT-PCR (LONG TEMPLATE PCR)	15
2.2.6 REAL-TIME PCR	15
2.2.7 PHAGEN-BANK DURCHMUSTERUNG	16
2.2.8 KULTIVIERUNG VON <i>P. PATENS</i>	16
2.2.9 TRANSFORMATION UND SELEKTION VON <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i>	16
2.2.10 FÄRBUNG VON ZELLKERNEN MITTELS DAPI	17
2.2.11 MIKROSKOPISCHE UND FOTOGRAFISCHE ANALYSE	18
2.2.12 HERSTELLUNG EINZELNER PLASMID-KONSTRUKTE	18
2.2.12.1 Herstellung der Verlustkonstrukte	19
2.2.12.2 Herstellung von Überexpressionskonstrukten in <i>P. patens</i>	21
2.2.12.3 Herstellung von Hefekonstrukte zur Überprüfung der Selbstaktivierung	23
2.2.13 DIE HERSTELLUNG DER VERWENDETEN GENSONDEN-FRAGMENTE	24
3. ERGEBNISSE	26
3.1 STRUKTURELLE UNTERSUCHUNG DER SBP-BOX GENFAMILIE IN <i>P. PATENS</i>	26
3.1.1 KLONIERUNG DER SBP-BOX GENE AUS DEM MODELLSYSTEM <i>P. PATENS</i>	26
3.1.2 EINZELKOPIE-GEN-NACHWEIS VON <i>PpSBP1-4</i> UND ABSCHÄTZUNG DER GRÖÖE DER GENFAMILIE	28
3.1.3 ISOLIERUNG WEITERER SBP-BOX GENE	29
3.1.4 PHYLOGENETISCHE REKONSTRUKTION DER SBP-BOX GENE	32
3.1.5 VERGLEICH DER SBP- PROTEINE AUS <i>P. PATENS</i> UND <i>A. THALIANA</i>	34
3.2 FUNKTIONALITÄT DER AHA-LIKE MOTIVE 1-3, DES RTYF-MOTIVS UND DER MIR156	41
3.2.1 FUNKTIONALITÄT DER AHA-LIKE MOTIVE1-3	41
3.2.2 IST DAS RTYF-MOTIV EINE AKTIVIERUNGSDOMÄNE?	44

3.2.3 GENOMISCHER LOCUS DER miR156 IN <i>P. PATENS</i>	45
3.2.4 KANN DIE PPMiR156 EINE ATMRE ERKENNEN?	47
3.3 EXPRESSIONSANALYSEN DER SBP-BOX GENE	50
3.3.1 EXPRESSION DER SBP-BOX GENE WÄHREND DES LEBENSZYKLUS VON <i>P. PATENS</i>	50
3.3.2 GENEXPRESSION UNTER INDUKTIVEN BEDINGUNGEN	53
3.4 FUNKTIONELLE ANALYSE DER SBP-BOX GENE IN <i>P. PATENS</i>	58
3.4.1 PARTIELLE VERLUSTMUTANTEN DER GENE <i>PpSBP3</i> , 6 UND 13	58
3.4.1.1 Stabile Überexpression der <i>AtMIR156b</i> am CAB-Locus in <i>P. patens</i>	59
3.4.1.2 Extrachromosomale Überexpression der <i>AtMIR156b</i> in <i>P. patens</i>	63
3.4.2 FUNKTIONELLE ANALYSE VON <i>PpSBP1</i> UND <i>PpSBP4</i> ANHAND VON GEWINN- UND VERLUSTMUTANTEN	66
3.4.2.1 Extrachromosomale Überexpression von <i>PpSBP1</i> und <i>PpSBP4</i>	66
3.4.2.2 Verlustmutanten von <i>PpSBP1</i> und <i>PpSBP4</i>	70
4. DISKUSSION	78
4.1 DIE EXON-INTRON STRUKTUR UND KONSERVIERTE PROTEINDOMÄNEN UNTERSTÜTZEN DIE PHYLOGENETISCHE REKONSTRUKTION	79
4.2 EINIGE <i>PpSBP</i> -BOX GENE KÖNNEN IN BESTEHENDE SUBFAMILIEN EINGEORDNET WERDEN	82
4.3 AKTIVIERUNGS- UND ANDERE PROTEINDOMÄNEN	83
4.3.1 MÖGLICHERWEISE IST NICHT JEDES AHA-LIKE MOTIV EINE AKTIVIERUNGSDOMÄNE	83
4.3.2 DAS RTYF-MOTIV IST MÖGLICHERWEISE KEINE AKTIVIERUNGSDOMÄNE	84
4.4 DIE INTERAKTION DER SBP-BOX GENE MIT DER miR156 IST EVOLUTIONÄR KONSERVIERT	85
4.5 DIE SBP-BOX GENE <i>PpSBP1</i> , 2, 4, 5 UND 12 SIND DIFFERENTIELL EXPRIMIERT	86
4.6 <i>PpSBP5</i> ZEIGTE EINE HÖHERE EXPRESSION AUF EINEM MEDIUM DAS PROTONEMA FÖRDERT	87
4.7 DIE GENE DER <i>PpSBP3</i> -GRUPPE REAGIEREN AUF CYTOKININ, EIN PHYTOHORMON WELCHES BEI DER BILDUNG VON KNOSPEN EINE ROLLE SPIELT	88
4.8 EINE VERSUCHTE ÜBEREXPRESSION DER <i>ATMIR156B</i> ZEIGTE KEINEN ABWEICHENDEN PHÄNOTYP	90
4.9 GEWINN UND VERLUSTMUTANTEN FÜR <i>PpSBP1</i> UND <i>PpSBP4</i> GEBEN ERSTE EINDRÜCKE FÜR EINE FUNKTION	91
4.9.1 DIE EXTRACHROMOSOMALE ÜBEREXPRESSION VON <i>PpSBP1</i> UND <i>PpSBP4</i> ZEIGEN ABNORMALE PROTONEMA ENTWICKLUNG	92
4.9.2 DER VERLUST VON <i>PpSBP1</i> UND <i>PpSBP4</i> FÜHRT ZU EINER HÖHEREN VERZWEIGUNGSRATE IM PROTONEMA	93
4.10. INTEGRIERUNG EINIGER SBP-BOX GENE IN DEN LEBENSZYKLUS VON <i>P. PATENS</i>	97
4.11 KANN UNS <i>P. PATENS</i> EINEN HINWEIS AUF DIE ALLGEMEINEN FUNKTIONEN DER SBP-BOX GENE LIEFERN?	99
5. ZUSAMMENFASSUNG	100
6. ENGLISH SUMMARY	102
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
8. NOMENKLATUR	105

ANHANG A: ZUGANGSNUMMERN DER SBP-BOX GENE UND SEQUENZEN DER NICHT EINGETRAGENEN SEQUENZEN	113
ANHANG B: ZUGANSNUMMER FÜR EST-SEQUENZEN, DIE HOMOLOGIE ZU DEN SBP-BOX GENEN AUS P. PATENS ZEIGEN	124
ANHANG C: OLIGUNKLEOTIDE	125
ANHANG D: POTENTIELLE CODIERENDE LOCI FÜR PPMIR156	127
EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG	133
DANKSAGUNG	134
LEBENS LAUF	135

1. Einleitung

Die in den Genen codierte Erbinformation legt wichtige Teile für das Wachstum und die Entwicklung jedes Organismus fest. Doch viele Gene werden erst zu einem bestimmten Zeitpunkt, in einem bestimmten Gewebetyp und bzw. oder als Reaktion auf Umweltfaktoren benötigt. Das Ablesen einer DNA-Matrize und Umschreiben in RNA, Transkription genannt, wird durch bestimmte Faktoren, den Transkriptionsfaktoren, beeinflusst.

In *Arabidopsis thaliana* codieren wahrscheinlich 5% des Genoms für solche Faktoren. Dies entspricht über 1500 Transkriptionsfaktoren, 45% davon sind wahrscheinlich spezifisch für Pflanzen (Riechmann *et al.*, 2000). Zu diesen pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren gehört die Familie der SBP-Box Gene, deren Struktur und Funktion in dem Modellsystem *Physcomitrella patens* während dieser Doktorarbeit genauer untersucht wurde.

1.1 Die SBP-Box Gene

Die SBP-Box Gene wurden zuerst in *Antirrhinum majus* als Faktoren identifiziert, die an den Promotor des floralen Meristem-Identitätsgens *SQUAMOSA* binden können (Klein *et al.*, 1996). Aus diesem Grunde wurden sie SQUAMOSA-Promotor Binde-Proteine, kurz SBP, genannt. *SQUAMOSA* gehört zu der Familie der MADS-Box Gene. Es codiert für einen Transkriptionsfaktor, der während der Blütenentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Huijser *et al.*, 1992).

In *Arabidopsis thaliana* umfasst die SBP-Box Genfamilie 17 Mitglieder. Nämlich die Gene *AtSPL1-16* und eines davon, *AtSPL13*, ist dupliziert. Die Abkürzung SPL steht für SBP-like und *At* für *Arabidopsis thaliana*. Die SBP-Box codiert für eine DNA-Bindungsdomäne, die über zwei Zink-Finger an DNA bindet (Yamasaki *et al.*, 2004). Der zweite Zinkfinger überlappt mit einem Zellkern-Lokalisierungssignal (NLS), so dass es auf dieser Ebene zu einer direkten Regulation der DNA-Bindung gegenüber der Lokalisierung im Zellkern kommen könnte (Birkenbihl *et al.*, 2005). Die Bindung an die DNA erfolgt an die Kern-Sequenz GTAC im Promotorbereich der Zielgene (Kropat *et*

al., 2005, Birkenbihl *et al.*, 2005). Eine SBP-Domäne bindet eine DNA-Doppelhelix in einem Verhältnis 1:1 (Yamasaki *et al.*, 2004).

Im Laufe der Zeit wurden von den unterschiedlichsten Organismen die Genome sequenziert. Homologe Sequenzen zu den SBP-Box Genen kann man nur innerhalb der grünen Pflanzen finden. Die evolutionäre Konservierung reicht von der unizellulären Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Kropat *et al.*, 2005), über Monocotyledonen (Moreno *et al.*, 1997, Xie *et al.*, 2006) bis Eudicotyledonen (Cardon *et al.*, 1999, Lännenpää *et al.*, 2004). Diese Beobachtung legt eine wichtige Funktion der SBP-Box Gene während der Entwicklung von grünen Pflanzen nahe.

Im Allgemeinen kann man anhand von Mutationen in einem Gen und den daraus resultierenden Phänotypen auf seine Funktion schließen. Für Mutanten der SBP-Box Gene waren zu Beginn dieser Doktorarbeit nur sehr wenige Phänotypen beschrieben, die einen Einblick in die Funktion dieser Genfamilie geben konnten. Cardon und Kollegen generierten 1997 Überexpressionslinien für *AtSPL3* in *A. thaliana*. Diese Pflanzen blühten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen früher. Ein weiterer Phänotyp wurde an der Pflanze *A. thaliana*, die eine Mutation in Gen *AtSPL8* hat, beschrieben. Die Verlustmutation in diesem Gen resultiert in einer reduzierten Fertilität, die auf eine fehlerhafte Entwicklung der Ovulen und Antheren zurückzuführen ist. Die Antheren zeigen stets weniger als vier Pollensäcke. In manchen Fällen ist die Entwicklung der Ovulen so gestört, dass der Eintritt in die Meiose nicht mehr stattfindet (Unte *et al.*, 2003). Außerdem wurde ein weiterer Phänotyp von Moreno und Kollegen 1997 in Mais beschrieben. Diese Verlustmutation in dem SBP-Box Gen *LIGULELESS1* führt zu dem Verlust der Ligula, ein Blatthäutchen an der Übergangsstelle von Blattscheide und Blattspreite.

Aus *A. thaliana* sind mittlerweile alle Mitglieder der SBP-Box Genfamilie bekannt. Cardon und Kollegen veröffentlichten 1999 die ersten Expressionsstudien für die *A. thaliana* Gene und teilten die damals bekannten SBP-Box Gene auf Grund einer phylogenetischen Rekonstruktion in mehrerer Subfamilien ein (siehe Abb. 1.1.1).

Die ersten pflanzlichen microRNAs wurde 2002 identifiziert (Llave *et al.*, 2002, Park *et al.*, 2002, Reinhart *et al.*, 2002). Wie die tierischen Vertreter sind sie zwischen 20 und 24 nt lang, werden im Genom kodiert und aus einer Vorstufe (pre-miRNA) ausgeschnitten (Bonnet *et al.*, 2006).

Das primäre Transkript (pri-miRNA) wird von der RNA Polymerase II transkribiert und ist ungefähr 1 Kilobase (kb) lang (Kidner und Martienssen, 2005). Der pri-miRNA wird eine Methylguanosingruppe angehängt (capping) und sie wird polyadenyliert (Aukermann und Sakai, 2003; Xie *et al.*, 2005). Die pri-miRNA wird wahrscheinlich von dem im Kern lokalisierten Enzym DICER-like1 (DCL1) zu einer nur noch 50-350nt langen Vorstufe, der pre-miRNA, prozessiert. Diese wird weiter zu einem miR:miR* Duplex verarbeitet, der in das Cytoplasma transportiert wird. Dort wird der Duplex aufgewunden und die microRNA geht einen Komplex mit verschiedenen Proteinen ein der "RNA induced silencing complex", kurz RISC, genannt wird. Dieser microRNA-Proteinkomplex erkennt die Ziel-mRNA und kann zur Degradation und bzw. oder zur Repremierung der Translation führen (für ein rezenten Übersichtsartikel siehe Bonnet *et al.*, 2006).

Für die miR156 sind außer den SBP-Box Genen keine weiteren Zielgene bekannt (Bartel und Bartel, 2003). Wie die SBP-Box Genfamilie zeigt die miR156 auch eine evolutionäre Konservierung im Pflanzenreich. Sie wurde in Eudicotyledonen, sowie in Monocotyledonen, basalen Gymnospermen, Farnen und Lycopoden entdeckt (Axtell und Bartel, 2005, siehe Abb. 1.1.2).

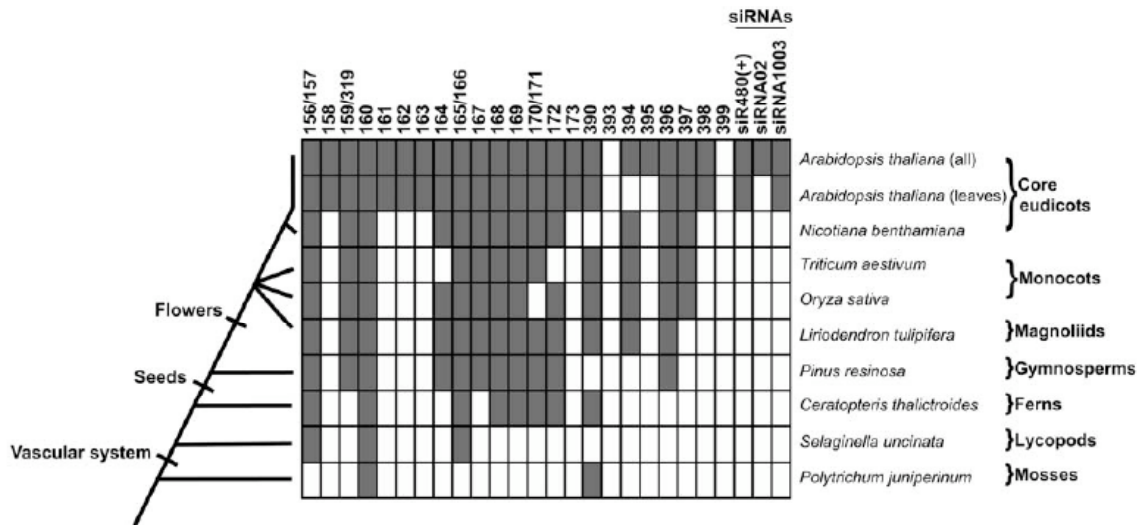


Abb. 1.1.2: Evolutionäre Konservierung von microRNAs. Abb. aus Axtell und Bartel, 2005.

Trotz umfangreicher Durchmusterungen in *A. thaliana* Mutantensammlungen verschiedenster Herkunft, war zu Beginn dieser Doktorarbeit nur ein abweichender Phänotyp beschrieben (Unte *et al.*, 2003). Dies könnte durch funktionelle Redundanz innerhalb der *AtSPL*-Gene zu erklären sein.

Um die Funktion der SBP-Box Gene zu studieren sind mutanten Allele außerordentlich hilfreich. In *A. thaliana* ist man nicht in der Lage gezielt Verlustmutationen in einem Gen hervorzurufen. *Physcomitrella patens* ist die einzige bekannte Landpflanze die mit hoher Effizienz genetische Manipulationen durch Homologe Rekombination erlaubt (Schaefer, 2001; Hohe und Reski, 2003). Dies erlaubt einen gezielten Allelaustausch.

Rensing und Kollegen beschrieben 2002, dass in *P. patens* homologe Genfamilien im Vergleich zu *A. thaliana* meist kleiner sind. Ein Beispiel hierfür ist die MADS-Box Genfamilie. In *A. thaliana* sind über 100 Mitglieder dieser Familie bekannt wohingegen in *P. patens* bis jetzt nur 17 (Dr. T. Muenster, unveröffentlichte Daten). *A. thaliana* und *P. patens* ähneln sich auf Genomebene. In beiden Pflanzen werden oft die gleichen Codons bevorzugt und die durchschnittliche Rate von Introns pro Gen (ca. 5) ist gleich. In *P. patens* sind die Introns im Durchschnitt länger (252bp) als die von *A. thaliana* (146bp) und meistens sind diese in *P. patens* länger als die Exons. Ebenfalls konserviert ist der Genaufbau von homologen Genen (Rensing *et al.*, 2005).

Das Moos *P. patens* ist leicht zu kultivieren und das Genom ist nur viermal größer als das von *A. thaliana* (Schaefer und Zryd, 2001). Sein dominanter haploider Lebenszyklus bietet die Möglichkeit rezessive Mutationen sofort zu entdecken (Cove *et al.*, 1997).

Dies macht *P. patens* zu einem idealen Modellsystem zum Studium der SBP-Box Genfamilie.

1.2 Das Modellsystem *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens gehört zu den Moospflanzen (Bryophyta). Der letzte gemeinsame Vorfahre mit den Samenpflanzen existierte wahrscheinlich vor 450 Millionen Jahren (Theissen *et al.*, 2001; Abb. 1.2.1).

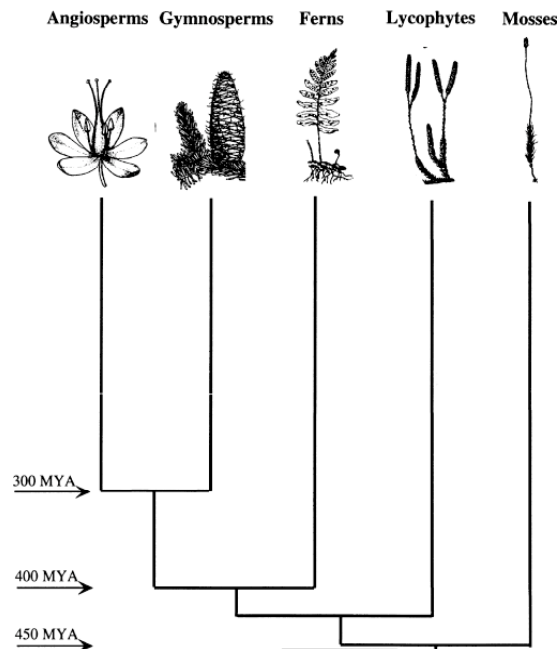


Abb. 1.2.1: Phylogenetische Rekonstruktion der evolutionären Verwandtschaften einiger Haupttaxa im Pflanzenreich. Bild verändert nach Theissen *et al.*, 2001.

Im Vergleich von rezenten mit fossilen Moosen findet man nur sehr wenige morphologische Änderungen (Frahm, 1994). Dies zeigt, wie wenig sich die Moose in den vergangenen Jahrillionen verändert haben und vielleicht auch auf Genomebene eher einen fossilen Stand reflektieren. Durch Sequenzvergleiche von *P. patens* Genen mit homologen Genen aus Samenpflanzen kann man wahrscheinlich einen detaillierten Einblick in die Evolution von Genen oder sogar ganzer Genfamilien bekommen.

Moose sowie Samenpflanzen unterliegen einem Generationswechsel, der mit einem Kernphasenwechsel verbunden ist (siehe Abb. 1.2.2). Im Gegensatz zu den Samenpflanzen ist die Phase des haploiden Gametophyten in Moosen dominant. Laubmoose besitzen Blätter-, Wurzel- und Stängel- ähnliche Strukturen (siehe Abb. 1.2.2). Diese entwickeln sich aus einem filamentösen Gewebe, dem Protonema, das aus der keimenden Spore durch Spitzenwachstum auswächst. Der erste Faden der aus einer keimenden Spore auswächst, besteht aus einem Zelltyp mit senkrechten Zellwänden und großen runden Chloroplasten. Diesen nennt man Chloronema. Durch die große Anzahl von Chloroplasten ist dieser Zelltyp wahrscheinlich auf die Energieversorgung spezialisiert. In Reaktion auf zunehmenden Licht- und Auxinkonzentrationen bildet sich ein neuer Zelltyp, das Caulonema. Caulonemazellen sind deutlich größer als Chloronemazellen, sie haben kleine, elliptische Chloroplasten und besitzen schräge Zellwände. Bei neu gebildetem Gewebe gibt es Übergangsstadien zwischen Chloronema und Caulonema (Schumaker und Dietrich, 1997). Caulonemazellen teilen sich weitaus schneller als Chloronemazellen und sind wahrscheinlich auf das rasche Ausbreiten der Kolonie spezialisiert. Als Reaktion auf Licht und Cytokinin kann sich aus einer Schwellung am distalen Ende einer Caulonemazelle eine dreidimensionale Knospe entwickeln. Diese wächst zu einem Stängelchen mit Blättchen heran, dem Gametophor (Schumaker und Dietrich, 1997). An der Basis jedes Gametophoren können sich bis zu 10 Wurzel-ähnliche Strukturen bilden, die Rhizoide (Ashton *et al.*, 1979). Der Begriff Gametophyt umfasst das Protonema, den Gametophor und die Rhizoide. Der Gametophor trägt die Sexualorgane. *P. patens* ist eine einhäusige Pflanze. Die männlichen Gameten entwickeln sich innerhalb der Antheridien und die weiblichen innerhalb der Archegonien (Cove und Knight, 1993). Die Spermatozoiden schwimmen zu den Archegonien und befruchten die Eizelle. Die diploide Zygote entwickelt sich zu einem diploiden Sporophyten, der in *P. patens* sehr klein ist. Er besteht aus einem kurzen, wenige Millimeter langen Stiel (Seta) auf dem die Sporenkapsel sitzt. Die diploide Sporenkapsel enthält die, durch meiotische Teilung entstandenen, haploiden Sporen (Cove und Knight, 1993, Abb. 1.2.2).

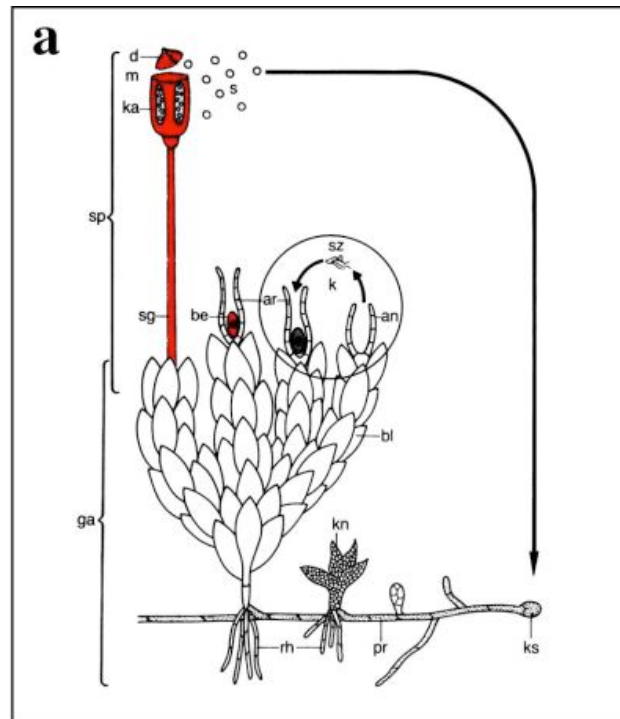


Abb. 1.2.2: Lebenszyklus des Laubmosses *P. patens*. Aus der keimenden Spore (ks) entwickelt sich ein Faden (Protonema, pr). Daraus kann sich eine Knospe (kn) entwickeln, die dann wiederum zum Gametophor auswächst. Dieser besitzt außer wurzelähnliche Auswüchse, die Rhizoide (rh), auch noch Blättchen (b) und Stängelchen. Der Gametophor trägt die männlichen (an) sowie die weiblichen (ar) Sexualorgane. Der Gametophyt (ga) umfasst den Gametophoren und das Protonema. Die Spermatozoide (sz) befruchten die Eizelle (be) und es entwickelt sich ein Embryo, der sich weiter zum Sporophyten (sp) differenziert. Der Sporophyt besteht aus einer Sporenkapsel (ka), die auf einem kleinen Stiel der Seta (sg) sitzt. Die diploiden Lebensstadien wurden in rot markiert. (Bild verändert nach Nultsch, 1991)

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es die SBP-Box Genfamilie aus dem Modellsystem *P. patens* zu klonieren und zu charakterisieren. Durch Verlust- und Gewinnmutanten soll versucht werden, eine Rolle dieser Gene in der Entwicklung von Moos aufzudecken. Diese Erkenntnisse könnten im Vergleich zu den bekannten Daten aus Samenpflanzen wie *A. thaliana* einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Funktion der SBP-Box Gene in der Entwicklung von Pflanzen leisten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Organismen

Pflanzenmaterial:

Für alle Experimente wurde *Physcomitrella patens* (Hedw.) BSG verwendet. Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen (beschrieben von D.G. Schaefer, 2001) in Klimakammern aufgezogen. Als Wachstumsbedingungen wurden, je nach aktueller Fragestellung, Dauerlicht, 16h Licht oder 8h Licht gewählt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Pflanzen vegetativ vermehrt.

Verwendete Phagen:

Lambda Phage NM1149 (Murray *et al.*, 1983). Zugangsnummer von NCCB: 3042

Verwendete *E. coli* Stämme:

DH5 α (life technologies, USA)
Top 10 (Clontech)
Pop13 (Schwarz-Sommer *et al.*, 1987)

Verwendete *S. cerevisiae* Stamm:

AH109 (Clontech Matchmaker 2 System)

2.1.2 Verwendete Vektoren

Name	Resistenz	Referenz bzw. Firma
pTopo2.1	Ampicillin/Kanamycin	Invitrogen
pBTSK	Ampicillin	Stratagene
pGBTK7	Kanamycin (Bakterien) Tryptophan (Hefe)	Clontech
pNesimi	Ampicillin (Bakterien) Paramomycin (Pflanze)	W. Faigl, MPIZ Köln
pARLAK	Ampicillin (Bakterien) Paramomycin (Pflanze)	W. Faigl, MPIZ Köln
pRT100	Ampicillin	Töpfer <i>et al.</i> , 1987
p35S-Zeo	Ampicillin (Bakterien) Zeocin (Pflanze)	Dr. M. Hasebe, NIBB Japan
pUC-Hyg	Ampicillin (Bakterien) Hygromycin (Pflanze)	Dr. B. Reiss, MPIZ Köln

2.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Alle verwendete Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen, Sigma oder Metabion synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang C aufgelistet.

2.1.3 Enzyme, Chemikalien und sonstige Materialien

Enzyme wurden von Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (USA) bezogen.

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: BioRad (USA), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Duchefa (Niederlande), Faust (Köln), Fluka (Schweiz), Invitrogen (Niederlande), Life Science (Neu-Isenburg), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Nylon-Membranen von Amersham-Buchler (Braunschweig) und von Roche (Mannheim) wurden verwendet. Die verwendeten Radioisotope (^{32}P -dCTP) wurden von

Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen und hatten eine spezifische Aktivität von 3000 Ci/mmol.

Die verwendeten Antibiotika wurden von Bayer (Leverkusen) bzw. Duchefa (Niederlande) bezogen. Gravitationsdurchfluss-Säulen zur Reinigung von Nukleinsäuren wurden von Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim) und Macherey und Nagel (Düren) bezogen. Röntgenfilme der Firma Kodak (USA) kamen für die Autoradiogramme zum Einsatz. 3MM Papier wurde von Schleicher und Schuell (Düren) bzw. Whatman (England) bezogen.

Die λ NM1149-cDNA-Bank, für deren Herstellung polyA⁺-RNA aus allen Lebensstadien des Mooses *P. patens* verwendet worden war, wurde mir freundlicherweise von Dr. H. Sommer (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von genomischer DNA

1 bis 1,5g Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff zermörsert. Zu dem zermörserten Pflanzenmaterial wurden 10ml CTAB-Puffer gegeben und gut suspendiert. Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln 30min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und 10min bei 4000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc pH 5.2 und 0,8 Volumen Isopropanol für 5min bei RT gefällt. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 4000rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 10mM Tris pH8.0 aufgenommen.

Die Konzentration der DNA wurde sowohl photometrisch als auch durch eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel bestimmt.

CTAB-Puffer:

100mM Tris/HCl pH8

1,4M NaCl

20mM EDTA

2% CTAB

2.2.2 Southern-Transfer und Radioaktive Hybridisierung

Mittels eines “Downward-Alkali-Blotting” (Koetsier *et al.*, 1993) wurde DNA, die auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde, auf eine positiv geladene Membran übertragen. Als Übertragungslösung wurde 0,4M NaOH verwendet und die Übertragung dauerte mind. 3h bis über Nacht.

Alle radioaktiven Hybridisierungen unter stringenten Bedingungen wurden über Nacht bei einer Temperatur von 65°C durchgeführt. Der verwendete Hybridisierungspuffer setzte sich zusammen aus:

0,2g PVP

0,2g Ficoll

10ml 10% SDS

150ml 20x SSPE

H₂O ad 1l

Gewaschen wurde bei 60°C mit 2xSSPE 0,1% SDS.

Für die nicht-stringenten Analysen wurde eine Hybridisierungstemperatur von 52°C gewählt und bei der gleichen Temperatur mit 5xSSPE 0,1% SDS gewaschen.

20x SSPE (1l):

7,4g EDTA

27,6g NaH₂PO₄·xH₂O

174g NaCl

2.2.3 Sequenzierung, Sequenzanalysen und Datenbanksuche

Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Service-Gruppe ADIS (*Automatic DNA Isolation and Sequencing*) am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung durchgeführt.

Sequenzanalysen und phylogenetische Rekonstruktionen wurden mit dem Programm MacVector 6.5 durchgeführt. Während dieser Doktorarbeit wurde das Genom vom *P. patens* sequenziert und kann bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und PHYSCObase (<http://moss.nibb.ac.jp/>) durchmustert werden. Proteinanalysen wurden mit dem Programm ExPASy (<http://www.expasy.org/>) durchgeführt. Mit dem Programm WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) wurden Sequenzvergleiche graphisch dargestellt.

2.2.4 RT-PCR (Reverse Transkription PCR)

Es wurde Gesamt-RNA präpariert und davon 2-4µg (nach DNaseI-Verdau) für die Erststrangsynthese eingesetzt. Diese erfolgte mit Superscript II (Invitrogen) und dem Oligo_{dT(15)} von Roche laut Protokoll des Herstellers. Die anschließende PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Reaktionsgemisch:

0,5µl dNTPs (25mM)

0,5µl Primer (10pmol/µl) jeweils

2,5µl 10x PCR-Puffer

1µl cDNA Erststrang

1Unit Taq-Polymerase (MBI Fermentas)

H₂O ad 25µl

PCR-Zyklen:

95°C 2min

95°C 30sec

60°C 30sec

72°C 1min

72°C 10min

} Xmal

Die Anzahl der Zyklen variierte je nach Expressionsstärke des jeweiligen Gens. Als interner Standard wurde *PpRAN* eingesetzt.

7,5µl des Reaktionsgemischs wurden entnommen und elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurde das Agarosegel mit einem Phosphor-Imager (Thyphoon 8600) der Firma Amersham Biosciences eingescannt und die Bandenstärke mit dem Programm ImageQuant berechnet.

Tabelle 2.2.1: Verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR

Name	Oligonukleotide	G r ö ß e d e s Amplifikats
<i>PpSBP1</i>	MR44/MR29	492bp
<i>PpSBP2</i>	SH143/SH79	434bp
<i>PpSBP3</i>	MR12/MR57	294bp
<i>PpSBP4</i>	MR64/MR25	372bp
<i>PpSBP5</i>	MR252/MR253	551bp
<i>RAN</i>	MR67/MR68	300 bp

2.2.5 LT-PCR (Long Template PCR)

Um die genomischen Fragmente der SBP-Box Gene aus *Physcomitrella patens* zu gewinnen, wurde eine LT-PCR mit Hilfe des Expand™ Long Template PCR Systems von Roche durchgeführt:

Mix 1:

2,5µl dNTPs

2µl Primer (10mM) jeweils

1µl DNA

17,5µl H₂O

Mix 2:

5µl 10x Puffer 3

0,75µl Enzym Mix

19,25µl H₂O

PCR-Programm:

94°C 2min

94°C 10sec

56°C 30sec

68°C 5min

} 10x

94°C 10sec

56°C 30sec

68°C 5min +20sec pro Zyklus

} 29x

68°C 7min

2.2.6 Real-Time PCR

Mit Hilfe der Real-Time PCR wird der DNA-Gehalt in einer Reaktion direkt während des Versuches gemessen. Als Farbstoff wurde SYBR-Green verwendet, das in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Zunahme der Fluoreszenz wird während der Amplifikation gemessen. Es wurde mit dem Gerät iQ5 von BioRad gearbeitet und die dazugehörige Software verwendet.

Für die Versuche wurde der SYBR-Green Master Mix der Firma BioRad verwendet:

PCR-Ansatz:

1,25µl Primer (2,5mM) jeweils

10 μ l cDNA

12,5 μ l SYBR-Green Master Mix

2.2.7 Phagen-Bank Durchmusterung

Die Durchmusterung einer λ NM1149-cDNA-Bank wurde nach Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Für das Durchmustern unter stringenten Bedingungen wurde bei 68°C hybridisiert und bei 60°C in 2xSSPE 0,1%SDS gewaschen. Bei der Durchmusterung unter nicht-stringenten Bedingungen wurde bei 52°C mit einem Sondengemisch hybridisiert und bei 52°C in 5xSSPE 0,1%SDS gewaschen.

2.2.8 Kultivierung von *P. patens*

Die Kultur von *P. patens* erfolgte nach den beschriebenen Standardbedingungen (Schaefer, 2001). Auf Minimalmedium (NO₃-Medium) in Petrischalen (9cm) bei 24°C und Langtagbedingungen (16h Licht/8h Dunkel) erfolgte die Anzucht der Gametophoren. Bei der Anzucht von reinem Protonema wurde dem Minimalmedium Ammoniumtartrat beigelegt (NH₄-Medium), das zu einer Unterdrückung des Übergangs von Protonema- zu Gametophoren-Wachstum führt. Die Induktion der Sexualorgane bzw. der reproduktiven Phase erfolgte bei 17°C und Kurztagbedingungen (8h Licht/16h Dunkel). Die Moose wurden außerdem gut mit Wasser benetzt.

Das Ernten und Sterilisieren vom Moos-Sporen wurde nach dem Protokoll von Dr. M. Hasebe (NIBB, Japan, <http://www.nibb.ac.jp/~evodevo/titleE.html>) durchgeführt. Als Sporenmedium wurde NH₄-Medium verwendet.

2.2.9 Transformation und Selektion von *Physcomitrella patens*

Die Transformation von *P. patens* Protoplasten wurde laut Protokoll von D.G. Schaefer (2001) durchgeführt, wobei linearisierte Plasmid-DNA der entsprechenden Konstrukte verwendet wurde. Die Selektion erfolgte je nach Resistenzkassette auf dem Plasmid in folgender Weise:

Selektion	Konzentration im Medium ($\mu\text{g/ml}$)	Regeneration auf Mannitol-haltigen Platten (Tage)	Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks (Wochen)
Zeocin	50	3	4
Paromomycin	40	7	2x 1
Hygromycin	15	5	2x 1

Danach erfolgte eine Relaxationsphase auf NH_4 -Tartrat-haltigem Medium ohne Selektionsdruck, wobei alle nicht stabilen Transformanten ihre Resistenz-Kassette verlieren sollten. Im Anschluss wurden die Moos-Kulturen wieder auf NH_4 -Medium mit Selektionsdruck überführt.

Für die transiente Transformation von *P. patens* Protoplasten wurde die dreifache Menge an DNA verwendet und die Protoplasten wurden keinem Selektionsdruck ausgesetzt. Nach drei Tagen im Dunkeln wurden die Protoplasten mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops auf ihre Expression der Fluoreszenzproteine YFP und CFP hin untersucht.

2.2.10 Färbung von Zellkernen mittels DAPI

Für die Färbung von Zellkernen der Sexualorgane mittels DAPI wurden fünf bis zehn Gametophoren, die ein Sporophyten trugen, in 500 μl Fixierungslösung aufgenommen und 60min unter Vakuum bei RT inkubiert. Die Fixierungslösung wurde abgenommen und das Pflanzenmaterial wurde in 500 μl TritonX-100 Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Pflanzenmaterial in der TritonX-100 Lösung 10-60min Vakuum ausgesetzt. Die TritonX-100 Lösung wurde gegen 500 μl DAPI-Färbepuffer ausgetauscht und die Gametophoren in der Färbelösung wurden 10min unter Vakuum bei RT inkubiert. Der DAPI-Färbepuffer wurde gegen 500 μl DAPI-Arbeitslösung ausgetauscht. Die Gametophoren in der Arbeitslösung wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und dann 10-60min Vakuum ausgesetzt. Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit DAPI-Färbepuffer gewaschen.

Die Färbung der Zellkerne wurde mittels des Konfokalen-Laser-Mikroskops überprüft.

Fixierungslösung (10ml):

1ml 30-40% Formaldehyd

9ml 50mM PIPES pH 6.8

DAPI-Färbepuffer (1l):

10ml 1M Tris pH8

2ml 0.5M EDTA pH8

30ml 5M NaCl

TritonX-100 Lösung:

1% TritonX-100 in DAPI-Färbepuffer

DAPI-Arbeitslösung:

1µg DAPI in 10ml DAPI-Färbepuffer.

2.2.11 Mikroskopische und fotografische Analyse

Alle lichtmikroskopischen Analysen wurden mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Axiophot), sowie mit einem Stereo-Mikroskop (FluoIIITM) der Firma Leica durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels einer digitalen Kamera (JVC 3 DCC bzw. Diagnostic Instruments INC) und dem Programm Diskus.

Für die konfokale-Laser Mikroskopie wurde die DMR7 der Firma Leica für Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet.

Alle Original-Bilder wurden im TIFF-Format gespeichert.

2.2.12 Herstellung einzelner Plasmid-Konstrukte

Die Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte wird im Folgenden beschrieben. Die verwendeten Vektoren sind im Abschnitt 2.1.2 aufgelistet und die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide in Anhang C. Die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente wurden nach der Klonierung sequenziert.

2.2.12.1 Herstellung der Verlustkonstrukte

Für die Verlustkonstrukte wurden Plasmide hergestellt, die je mindestens 500bp der genomischen Region des betreffenden Genes 5' und 3' einer Selektionskassette trugen. Für beide Konstrukte wurde die gleiche Klonierungsstrategie gewählt, die in Abb. 2.2.1 dargestellt ist.

pSBP1-Zeo:

In Abb. 2.2.2 wurden der genomische Locus von *PpSBP1* und das Konstrukt schematisch dargestellt.

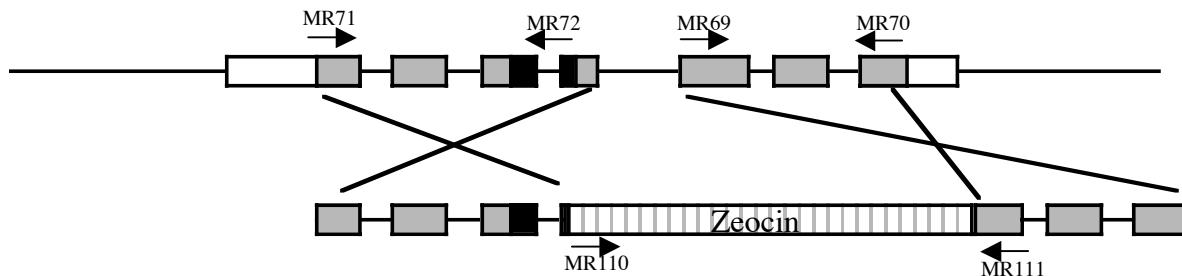


Abb. 2.2.2: Vergleich zwischen genomischen Locus und Konstrukt. Oben: Genomischer Locus von *PpSBP1*. Unten: Schematischer Aufbau des Verlustkonstruktes. In schwarz wurde die SBP-Box unterlegt, in grau die codierenden Bereiche und in weiß die UTR-Bereiche. Die Selektionskassette wurde gestrichelt dargestellt. Die Kreuze deuten die Bereiche für die homologe Rekombination an. Die Pfeile geben die Positionen der verwendeten Oligonukleotide an.

Mittels PCR wurden zwei Fragmente aus genomischer *P. patens* DNA amplifiziert (MR71-MR72 und MR70-MR69) und wie in Abb. 2.2.1 beschrieben in pBTSK kloniert. Als Selektionsmarker wurde eine Resistenzkassette gegen Zeocin verwendet. Diese wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden MR110 und MR111 aus dem Vektor p35S-Zeo amplifiziert. Diese Oligonukleotide trugen eine *Bc*II Schnittstelle, die kompatible Enden zu *Bg*II erzeugen. Das Fragment wurde, wie in Abb. 2.2.1 beschrieben, in den Vektor pBTSK, der schon die genomischen Fragmente enthielt, eingebracht.

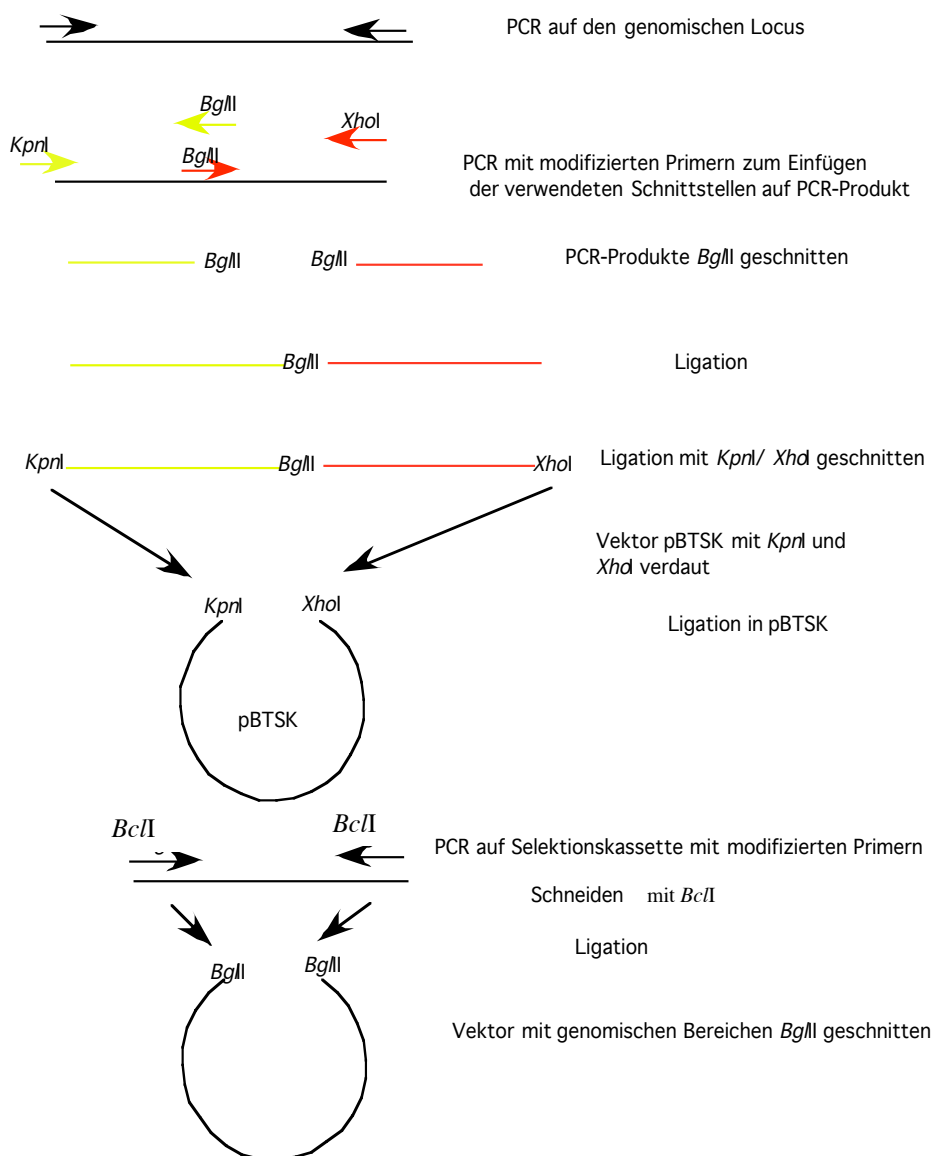


Abb. 2.2.1: Klonierungsschema für Verlustkonstrukte. Es wurde eine PCR auf den genomischen Locus mit genomischer DNA als Vorlage durchgeführt. Das Amplifikat wurde anschließend als Vorlage für eine PCR mit modifizierten Oligonukleotiden eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit *BglII* verdaut und ligiert. Das Ligationprodukt wurde *KpnI* und *XhoI* verdaut und in den geöffneten Vektor pBTSK kloniert. Mit modifizierten Primer wurde eine PCR auf die Selektionskassette, mit dem entsprechenden Plasmid als Vorlage, durchgeführt. Das Amplifikat wurde mit *BclI* geschnitten und in den *BglII* geschnittenen Vektor, der die genomischen Fragmente enthielt, kloniert.

pSBP4-Hyg:

In der folgenden Abbildung wird der genomische Locus im Vergleich zum Verlustkonstrukt schematisch dargestellt.

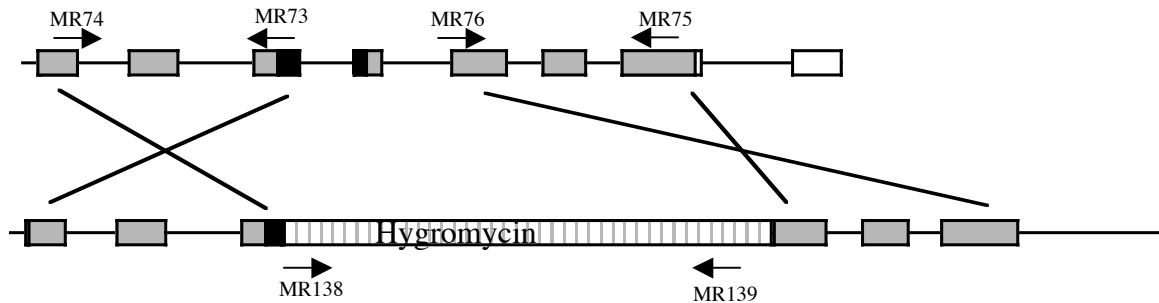


Abb. 2.2.3: Vergleich zwischen genomischen Locus und Konstrukt. Oben: Genomischer Locus von *PpSBP4*. Unten: Schematischer Aufbau des Verlustkonstrukt. In schwarz wurde die SBP-Box unterlegt, in grau die codierenden Bereiche und in weiß die UTR-Bereiche. Die Selektionskassette wurde gestrichelt dargestellt. Die Kreuze deuten die Bereiche für die Homologe Rekombination an. Die Pfeile geben die Positionen der verwendeten Oligonukleotide an.

Die Klonierung erfolgte nach dem Schema, das in Abb. 2.2.1 beschrieben wurde. Für die Amplifikation der genomischen Fragmente wurde die Oligonukleotide MR73 (mit *Bgl*III Schnittstelle)-MR74 für den 5' Bereich und die Oligonukleotide MR75-MR76 (mit *Bgl*III Schnittstelle) für den 3' Bereich gewählt. Als Selektionsmarker wurde eine Resistenzkassette gegen Hygromycin verwendet. Diese wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden MR138 und MR139 aus dem Vektor pUC-Hyg amplifiziert. Diese Oligonukleotide trugen eine *Bcl*II Schnittstelle, die kompatible Enden zu *Bgl*III erzeugen. Diese Resistenzkassette wurde, wie in Abb. 2.2.1, beschrieben in den Vektor pBTSK, mit den genomischen Fragmenten von *PpSBP4*, kloniert.

2.2.12.2 Herstellung von Überexpressionskonstrukten in *P. patens*

Für die Herstellung der Überexpressionskonstrukte wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Für die stabile Integration in das Genom von *P. patens* wurden homologe Bereiche zu *ZLAB1* gewählt.

pNesi-miR:

Aus dem Vektor pRS105, der mir freundlicherweise von R. Schwab, MPI Tübingen, zur Verfügung gestellt wurde, wurde der genomische Locus der AtMIR156b mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut. Das Fragment wurde in den *NotI* geöffneten Vektor pNesimi kloniert.

Der Vektor pNesimi trägt eine NPTII Resistenzkassette und beinhaltet zwei homologe Bereiche zu *ZLABI*.

Des Weiteren wurden auch Konstrukte hergestellt, die keinerlei homologe Bereiche zum *P. patens* Genom trugen. Bei diesen Konstrukten findet also keine homologe Rekombination statt und diese liegen als Plasmid in der Pflanzenzelle vor. Diese extrachromosomalen Konstrukte trugen nur die Selektionskassette und die entsprechende cDNA oder den genomischen Locus unter der Kontrolle eines CaMV 35S Promotors.

p35S-Zeo-SBP1:

Mittels PCR wurde die cDNA von *PpSBP1* mit den Oligonukleotiden MR158-MR159 amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* verdaut und in den Vektor pRT100, der zuvor mit *KpnI* und *XhoI* geöffnet wurde, kloniert. Durch diese Zwischenklonierung wurde die cDNA mit einem CaMV 35S Promotor und einem Terminator fusioniert. Dieses Fragment wurde aus dem Vektor durch PCR mit den Oligonukleotiden W193 und W192 amplifiziert und das Amplifikat anschließend mit *NotI* verdaut. Das geschnittene Fragment wurde in den *NotI* geöffneten Vektor p35S-Zeo kloniert.

p35S-Zeo-SBP4:

Die Klonierung entspricht der von *p35S-Zeo-SBP1*. Für die Amplifikation der cDNA von *PpSBP4* wurde die Oligonukleotide MR156-MR157 verwendet.

p35S-Zeo-miR156:

Aus dem Vektor pRS105 wurde das genomische Fragment der AtMIR156b mit *NotI* ausgeschnitten und in den *NotI* geöffneten Vektor p35S-Zeo kloniert.

2.2.12.3 Herstellung von Hefekonstrukte zur Überprüfung der Selbstaktivierung

Alle Konstrukte wurden über die Schnittstellen *NcoI* und *EcoRI* hergestellt.

p2WD-short:

Von der Firma Metabion wurde ein Teilstück des Genes *PpSBP2* (MR228 99bp) synthetisiert, das am 5'Ende eine *NcoI* und am 3'Ende eine *EcoRI* Schnittstelle trug. Dieses Teilstück, das den codieren Bereich des AHA-like1 Motiv trug, wurde mit beiden Restriktionsenzymen verdaut und in den Hefvektor pGBKT7 kloniert.

p3WDshort:

Die Klonierung entspricht der von *p2WD-short*. Ein Teilstück des Genes *PpSBP3* (MR224, 53bp), welches einen Teil des codieren Bereichs des AHA-like3 Motiv trug, wurde in den Vektor pGBKT7 kloniert.

p1WD:

Mit Hilfe der Oligonukleotide MR226 (trägt *NcoI* Schnittstelle) und MR227 (trägt *EcoRI* Schnittstelle) wurde ein Teil der cDNA von *PpSBP1*, der für eine Bereich des AHA-like2 Motiv codiert, amplifiziert, mit beiden Restriktionsenzymen verdaut und in den Hefvektor pGBKT7 kloniert.

p2WD-long:

Durch PCR mit den Oligonukleotiden MR229 und MR230 wurde ein größerer Bereich (120bp) der cDNA von *PpSBP2*, das für das AHA-like1 Motiv codiert, amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* verdaut in den geöffneten Vektor pGBKT7 kloniert.

p3WD-long:

Die Amplifikation eines Teils der cDNA von *PpSBP3* welches einen größeren Bereich des AHA-like3 Motiv umfasst, wurde mit den Oligonukleotide MR114 und MR223 durchgeführt. Das PCR-Produkt (177 bp) wurde verdaut und in den geöffneten Vektor pGBKT7 kloniert.

p3WD-WT:

Mittels PCR wurde ein Teil der cDNA von *PpSBP3*, welches eine Größe von 232bp hatte, mit den Oligonukleotiden MR114 und MR115 amplifiziert. Das Amplifikat wurde verdaut und in den geöffneten Vektor pGBKT7 kloniert.

p2WD-WT:

Mit Hilfe der Oligonukleotide MR112 und MR113 wurde ein Teil der cDNA von *PpSBP2* amplifiziert. Das PCR-Produkt war 261bp groß und wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* verdaut. Das geschnittene Fragment wurde in den Hefevektor pGBKT7 kloniert.

2.2.13 Die Herstellung der verwendeten Gensonden-Fragmente

Die verwendeten Gensonden wurden mittels PCR synthetisiert und durch Gelelektrophorese mit anschließender Elution aus dem Gel aufgereinigt.

Gen:	Oligonukleotid:	Verwendung
<i>PpSBP1</i>	SH191/SH176	Durchmusterung
<i>PpSBP2</i>	SH143/SH79	Durchmusterung
<i>PpSBP3</i>	MR07/MR09	Durchmusterung
<i>PpSBP4</i>	SH178/MR01	Durchmusterung
<i>PpSBP1</i>	MR44/MR29	Southern Blot Analyse
<i>PpSBP2</i>	SH143/SH79	Southern Blot Analyse
<i>PpSBP3</i>	MR12/MR57	Southern Blot Analyse
<i>PpSBP4</i>	MR64/MR25	Southern Blot Analyse

Alle nicht näher beschriebenen Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Strukturelle Untersuchung der SBP-Box Genfamilie in *P. patens*

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die SBP-Box Gene in *P. patens* zu klonieren, zu charakterisieren und einen Einblick in ihre Funktion zu bekommen. Doch bevor mit der funktionellen Analyse der SBP-Box Gene in *P. patens* begonnen werden konnte, mussten zuerst die Mitglieder dieser Genfamilie isoliert werden. Dies wurde durch zwei verschiedene Ansätze erreicht. Zum einem die Klonierung der SBP-Box Gene durch Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek unter stringenten und nicht stringenten Bedingungen. Zum zweiten durch Sequenzvergleich der, im Laufe dieser Doktorarbeit freigegebenen „Whole-Genom-Shutgun“ Sequenzen bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und anschließender Klonierung der neu identifizierten SBP-Box Gene aus einem cDNA-Pool.

3.1.1 Klonierung der SBP-Box Gene aus dem Modellsystem *P. patens*

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war das Genom von *P. patens* noch nicht sequenziert und in den öffentlichen EST-Datenbanken aus *P. patens* waren keine homologen Sequenzen zu den SBP-Box Genen enthalten. In dem Labor von Dr. P. Huijser (MPIZ, Köln) wurde allerdings schon eine Durchmusterung einer genomischen DNA Bibliothek aus *P. patens* nach SBP-Box Genen durchgeführt. Bei dieser Suche wurden Teile zwei verschiedener SBP-Box Gene gefunden, *PpSBP1* und *PpSBP2*. Diese Sequenzen wurde mir freundlicherweise von S. Höhmann (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Sequenzen wurden Oligonukleotide entworfen und für eine PCR mit *P. patens* genomischer DNA als Vorlage, verwendet. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, radioaktiv-markiert (siehe 2.2.2) und als Sonde für das Durchmustern der *P. patens* cDNA Bibliothek (siehe 2.2.7) verwendet.

Dr. R. Reski (Universität Freiburg) war zu diesem Zeitpunkt im Besitz einer nicht öffentlichen EST-Datenbank aus *P. patens*. In dieser befanden sich noch zwei weitere Teilsequenzen von SBP-Box Genen, die er mir freundlicherweise zur Verfügung stellte

(s_pp015003060r und s_pp020005015r). Im Weiteren werden diese Sequenzen *PpSBP4* (s_pp015003060r) und *PpSBP3* (s_pp020005015r) genannt. Ausgehend von diesen Sequenzen wurden auch für *PpSBP3* und *PpSBP4* Oligonukleotide entworfen. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, radioaktiv-markiert (siehe 2.2.2) und als Sonde für das Durchmusteren der *P. patens* cDNA-Bibliothek (siehe 2.2.7) verwendet.

Die Phagen cDNA-Bibliothek wurde aus polyA⁺-RNA, die aus allen Stadien des *P. patens* Lebenszyklus isoliert wurde, hergestellt. Diese wurde mir freundlicherweise von Dr. H. Sommer (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt.

Die Durchmusterung erfolgte unter stringenten Bedingungen (siehe 2.2.7) und Verwendung verschiedener Gensonden (siehe 2.2.13).

Von allen positiven Phagen wurde DNA isoliert und mit dieser wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden MR14 und MR15 durchgeführt. Diese binden an die Arme des Phagen NM1149. Die gewonnenen Amplifikate wurden sequenziert (siehe 2.2.3).

Für die Gene *PpSBP1*, *PpSBP3* und *PpSBP4* konnte jeweils ein komplettes offenes Leseraster (ORF) aus den Phagen isoliert werden. Im Falle von *PpSBP2* wurde nur ein Teil des ORF isoliert.

Anhand der isolierten cDNA Sequenzen konnten Oligonukleotide entworfen werden, die soweit wie möglich am 5' und 3' Ende lagen. Diese wurde für eine „Long Template PCR“ (siehe 2.2.5) mit genomischer *P. patens* DNA als Vorlage, eingesetzt. Die gewonnenen PCR Produkte wurden sequenziert (siehe 2.2.3) und die Sequenzen wurden bei der öffentlichen Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) eingetragen und sind im Anhang A verzeichnet.

Durch den Sequenzvergleich von cDNA mit genomischer DNA konnten die Exon-Intron Strukturen der *PpSBP*-Box Gene aufgedeckt werden. Diese sind in der Abb. 3.1.1 schematisch dargestellt.

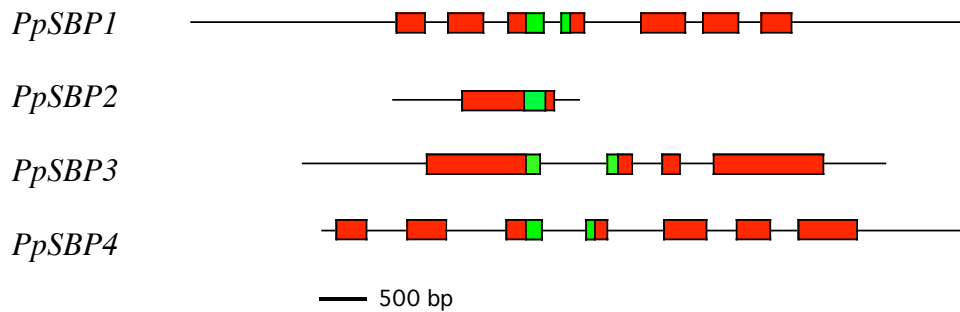


Abb. 3.1.1: Exon-Intron Struktur *PpSBP1-4*. In rot wurden die Exons dargestellt und in grün ist die SBP-Box hervorgehoben. *PpSBP2* war nur zu diesem Zeitpunkt nur teilweise kloniert.

3.1.2 Einzelkopie-Gen-Nachweis von *PpSBP1-4* und Abschätzung der Größe der Genfamilie

Zur Bestimmung der Kopienzahl der klonierten SBP-Box Gene *PpSBP1* bis *PpSBP4* wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt (siehe 2.2.2).

Je 10 µg genomischer DNA wurden über Nacht mit den Enzymen *BclI*, *HindIII*, *EcoRI* und *EcoRV* verdaut. Alle diese Enzyme erkennen eine Sequenz von sechs Nukleotiden. Dies bedeutet, dass in einer Zufallssequenz statistisch alle 4kb eine Schnittstelle zu erwarten ist. Nach Auftrennung der Ansätze im Agarosegel und Übertragung der DNA auf eine N⁺- Nylonmembran wurde mit radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten und nicht stringenten Bedingungen hybridisiert (siehe 2.2.2).

Die Sonden wurden durch PCR auf die entsprechende cDNA gewonnen (siehe 2.2.13). Es wurden Sequenzen am 3'Ende ausgewählt, die keine Übereinstimmung mit den anderen Genen zeigten. Nur bei *PpSBP2* wurde die SBP-Box als Sonde verwendet, da kaum mehr Sequenzinformation zur Verfügung stand.

Um die Größe der gesamten SBP-Box Genfamilie in *P. patens* zu bestimmen, wurde eine Southern Blot Analyse unter nicht stringenten Bedingungen durchgeführt (siehe 2.2.2).

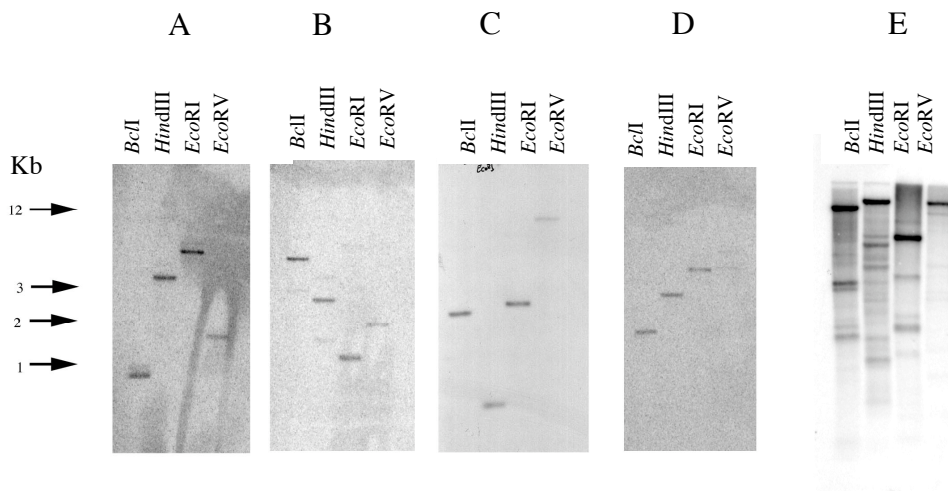


Abb. 3.1.2: Einzelkopie-Nachweis für *PpSBP1-4* und Abschätzung der Größe der Genfamilie. Ausgelesener Southern Blot für A: *PpSBP1*. B: *PpSBP2*. C: *PpSBP3*. D: *PpSBP4*. E: Abschätzung der Gesamtgröße der Familie.

Bei den Southern Blot Analysen unter stringenten Bedingungen findet man pro Enzym und Sonde immer nur eine Bande (siehe Abb.3.1.2 A-D). Daraus kann man ableiten, dass die SBP-Box Gene *PpSBP1-4* Einzelgene sind. Im Falle von *PpSBP2* sind des Weiteren noch mehrere schwache Banden zusehen (siehe Abb.3.1.2 B). Dies deutet auf mindestens ein weiteres Gen hin, das *PpSBP2* sehr ähnlich ist.

Bei der Hybridisierung unter nicht stringenten Bedingungen kann man sehr viele unterschiedlich starke Bande erkennen (siehe Abb.3.1.2 E). Daraus ergibt sich, dass es deutlich mehr als die vier bis dorthin klonierten Gene in *P. patens* gibt.

3.1.3 Isolierung weiterer SBP-Box Gene

Die Southern Blot Analyse unter nicht stringenten Bedingungen zeigte eine weitaus größere Anzahl an SBP-Box Genen als die vier isolierten (siehe Abb.3.1.2 E). Um diese zu klonieren, wurde die cDNA-Bibliothek noch mal unter nicht stringenten Bedingungen durchmustert (siehe 2.2.7).

Im Unterschied zu der Durchmusterung unter stringenten Bedingungen wie in 3.1.2 beschrieben, wurde hier ein Sondengemisch von *PpSBP2* und *PpSBP4* eingesetzt (siehe 2.2.13).

Aus den isolierten Phagen wurde DNA isoliert, diese wurde sequenziert und mit den bereits isolierten SBP-Box Genen verglichen. Wie erwartet wurden alle vier bekannten SBP-Box Gene nochmals isoliert. Nur ein weiteres potentiell SBP-Box Gene (Phage16)

konnte gefunden werden. Im Vergleich zu den anderen SBP-Box Genen zeigte es sehr große Ähnlichkeiten, obwohl die charakteristische SBP-Box in dieser Sequenz nicht enthalten war.

Aus der vorhandenen cDNA-Bibliothek konnten nicht alle SBP-Box Gene aus *P. patens* isoliert werden, doch während dieser Doktorarbeit wurde das Genom von *P. patens* sequenziert. Die zur Verfügung stehenden Sequenzdaten kommen aus einer „Whole-Genom-Shotgun“ Sequenzierung und können mittels einer MegaBLAST Suche in der NCBI Trace Archive Datenbank durchsucht werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.shtml>). Mit Hilfe der SBP-Domäne von AtSPL1 wurden die genomischen Sequenzen in der Datenbank durchsucht und mit den Programmen AssemblyLIGN™ Version 1.0.9c (Oxford Molecular Group plc 1999) und einem automatischen Assemblierungsprogramm der PHYSCObase (<http://moss.nibb.ac.jp/>) zusammengefügt. Auf diese Weise konnten neun weitere SBP-Box Gene gefunden werden.

Anhand der genomischen Sequenzen konnten Oligonukleotide entworfen werden und ein neuer cDNA-Pool wurde als Vorlage für die PCR verwendet. Die folgenden SBP-Box Gene konnten wahrscheinlich vollständig isoliert werden, da für sie ein potentielles Start- und Stop-Codon identifiziert werden konnte: *PpSBP5*, *PpSBP6*, *PpSBP9*, *PpSBP12* und *PpSBP13*. Von *PpSBP10* und *7* konnten nur Teile der Gene isoliert werden und von *PpSBP8* und *11* konnten keine Amplifikate gewonnen werden. Alle isolierten cDNA Sequenzen sind bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) einzusehen. Die Zugangsnummer und die Sequenzen der Gene *PpSBP8* und *PpSBP11*, für die keine cDNA isoliert werden konnte, wurden in Anhang A aufgelistet.

Durch den Vergleich der cDNA-Sequenzen mit der genomischen DNA wurden die Exon-Intron Grenzen bestimmt. Für die Gene, deren cDNA Sequenz nicht oder nur unvollständig vorhanden war, konnte durch einen Vergleich der genomischen Sequenzen mit ähnlichen SBP-Proteinen eine Exon-Intron Struktur abgeleitet werden.

Außerdem konnten anhand der neu assemblierten genomischen Sequenzen die öffentlichen EST-Datenbanken durchmustert werden. Für *PpSBP11* wurde eine EST-Sequenz gefunden. Eine vollständige Liste aller gefundenen EST-Sequenzen wird in Anhang B angegeben. Es wurde auch die Sequenz des potentiellen SBP-Box Gens aus

der heterologen Durchmusterung mit den neuen SBP-Box Genen verglichen. Diese Sequenz entspricht dem SBP-Box Gen *PpSBP7*.

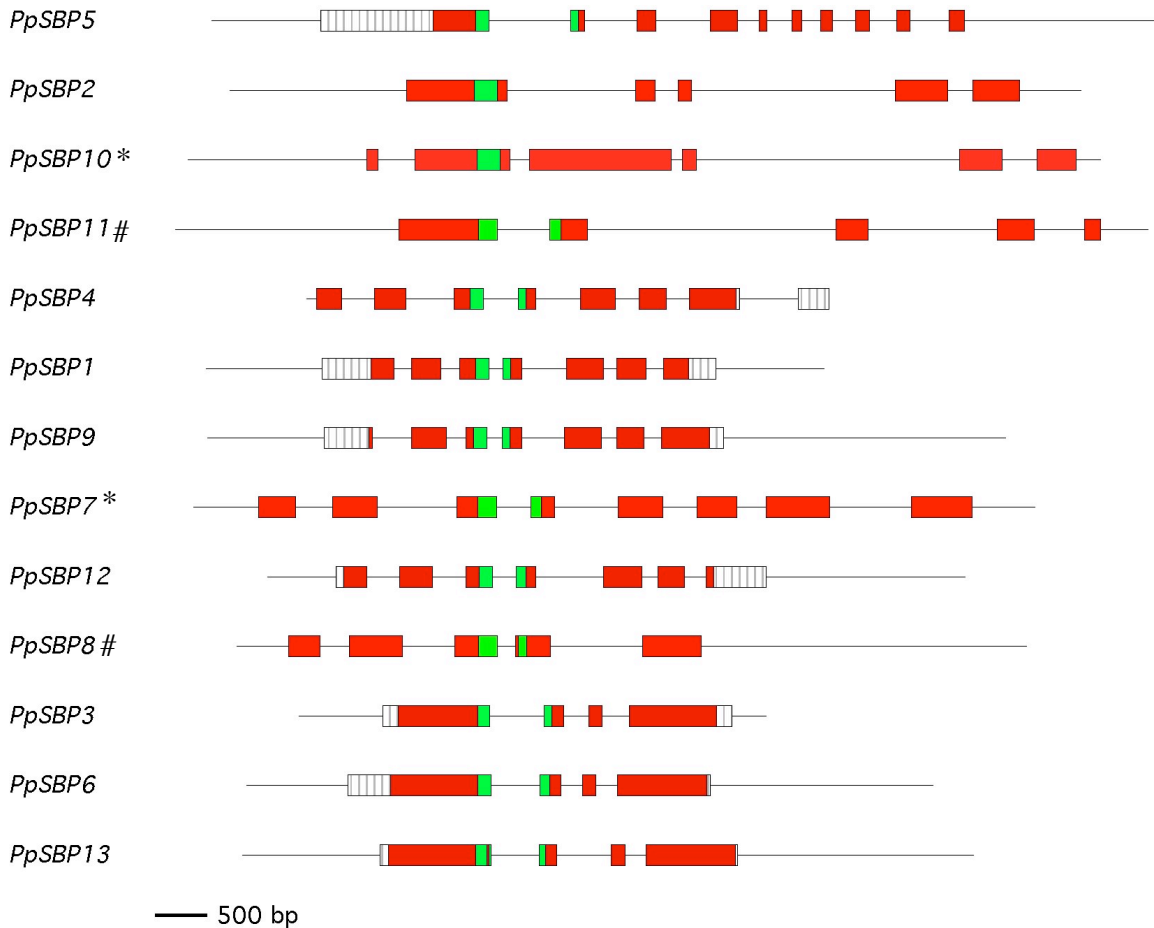


Abb. 3.1.3: Exon-Intron Struktur der SBP-Box Gene aus *P. patens*. In rot wurden die codierende Bereiche dargestellt. In grün wurde die SBP-Box und die UTR-Regionen wurden weiß gestrichelt hervorgehoben. * markiert die nur zum Teil sequenzierten Sequenzen, # markiert die vorhergesagten Strukturen.

Anhand der Organisation der verschiedenen Gene kann man mehrere Gruppen unterscheiden:

- *PpSBP5* besteht aus 10 Exons.
- *PpSBP2*, *10* und *11* bestehen aus fünf bis sechs Exons und besitzen sehr großen Introns.
- *PpSBP4*, *1*, *9*, *7*, *12* und *8* bestehen aus mindestens fünf und maximal acht Exons, die alle vergleichbar groß sind.

- *PpSBP3*, *6* und *13* bestehen aus vier Exons, von denen das erste und das letzte Exon deutlich größer sind als die beiden mittleren.

In fast allen Fällen gibt es nur die klassische Exon-Intron Grenzen GT/AG. Nur *PpSBP3* zeigt eine Ausnahme, das erste Intron endet auf AA statt AG.

3.1.4 Phylogenetische Rekonstruktion der SBP-Box Gene

Um einen ersten Einblick in die evolutionäre Verwandtschaft der SBP-Box Gene aus *P. patens* und *A. thaliana* zu bekommen wurde versucht eine phylogenetische Rekonstruktion durchzuführen (siehe Abb. 3.1.4).

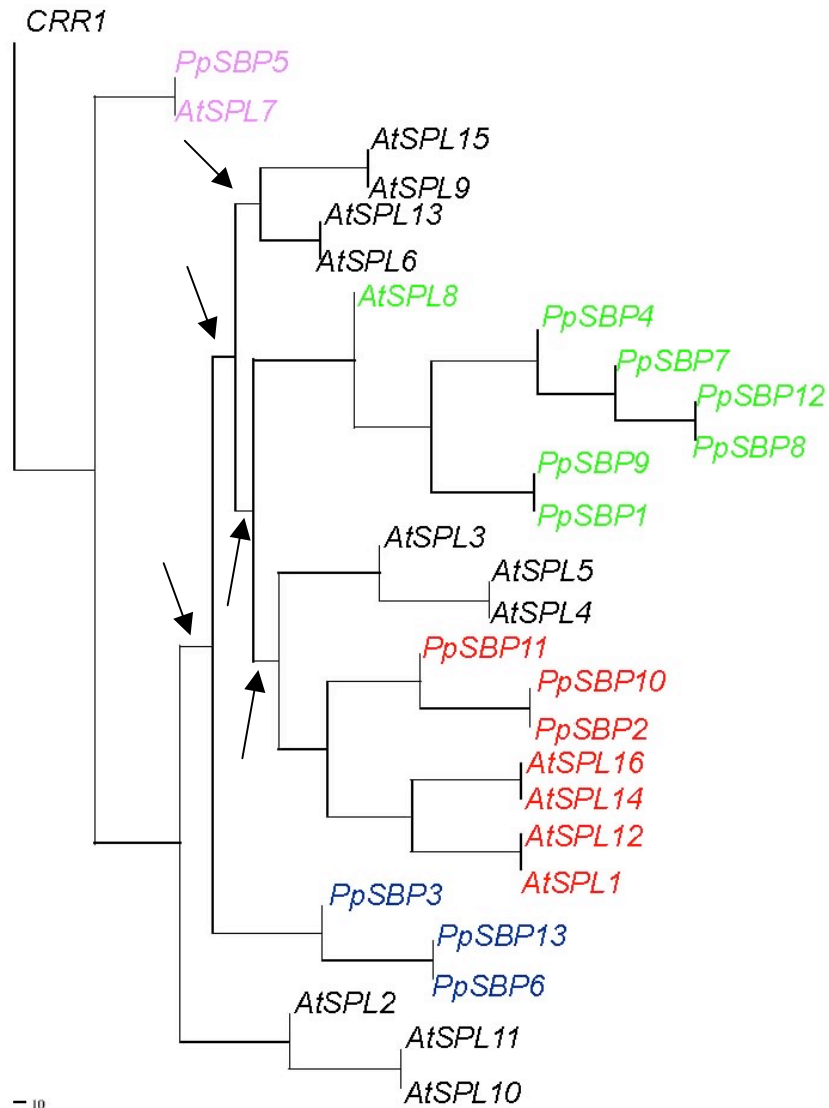


Abb. 3.1.4: Phylogenetische Rekonstruktion der SBP-Box Gene aus *P. patens* und *A. thaliana*, auf Grund der konservierten SBP-Box Sequenzen. *CRR1* wurde als Außengruppe gewählt. Alle *PpSBPs* wurden farblich unterlegt und die *AtSPLs* wurden je nach Gruppenzugehörigkeit farblich unterlegt. Pfeile zeigen auch schwach unterstützte Zweige deren Bootstrap-Werte unter 50% liegen. Maßstab unten links in %.

Für diese Rekonstruktion wurden die Nukleotidsequenzen der konservierten SBP-Box verwendet. Der Sequenzvergleich sowie die phylogenetische Rekonstruktion, mit der Methode Neighbor Joining, wurden mit dem Programm MacVector™ 7.2.2 durchgeführt. Als Außengruppe wurde ein SBP-Box Gen aus *Chlamydomonas reinhardtii*, *CRR1* (Kropat *et al.*, 2005), verwendet

Trotz der schlechten Unterstützung einiger Zweige können ein paar Einblicke in die Evolution der SBP-Box Gene gewonnen werden. Die Gene *PpSBP11*, *PpSBP10* und *PpSBP2* scheinen einen gemeinsamen Vorfahren zusammen mit den Genen *AtSPL16*, *AtSPL14*, *AtSPL12* und *AtSPL1* zu haben und bilden somit die *AtSPL1*-Gruppe. Außerdem scheint *AtSPL8* in *P. patens* sechs orthologe Gene *PpSBP4*, *PpSBP7*, *PpSBP12*, *PpSBP1* und *PpSBP9* zu haben, die auf zwei Zweige verteilt sind. Diese bilden die *AtSPL8*-Gruppe. *AtSPL7* und *PpSBP5* scheinen sich von den übrigen SBP-Box Genen schon sehr früh abgespalten zu haben und bilden vielleicht eine eigene Gruppe, die *AtSPL7*-Gruppe genannt wird. Außerdem scheinen diese Gene am ehesten die basale Form eines SBP-Box Gens wiederzuspiegeln. Die Gene *PpSBP3*, *PpSBP6* und *PpSBP13* sind zu sich enger verwandt als zu den *A. thaliana* Genen und bilden die *PpSBP3*-Gruppe.

3.1.5 Vergleich der SBP- Proteine aus *P. patens* und *A. thaliana*

Da die phylogenetische Rekonstruktion nur bedingt Hinweise auf die evolutionäre Verwandtschaft der SBP-Box Gene aus *P. patens* und *A. thaliana* gab, wurden die SBP-Proteine genauer auf konservierte Bereiche analysiert, die vielleicht auch einen Hinweis auf die evolutionäre Verwandtschaft geben können.

Die Proteine der *AtSPL1*-Gruppe haben die gleichen konservierten Domänen und sind alle nach dem folgenden Schema aufgebaut:

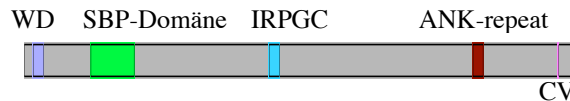


Abb. 3.1.5: Konservierte Domänen der Proteine der AtSPL1-Gruppe. In dunkelblau wurde die WD-Domäne, die später als AHA-like1 Motiv bezeichnet wird, dargestellt, in grün die SBP-Domäne, in hellblau die IRPGC-Domäne, in rot der “ANK-repeat” und in lila die CV-Domänen.

Im N-terminalen Bereich findet man drei konservierte Tryptophane (W), gefolgt von einem Aspartat (D). Auf Grund dieser Aminosäurezusammensetzung wurde der konservierte Bereich WD-Domäne genannt. Mit dem Programm WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>) wurden die konservierten Aminosäuren in Abb. 3.1.6 graphisch dargestellt. Jedes Sequenzlogo ist eine graphische Darstellung eines Aminosäuren- oder Nukleinsäuren-Sequenzvergleichs. Jedes Logo besteht aus Säulen aus Symbolen, eine Säule pro Position in der Sequenz. Die Gesamthöhe der Säule zeigt die Sequenzkonservierung an dieser Position, während die Höhe der Symbole in der Säule die relative Häufigkeit der Aminosäure oder Nukleinsäure an dieser Position repräsentiert. Aminosäuren oder Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften können zusätzlich durch unterschiedliche Farben dargestellt werden (Crooks *et al.*, 2004).

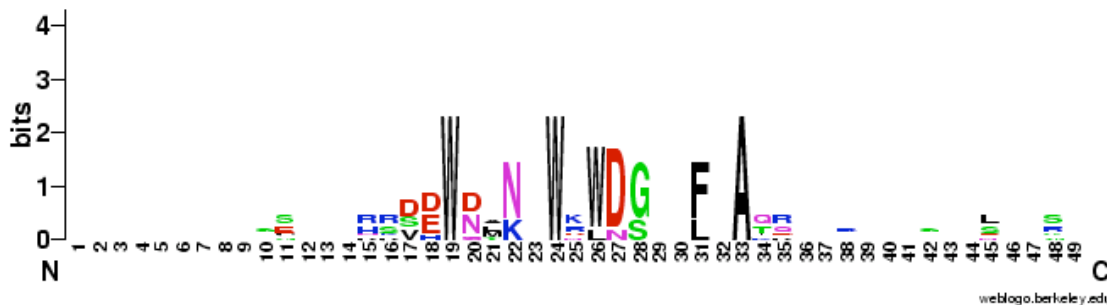


Abb. 3.1.6: WebLogo der WD-Domäne aus den Proteinen der AtSPL1-Gruppe.

In Abb. 3.1.6 erkennt man deutlich, dass zwei bis drei Tryptophane (W) konserviert sind, meist begleitet von sauren Aminosäuren wie Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E). Diese Aminosäuren sind in den Proteinsequenzen von hydrophoben Aminosäuren eingerahmt. Diese Zusammensetzung von aromatischen und sauren Aminosäuren, die in hydrophobe Aminosäure eingebettet sind, kennt man als AHA-Motiv (Nover und Scharf, 1997). Aus diesem Grund wird die WD-Domäne in AHA-like umbenannt. Das AHA-Motiv ist nicht durch eine bestimmte Aminosäuresequenz charakterisiert, sondern durch

das Vorhandensein von aromatischen und sauren Aminosäuren in einem hydrophoben Kontext. Die Kernsequenz dieses AHA-like1 Motiv möchte ich als WX_4WXWD beschreiben.

In der Mitte der Proteine kann man einen konservierten Bereich mit den Aminosäuren Isoleucin (I), Arginin (R), Prolin (P), Glycin (G) und Cystein (C) entdecken (siehe Abb. 3.1.7). Aus der Zusammensetzung dieser konservierten Aminosäuren wurde der Name IRPGC-Domäne abgeleitet. Außer in den SBP-Domän Proteinen wurde diese Domäne in keinen anderen bekannten Proteinen gefunden und für diese Domäne ist noch keine biologische Funktion bekannt.

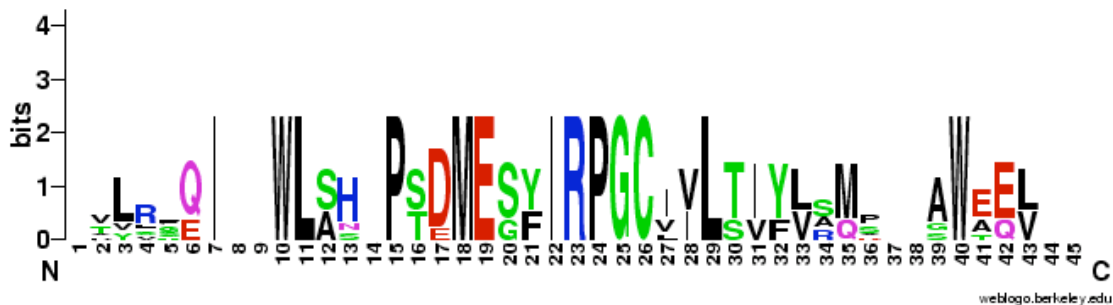


Abb. 3.1.7: WebLogo der IRPGC-Domäne aus den Proteinen der AtSPL1-Gruppe.

Im C-terminalen Bereich dieser Proteine kann man ein oder mehrere „ANK-repeats“ erkennen (siehe Abb. 3.1.8). Dieses Motiv beinhaltet ungefähr 33 Aminosäuren und wurde zuerst in Ankyrin entdeckt. Ein „ANK-repeat“ wurde als L-förmige Struktur, bestehend aus einer Beta-Haarnadelstruktur und zwei Alpha-Helices, beschrieben. Viele „ANK-repeat“ Regionen spielen bei der Protein-Protein Interaktion eine wichtige Rolle (Überblick in Cai und Zhang, 2006). Ob dies auch in diesen Proteinen der Fall ist und welche Proteine dies sein könnten, ist noch unbekannt.

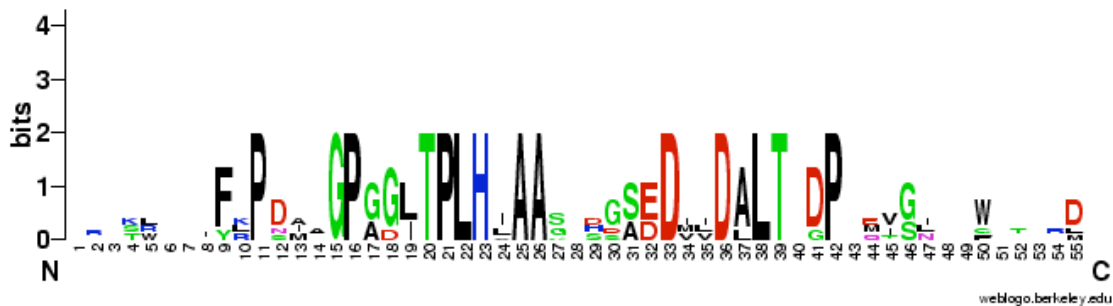


Abb. 3.1.8: WebLogo der „ANK-repeat“ Region aus den Proteinen der AtSPL1-Gruppe.

Am Ende dieser Proteine findet man mehrere konservierte Cysteine (siehe Abb. 3.1.9). Solche Anhäufungen von Cysteinen spielen oft bei der Bindung von Metall-Ionen eine Rolle (Hamer, 1986). Dies könnte auch bei den SBP-Proteinen der Fall sein.

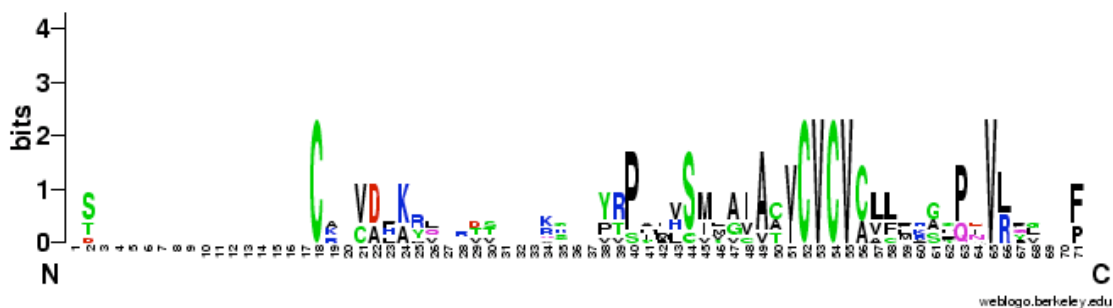


Abb. 3.1.9: WebLogo der CV-Domäne aus den Proteinen der AtSPL1-Gruppe

Die Proteine PpSBP5 und AtSPL7 haben einen ähnlichen Aufbau, ihnen fehlt aber der „Ank-repeat“.

Die Proteine der AtSPL8-Gruppe besitzen vor der SBP-Domäne einen weiteren konservierten Bereich (siehe Abb. 3.1.10).



Abb. 3.1.10: Domänen-Struktur der Proteine PpSBP1, PpSBP4, PpSBP7, PpSBP8, PpSBP9, PpSBP12 und AtSPL8. In gelb wurde die RTYF-Domäne markiert und grün stellt die SBP-Domäne dar.

Die RTYF-Domäne ist durch die konservierten Aminosäuren Arginin (R), Threonin (T), Tyrosin (Y) und Phenylalanin (F) charakterisiert, durch die sie auch ihren Namen erhalten hat (siehe Abb. 3.1.11). Auch dieses Motiv ist nur aus den SBP-Domän

Proteinen bekannt und ihre biologische Funktion ist noch unbekannt. Es wurde versucht ihr im Laufe dieser Arbeit eine Funktion zuzuordnen (siehe 3.2.2).



Abb. 3.1.11: WebLogo des RTYF Motiv aus den Proteinen der AtSPL8-Gruppe.

In den Proteinen PpSBP1, PpSBP4, PpSBP7, PpSBP8, PpSBP9, PpSBP12 kann man N-terminal der RTYF Domäne noch eine weitere Domäne entdecken, wiederum ein AHA-like Motiv.

Dieses AHA-like Motiv hat, im Gegensatz zu dem AHA-like1 Motiv, Glutaminsäure (E) anstatt Asparaginsäure (D) konserviert. Außerdem liegt ein konserviertes Tyrosin (Y) vor dem eigentlichen AHA-like Motiv. Deshalb wurde dieses AHA-like Motiv im weiteren Verlauf dieser Arbeit AHA-like2 genannt. Die Kernsequenz für das AHA-like2 Motiv ist $YX_6EW\text{EWD}$



Abb. 3.1.12: Weblogo des AHA-like2 Motivs aus den Proteinen PpSBP1, PpSBP4, PpSBP7, PpSBP8, PpSBP9 und PpSBP12 .

Die Proteine PpSBP3, PpSBP6, PpSBP13, AtSPL9, AtSPL15, AtSPL13, AtSPL6, AtSPL10, AtSPL11 und AtSPL2 zeigen ein konserviertes Motiv C-terminal der SBP-Domäne. Außerdem zeigen die Proteine der PpSBP3-Gruppe ein konserviertes Motiv N-

terminal der SBP-Domäne.

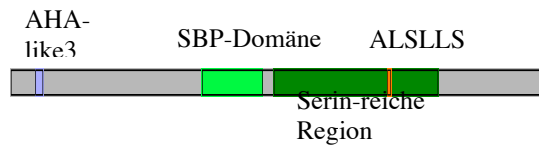


Abb. 3.1.13: Domänen-Struktur der Proteine PpSBP3, PpSBP6, PpSBP13, AtSPL9, AtSPL15, AtSPL13, AtSPL6, AtSPL10, AtSPL11 und AtSPL2. In dunkelblau wurde das AHA-like3 Motiv dargestellt. Dies gibt es nur in den Proteinen PpSBP3, PpSBP6 und PpSBP13. In grün die SBP-Domäne und in dunkelgrün eine Serin-reiche Region. In rot wurde die ALSLLS-Domäne markiert.

In Abb.3.1.14 wurde die konservierte ALSLLS-Domäne aus den Proteinen PpSBP3, PpSBP6, PpSBP13, AtSPL9, AtSPL15, AtSPL13, AtSPL6, AtSPL10, AtSPL11 und AtSPL2 graphisch dargestellt. Die Nukleotidsequenz dieser Domäne ist auch eine Zielsequenz für die microRNA156.



Abb.3.1.14: WebLogo der Proteinsequenz der miR156 Zielsequenz. Proteinsequenz, des für die MRE codierenden Bereich. WebLogo wurde Sequenzvergleich aller PpSBPs und AtSPLs mit MRE gewonnen

Die MRE der Gene *PpSBP3*, *6* und *13* liegt, wie in den *A. thaliana* *SPLs* im letzten Exon (siehe Abb. 3.1.15)



Abb. 3.1.16: WebLogo des AHA-like3 Motivs aus der PpSBP3-Gruppe.

3.2 Funktionalität der AHA-like Motive 1-3, des RTYF-Motivs und der miR156

3.2.1 Funktionalität der AHA-like Motive 1-3

Wie in 3.1.4 beschrieben, kann man drei AHA-like Motive in den Moos SBP-Proteinen unterscheiden. Das AHA-Motiv ist nicht nur im Pflanzenreich (Döring *et al.* 2000; Kotak *et al.*, 2004) als Aktivierungsdomäne bekannt, sondern auch in Hefe und Säugetieren (Nover and Scharf, 1997).

Nun stellt sich die Frage, ob die AHA-like Motive aus den SBP-Box Genen ebenfalls als Aktivierungsdomäne wirken können. Um dies zu beantworten wurde ein Selbstaktivierungsversuch in Hefe durchgeführt.

Da sich in *A. thaliana* nur ein Typ des AHA-like Motivs finden lässt, wurde der Versuch mit diesem Typ gestartet (AHA-like1). Aus diesem Grund wurde zwei Vertreter ausgewählt, nämlich AtSPL1 und AtSPL14 und ihre AHA-like1 Motive in den Hefevektor pGBKT7 kloniert.

Im AHA-Motiv spielen vor allem die konservierten aromatischen Aminosäuren eine wichtige Rolle. Sie bilden eine Art Plattform, an der die Faktoren der Transkriptionsmaschinerie andocken können (Döring *et al.*, 2000). Folglich führt eine Mutation der aromatischen Aminosäuren zu einem Verlust der Aktivierungsfähigkeit. Auch dies wurde mittels verschiedener Konstrukte, in denen zwei der drei konservierten Tryptophane ausgetauscht wurden, getestet.

Auch die mutanten AHA-like1 Motive aus AtSPL1 und AtSPL14 wurden in einen Hefevektor (pGBKT7) mit einer GAL4-DNA Bindedomäne kloniert und in den Hefestamm AH109 transformiert. Diese Konstrukte wurden mir freundlicherweise von Dr. U. Hartmann (MPIZ Köln) zur Verfügung gestellt. Wenn das AHA-like1 Motiv eine

Aktivierungsfähigkeit in Hefe besitzt, wachsen die Hefen auf Medium ohne Histidin und Tryptophan (□HW-Medium). Als Kontrolle wurde der leere Vektor transformiert und die entsprechenden Hefen ebenfalls auf das □HW-Medium ausgebracht. Die Hefekulturen wurden bis zu einer einheitliche OD₆₀₀ wachsen gelassen, dann in einer Verdünnungsreihe jeweils 1:10 auf □HW-Medium ausgebracht und drei Tage bei 30°C inkubiert. Alle Selbstaktivierungstests wurden auf die gleiche Weise durchgeführt.

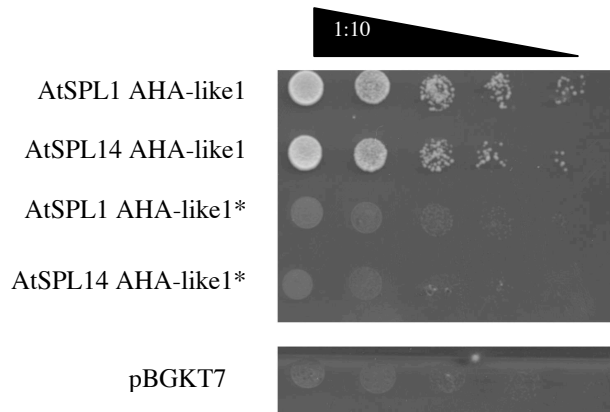


Abb. 3.2.1: Selbstaktivierungstest in Hefe des AHA-like1 Motivs aus *A. thaliana*. Das AHA-like1 Motiv von AtSPL1 und AtSPL14 zeigt ein Wachstum auf dem □HW-Medium im Vergleich zu den Hefen mit dem leeren Vektor. * markiert die veränderten AHA-like1 Motive. Sie zeigen kein Wachstum auf dem □HW-Medium.

In Abb. 3.2.1 kann man ein deutliches Wachstum der Hefe mit dem AHA-like1-Motiv aus *A. thaliana* auf dem Selektionsmedium erkennen, während das mutierte AHA-like1 Motiv keinerlei Aktivität im Vergleich mit dem leeren Vektor zeigt.

In *P. patens* gibt es drei verschiedene Varianten des AHA-like Motivs (siehe 3.1.4). Mit dem nachfolgenden Versuch sollte die Frage beantwortet werden, ob die verschiedenen AHA-like Motive aus Moos die gleiche Aufgabe als Aktivierungsdomäne erfüllen, wie das AHA-like1 Motiv aus *A. thaliana*. Da allerdings für das AHA-Motiv keine genaue Größe beschrieben ist, wurde außerdem auch versucht dieses Motiv durch immer kleiner werdende Konstrukte einzugrenzen.

Je ein Vertreter für die drei verschiedenen AHA-like Motive wurde ausgewählt (PpSBP1 für AHA-like2, PpSBP2 für AHA-like1 und PpSBP3 für AHA-like3) und in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Konstrukte wurde wie in 2.2.12.3 beschrieben

hergestellt. Die Hefen wurde auf Platten ohne Tryptophan selektiert und anschließend auf \square HW-Medium ausgebracht.

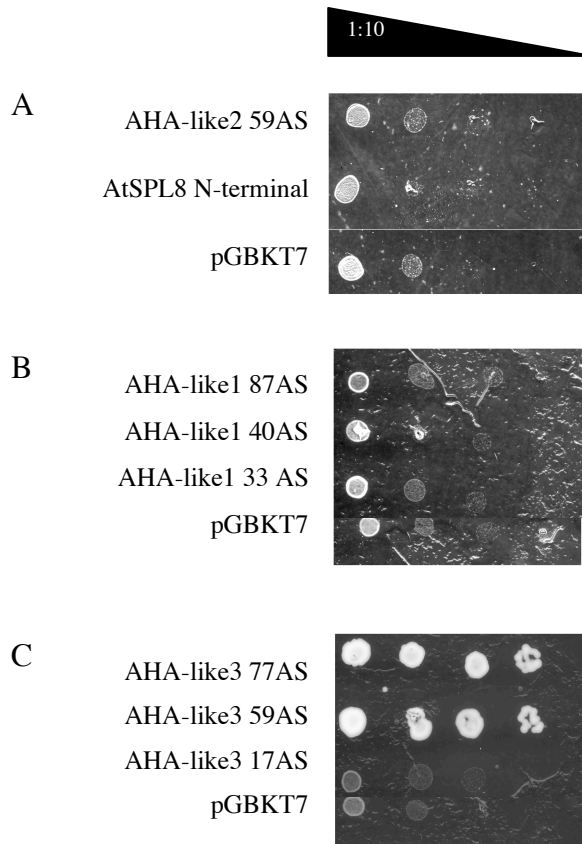


Abb. 3.2.2: Selbstaktivierungstest der AHA-like Motive1-3 der PpSBPs. A= Weder das AHA-like2 Motiv noch der N-terminale Bereich von AtSPL8 zeigen ein sichtbares Wachstum der Hefen im Vergleich zum leeren Vektor. B= Die Hefen mit dem *P. patens* AHA-like1 Motiv zeigen im Vergleich zum leeren Vektor kein Wachstum. C= Das AHA-like3 Motiv zeigt mit einer Länge von 77 und 39 Aminosäuren ein sichtbares Wachstum gegenüber dem leeren Vektor. Bei einer Länge von 17 Aminosäuren konnte kein Wachstum der Hefen im Vergleich mit dem leeren Vektor festgestellt werden.

AtSPL8 und PpSBP1 ähneln sich zwar im Aufbau der Proteine doch AtSPL8 besitzt kein AHA-like Motiv. Als Kontrolle zum AHA-like2 Motiv wurde der N-terminale Bereich von AtSPL8 verwendet. Dieser wurde in den Hefevektor pGBKT7 kloniert (das Konstrukt wurde mir von Dr. Y. Zhang, MPIZ Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) und im Vergleich zu dem AHA-like2 Motiv analysiert. Der N-terminale Bereich von AtSPL8 zeigte im Vergleich zum AHA-like2 Motiv und dem leeren Vektor keinerlei Aktivierungsfähigkeit (siehe Abb. 3.2.2 A). Das AHA-like2 Motiv selber, wies im

Vergleich zum leeren Vektor auch kein sichtbares Wachstum und damit keine Aktivierungsfähigkeit in Hefe auf (siehe Abb. 3.2.2 A).

Die Hefen mit dem AHA-like1 Motiv aus *P. patens* zeigen kein Wachstum im Vergleich zu den Hefen mit dem leeren Vektor auf dem □HW-Medium (siehe Abb. 3.2.2 B). Das AHA-like1 Motiv aus *P. patens* besitzt im Gegensatz zum AHA-like1 Motiv aus *A. thaliana* keine Aktivierungsfähigkeit in Hefe.

Eine deutliche Selbstaktivierung im Vergleich zum leeren Vektor konnte bei dem AHA-like3 Motiv festgestellt werden. Dieses konnte sogar bis auf 39 Aminosäuren eingengt werden. Das noch kleinere Konstrukt mit nur 17 Aminosäuren zeigte kein Wachstum der Hefe im Vergleich zum leeren Vektor (siehe Abb.3.2.2 C).

3.2.2 Ist das RTYF-Motiv eine Aktivierungsdomäne?

Das RTYF-Motiv markiert eine charakteristische Domäne für die Proteine PpSBP1, PpSBP4, PpSBP7, PpSBP8, PpSBP9, PpSBP12 und AtSPL8. Bei früheren Versuchen mit AtSPL8 wurde bei einer Hefe-zwei-Hybrid Durchmusterung eine Selbstaktivierungsfähigkeit von AtSPL8 festgestellt (persönliche Mitteilung Dr. Y. Zhang, MPIZ Köln). Da das RTYF-Motiv in der AtSPL8-Gruppe den einzigen konservierten Bereich außerhalb der SBP-Domäne darstellt, lag die Vermutung nahe, dass dieses Motiv für die Aktivierung in Hefe verantwortlich ist. Deswegen wurde dieses Motiv auf Selbstaktivierung in Hefe getestet.

Mir wurden drei verschiedene Hefekonstrukte zur Verfügung gestellt (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Y. Zhang, MPIZ, Köln), die den N- und C-terminalen Bereich und das RTYF-Motiv alleine enthielten.

Die verschiedenen Konstrukte lagen in dem Hefe-Vektor pGBKT7 vor, welcher eine DNA-Bindedomäne besaß. Die Konstrukte wurden in den Hefestamm AH109 transformiert und auf Platten ohne Tryptophan selektiert.

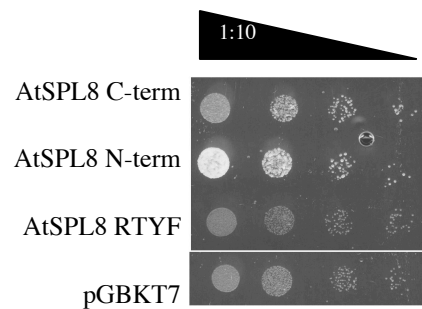


Abb. 3.2.3: Selbstaktivierungstest des AtSPL8 RTYF-Motivs. Weder die Hefen mit dem N- oder C-terminalen Bereich noch mit dem RTYF Motiv alleine zeigten Wachstum im Vergleich zum leeren Vektor.

Keines der drei getesteten Konstrukte zeigte im Vergleich zum leeren Vektor ein deutliches Wachstum auf dem \square HW-Medium. Das RTYF-Motiv scheint keine Aktivierungsdomäne in Hefe zu sein.

3.2.3 Genomischer Locus der miR156 in *P. patens*

In *A. thaliana* werden wahrscheinlich 11 der 17 Mitglieder von den microRNAs 156 und 157 kontrolliert (Rhoades *et al.*, 2002). Auch in *P. patens* ist die miR156 exprimiert und zumindest *PpSBP3* ist ein Zielgen dieser microRNA (Arazi *et al.*, 2005).

Die von JGI bereitgestellten genomischen Sequenzdaten der „Whole-Genom-Shutgun“ Sequenzierung (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.shtml>) von *P. patens* wurden nach codierenden Regionen für die miR156 durchsucht und es konnten zwei potentielle Loci identifiziert werden. Mit Hilfe des Programms mfold (Zucker *et al.*, 1999) wurde die Sekundärstruktur der potentiellen Transkripte ermittelt. Sie zeigen die für miRNA Transkripte charakteristische Faltung in Haarnadelstrukturen (siehe Abb. 3.2.4). Die Sequenzen sind in Anhang A hinterlegt.

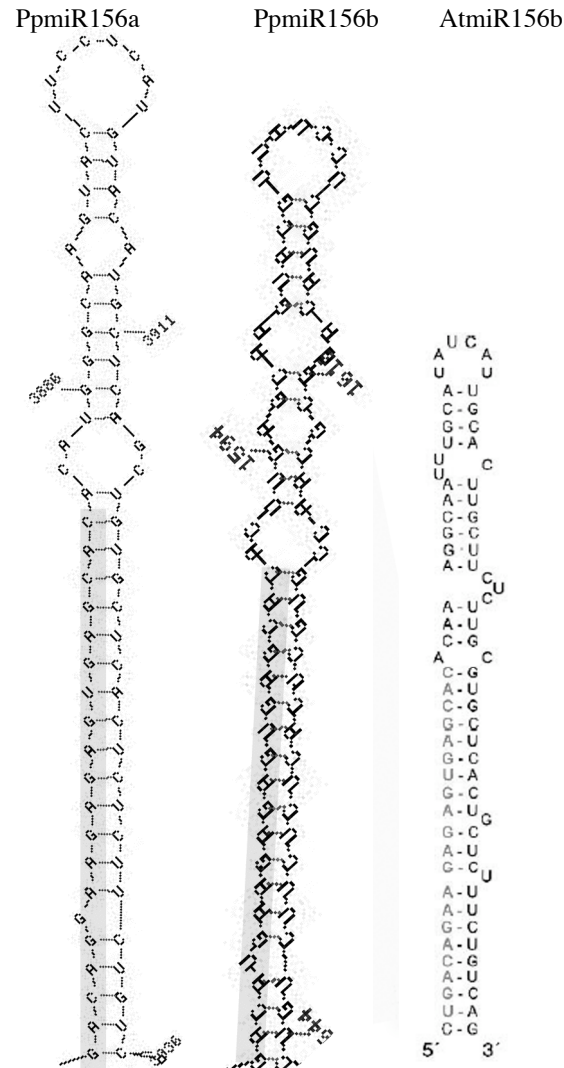


Abb. 3.2.4: MiR Haarnadelstrukturen. Haarnadelstrukturen der Transkripte von Links: PpmiR156a. Mitte: PpmiR156b. Rechts: AtmiR156b (verändert nach Reinhart *et al.*, 2002). Grau wurde die miR156 unterlegt.

Die vorhergesagte Faltung in Haarnadelstrukturen der potentiellen Transkripte von PpmiR156a und PpmiR156b zeigen große Ähnlichkeiten mit der Haarnadelstruktur des Transkripts AtmiR156b (siehe Abb. 3.2.4). Basierend auf den Sequenzen der genomischen Loci der PpmiR156 wurden Oligonukleotide für die potentielle Vorstufe der PpmiR156a und b (pre-PpmiR156a und pre-PpmiR156b) entworfen. Mit diesen Oligonukleotiden (MR265/MR266 Locus a, MR267/MR268 Locus b) wurde eine RT-PCR (siehe 2.2.4) durchgeführt. Als Vorlage diente Gesamt-RNA, die aus sieben Tage altem Protonema gewonnen wurde. Die Gesamt-RNA wurde mit DNaseI verdaut um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Für den Locus PpmiR156a konnte die pre-PpmiR156a

nachgewiesen werden (siehe Abb.3.2.5). Zur Kontrolle wurde das gewonnene Amplifikat aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte, dass die pre-PpmiR156a amplifiziert wurde.

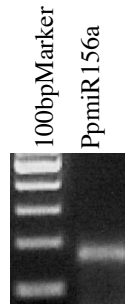


Abb. 3.2.5: RT-PCR auf die pre-PpmiR156a. Links 100bp Marker. Rechts Amplifikat nach 40 Zyklen

Zusammen mit den Ergebnissen von Arazi *et al.*, 2005 wurden fast alle Kriterien für eine miRNA und ihrer codierenden Region erfüllt die bei Ambros *et al.*, 2003 aufgelistet wurden. Nur eine Akkumulation der pre-miR156 in einer DICER defizienten Mutante wurde noch nicht nachgewiesen, da bis jetzt noch keine solche Mutante für *P. patens* beschrieben wurde.

3.2.4 Kann die PpmiR156 eine AtMRE erkennen?

Wir wissen nun, dass es in *P. patens* mindestens einen codierenden Bereich für die miR156 gibt. Die PpmiR156 ist identisch mit der AtmiR156 und auch die MREs in den SBP-Box Gentranskripten beider Spezies sind identisch. Doch bis jetzt wurde noch nicht nachgewiesen, dass die PpmiR156 auch tatsächlich eine *A. thaliana* MRE erkennen kann. Um dies zu überprüfen wurde ein Zielgen der miR156 aus *A. thaliana* in *P. patens* Protoplasten transformiert.

Als Zielgen wurde *AtSPL3* gewählt, das eine miR156 MRE trägt und dessen Protein im Zellkern lokalisiert ist. *AtSPL3* wurde mit YFP und CFP fusioniert, das resultierten die Konstrukten 35S::*SPL3*-YFP:MRE⁺ und 35S::*SPL3*-CFP:MRE⁺. Als Kontrolle wurde die miR156 MRE so verändert, dass die miR156 nicht mehr binden konnte und somit auch keine post-transkriptionelle Regulation mehr stattfinden konnte. Diese abgeänderte miR156 MRE wurde mit YFP und CFP fusioniert, daraus resultierten die Konstrukten 35S::*SPL3*-YFP:MRE⁻ und 35S::*SPL3*-CFP:MRE⁻.

Diese Konstrukte wurden mir freundlicherweise von Dr. M. Gandikota und Dr. R. Birkenbihl (beide MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt.

Moos-Protoplasten wurden gleichzeitig mit den beiden Konstrukten 35S::SPL3-CFP:MRE⁻ und 35S::SPL3-YFP:MRE⁺ transformiert (siehe 2.2.9). Wenn eine miR156 in Wildtyp-Protoplasten vorhanden ist und die MRE von *AtSPL3* erkennt, sollte die Intensität des YFP mit der wildtypischen MRE deutlich geringer sein, als jene des CFP mit der mutierten Form der MRE (siehe Abb. 3.2.6 links). Je 10 Protoplasten wurden auf die Intensität der Fluorophore hin mit dem Programm ImageJ 10.2 quantifiziert. Im Durchschnitt ist die Intensität des CFP viermal höher als die Intensität des YFP.

Um auszuschließen dass dieser Effekt durch unterschiedliche Intensitäten der verwendeten Fluorophore in Protoplasten zustande kommt, wurden in einem weiteren Experiment die Fluorophore ausgetauscht. Dies bedeutet das Wildtyp Protoplasten mit Konstrukten transformiert wurden in denen diesmal das CFP die wildtypische MRE besaß und YFP die mutierte Form. Wenn eine miR156 vorhanden ist und die MRE erkennt, sollte in diesem Fall die Intensität des YFP mit mutierter MRE gegenüber dem CFP mit wildtypischer MRE höher sein (siehe Abb. 3.2.6 rechts). Es wurde bei 10 Protoplasten die Intensität der Fluorophore quantifiziert. Die Intensität des YFP ist im Durchschnitt zweimal so stark wie die Intensität des CFP. Für beide Experimente wurden die Daten durch einen T-Test statistisch ausgewertet. Der p-Wert liegt unter 0,0001 und zeigt die Signifikanz des Unterschieds in der Intensität.

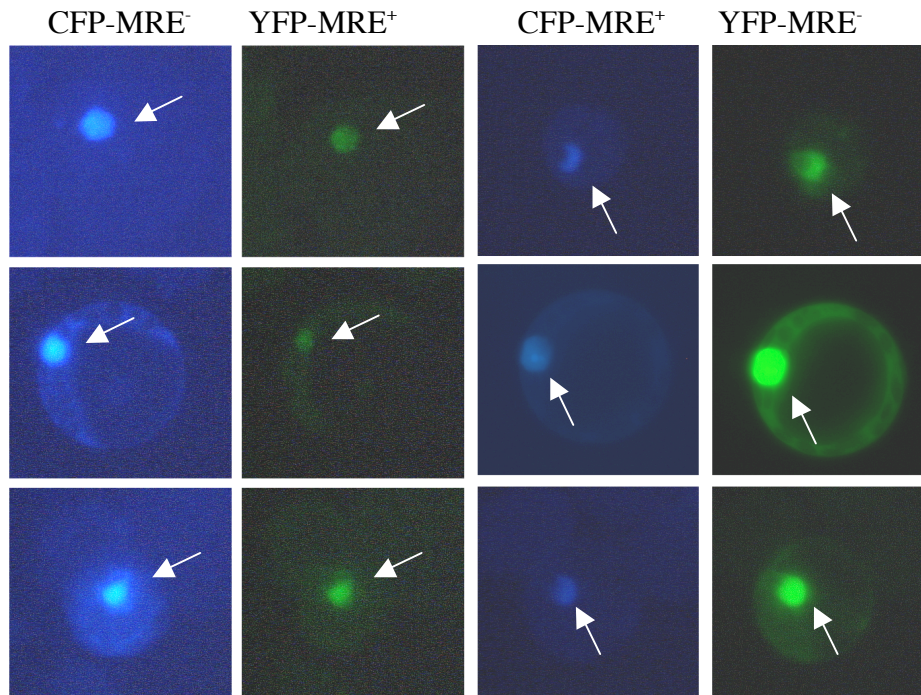


Abb. 3.2.6: Effekt der MRE in *P. patens* Protoplasten. Links: Protoplasten transformiert mit 35S::AtSPL3:CFP-MRE⁻ und 35S::AtSPL3:YFP-MRE⁺. CFP- MRE⁻ zeigt eine höhere Intensität im Vergleich zu dem YFP- MRE⁺. Rechts: Protoplasten transformiert mit 35S::AtSPL3:CFP-MRE⁺ und 35S::AtSPL3:YFP-MRE⁻. YFP- MRE⁻ zeigt eine höhere Intensität im Vergleich zu dem CFP- MRE⁺. Weiße Pfeile zeigen auf den Zellkern.

Es zeigte sich zwar, dass der Fluorophor mit der mutierten MRE immer eine höhere Intensität aufweist als das mit der wildtypischen MRE, doch scheint es außerdem noch einen Unterschied in der Intensität der einzelnen Fluorophore zu geben. Das CFP mit mutierter MRE ist im Durchschnitt viermal stärker als YFP mit wildtypischer MRE, während das YFP mit mutierter MRE gegenüber dem CFP mit wildtypischer MRE nur doppelt so stark ist. Durch eine weitere Transformation wurde dies überprüft. In *P. patens* Protoplasten wurden die beiden Fluorophore mit der wildtypischen MRE und in einem weiteren Transformationsansatz die beiden Fluorophore mit der mutierten MRE eingebracht (siehe Abb. 3.2.7).

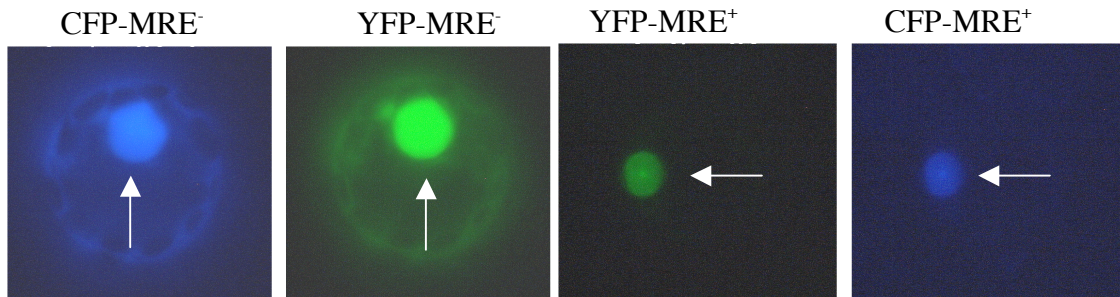


Abb. 3.2.7: Analyse der verschiedenen Fluorophore in Protoplasten. Links: Protoplast transformiert mit 35S::SPL3-CFP:MRE⁻ und 35S::SPL3-YFP:MRE⁻. Rechts: Protoplast transformiert mit 35S::SPL3-CFP:MRE⁺ und 35S::SPL3-YFP:MRE⁺. Der weiße Pfeil zeigt auf den Zellkern.

Nach Quantifizierung der Intensität wurde festgestellt, dass CFP im Vergleich zu YFP eine doppelt so starke Intensität aufweist. Wenn man dies bei der Berechnung der Verhältnisse von MRE⁺ zu MRE⁻ berücksichtigt zeigt sich, dass bei beiden Fluorophoren mit wildtypischer MRE⁺ die Intensitäten im Vergleich zum Fluorophor mit mutierter MRE⁻ immer geringer sind.

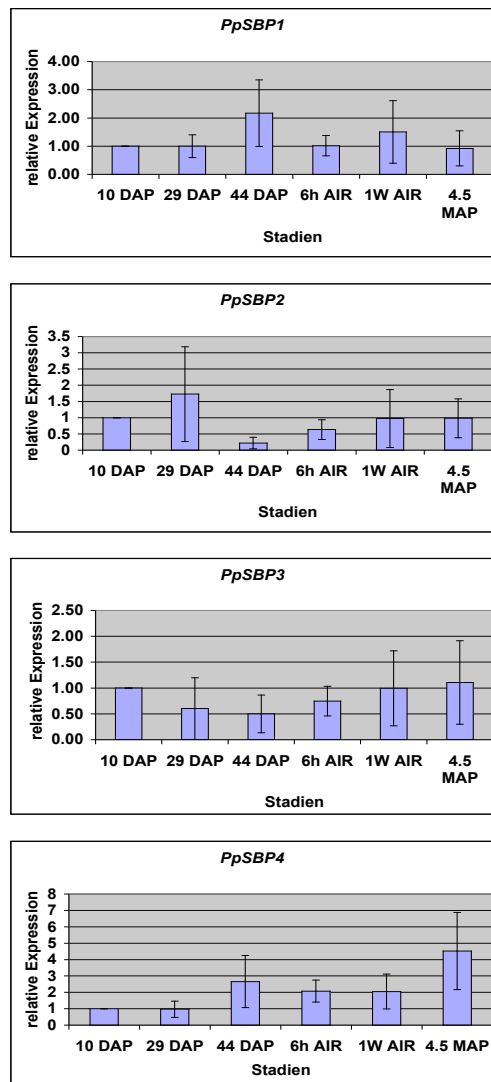
3.3 Expressionsanalysen der SBP-Box Gene

3.3.1 Expression der SBP-Box Gene während des Lebenszyklus von *P. patens*

Die *AtSPL*-Gene zeigten eine zeitliche und räumliche Expression (Cardon *et al.*, 1999). Es stellt sich die Frage, wie die *PpSBP*-Box Gene exprimiert sind und ob sie eine differentielle Expression zeigen.

Es wurde eine RT-PCR (siehe 2.2.4) mit je 250ng Gesamt-RNA, die aus sechs verschiedenen Stadien geerntet wurde, durchgeführt. Die sechs Stadien deckten alle Phasen des *P. patens* Lebenszyklus ab: Protonema 10 Tage nach Propagierung (DAP), Gametophoren 29 DAP, ausgereifte Gametophoren 44DAP, ausgereifte Gametophoren 6 Stunden nach Induktion der reproduktiven Phase (AIR) und 53DAP, Gametophyt 60DAP 1 Woche AIR, dieses Stadium enthält Antheridien. Als letztes Stadium wurden Gametophyten mit Sporophyten 4,5 Monate nach Propagation (MAP) gewählt. Dieses enthält Antheridien, Archegonien sowie junge und reife Sporophyten. Für jedes Stadium wurde jeweils eine ganze Platte geerntet. Dies bedeutet, dass es sich immer um Mischgewebe handelte.

Für jedes Gen wurden spezifische Oligonukleotide eingesetzt und als interner Standard wurde das Homolog von *AtRAN3* aus *P. patens* (Zugangsnummer bei NCBI: CJ972918) eingesetzt. RAN ist eine kleine GTPase, die ubiquitär exprimiert ist (Vernoud *et al.*, 2003). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.2.1 aufgelistet. Diese überspannen ein Intron, um cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können, und liegen im 3' Bereich des jeweiligen Gens, da dort kaum konservierte Bereiche entdeckt wurden.



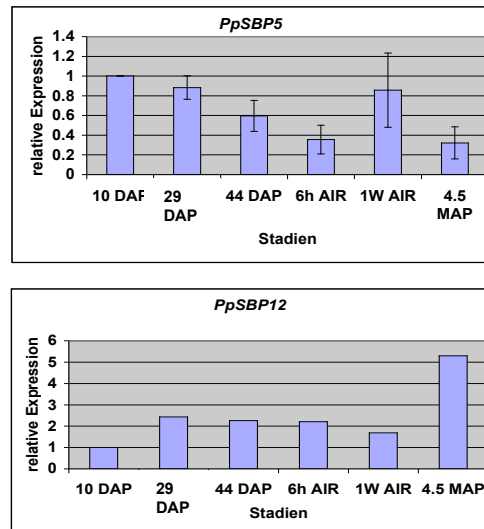


Abb. 3.3.1: Quantifizierung der Expression von *PpSBP1-5* und *12* in sechs Lebensstadien.

In Abb. 3.3.1 wurden Ergebnisse der Quantifizierung der RT-PCR graphisch dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels des PhosphorImager Thyphoon. Dort wurden die Agarosegele eingescannt und mit dem Programm ImageQuant quantifiziert (siehe 2.2.4). Alle RT-PCRs, mit Ausnahme der von *PpSBP12*, wurden mindestens dreimal wiederholt und jedes Mal gegen den internen Standard *PpRAN* normalisiert. Die hier gezeigten Expressionsdaten von *PpSBP12* basieren nur auf einer RT-PCR. Bei 10DAP wurde eine relative Expressionsstärke von 1 vorausgesetzt und die normalisierten Expressionsdaten wurden dieser Expressionsstärke angeglichen. Alle gesammelten Daten gingen in die Quantifizierung ein. Außerdem wurden verschiedene unabhängige biologische Proben für die Präparation von Gesamt-RNA verwendet.

Wie man in Abb. 3.3.1 erkennen kann, konnte das Transkript von allen getesteten SBP-Box Genen in allen getesteten Stadien nachgewiesen werden. Die Expressionsmuster der SBP-Box Gene *PpSBP1*, 2, 3, 4, und 5 sind sehr unterschiedlich. Dagegen scheinen die SBP-Box Gene *PpSBP4* und *PpSBP12* ein ähnliches Expressionsmuster zu haben. Sie zeigen die niedrigste Expression im jüngsten und die höchste Expression im ältesten getesteten Stadium.

3.3.2 Genexpression unter induktiven Bedingungen

Durch Licht und verschiedenen Medien kann man Entwicklungsprozesse in *P. patens* steuern (Schaefer, 2001). Aus diesem Grunde wurde auch getestet, ob Licht oder Medium einen Effekt auf die Expression einiger SBP-Box Gene haben. Es wurde eine RT-PCR (siehe 2.2.4) mit Gesamt-RNA aus sieben Tage altem Protonema durchgeführt. Das Protonema wurde unter folgenden Bedingungen aufgezogen: Minimalmedium (NO_3) und 16h Licht (LT), NO_3 und Dauerlicht (DL), Minimalmedium, dem Ammoniumtartrat zugesetzt wurde (NH_4) und LT, NH_4 und DL. Je 250ng Gesamt-RNA wurden für die RT-PCR eingesetzt. Als interner Standard wurde *PpRAN* eingesetzt.

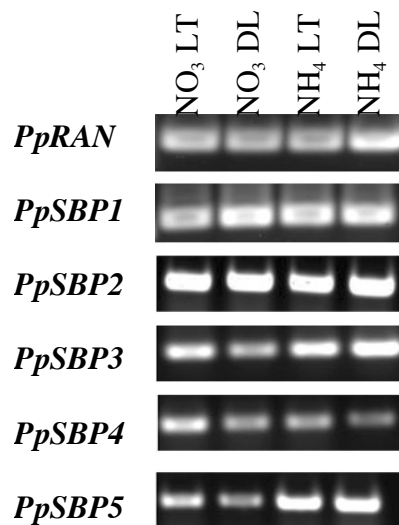


Abb. 3.3.2 RT-PCR unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Aus einem 25 μ l PCR-Ansatz wurden 7.5 μ l auf ein Agarosegel geladen.

Die RT-PCRs wurden dreimal wiederholt und ebenfalls mittels ImageQuant quantifiziert. Nach Normalisierung gegen *PpRAN* zeigten sich keine erkennbaren Veränderungen in der Expressionsstärke der Gene *PpSBP1-4*. Bei *PpSBP5* scheint das NH_4 -Medium einen Anstieg der Expression in Vergleich zu NO_3 -Medium hervorzurufen. Nach der Quantifizierung zeigte sich, dass *PpSBP5*, im Vergleich zu NO_3 -Medium, auf NH_4 -Medium zweimal so stark exprimiert ist (siehe Abb. 3.3.3).

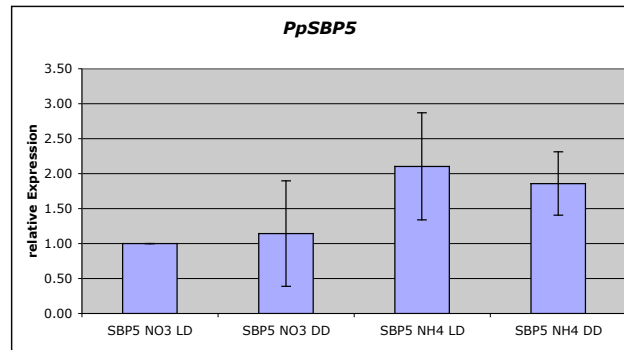


Abb. 3.3.3. Quantifizierung der Expressionsstärke von *PpSBP5* in Reaktion auf Licht und Medium.

Die Phytohormone Auxin und Cytokinin spielen während der Entwicklung von *P. patens* eine wichtige Rolle. Am besten wurden die Effekte der Phytohormone an Protonema studiert. Auxin wird für die Transition von Chloronema zu Caulonema benötigt, während Cytokinin die Knospenbildung induziert (Schumaker und Dietrich, 1997).

In Folge dessen wurde sieben Tage altes Protonema, das mit diesen beiden Phytohormonen (NAA als Auxin und BAP als Cytokinin) und ein Auxin-Inhibitor (NPA) behandelt wurde, auf die Expressionsstärke verschiedener SBP-Box hin untersucht. Nur *PpSBP3* zeigte eine sichtbare Veränderung der Genexpression bei Behandlung mit Cytokinin. Aus diesem Grund wurde die Änderung der Expression mittels Real-Time PCR quantifiziert (siehe 2.2.10). Als interner Standard wurde für die Real-Time PCR 5S rRNA eingesetzt, da das Amplifikat nur eine Größe von 120bp besitzt und für die Real-Time PCR am besten Fragmente in der Größe von 100-200bp geeignet sind. Für *PpSBP3* wurden die Oligonukleotide MR24 und MR49 eingesetzt. Die Änderung der Expression nach Cytokinin Behandlung wurde und gegen 5S rRNA (Zugangsnummer für NCBI: AP005672) normalisiert (siehe Abb. 3.3.4).

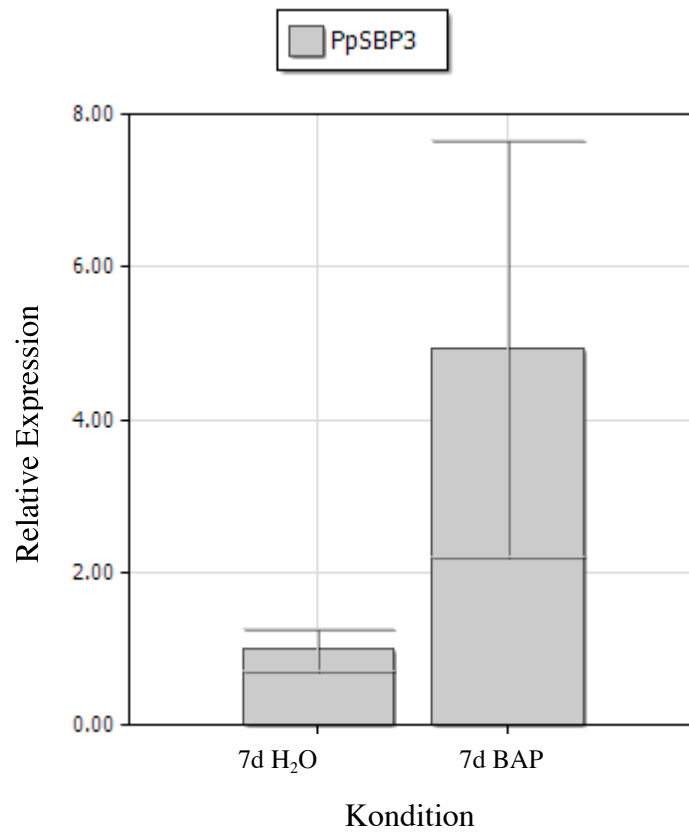


Abb. 3.3.4: Quantifizierung der Expressionsstärke von *PpSBP3* 7 Tage nach Induktion. Links: Unbehandelte Probe. Es wurde eine Expressionsstärke von *PpSBP3* von 1 vorausgesetzt. Rechts: Cytokinin-behandelte Probe.

Nach sieben Tagen konnte man im Durchschnitt eine 5mal stärkere Expression von *PpSBP3* in induziertem Gewebe im Vergleich zu nicht-induziertem Gewebe finden (siehe Abb. 3.3.4).

Die große Standardabweichung kann auf einen zeitlich begrenzten Effekt des Cytokinins auf die Expressionsstärke von *PpSBP3* hindeuten. Um heraus zu finden, ob es sich hierbei um einen direkt oder indirekten Effekt handelt, wurden mehrere Zeitpunkte getestet und diesmal auch die Expression der verwandten Gene *PpSBP6* (MR274/MR269) und *PpSBP13* (MR260/MR245) überprüft.

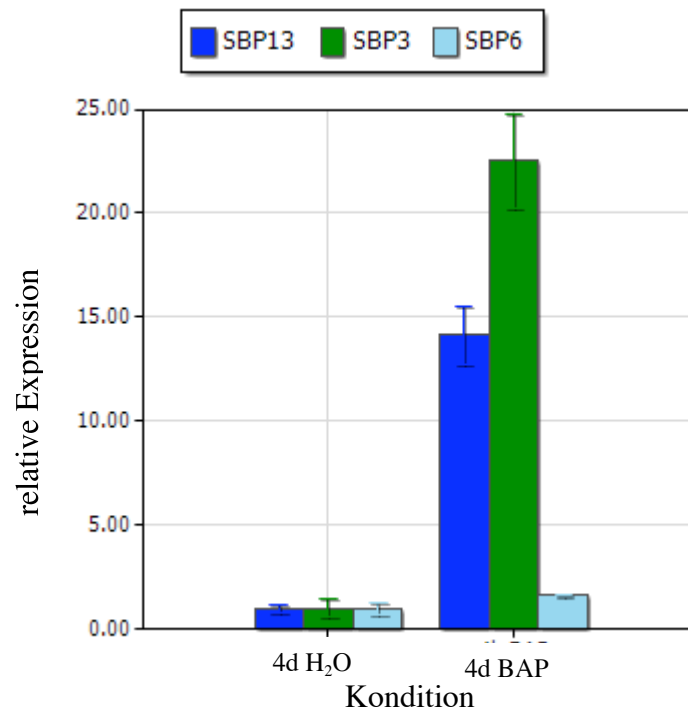


Abb. 3.3.5: Quantifizierung der Expressionsstärke 4 Stunden nach Induktion mit Cytokinin. Links: Unbehandelte Probe. Es wurde eine Expressionsstärke der Gene *PpSBP3*, *6* und *13* von 1 angenommen. Rechts: Cytokinin-behandelte Probe.

Schon nach vier Stunden kann man eine starke Reaktion auf die Expression von *PpSBP3* feststellen. Im Vergleich zur Kontrolle, die zum gleichen Zeitpunkt mit Wasser behandelt wurde, zeigte dieses Gen im Durchschnitt eine ungefähr 22fach höhere Expression. *PpSBP13* wurde im Vergleich zur Kontrolle 14fach höher exprimiert. Nur *PpSBP6* zeigte keine sichtbaren Änderungen (siehe Abb.3.3.5).

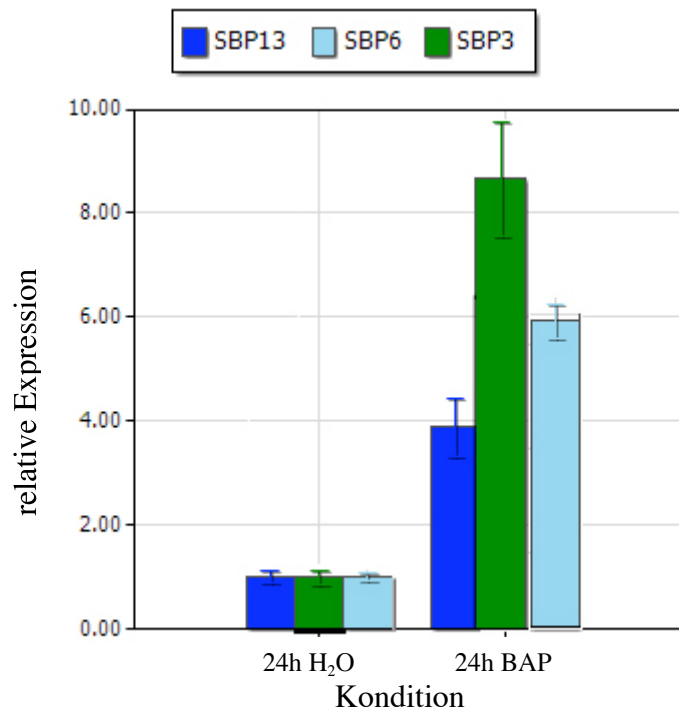


Abb. 3.3.6: Quantifizierung der Expressionsstärke 24 Stunden nach Induktion mit Cytokinin. Links: Unbehandelte Probe. Es wurde eine Expressionsstärke von *PpSBP3*, *6*, und *13* von 1 angenommen. Rechts: Cytokinin-behandelte Probe.

24 Stunden nach Behandlung mit Cytokinin wurde *PpSBP3* im Durchschnitt nur noch 9mal höher exprimiert als in der Kontrolle. Auch die Expression von *PpSBP13* sank im Vergleich zu der Probe, die vier Stunden nach Behandlung mit Cytokinin geerntet wurde. Die durchschnittliche Expression war nur noch 4mal höher als in der Wasserkontrolle. *PpSBP6* hingegen zeigte 24 Stunden nach Cytokinin-Behandlung eine durchschnittliche Expression, die fast 6mal höher war als in der Wasserkontrolle (siehe Abb. 3.3.6).

Wie in 3.1.4.3 schon erwähnt wurde, steht zumindest *PpSBP3* unter der Kontrolle der PpmiR156 und die beiden Gene *PpSBP6* und *13* weisen die gleiche MRE auf. Es könnte auch sein, dass nicht die SBP-Box Gene auf Cytokinin reagieren, sondern die Regulation der Expression über die PpmiR156 verläuft. Folglich wurde nun die Expression der pre-PpmiR156a unter Cytokinin-Behandlung getestet.

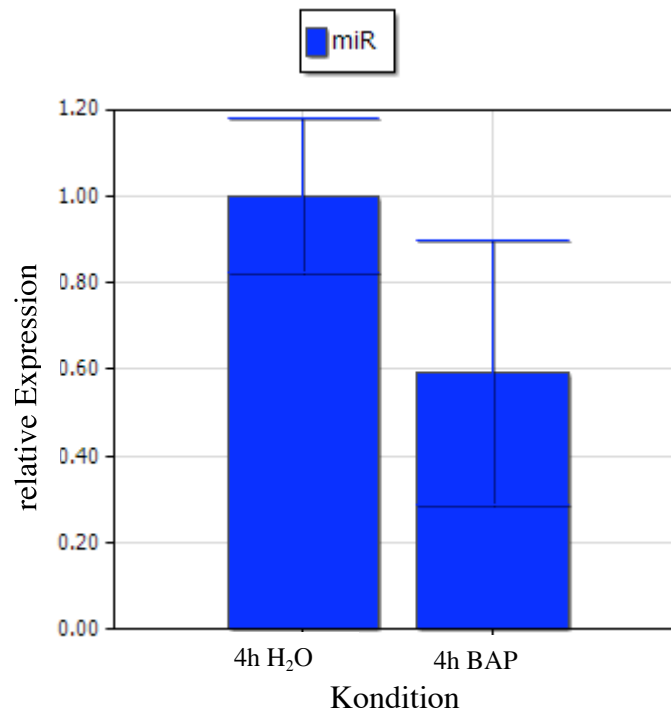


Abb. 3.3.7: Quantifizierung der Expressionsstärke vier Stunden nach Induktion mit Cytokinin. Links: Unbehandelte Probe. Es wurde eine Expressionsstärke der PpmiR156a von 1 angenommen. Rechts: Cytokinin-behandelte Probe.

Nach der Behandlung mit Cytokinin zeigte sich eine schwache Reduktion der Expression der pre-PpmiR156a (siehe Abb. 3.3.7).

3.4 Funktionelle Analyse der SBP-Box Gene in *P. patens*

3.4.1 Partielle Verlustmutanten der Gene *PpSBP3*, *6* und *13*

In *A. thaliana* stehen wahrscheinlich 11 der 17 Mitglieder der SBP-Box Genfamilie unter der Kontrolle der miR156 und miR157 (Rhoades *et al.*, 2002). Eine Überexpression der miR156b in *A. thaliana* zeigte einen sehr starken Phänotyp. Die Pflanzen sind buschig, haben einen Verlust von apikaler Dominanz und sie blühen unter Langtag Bedingungen ein wenig später. Obendrein konnte in dieser Mutante eine stark verringerte Transkriptmenge der miR156 kontrollierten *SPL*-Gene nachgewiesen werden (Schwab *et al.*, 2005).

Auch in *P. patens* findet man die gleiche MRE in drei verschiedenen Genen, *PpSBP3*, *PpSBP6* und *PpSBP13* und auch mindestens ein codierender Locus für PpmiR156 ist vorhanden (siehe 3.1.5.3).

3.4.1.1 Stabile Überexpression der *AtMIR156b* am CAB-Locus in *P. patens*

Für mich stellte sich nun die Frage, ob ein stabiler Überexpressor der miR156 in Moos auch zu einem abweichenden Phänotyp vom Wildtyp führt, da die Transkriptmenge von drei SBP-Box Gene verringert sein sollten. In Folge dessen wurde ein Allelaustausch am *ZLAB1*-Locus durchgeführt.

ZLAB1 ist ein Mitglied einer Multigenfamilie in *P. patens*, das für ein Chlorophyll-a/b-Bindeprotein des Lichtsammelkomplexes II codiert (Long *et al.*, 1989). Hofmann und Kollegen (1999) zeigten, dass eine Unterbrechung dieses Genes keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zeigte. Aus diesem Grund ist dieser Locus ideal, um einen Allelaustausch durchzuführen. In meinem Fall wurde das *ZLAB1* Gen mit einem Konstrukt ausgetauscht, das jeweils homologe Bereiche zu *ZLAB1*, eine NPTII Selektionskassette und den genomischen Locus der *A. thaliana* MIR156b trug. Der genomische Locus der *AtMIR156b* wurde mir freundlicherweise von Dr. R. Schwab (MPI Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Bevor man mit der Phänotypen-Analyse beginnen konnte, war es wichtig zu wissen, ob der Allelaustausch am richtigen Locus stattgefunden hat. Wenn nicht, könnte ein abweichender Phänotyp auch durch eine Unterbrechung in einem anderen Gen zustanden kommen. Um die Integration am *ZLAB1*-Locus nachzuweisen, wurde eine PCR mit genomische DNA der transgenen Linien als Vorlage, durchgeführt. Es wurden die Oligonukleotide PV38 und MR155 verwendet. Das Oligonukleotid PV38 bindet in der NPTII Selektionskassette und das Oligonukleotid MR155 bindet im *ZLAB1* Locus außerhalb der homologen Bereiche des Konstrukts. Nach Sequenzierung der Amplifikate stellte sich heraus, dass es sich um das gewünschte Fragmente handelte.

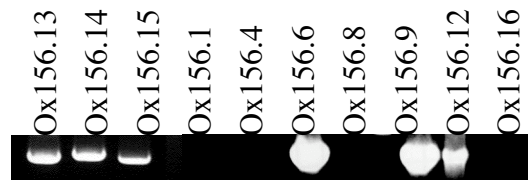


Abb. 3.4.1: Integration an *ZLAB1*-Locus. Für die Linien Ox156.13, .14, .15, .6, .9 und Ox156.12 konnte eine Bande in der richtigen Größe isoliert werden.

Die Integration am *ZLAB1*-Locus konnte für die transgenen Linien Ox156.6, Ox156.9, Ox156.12, Ox156.13, Ox156.14 und Ox156.15 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.1).

Des Weiteren wurde eine RT-PCR auf die pre-AtmiR156b gemacht. Eine DNA-Kontamination wurde durch einen DNaseI-Verdau und durch eine PCR auf die RNA ausgeschlossen. Die RT-PCR mit den Oligonukleotiden MR146 und MR147 wurde mit fünf unabhängigen Ox-AtmiR156b Linien durchgeführt (siehe Abb. 3.4.2). Durch Sequenzierung des Amplifikats konnte ausgeschlossen werden, dass endogene miR156 amplifiziert wurde.

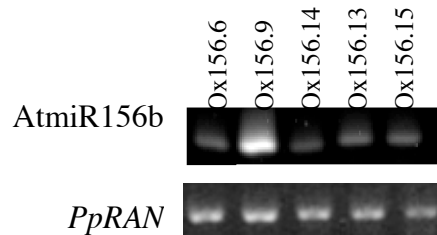


Abb. 3.4.2: RT-PCR auf die pre-AtmiR156b. Für alle getesteten Linien konnte ein Amplifikat gewonnen werden.

Wie man in Abb. 3.4.2 sieht, konnte bei der RT-PCR für alle getesteten Linien eine Bande für die pre-AtmiR156b amplifiziert werden. Die Linie Ox156.9 zeigte die stärkste Expression der pre-AtmiR156b und wurde aus diesem Grund vor allem für die Phänotypen-Analyse verwendet.

Außerdem wurde eine RT-PCR auf das Zielgen *PpSBP3* mit drei unabhängigen Ox-AtmiR156b-Linien durchgeführt. Als interner Standard wurde *PpRAN* eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurde auch eine RT-PCR auf das SBP-Box Gen *PpSBP1* durchgeführt,

welches sehr wahrscheinlich nicht unter direkter Kontrolle der miR156 steht, da es keine MRE für die miR156 aufweist (siehe Abb. 3.4.3).

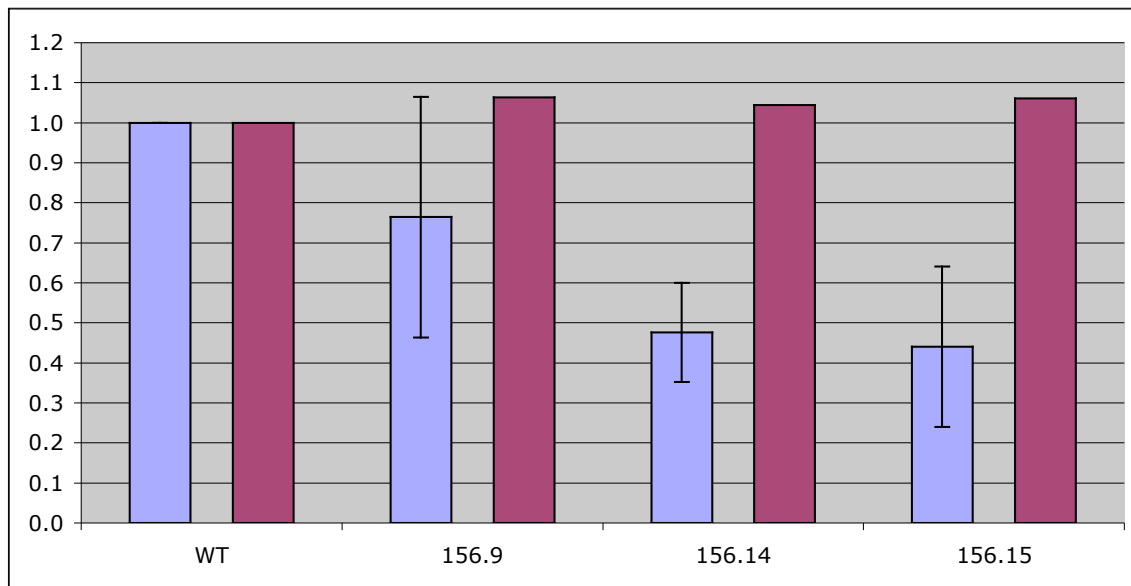


Abb. 3.4.3: Expression des miRNA Zielgens *PpSBP3* und des Nicht-Zielgens *PpSBP1* in einigen *AtmiR156b* Überexpressionslinien. Quantifizierung von *PpSBP3* in blau und *PpSBP1* in pink.

Die semiquantitative RT-PCR zeigte nur eine schwache Reduktion des Zielgens *PpSBP3*, während sich die Expression des Nicht-Zielgens *PpSBP1* nicht änderte (siehe Abb. 3.4.3).

Die RT-PCRs für *PpSBP3* wurde dreimal wiederholt, während die für *PpSBP1* nur einmal durchgeführt wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung gegen *PpRAN*.

Da nun die Integration des Konstruktes und die Expression der *AtmiR156b* nachgewiesen waren, wurde als nächstes mit der Phänotypenanalyse begonnen.

Die transgenen Linien wurden auf NO_3^- - und NH_4^- - Medium im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich die *AtmiR156b* Überexpressionslinien hinsichtlich der Morphologie des Protonemas, der Gametophoren, der Ausbildung der männlichen und weiblichen Sexualorganen, der anschließenden Entwicklung des Sporophyten, sowie deren Reifung und der Sporen, unter den gewählten Kulturbedingungen nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheiden (siehe Abb. 3.4.4).

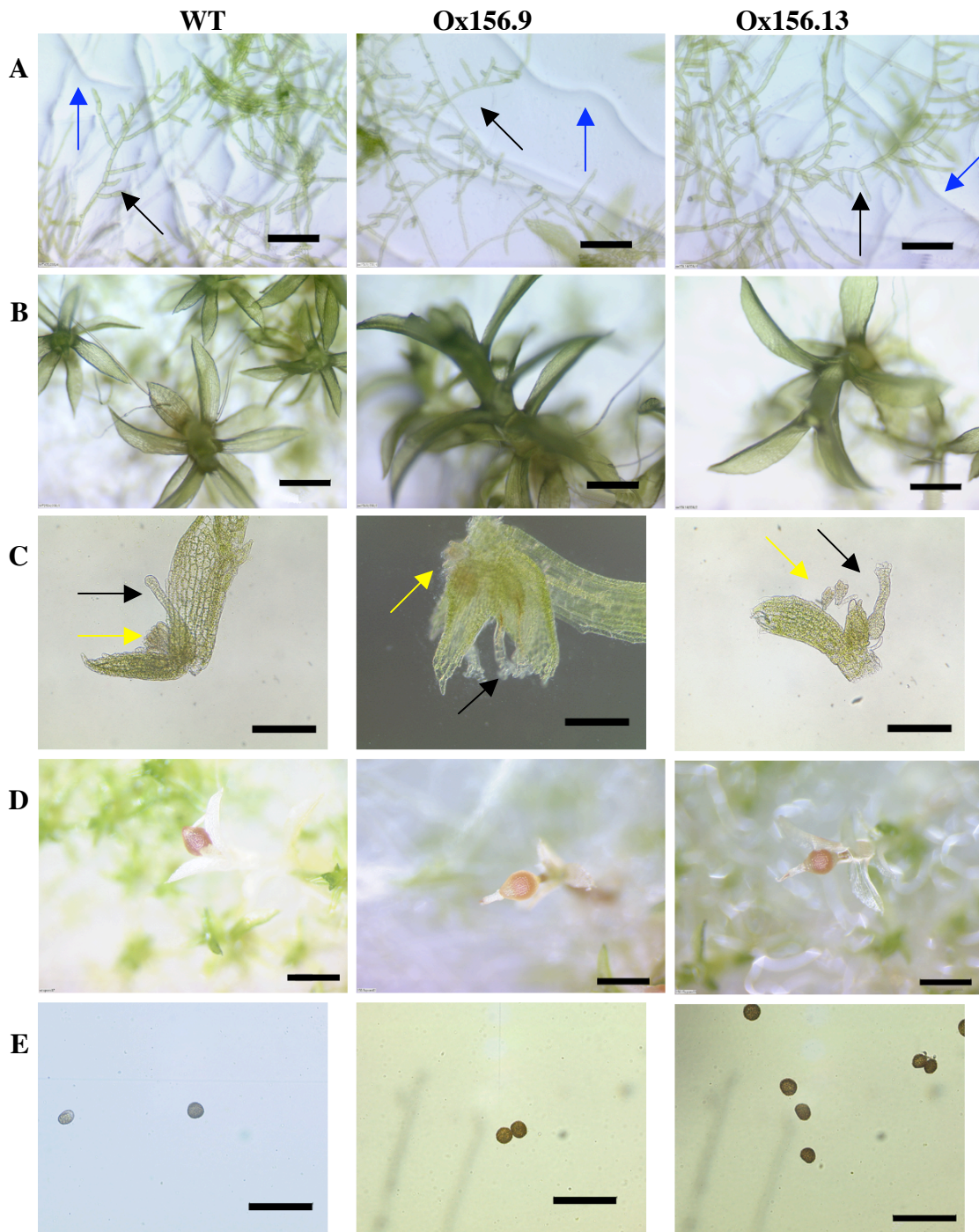


Abb. 3.4.4. Phänotypische Analyse Linien Ox156.9 und Ox156.13. A= Protonema. Der schwarze Pfeil zeigt auf Chloronema und der blaue auf Caulonema. B= Gametophor. B. C= Sexualorgane. Schwarzer Pfeil zeigt auf Archegonien, gelber Pfeil auf Antheridien. D= Sporophyt. E= Sporen. Als Maßstab wurde ein schwarzer Balken eingesetzt. Dieser entspricht bei A= 250µm. B und D= 500µm. C= 200µm. E= 100µm.

3.4.1.2 Extrachromosomale Überexpression der *AtMIR156b* in *P. patens*

Im Vergleich zu anderen Promotoren zeigt der CaMV 35S Promotor, der auch hier in allen Fällen für die Überexpressionskonstrukte eingesetzt wurde, eine geringere Aktivität (Horstmann *et al.*, 2004). Dies könnte erklären, warum in den analysierten Überexpressionslinien des *AtMIR156b* Locus kein Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp entdeckt werden konnte und auch der Effekt auf die Transkriptmenge von *PpSBP3* sehr gering war (siehe Abb. 3.4.3).

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde ein weiterer Ansatz zur Herstellung von Überexpressionslinien gewählt. K. Henschel (2002) beschrieb eine Überexpressionslinie, die nicht stabil ins Genom integriert wurde. In dieser Linie war die Expression des entsprechenden Genes um das hundertfache erhöht.

Somit wurde ein Überexpressionskonstrukt hergestellt, welches die NPTII Selektionskassette und den *AtMIR156b* genomischen Locus unter der Kontrolle eines CaMV 35S Promotors, ohne homologe Bereiche zu dem *P. patens* Genom, enthielt (siehe 2.2.12.2). Bei diesem Ansatz geht man davon aus, dass durch eine höhere Kopienanzahl pro Zelle eine stärkere Expression der *Atmir156b* zustande kommt und es damit vielleicht zu einem abweichenden Phänotyp kommt.

Bei den nicht-stabilen Überexpressionspflanzen musste strikt darauf geachtet werden, dass sie immer auf Medium mit dem Selektionsmarker, in diesem Fall Zeocin, wuchsen, da sonst die Gefahr des Verlustes des Plasmids besteht.

Nach der Transformation konnte nur eine transgene Linie gewonnen werden (Ex156.1). Diese wurde auf ihre Expression der pre-*Atmir156b* mittels RT-PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide MR146 und MR147 überprüft. Eine DNA-Kontamination wurde durch einen DNaseI-Verdau ausgeschlossen.

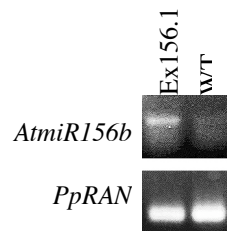


Abb. 3.4.5: RT-PCR zum Nachweis der pre-AtmiR156b. Oben: Amplifikation der pre-AtmiR156b. Unten. Interner Standard *PpRAN*.

Das Ergebnis der RT-PCR zeigt, dass die Linie Ex156.1 die pre-AtmiR156b exprimiert, während im Wildtyp keine Bande amplifiziert wurde (siehe Abb. 3.4.5). Doch überraschenderweise ist die Expression der pre-AtmiR156b sehr schwach und auch eine Phänotypenanalyse zeigte keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (siehe Abb. 3.4.6).

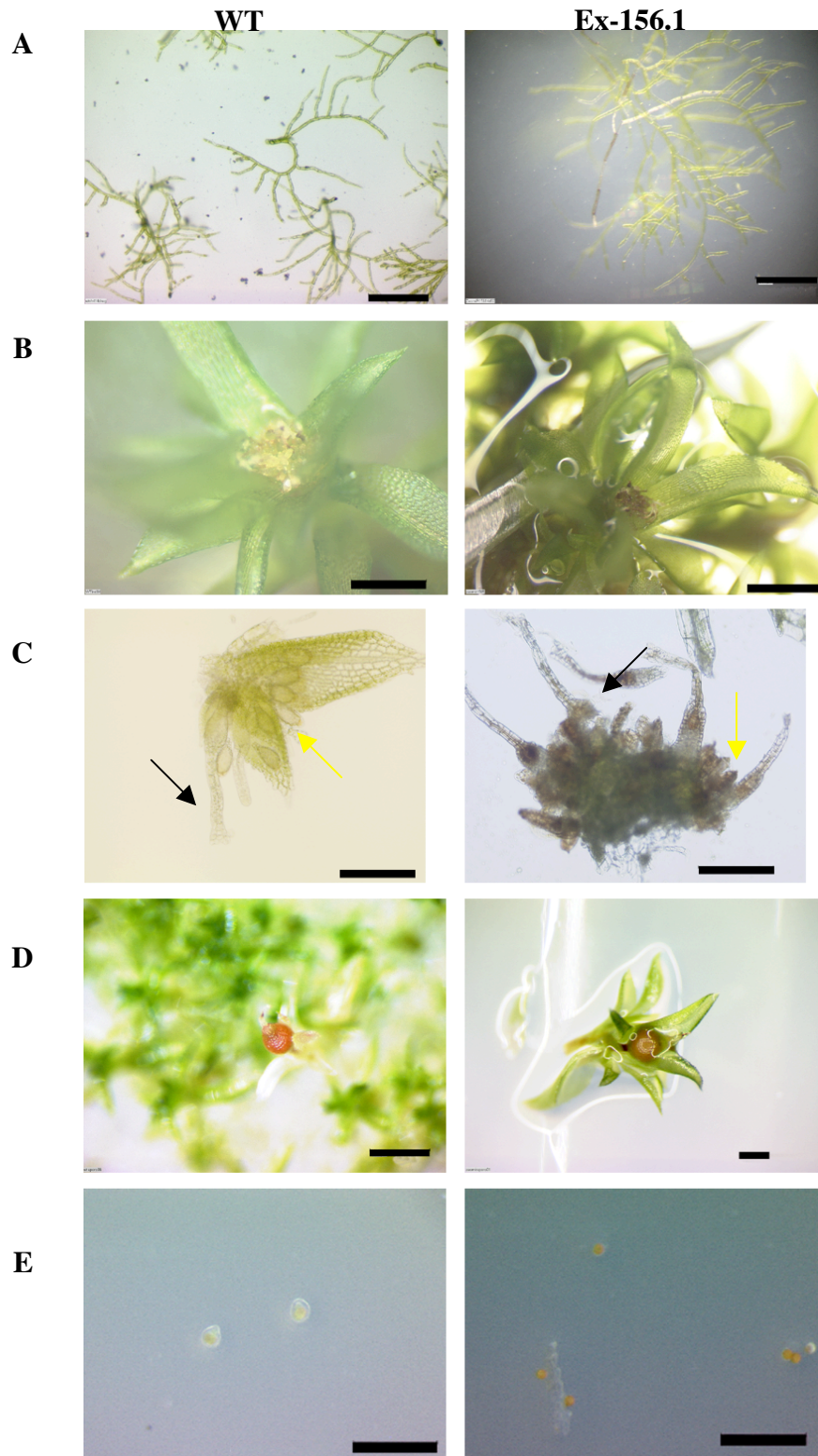


Abb. 3.4.6: Phänotypenanalyse der nicht-stabilen *AtmiR156b* Überexpressionslinie. A= Protonema. B= Gametophor mit Sexualorganen. C= Sexualorgane. Schwarzer Pfeil zeigt auf Archegonien, gelber auf Antheridien. D= Sporophyt. E= Sporen. Größenmarkierung entspricht A, B und D= 500µm, C=200µm E= 250µm.

3.4.2 Funktionelle Analyse von *PpSBP1* und *PpSBP4* anhand von Gewinn- und Verlustmutanten

3.4.2.1 Extrachromosomale Überexpression von *PpSBP1* und *PpSBP4*

Auch für die SBP-Box Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* wurden transgene Moospflanzen hergestellt, die ein Überexpressionskonstrukt trugen, welches nicht stabil im Genom integrierte. Wie auch bei der extrachromosomalen Überexpressionslinie Ex156.1 musste auch hier darauf geachtet werden, dass die Pflanzen immer einem Selektionsdruck, in diesem Fall Zeocin, ausgesetzt waren. Für die Überexpressions-Linie des Gens *PpSBP1* konnten nur zwei unabhängige Linien gefunden werden und für *PpSBP4* konnte sechs unabhängige Linien isoliert werden (siehe Abb. 3.4.7).

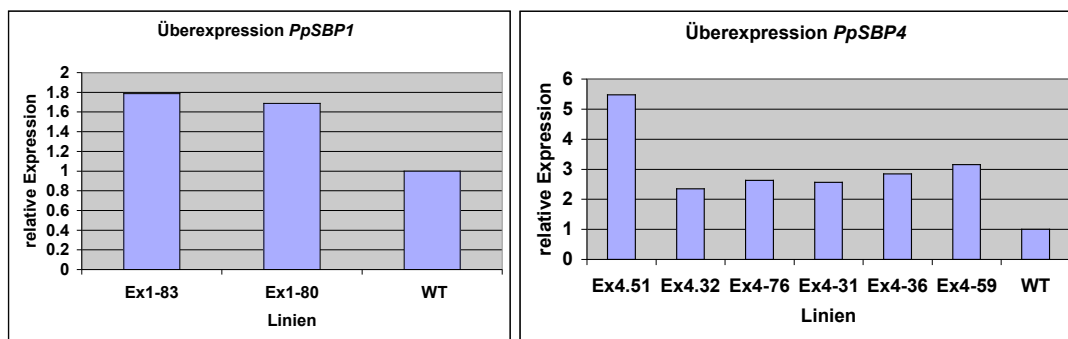


Abb. 3.4.7: Quantifizierung der Überexpressionslinien. Links: Überexpressionslinien für *PpSBP1*. Rechts: Überexpressionslinien für *PpSBP4*.

In den Linien Ex1-83 und Ex1-80 wurde *PpSBP1* ungefähr 1,7mal höher exprimiert als im Wildtyp (siehe Abb. 3.4.7). In der Linie Ex4-51 war *PpSBP4* ungefähr 5,5mal höher exprimiert. In den übrigen Linien wurde *PpSBP4* 2,5-3mal höher exprimiert als im Wildtyp. (siehe Abb. 3.4.7).

Mit diesen transgenen Pflanzen wurde eine Phänotypen-Analyse im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt (siehe Abb. 3.4.8). Der Wildtyp war keinem Selektionsdruck ausgesetzt.

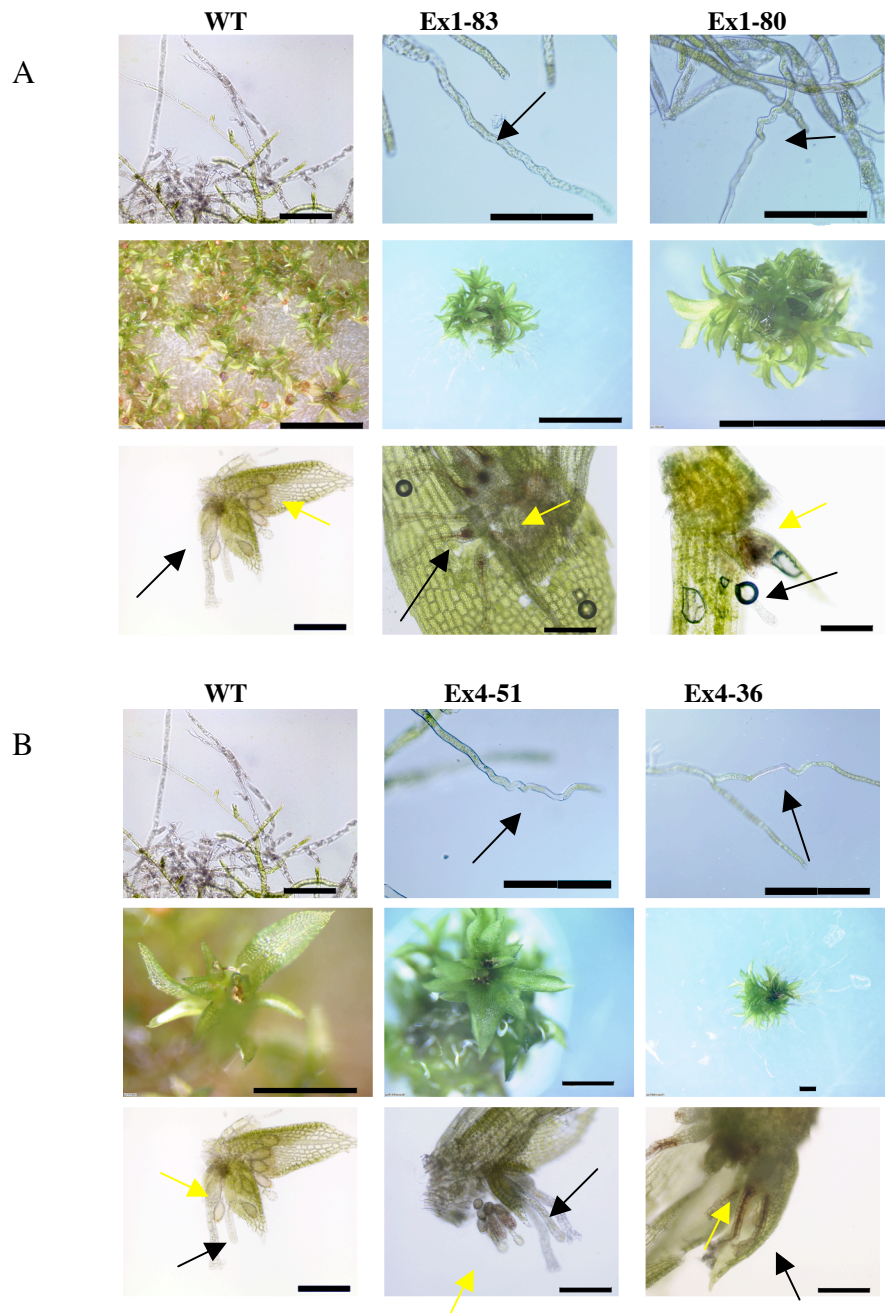


Abb. 3.4.8: Phänotypenanalyse der Überexpressionslinien. A= Überexpressionslinien für *PpSBP1*. B= Überexpressionslinien für *PpSBP4*. Gezeigt wurden von oben nach unten: Protonema, Pfeil zeigt auf korkenzieherartiges Protonema; Gametophyten; Sexualorgane. Schwarzer Pfeil zeigt auf Archegonien, gelber auf Antheridien. Größenstandards in A= oben und unten 200 μ m, Mitte 5mm. B= oben und unten 200 μ m, Mitte 1mm.

Wie man in Abb. 3.4.8 A erkennen kann, zeigten die transgenen Linien Ex1-83 und Ex1-80 einen Phänotyp im Protonema. Ein Teil der Fäden waren korkenzieherartig aufgewunden. Die Gametophoren ließen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp

erkennen und auch die Sexualorgane schienen sich normal zu entwickeln. Die Befruchtung in den transgenen Linien fand statt, was aus der Braunfärbung der Hälse der Archegonien ableiten lässt (Tanahashi *et al.*, 2005). Doch es kam zu keiner Weiterentwicklung zum Sporophyten, denn selbst 4 Monaten nach Induktion der Sexualorgane konnten keine Sporophyten entdeckt werden.

Zur Kontrolle wurden diese Linien auf NO_3 -Medium ohne Selektionsdruck ausplattiert. Dort sollten sie das Konstrukt verlieren und damit auch die hier beschriebenen abweichenden Phänotyp vom Wildtyp. Im Weiteren werden diese Linien Relaxations-Linien genannt.

Die Relaxations-Linien für Ex1-80 und Ex1-83 zeigten kein korkenzieherartiges Protonema mehr und 3 Monaten nach Induktion der Sexualorgane bildeten sie Sporophyten aus.

Die Überexpressionslinien für *PpSBP4* zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die *PpSBP1*-Linien (siehe Abb. 3.4.8 B). Auch hier sah man das korkenzieherartige Protonoma, während bei der Entwicklung des Gametophors und der Sexualorgane keine sichtbaren Änderungen zum Wildtyp entdeckt wurden, allerdings wurde auch in diesem Linien keine Sporophyten beobachtet. Die Relaxations-Linien bildeten 3 Monate nach Induktion der Sexualorgane Sporophyten.

Die Linie Ex4-51 zeigte die stärkste Expression von *PpSBP4* (siehe Abb.3.4.9). Im Gegensatz zu den anderen Ex-Linien wurde in den Blättchen Abweichungen zum Wildtyp festgestellt.

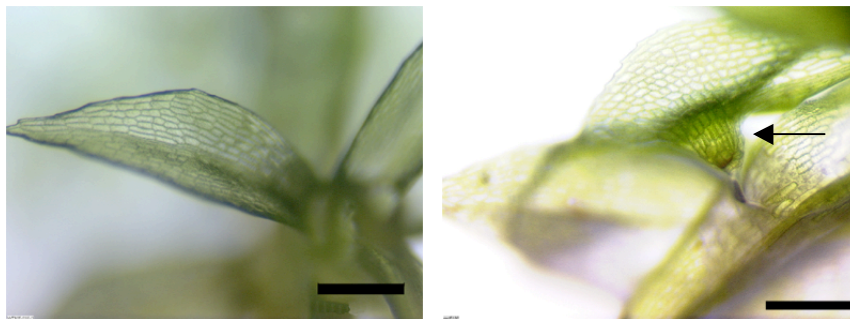


Abb. 3.4.8: Phänotyp im Gametophoren der Linie Ex4-51. Rechts: Wildtyp-Blättchen. Links. Blättchen der Linie Ex-4-51. Schwarzer Pfeil zeigt auf mehrzelligen Auswuchs. Größenstandard = 250 μm .

In der Linie Ex4-51 sah man auch häufig mehrzellige Auswüchse an der Unterseite der Blättchen, die in wildtypischen Blättchen nicht beobachtet wurden (siehe Abb. 3.4.8). Auch die Relaxations-Linie von Ex4-51 zeigte diese Auswüchse nicht mehr. Das dieser Phänotyp nur in dieser Linie beobachtet wurde, kann mit der Expressionsstärke von *PpSBP4* in dieser Linie zusammenhängen.

Für das Ausbleiben eines Sporophyten kann es viele Gründe, außer der Überexpression der SBP-Box Gene, geben. Um zu Überprüfen, ob in den Überexpressionslinien die Befruchtung auch tatsächlich stattfindet, obwohl die Hälse der Archegonien braun sind, wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI der Eizelle durchgeführt (siehe 2.2.10). Anhand der Leuchtkraft kann man unterscheiden, ob eine Eizelle befruchtet wurde oder nicht (Tanahashi *et al.*, 2005). Wenn das Cytoplasma stärker leuchtet als der Kern der Eizelle hat noch keine Befruchtung stattgefunden. Wenn allerdings der Kern stärker leuchtet als das Cytoplasma, dann ist die Eizelle befruchtet (siehe Abb. 3.4.9 A).

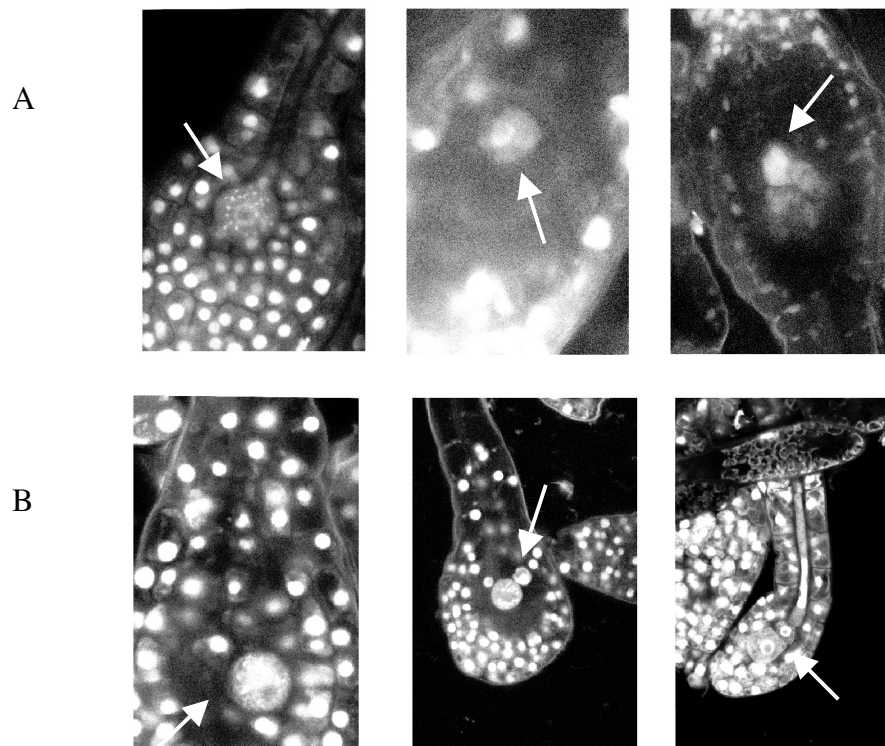


Abb. 3.4.9: Zellkernfärbung der Sexualorgane mittels DAPI A= Wildtyp Sexualorgane. Links: unbefruchtete Eizelle. Mitte: befruchtete Eizelle. Rechts: Embryo. B= Links: unbefruchtete Eizelle der Linie Ex-4-51. Mitte: befruchtete Eizelle der Linie Ex-4-51. Rechts: unbefruchtete Eizelle der Linie Ex-4-32 mit Bauchkanalzelle.

Die Eizellen der Linien Ex4-51 und Ex4-32 zeigten im Vergleich zu der Wildtyp Eizelle keine offensichtlichen Veränderungen (siehe Abb. 3.4.9 B). In Abb. 3.4.9 wurden unbefruchtete und befruchtete Eizelle dargestellt. Nur einen sich teilenden Embryo konnte für die Linien Ex4-51 und Ex4-32 nicht gefunden werden.

3.4.2.2 Verlustmutanten von *PpSBP1* und *PpSBP4*

Da die extrachromosomalen Überexpressionslinien von *PpSBP1* und *PpSBP4* einen ähnlichen Phänotyp im Protonema aufweisen, wurden um mehr Information über die Funktionalität dieser beiden SBP-Box Gene zu bekommen auch Verlustmutanten für sie hergestellt.

Die Herstellung der Konstrukte für die Unterbrechung der Gene wurde in 2.2.12.1 beschrieben.

Bei der Transformation dieser Konstrukte konnten zwar immer regenerierende Protoplasten gefunden werden, doch konnten für die Regeneranten keine Integration am richtigen Locus nachgewiesen werden. Da aber die Überexpressionslinien für beide Gene einen veränderten Phänotyp im Protonema zeigten, könnte es sein, dass auch die Verlustmutanten schon einen Effekt auf die Protonemaentwicklung ausüben. Für die Standardtransformation verwendet man NH_4 -haltiges Medium, welches die Bildung von Gametophoren unterdrückt und somit die Bildung von Protonema bevorzugt. Wenn nun schon im Protonemagewebe der Transformanten ein stark negativer Effekt auf die Entwicklung auftreten sollte, könnte die Wahl des Mediums fatale Folgen haben.

Aus diesem Grund wurde ein neuer Ansatz für die Transformation gewählt. Jeweils die Hälfte der transformierten Protoplasten wurde auf NO_3 -Medium und die anderen auf NH_4 -Medium regeneriert. Diese Strategie brachte den Durchbruch.

Bei den Pflanzen, die auf NO_3 -Medium regenerierten konnte bei vielen untersuchten transgene Pflanzen eine Integration am richtigen genomischen Locus festgestellt werden. Während bei den Pflanzen, die auf NH_4 -Medium regenerierten keine stabile Integration ins Genom gefunden werden konnte (siehe Abb. 3.4.10 und 3.4.11).

Ein Teil der Protoplasten wurde auch mit den beiden Verlustkonstrukten doppeltransformiert, doch leider hat immer nur ein Rekombinationsereignis stattgefunden (siehe Abb. 3.4.10 und .11).

Zum Nachweis der 5'Integration des Inserts von *pSBP1-Zeo* wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden MR44 und w349 durchgeführt, mit genomischer DNA als Vorlage. Das Oligonukleotid w349 bindet innerhalb der Selektionskassette und des Oligonukleotid MR44 bindet im Gen *PpSBP1* außerhalb des Konstrukts. Es wurden neun transgene Pflanzen, die aus der Doppeltransformation mit den Verlustkonstrukten für *PpSBP1* und *PpSBP4* resultierten getestet.

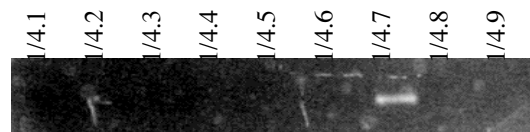


Abb. 3.4.10: Nachweis der 5'Integration des Inserts von *pSBP1-Zeo*. Für die Linie 1.4/7 konnte eine Bande amplifiziert werden.

Für die Linie 1/4.7 konnte die Integration des Inserts aus *pSBP1-Zeo* am 5'Ende nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.10). Auch die Sequenzierung des gewonnenen Amplifikats bestätigte die Integration.

Für die PCR zum Nachweis der 3'Integration des Inserts von *pSBP4-Hyg* wurden die Oligonukleotide w283 und MR64 verwendet. w283 bindet in der Selektionskassette und MR64 im Gen *PpSBP4* außerhalb des Konstruktes. Es wurden die neun Linien aus der Doppeltransformation und sechs Linien aus einer einfach Transformation mit dem Plasmid *pSBP4-Hyg* getestet.

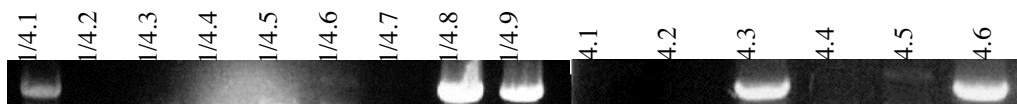


Abb. 3.4.11: Nachweis der 3'Integration des Inserts von *pSBP4-Hyg*. Für die Linien 1/4.1, 1/4.8, 1/4.9, 4.3 und 4.6 konnte eine Bande amplifiziert werden.

Auch hier wurde die Integration mittels Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt.

Für die Linien 1/4.1, .8 und .9 konnte die Integration im 3'Bereich des Locus nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.11). Bei der Einfachtransformation konnte die Integration für die Linien 4.3 und 4.6 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.11). Für

keine der Linien die aus der Doppeltransformation resultierten, wurden Integrationen an beiden Loci festgestellt.

Die Protoplasten der Linien 1/4.1, .7, .8 und .9, sowie die der Linien 4.1, .3 und .6 wurden auf NO_3 -Medium regeneriert. Die anderen getesteten Linien regenerierten auf NH_4 -haltigem Medium.

Nun sollte mittels RT-PCR festgestellt werden, ob in diesen transgenen Linien eine Chimäre mRNA, bestehend aus dem 5' Bereich der mRNA von *PpSBP1* oder *PpSBP4* und dem Selektionsmarker, nachzuweisen war (siehe Abb. 3.4.12). Für *PpSBP4* wurden die Oligonukleotide SH178 und w282 eingesetzt, für *PpSBP1* die Oligonukleotide SH191 und w355. Die Oligonukleotide w282 und w355 lagen im ORF der Selektionskassette, die Oligonukleotide SH178 und SH191 binden an die mRNA des entsprechenden Gens.

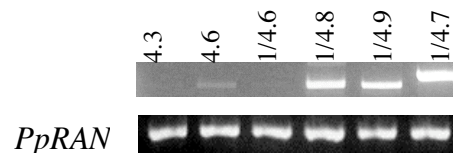


Abb. 3.4.12: Nachweis einer Chimären RNA in *PpSBP1* und *PpSBP4* transgenen Linien. Für die Linien 4.6, 1/4.8 und 1/4.9 konnte eine Chimäre für *PpSBP4* mit der Hygromycin Resistenzkassette festgestellt werden. Für die Linien 1/4.7 konnte eine Chimäre für *PpSBP1* mit der Zeocin Resistenzkassette festgestellt werden.

Für die Linien 4.6, 1/4.8, .9 und .7 wurden die Chimären nachgewiesen (siehe Abb. 3.4.12).

Als weitere Kontrolle wurde versucht, die komplette mRNA von *PpSBP1* und *PpSBP4* zu amplifizieren (siehe Abb. 3.4.13). Es wurde eine RT-PCR mit Gesamt-RNA als Vorlage durchgeführt. Für *PpSBP1* wurden die Oligonukleotide MR280 und MR44 und für *PpSBP4* wurden die Oligonukleotide MR281 und MR64 verwendet.

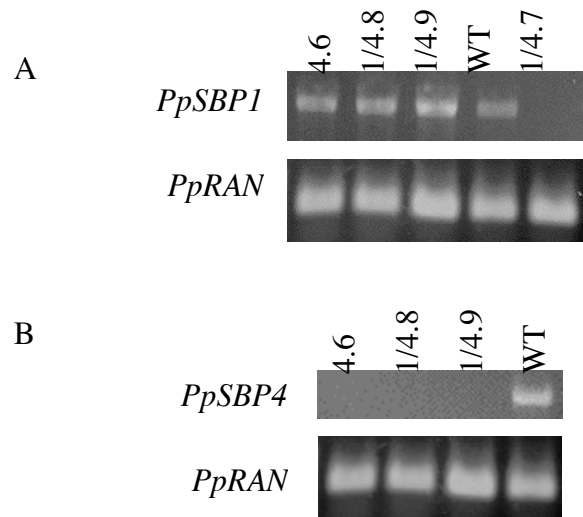


Abb. 3.4.13: Verlust der kompletten cDNA für die Verlustmutationalinien. A= Amplifikation der kompletten cDNA von *PpSBP1* (oben). Unten: interner Standard *PpRAN*. Für die Verlustmutationalinie 1/4.7 konnte für *PpSBP1* kein vollständiges Transkript mehr nachgewiesen werden. B= Amplifikation der kompletten cDNA von *PpSBP4* (oben). Unten interner Standard *PpRAN*. Für die Linien 4.6, 1/4.8 und 1/4.9 konnte kein vollständiges Transkript für *PpSBP4* nachgewiesen werden.

Wie erwartet wurde bei der RT-PCR für *PpSBP1* in der *PpSBP1* Verlustmutationalinie 1/4.7 (*sbp1-1/4.7*) kein vollständiges Transkript nachgewiesen (siehe Abb. 3.4.13 A). Auch für die Verlustmutanten-Linien 4.6, 1/4.8 und 1/4.9 (*sbp4-4.6*, *sbp4-1/4.8*, *sbp4-1/4.9*) konnte kein Transkript für *PpSBP4* nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.13 B).

Um die Hypothese zu überprüfen, dass das Medium eine wichtige Rolle bei der Regeneration der transgenen Protoplasten spielt, wurden die transgenen Linien wieder protoplastiert und auf NO_3^- - und NH_4^- - Medium ausplattiert. (siehe Abb. 3.4.14).

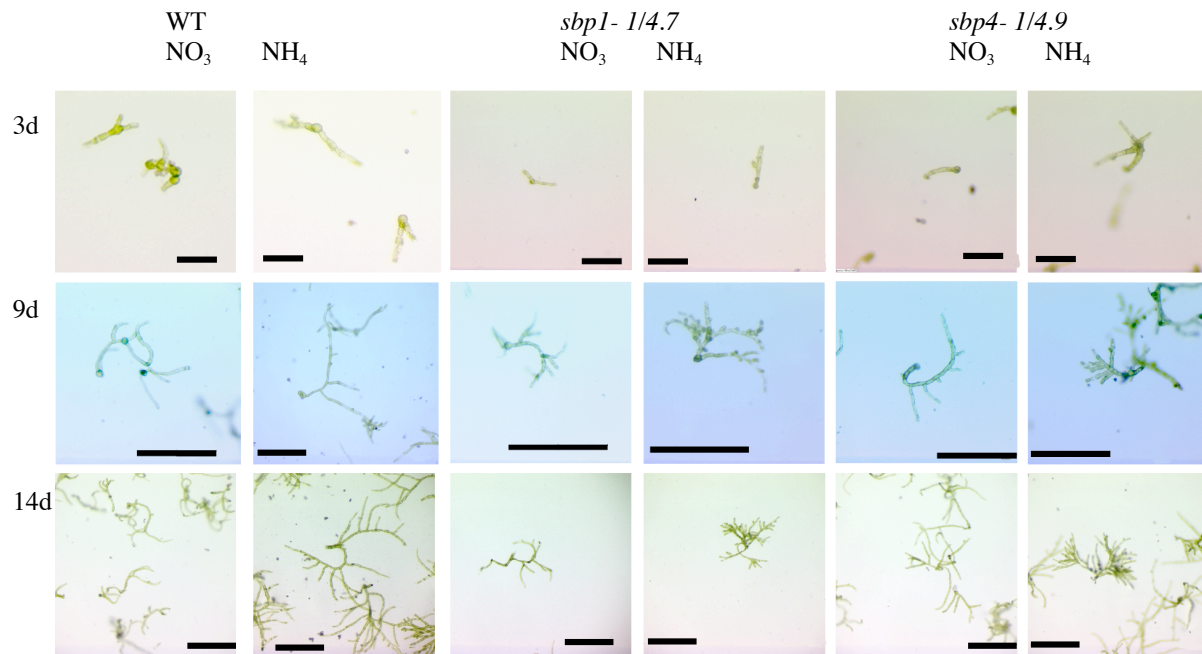


Abb. 3.4.14: Protoplastenregeneration auf verschiedenen Medien. Links: Wildtyp-Protoplasten Mitte: Protoplasten der Linie 1/4.7. Rechts: Protoplasten der Linie 1/4.9. Die jeweiligen Protoplasten regenerierten im Vergleich auf NO₃- und NH₄-Medium. Größenstandards: 3d= 250µm, 9d und 14d= 500µm.

In Abb. 3.4.14 kann man erkennen, dass Wildtyp Protoplasten auf NO₃- langsamer regenerierten als auf NH₄-Medium. Die Protoplasten der *sbp1-1/4.7*-Verlustmutante hingegen regenerierten auf NO₃-Medium ähnlich wie der Wildtyp, doch auf NH₄-Medium zeigten die Protonemafäden eine stärkere Verzweigung als der Wildtyp und die Kolonie wirkte eher klein und gestaucht (siehe Abb. 3.4.14 Mitte). Die Protoplasten der *sbp4-1/4.9*-Verlustmutante entwickelten sich auf NO₃-Medium ähnlich wie der Wildtyp und zeigt wie *sbp1-1/4.7*-Verlustmutante auf NH₄-Medium eine höhere Verzweigungsrate (siehe Abb. 3.4.14 Rechts). Allerdings ist der Effekt von NH₄-Medium auf den Phänotyp der Linie *sbp1-1/4.7* viel deutlicher als bei der Linie *sbp4-1/4.9*.

Beide Linien zeigten eine höhere Verzweigungsrate im Vergleich zum Wildtyp. Um dies genauer zu analysieren wurden Protonemafäden unter dem Mikroskop näher betrachtet (siehe Abb. 3.4.15).

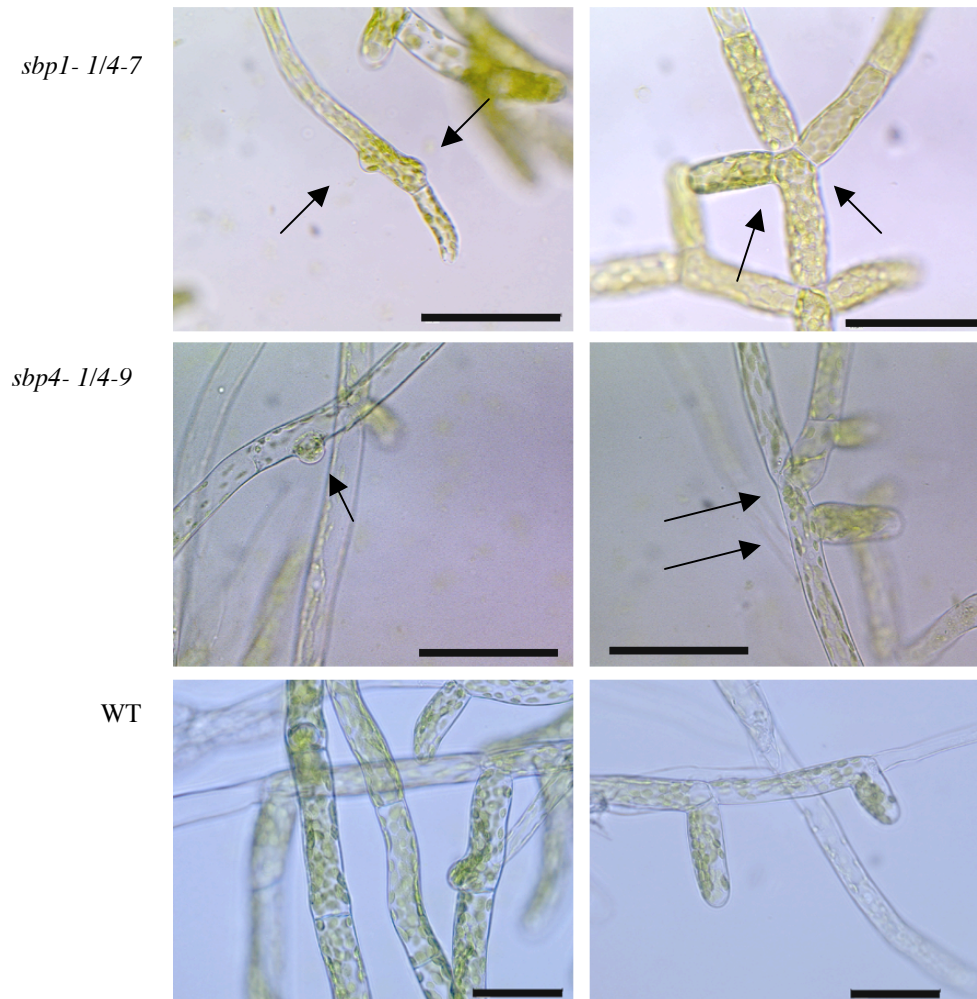


Abb. 3.4.15: Protonema-Analyse. Oben: Linie *sbp1-1/4.7*. Pfeile zeigen auf Doppelverzweigungen. Mitte: Linie *sbp4-1/4.9*. Pfeile zeigen auf Fehlstellung der Schwellung und Doppelverzweigung. Unten: Wildtyp. Größenmaßstab: 50 μ m.

Bei der näheren Betrachtung fiel auf, dass bei den Linien *sbp1-1/4.7* und *sbp4-1/4.9* oft Doppelverzweigungen zu beobachten sind (siehe Abb. 3.4.15). Bei der Linie *sbp1-1/4.7* sah man außerdem, dass sich schon in der ersten subapikalen Zelle des Protonemafadens Seitentriebe bilden (siehe Abb. 3.4.15, oben links), während dies im Wildtyp normalerweise nicht der Fall ist (Schumaker und Dietrich, 1997). Eine Schwellung bildet sich frühesten in der zweiten subapikalen Zelle und die Schwellung befindet sich am distalen Ende der Zelle (Schumaker und Dietrich, 1997). Bei der Linie *sbp4-1/4.9* konnte man beobachten, dass die Position der Seitentriebe nicht mehr ausschließlich auf das distale Ende der Zelle festgelegt ist. Schwellungen traten auch in der Mitte einer Zelle auf (siehe Abb. 3.4.15, Mitte links). Die Verhältnisse der abnormalen Seitentriebe zu

normalen Seitentrieben wurden in den Mutanten und im Wildtyp bestimmt. Als abnormale Seitentriebe wurde eine veränderte Position der Seitentriebeanlage, Doppelverzweigungen und im Falle der Linie *sbp1-1/4.7*, die Anlage der Seitentriebe in der ersten subapikalen Zelle, aufgefasst. Es wurden nur Protonemazellen mit Seitentrieben berücksichtigt. Das Ergebnis wurde in Tabelle 3.4.1 dargestellt.

Tabelle 3.4.1: Anzahl der abnormalen Seitentriebe

Linie	Zellen	abnormale Zellen	abnormale Zellen in %
WT	94	7	7.4
<i>sbp1-1/4.7</i>	65	27	41.5
<i>sbp4-4.6</i>	87	50	57.5
<i>sbp4-1/4.8</i>	85	35	41.2
<i>sbp4-1/4.9</i>	68	24	35.3

Die Verlustmutanten wurden über die Zeit weiter in ihrer Entwicklung beobachtet. Die transgene Linie *sbp1-1/4.7* zeigte einen abweichenden Phänotyp in den Gametophoren im Vergleich zum Wildtyp. Diese Linie bildet keine vollständigen Gametophoren aus. Aus den Knospen entwickeln sich nur ein paar Blätter, aber es fand keine Bildung eines Stängelchens statt (siehe Abb. 3.4.17). Während die transgenen Linien *sbp4-1/4.8* und *sbp4-1/4.9* Gametophoren bildeten, die Kolonien aber rasch eine braune Farbe annahmen (siehe Abb. 3.4.17). Dies könnte durch eine vermehrte Bildung von Rhizoiden zustande kommen.

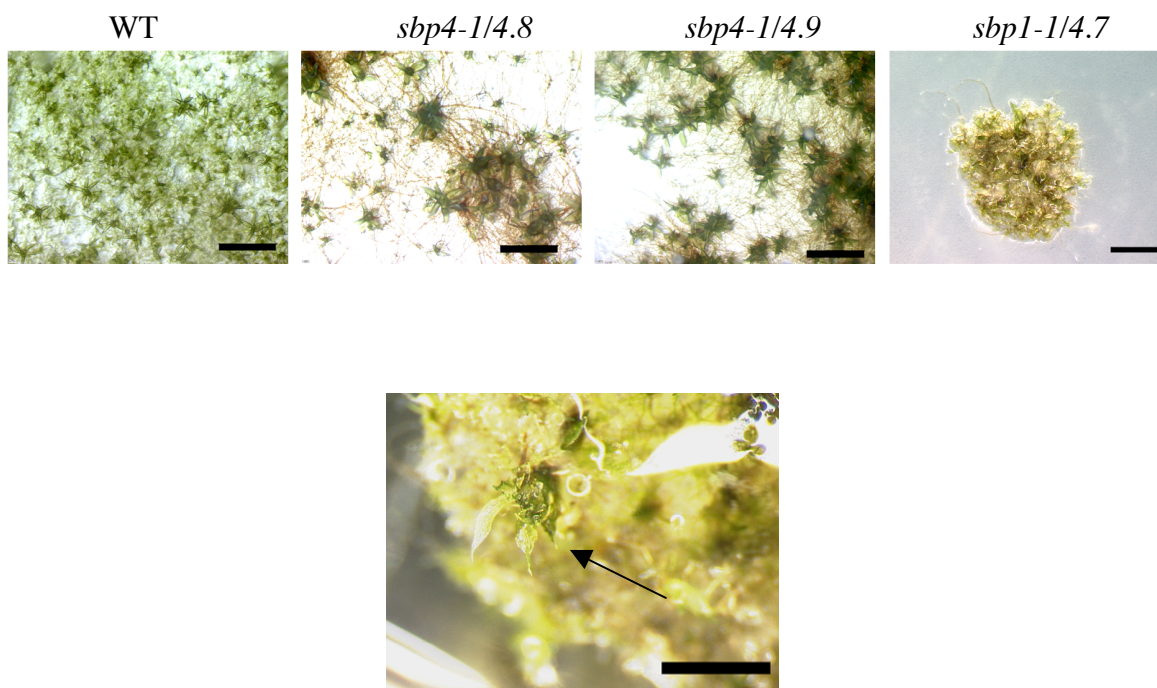


Abb. 3.4.17: Phänotypenanalyse der *PpSBP1* und *PpSBP4* transgenen Linien 1 Monat nach Propagation. Oben von links nach rechts: WT, *sbp4-1/4.8*, *sbp4-1/4.9*, *sbp1-1/4.7*. Unten: Vergrößerung von *sbp1-1/4.7*. Pfeil zeigt auf Gametophoren. Größenmaßstab: Oben 2mm. Unten 1mm.

4. Diskussion

Die SBP-Box Genfamilie codiert für pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren. Ihre evolutionäre Konservierung und ihre differentielle Expression deuten auf wichtige Funktionen in der Entwicklung von grünen Pflanzen hin. Doch trotz umfangreicher Mutanten-Durchmusterungen war zu Beginn dieser Arbeit nur eine Mutanten mit abweichenden Phänotyp vom Wildtyp in *A. thaliana* beschrieben (Unte *et al.*, 2003). Dies legte die Vermutung nahe, dass es innerhalb dieser Genfamilie eine funktionelle Redundanz der Gene gibt.

Durch eine vergleichende Sequenzanalyse der Genome von *A. thaliana* und *P. patens* wurde entdeckt, dass konservierte Genfamilie in *P. patens* kleiner sind (Rensing *et al.*, 2002). Diese Beobachtung gab den Ausschlag die SBP-Box Genfamilie in *P. patens* zu studieren. Wenn es dort weniger Mitglieder dieser Genfamilie gibt, könnte man das Problem der funktionellen Redundanz umgehen. Außerdem ist *P. patens* die einzigste bekannte Landpflanze die Homologe Rekombination in einer sehr hohen Effizienz durchführt (Schaefer, 2001; Hohe und Reski, 2003). Dies bietet die Möglichkeit zum gezielten Allelaustausch.

Doch bevor die Funktion der Gene studiert werden konnte mussten die SBP-Box Gene aus *P. patens* isoliert werden. Im Laufe dieser Doktorarbeit wurden 13 SBP-Box Gene aus *Physcomitrella patens* identifiziert. Die Genfamilie der SBP-Box Gene bildet also eine Ausnahme zu der Beobachtung von Rensing und Kollegen (2002). In *P. patens* wurden von mir 13 Mitglieder identifiziert und in *A. thaliana* gibt es 17. Die Genfamilien in beiden Spezies sind also fast gleichgroß. In einem Vergleich der SBP-Proteine aus *P. patens* mit denen aus *A. thaliana* wurden konservierte Bereiche außerhalb der SBP-Domäne identifiziert, die vielleicht einen ersten Hinweis auf die Funktion dieser Gene liefern können.

Um die Funktion einiger SBP-Box Gene in *P. patens* aufzudecken, wurden Expressionsstudien unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Des Weiteren wurden für einige SBP-Box Gene Gewinn- und Verlustmutanten hergestellt, deren abweichender Phänotyp erste Hinweise auf eine Funktion geben. Alle cDNA Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten SBP-Box Gene sind bei NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) einzusehen. Die Zugangsnummern und die Sequenzen der Gene *PpSBP8* und *PpSBP11*, für die keine cDNA isoliert wurde, sind in Anhang A verzeichnet.

4.1 Die Exon-Intron Struktur und konservierte Proteindomänen unterstützen die phylogenetische Rekonstruktion

Die phylogenetische Rekonstruktion der SBP-Box Gene zeigte bei einigen Zweigen eine sehr schlechte Unterstützung (siehe Abb. 3.1.4), doch diese können anhand der Exon-Intron Struktur und konservierter Proteindomänen außerhalb der SBP-Domäne unterstützt werden.

Alle hier erwähnten Proteindomänen wurden detailliert in 3.1.5 beschrieben.

In die erste Gruppe gehört *PpSBP5* und *AtSPL7*. *PpSBP5* besteht aus 10 Exons, genau wie die Gene *AtSPL1*, *AtSPL12*, *AtSPL7*, *AtSPL14* und *AtSPL16*. *PpSBP5* und *AtSPL7* codieren diese im Gegensatz zu den oben genannten *AtSPL*-Genen keinen "Ank-repeat".

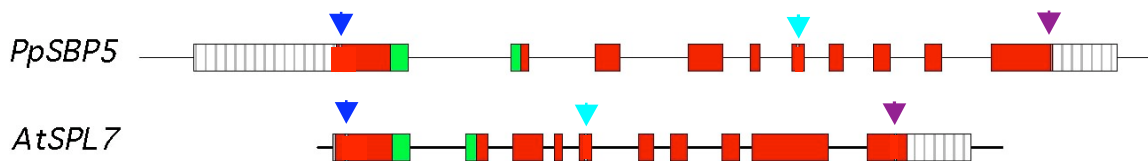


Abb. 4.1.1: Exon-Intron Struktur von *PpSBP5* und *AtSPL7*. Rot markiert wurde die codierenden Bereiche, grün die SBP-Box und weiß gestrichelt die UTR-Bereiche. Dunkelblauer Pfeil zeigt Position des codierenden Bereiches für das AHA-like1 Motiv, hellblau die des IRPGC-Domäne, lila den Bereich der CV-Domäne an.

Wie in Abb. 4.1.1 graphisch dargestellt ist, zeigen die Gene *AtSPL7* und *PpSBP5* einen ähnlichen Genaufbau und die codierenden Bereiche des AHA-like1 Motivs und der CV-Domäne sind in beiden Genen konserviert. Durch diese Beobachtung lässt sich dieser Zweig der phylogenetischen Rekonstruktion unterstützen.

Die Position der IRPGC-Domäne, in *PpSBP5* liegt der codierende Bereich im Exon 6 und in *AtSPL7* liegt er in Exon 5, ist variabel. Eine mögliche Erklärung ist, dass während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufergen ein Exon Verlust zwischen den Exons, die für die SBP-box und IRPGC-Domäne codieren, zu der Struktur von *AtSPL7*

geführt hat und ein Exon Verlust zwischen den codierenden Exons für die IRPGC-Domäne und der CV-Domäne zur Entstehung der Struktur von *PpSBP5*.

In die zweite Gruppe gehören die Gene der *AtSPL1*-Gruppe. Allerdings zeigt ein Vergleich der Exon-Intron Strukturen keine großen Ähnlichkeiten.

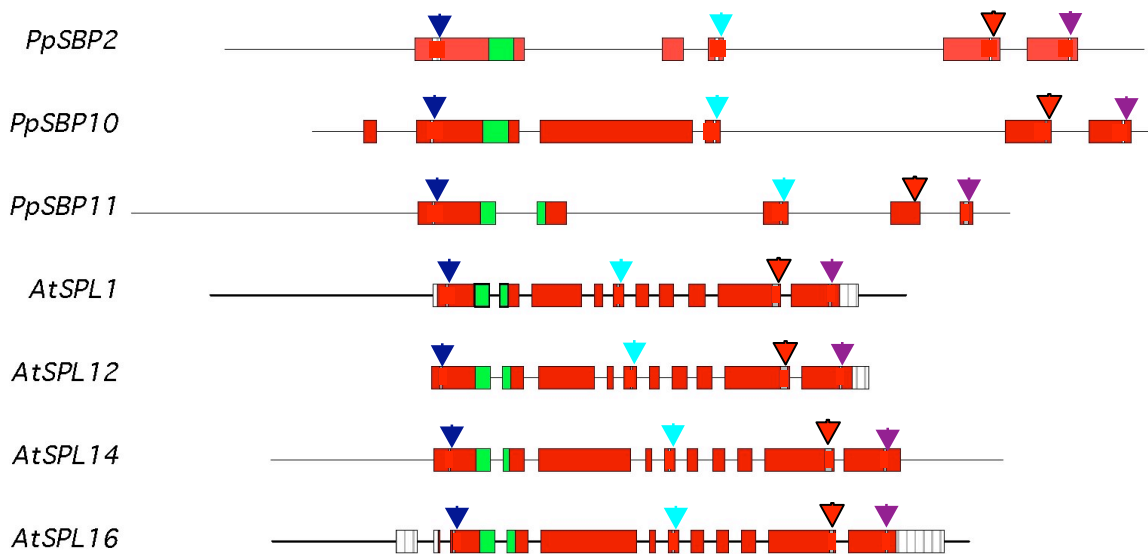


Abb. 4.1.2: Exon-Intron Struktur der Gene der *AtSPL1*-Gruppe. In weiß wurde die UTR-Bereiche dargestellt, die codieren Region in rot und die SBP-Box in grün. Dunkelblauer Pfeil zeigt Position des AHA-like Motiv, hellblau die des IRPGC-Domäne, rot der “Ank-repeat“, lila die CV-Domäne

Die SBP-Box Gene *PpSBP2*, *PpSBP10* und *PpSBP11* bestehen aus 5-6 Exons während die Gene *AtSPL1*, *AtSPL12*, *AtSPL14* und *AtSPL16* aus 10-11 Exons bestehen. Trotzdem sind die meisten codierenden Bereiche von konservierten Proteinsequenzen zwischen beiden Spezies konserviert. Das AHA-like1 Motiv wird immer im ersten Exon codiert, mit Ausnahme von *AtSPL16* und *PpSBP10*, und das CV-Motiv im letzten Exon. Der “Ank-repeat” liegt im vorletzten Exon, während die Position der IRPGC-Domäne zwischen *A. thaliana* und *P. patens* bezüglich der Exon-Intron Struktur nicht konserviert ist (siehe Abb. 4.1.2).

Die Gene *PpSBP2* und *PpSBP10* haben kein Intron in der SBP-Box, während dies in allen anderen SBP-Box Genen aus *P. patens* und *A. thaliana* konserviert ist. Anhand der phylogenetischen Rekonstruktion (siehe Abb. 3.1.4) ist es nahe liegend, dass dieses

Intron in den beiden Genen verloren gegangen ist, da die beiden Gene *PpSBP5* und *AtSPL7*, die wahrscheinlich am ehesten eine basale Form dieser Gene repräsentieren, dieses Intron noch besitzen.

Diese Beobachtungen unterstützen den Zweig dieser Gruppe in der phylogenetischen Rekonstruktion.

In die dritte Gruppe werden die Gene der *AtSPL8*-Gruppe eingeordnet. Ihre Produkte enthalten alle ein RTYF-Motiv.

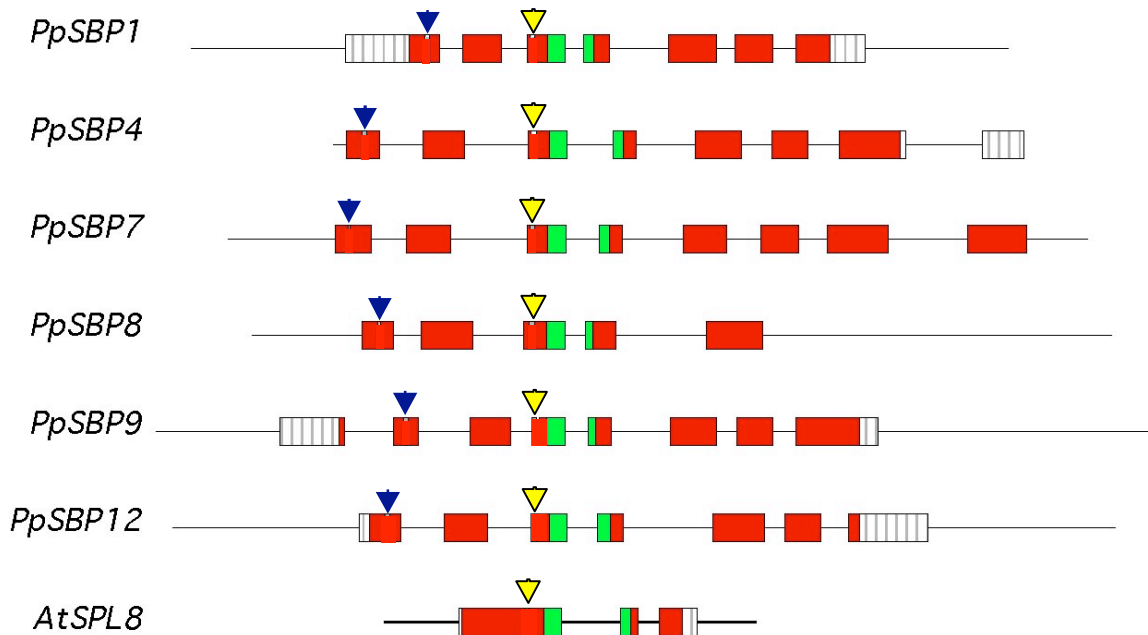


Abb. 4.1.3: Exon-Intron Struktur der Gene *AtSPL8*-Gruppe. Weißgestrichelt wurden die UTR-Bereiche dargestellt, die codierenden Region in rot und die SBP-Box in grün. Dunkelblauer Pfeil zeigt auf den codierenden Bereich des AHA-like2 Motiv und der gelbe zeigt den des RTYF-Motivs.

Im Vergleich der Exon-Intron Strukturen von *AtSPL8* mit *PpSBP4*, *1*, *9*, *7*, *8*, und *12* erkennt man, dass *AtSPL8* nur aus drei Exons besteht, während die *P. patens* Gene dieser Gruppe aus mindestens fünf bis neun Exons besteht. Im ersten Exon liegt der codierende Bereich für ein AHA-like2 Motiv, mit Ausnahme von *PpSBP9* wo es im zweiten Exon liegt. Diese Motiv fehlt in *AtSPL8*, daraus lässt sich ableiten, dass dieses Exon vielleicht während der Evolution verloren gegangen ist. Das erste Exon von *AtSPL8* ist viel größer als das zweite Exon in den *PpSBPs* dieser Gruppe und im ersten Exon von *AtSPL8* liegt der codierende Bereich der SBP-Box. Dieser liegt in den *PpSBPs* dieser Gruppe im

dritten Exon. Vielleicht ist das zweite Intron der *PpSBPs* dieser Gruppe im Laufe der Evolution zu *AtSPL8* verloren gegangen. Die Sequenzähnlichkeiten dieser Gene sind aber zu gering um diese Hypothese zu stützen. Insgesamt unterstützen die konservierten Bereiche, außerhalb der SBP-Box, diesen Zweig der phylogenetischen Rekonstruktion.

In die vierte Gruppe wurde die Gene *PpSBP3*, *PpSBP6* und *PpSBP13* eingeordnet. Ihre Exon-Intron Struktur zeigt den einfachsten Genaufbau von allen *PpSBPs*, sie bestehen nur aus vier Exons (siehe Abb. 3.1.3). Im letzten Exon dieser drei Gene kann man eine MRE für die miR156 entdecken. In *A. thaliana* zeigen 11 der 17 Mitglieder der SBP-Box Genfamilie die gleiche MRE (Rhoades *et al.*, 2002), die auch hier im letzten Exon liegt (siehe Abb. 3.2.10). Die Zielsequenz selber hat sich nicht verändert und ist zu dem meisten *AtSPLs* identisch. Nur *AtSPL3* zeigt mehr Fehlpaarungen zu der AtmiR156. Die miR156 MRE liegt bei allen *PpSBP*-Box Genen innerhalb des codierenden Bereichs und macht einen Teil des Proteins aus, während dies nur bei acht der *AtSPLs* der Fall ist. Bei *AtSPL3*, 4 und 5, die bis jetzt nur in Samenpflanzen gefunden wurden (P. Huijser, persönliche Mitteilung), liegt die MRE im 3'UTR. Möglicherweise ist dies durch eine Einführung eines Stop-Codon vor der MRE zustande gekommen.

4.2 Einige *PpSBP*-Box Gene können in bestehende Subfamilien eingeordnet werden

In Cardon *et al.*, 1999 wurden durch eine erste phylogenetische Rekonstruktion einer begrenzten Zahl von SBP-Box Genen aus Samenpflanzen mehrere Subfamilien festgelegt. Es wurde versucht, die *PpSBP*-Box Gene in die bestehenden Subfamilien einzuordnen.

Die Proteine *AtSPL1*, *AtSPL12*, *AtSPL14*, *AtSPL16*, *PpSBP2*, *PpSBP10* und *PpSBP11* weisen die gleichen Proteindomänen auf. Diese wurden detailliert in 3.1.5 beschrieben. *AtSPL1* und *AtSPL12* und *OsSBP1* gehören in die *AtSPL1*-Subfamilie. Anhand der Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktion, des Vergleichs der Exon-Intron Strukturen und der Proteindomänen können also auch die Gene *PpSBP2*, *PpSBP10* und *PpSBP11* in dieser Subfamilie eingeordnet werden.

Eine weitere Subfamilie, ZmLG1, bestehend aus *AtSPL8*, *ZmLG1*, *ZmSBP4*, *ZmSBP3*, *ZmSBP2*, *ZmSBP1* und *SBPH3* wurde in Cardon *et al.*, 1999 beschrieben. Durch die phylogenetische Rekonstruktion der SBP-Box, die durch die Exon-Intron Strukturen unterstützt wird und durch das Vorhandensein von dem konservierten RTYF-Motiv können die Gene *PpSBP1*, *PpSBP4*, *PpSBP7*, *PpSBP8*, *PpSBP9* und *PpSBP12* in die ZmLG1-Subfamilie eingeordnet werden.

Die phylogenetische Rekonstruktion der SBP-Box Gene aus *A. thaliana* und *P. patens* konnten erste Hinweise auf die evolutionäre Verwandtschaft dieser Gene liefern. Vielleicht könnte eine phylogenetische Rekonstruktion mit weiteren SBP-Box Sequenzen aus anderen Spezies weitere Einblicke gewähren. Da aber in dieser Arbeit vor allem Wert auf die Funktionalität der SBP-Box Gene aus *P. patens* gelegt wurde, wurde diese nicht durchgeführt.

4.3 Aktivierungs- und andere Proteindomänen

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SBP-Proteine außerhalb der SBP-Domäne, welche für die DNA-Bindung verantwortlich ist (Birkenbihl *et al.*, 2005), noch weitere konservierte Bereiche tragen. Doch für die meisten ist noch keine biologische Funktion bekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit versucht für zwei Motive eine biologische Funktion aufzudecken.

4.3.1 Möglicherweise ist nicht jedes AHA-like Motiv eine Aktivierungsdomäne

Wie in 3.1.5 beschrieben wurde N-terminal der SBP-Domäne in den PpSBP-Proteinen ein AHA-like Motiv identifiziert. Ein AHA-Motiv ist eine gut beschriebene Aktivierungsdomäne aus Pflanzen, Hefen und Säugetieren. Sie ist durch aromatischen und sauren (acidic) Aminosäuren, die in hydrophobe Aminosäure eingebettet sind charakterisiert (Nover und Scharf, 1997). In den PpSBP-Proteinen gibt es drei Varianten des AHA-like Motivs. In den AtSPLs, die der AtSPL1-Subfamilie angehören, gibt es nur eine erkennbare Variante des AHA-like Motivs und dieses Motiv zeigte eine deutliche transkriptionelle Aktivierung in Hefe, was die Vermutung nahe legte, dass dieses Motiv

auch *in planta* aktivierend wirken kann. Die Situation der AHA-like Motive aus *P. patens* ist nicht so einfach zu klären. Die Motive AHA-like1 und AHA-like2 aus *P. patens* zeigten keine Aktivierungsfähigkeit in Hefe. Dies könnte bedeuten, dass sie keine Aktivierungsdomänen *in planta* sind, oder die Faltung der Proteine in Hefe nicht richtig war oder in Hefe fehlten wichtige Co-Faktoren. Dies könnte man durch einen gleichartigen Versuch in Moos-Protoplasten überprüfen.

Die Aminosäuresequenzen in Aktivierungs- oder Repressordomänen sind oft schlecht konserviert und konservierte Aminosäuren müssen nicht unbedingt etwas zu der Funktion dieser Domänen beitragen (Schwechheimer und Bevan, 1998). Dies könnte auch für die AHA-like Motive 1 und 2 gelten. Vielleicht wurden die Konstrukte zu klein gewählt und die Motive könnten in einem größeren Kontext vielleicht doch als Aktivierungsdomäne wirken.

Falls das AHA-like2 Motiv auch *in planta* keine Aktivierungsfähigkeit zeigt, könnte dies erklären, warum dieses Motiv während der Evolution in AtSPL8 verloren gegangen ist. Bei dem AHA-like1 Motiv wäre eine Erklärung schwieriger. Wenn es in *P. patens* keine transkriptionelle Aktivierung zeigte, während dieses Motiv aus *A. thaliana* in Hefe aktivierend wirkte, könnte eine Weiterentwicklung dieses Motivs von der inaktiven Form in *P. patens* zu der aktiven Form in *A. thaliana* stattgefunden haben.

Das AHA-like3 Motiv hingegen zeigte eine starke Aktivierung in Hefe. Dies lässt vermuten, dass dieses Motiv auch in Pflanzen aktivierend wirken kann.

4.3.2 Das RTYF-Motiv ist möglicherweise keine Aktivierungsdomäne

In den Proteinen der ZmLg1-Subfamilie aus *A. thaliana* und *P. patens* liegt N-terminal der SBP-Domäne ein RTYF-Motiv. Da AtSPL8 in einer Hefe-zwei-Hybrid Durchmusterung eine Selbstaktivierung zeigte, lag die Vermutung nahe, dass vielleicht das RTYF-Motiv dafür verantwortlich ist. Doch der Selbstaktivierungsversuch in Hefe zeigte, dass dies wahrscheinlich nicht der Fall ist (siehe 3.2.2). Aber wie schon oben erwähnt könnte dies auch durch eine nicht korrekte Faltung des Proteins in Hefe oder durch fehlende Co-Faktoren zustande kommen. Um dies auszuschließen könnte ein Aktivierungsversuch in Moos-Protoplasten durchgeführt werden. Man könnte auch das Gesamtprotein in Hefe auf transkriptionelle Aktivierung testen und dann das RTYF-

Motiv mutieren und sehen ob durch die Mutationen die transkriptionelle Aktivierung verloren geht.

4.4 Die Interaktion der SBP-Box Gene mit der miR156 ist evolutionär konserviert

11 der 17 Mitglieder der SBP-Box Genfamilie aus *A. thaliana* tragen eine Zielsequenz für die microRNA156 und 157 (Rhoades *et al.*, 2002). Für einige dieser Gene konnte experimentell gezeigt werden, dass sie von dieser miRNA erkannt und geschnitten werden (Wu und Poethig, 2006). Wie schon vorher erwähnt wurde auch in drei der 13 SBP-Box Gene aus *P. patens* die gleiche MRE identifiziert. Für *PpSBP3* wurde gezeigt, dass es *in planta* ein Zielgen für die miRNA156 ist (Arazi *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass die Regulation einiger SBP-Box Gene über die miRNA156 ein alter Mechanismus ist. Auch Axtell und Bartel (2005) zeigten, dass die miR156 evolutionär konserviert ist. Allerdings konnte sie in dem Laubmoos *Polytrichum juniperinum* keine miR156 entdecken. Es könnte sein, dass bei der Klonierung der microRNAs die miR156 übersehen wurde, oder aber die miR156 könnte in *P. juniperinum* verloren gegangen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch getestet, ob die PpmiR156 funktionell ist und eine AtMRE erkennen konnte. Dies wurde durch transiente Expression von Transgenen mit wildtypischer MRE (MRE⁺) und mutierten Sequenz (MRE⁻), die für ein Reporterprotein mit unterschiedlichen Fluorophoren codierte, in Moos-Protoplasten getestet (siehe 3.2.5). Das Konstrukt mit der wildtypischen miRNA (MRE⁺) Zielsequenz resultierte immer in einer schwächeren Fluoreszenz der transformierten Protoplasten als das Konstrukt mit der mutierten Sequenz (MRE⁻). Dies bedeutet, dass die Transkripte mit der wildtypischen MRE wahrscheinlich von der PpmiR156 erkannt wurden und dies zu einer Degradation der mRNA und bzw. oder zu einer Störung der Translation führte. Die Transkripte mit der mutierten MRE konnten von der PpmiR156 nicht erkannt werden, es fand keine post-transkriptionelle Regulation statt und somit konnte mehr Reporterprotein akkumulieren und eine höhere Fluoreszenz erreicht werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die PpmiR156 in Protoplasten aktiv ist eine *A. thaliana* MRE erkennen kann.

Für die PpmiR156 wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei potentielle codierende Loci aus der genomischen Datenbank identifiziert. Für den Locus *PpMIR156a* wurde in *Protonema* auch ein Transkript, welches wahrscheinlich eine pre-PpmiR156a war, nachgewiesen (siehe 3.2.3). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass der *PpMIR156a* Locus wirklich für eine PpmiR156 codiert und biologisch aktiv ist.

4.5 Die SBP-Box Gene *PpSBP1*, 2, 4, 5 und 12 sind differentiell exprimiert

Einige der SBP-Box Gene aus *A. thaliana* zeigten eine differentielle Expression (Cardon *et al.*, 1997,1999; Unte *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2006). Eine differentielle Expression kann einen Hinweis auf eine mögliche Funktion und bzw. oder Beteiligung der Gene an Entwicklungsprozessen liefern Um die Frage zu beantworten, ob die *PpSBP*-Box Gene auch differentiell exprimiert sind, wurde eine Expressionsstudie über sechs verschiedene Phasen des Lebenszyklus von *P. patens* mit den Genen *PpSBP1-5* und *12* durchgeführt (siehe 3.3.3).

Alle diese Gene konnten in dem getesteten Gewebe nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3.1).

Die Expression von *PpSBP1* schien während der Entwicklung von *Protonema* zum Gametophoren über die Zeit langsam zuzunehmen. Doch schon kurz nach der Induktion der Sexualorgane, die durch Kurztag und Zugabe von Wasser ausgelöst wurde, sank die Expression wieder und bleibt danach während der Entwicklung der Sexualorgane und des Sporophyten fast unverändert. Es könnte sein, dass durch die Kurztagbedingungen eine Repression von *PpSBP1* zustande kam und bzw. oder *PpSBP1* könnte bei der Entwicklung von Gametophoren, die in dem Gewebe nach 44DAP dominant sind, eine Rolle spielen.

Die Expression von *PpSBP2* zeigte einen deutlichen Einbruch bei 44 Tage altem Gewebe und wird somit wahrscheinlich nicht in Gametophoren benötigt oder deren Entwicklung sogar entgegen wirken.

PpSBP3 hingegen war in allen Stadien sehr schwach exprimiert. Dieses Gen steht aber unter der Kontrolle der PpmiR156 (Arazi *et al.*, 2005). Über die räumliche und zeitliche

Expression der PpmiR156 ist noch sehr wenig bekannt. Es könnte sein, dass *PpSBP3* nur in bestimmten Zellen oder nur zu einem bestimmten Zeitpunkt benötigt wird. Es wäre zu erwarten, dass in diesen Zellen oder zu diesem Zeitpunkt die PpmiR156 nicht mehr exprimiert wird. Deshalb wäre für die microRNA regulierten Gene ein Fusionskonstrukt mit dem vollständigen Gen unter der Kontrolle seines eigenem Promotors mit einem Fluoreszenzreporterproteins sehr hilfreich. Damit könnte man am lebenden Gewebe und auf zellulärer Ebene die Expression der Gene studieren und vielleicht auch Rückschlüsse auf die Rolle der PpmiR156 in der Entwicklung von *P. patens* ziehen.

Die Expression der miteinander verwandten Gene *PpSBP4* und *PpSBP12* nahm während der Entwicklung vom Protonema über die Gametophoren zum Sporophyten über die Zeit langsam zu. Dies könnte ein Hinweis sein, dass diese Gene erst spät in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen und vielleicht in ihrer Funktion redundant zueinander sind. Allerdings wurde die RT-PCR für *PpSBP12* nur einmal durchgeführt und muss zur statistischen Absicherung noch wiederholt werden.

Die Expression von *PpSBP5* dagegen nahm während der Entwicklung von Protonema über Gametophoren zum Sporophyten über die Zeit langsam ab. Mit einer Ausnahme, 1 Woche nach Induktion der Sexualorgane war die Expression von *PpSBP5* wieder fast so stark wie 10 Tage nach Propagation. Dies weist darauf hin, dass *PpSBP5* wahrscheinlich wichtig für die Entwicklung des Protonemas ist und vielleicht auch bei der Bildung der Sexualorgane eine positive Rolle spielt.

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass für diese Expressionsstudien immer Mischgewebe geerntet wurde und deshalb über kleine Änderungen in Einzelzellen oder bestimmten Gewebetypen keine Aussage gemacht werden kann.

4.6 *PpSBP5* zeigte eine höhere Expression auf einem Medium das Protonema fördert

Bei der Kultur von *P. patens* werden verschiedene Medien und Wachstumsbedingungen gewählt (Schaefer, 2001). Diese können die Entwicklung von *P. patens* steuern. Ein Effekt der verschiedenen Wachstumsbedingungen auf die Expression einiger SBP-Box Gene kann einen Hinweis auf eine Beteiligung an einem bestimmten

Entwicklungsprozess liefern. Im Laufe dieser Arbeit wurde ein Effekt dieser Bedingungen auf die Gene *PpSBP1-5* untersucht.

Ein Effekt des Mediums auf die Expression der SBP-Box Gene *PpSBP1-4* konnte ausgeschlossen werden und auch Dauerlicht im Vergleich mit Langtag zeigte keine Änderungen in der Expression (siehe Abb. 3.3.2). *PpSBP5* schien auf die Zugabe von NH_4 im Medium zu reagieren (siehe Abb. 3.3.3). NH_4 unterdrückt die Entwicklung von Gametophoren und fördert die Entwicklung von Protonema (Schaefer, 2001). Vielleicht spielt *PpSBP5* bei diesem Prozess eine Rolle. Da aber für diesen Versuch sieben Tage altes Protonema verwendet wurde, ist unklar ob der Anstieg der Expression von *PpSBP5* in direktem Zusammenhang zum Stickstoff-Stoffwechsel steht, oder die vermehrte Bildung eines bestimmten Protonemazelltyps zu einer höheren Transkriptmenge führt.

Um alle Stadien des Lebenszyklus von *P. patens* abzudecken sollte die Expression aller SBP-Box Gene unter Dauerlicht, Langtag und Kurztag-Bedingungen sowie ihre Reaktion auf die verschiedenen Medien getestet werden. Des Weiteren sollte eine Expressionsanalyse während des Lebenszyklus von *P. patens* für die noch fehlenden SBP-Box Gene durchgeführt werden.

4.7 Die Gene der *PpSBP3*-Gruppe reagieren auf Cytokinin, ein Phytohormon welches bei der Bildung von Knospen eine Rolle spielt

Phytohormone spielen eine wichtige Rolle während der Entwicklung von *P. patens*. Am besten wurde die Effekte von Auxin und Cytokinin auf die Entwicklung des Protonemas beschrieben (Schumaker und Dietrich, 1997). Auxin scheint vor allem bei der Transition von Chloronema zu Caulonema eine Rolle zu spielen, wohingegen Cytokinin für die Bildung von Knospen wichtig ist (Ashton *et al.*, 1979; Schumaker und Dietrich, 1997; Cove *et al.*, 2006, Decker *et al.*, 2006).

Aus diesem Grund wurde die Expression der SBP-Box Gene *PpSBP1-5* in Reaktion auf die Phytohormone Cytokinin und Auxin und einem Auxin-Inhibitor getestet.

Sieben Tage nach Behandlung zeigte nur *PpSBP3* eine deutliche Änderung in seiner Expression in Reaktion auf Cytokinin (siehe Abb. 3.3.4).

Der Effekt des Cytokinins auf die Expression von *PpSBP3* könnte ein direkter Effekt sein, denn schon vier Stunden nach Behandlung mit Cytokinin kommt es zu einer dramatischen Erhöhung der Expression, die im weiteren Zeitverlauf langsam wieder abnahm (siehe 3.3.2). Diese Abnahme der Expression in Anwesenheit von Cytokinin lässt auf einen Feedback-Mechanismus schließen. Da Cytokinin auf die Expression von *PpSBP3* einen sehr starken Effekt zeigte wurden auch die verwandten Gene *PpSBP6* und *PpSBP13* auf ihre Reaktion auf Cytokinin hin überprüft. *PpSBP13* reagierte ähnlich wie *PpSBP3*, es zeigte einen starken Anstieg nach vier Stunden während die Expression nach 24 Stunden geringer war. *PpSBP6* hingegen reagierte anders. Es zeigte erst nach 24 Stunden eine Erhöhung der Expression. Somit steht *PpSBP6* wahrscheinlich nicht direkt unter der Kontrolle von Cytokinin.

Alle drei Gene tragen ein MRE, doch die erhöhte Expression der Gene als Reaktion auf die Zugaben von Cytokinin ist wahrscheinlich nicht durch eine Reduktion der miRNA156 in Reaktion auf Cytokinin zu erklären. Die pre-PpmiR156a zeigte nach vier Stunden nur eine kleine Veränderung der Expression, welche in keinem Verhältnis zu dem extremen Anstieg in der Expression der Gene *PpSBP3* und *PpSBP13* nach vier Stunden steht (siehe Abb. 3.3.7). Außerdem reagierte *PpSBP6*, welches die gleiche MRE aufweist wie *PpSBP3* und *13*, sehr viel langsamer. Aus diesem Grund ist es eher unwahrscheinlich, dass die PpmiR156a für den Anstieg der Expression der Gene *PpSBP3*, *6* und *13* in Reaktion auf Cytokinin verantwortlich ist.

Wenn diese Gene aber durch die PpmiR156 reguliert werden, wie kann die Erhöhung der Expression der Gene zustande kommen, wenn doch die PpmiR156a nicht weniger wird? Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Es könnte sein, dass die PpmiR156 nicht in allen Zellen aktiv ist und in diesen Zellen kommt es zur Induktion der Gene durch Cytokinin. Außerdem gibt es wahrscheinlich mindestens zwei Loci, die für die PpmiR156 codieren. Da für die *PpMIR156b* mit den gewählten Oligonukleotiden keine Vorstufe der PpmiR156b amplifiziert werden konnte, wurde dieser Locus für die weiteren Untersuchungen vernachlässigt. Es ist in diesem Falle jedoch unabdingbar die Expression von *PpMIR156b* genauer zu untersuchen. Es könnte nämlich sein, dass die PpmiR156b im Vergleich zu *PpMIR156a* im Protonema viel stärker exprimiert ist und man für die *PpMIR156b* einen größeren Effekt des Cytokinins auf die Expression

feststellen könnte. Alternativ kann man auch die Menge der miR156 durch eine Northern-Blot Analyse bestimmen.

4.8 Eine versuchte Überexpression der AtmiR156b zeigte keinen abweichenden Phänotyp

Eine Überexpression der AtmiR156b zeigte in *A. thaliana* einen abweichenden Phänotyp vom Wildtyp (Schwab *et al.*, 1005). Die Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp buschig, zeigten einen Verlust von apikaler Dominanz und blühten unter Langtagbedingungen etwas später. Dieser Phänotyp resultierte sehr wahrscheinlich aus der verringerten Transkriptmenge der microRNA regulierten *AtSPLs*, die durch eine vergleichende Transkriptom-Analyse nachgewiesen wurde (Schwab *et al.*, 2005).

Da auch in *P. patens* wahrscheinlich drei SBP-Box Gene über die miR156 reguliert werden, lag die Vermutung nahe, dass eine Überexpression der miR156 auch in *P. patens* zu einem veränderten Phänotyp führen könnte. Zu diesem Zeitpunkt war der potentielle genomische Locus für die PpMIR156 noch unbekannt und aus diesem Grund wurde für die Transformation der genomische Locus der AtMIR156b verwendet. Dieser wurde unter der Kontrolle eines CaMV 35S Promotors an den *ZLAB1*-Locus integriert.

In den transgenen Linien wurde nur eine schwache Expression der pre-AtmiR156 nachgewiesen (siehe Abb. 3.4.2) und auch die Transkriptmenge des Zielgens *PpSBP3* war nur schwach reduziert (siehe Abb. 3.4.3).

Bei der Phänotypenanalyse konnte in den Ox-AtmiR156b Linien keine Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Vielleicht war die AtmiR156b zu niedrig exprimiert und aus diesem Grund kam es zu keiner drastischen Reduktion der Transkriptmenge der potentiellen miRNA regulierten Genen, wie auch für das Zielgen *PpSBP3* gezeigt wurde.

Eine andere Strategie zur Erzeugung von Überexpressionslinien wurde von K. Henschel (2002) beschrieben. Sie stellte Konstrukte her, die nicht stabil ins Genom integrierten und somit in einer höheren Anzahl von Kopien in der Pflanzenzelle vorlagen. Bei ihr war die Expression des betreffenden Gens um das 100fache erhöht. Dieser Ansatz wurde auch für die Überexpression der AtmiR156b verfolgt. Bei dieser Transformation konnte nur eine

Linie isoliert werden, die zwar die pre-AtmiR156b aufwies (siehe Abb. 3.4.7), jedoch die AtmiR156b nicht stärker exprimiert als die stabilen Linien. Auch die extrachromosomale Überexpression der AtmiR156b zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen abweichenden Phänotyp.

Eine Erklärung für die schwache Expression auch in den extrachromosomalen Linien der AtmiR156b könnte sein, dass die miR156 nur bis zu einem bestimmten Schwellenwert überexprimiert werden kann. Alles darüber hinaus ist möglicherweise letal und so während der Selektionsrunden verloren gegangen. Des Weiteren könnte es sein, dass die Prozessierung der AtmiR156b in *P. patens* nicht richtig stattfindet. Um dies auszuschließen wäre es sinnvoll, das endogene Gen der miR156 in *P. patens* zu überexprimieren und diese im Vergleich zum Wildtyp zu analysieren. Man sollte ihn unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors bringen um eine potentielle Letalität zu umgehen (Saidi *et al.*, 2005). Da in dieser Arbeit auch zumindest ein aktiver codierender Locus für die PpmiR156b isoliert wurde, wäre es interessant die PpmiR156 Überexpressionslinie mit einer herzustellenden Verlustmutanten für die PpmiR156 zu vergleichen.

4.9 Gewinn und Verlustmutanten für *PpSBP1* und *PpSBP4* geben erste Eindrücke für eine Funktion

Ziel dieser Arbeit war etwas über die Funktion der SBP-Box Gene in *P. patens* herauszubekommen. Die Überexpressionslinien für die *AtMIR156b* zeigten keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp und ließen somit keine Aussage auf eine mögliche Funktion der Gene *PpSBP3*, *PpSBP6* und *PpSBP13* in der Entwicklung von *P. patens* zu. Eine weitere Strategie war es, Gewinn- und Verlustmutanten für die Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* herzustellen. Diese Gene sind Orthologe zu *AtSPL8*. Mutationen in *AtSPL8* führen zu einem abweichenden Phänotyp (Unte *et al.* 2003, Zhang, 2005). Es ist denkbar, dass die orthologen Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* eine ähnliche Funktion in Moos erfüllen und eine Mutation oder Überexpression dieser beiden Gene zu einem vom Wildtyp abweichende Phänotyp führt.

4.9.1 Die extrachromosomale Überexpression von *PpSBP1* und *PpSBP4* zeigen abnormale Protonema Entwicklung

Da festgestellt wurde, dass der CaMV 35S Promotor nur eine schwache Aktivität in *P. patens* besitzt wurden extrachromosomale Überexpressionslinien für die beiden Gene hergestellt. Für *PpSBP1* konnten zwei Linien isoliert werden, die nur eine 1,7mal höhere Expression zeigten (siehe Abb. 3.4.10). Für *PpSBP4* konnten sechs Linien isoliert werden, von denen die stärkste Linie eine 5mal höhere Expression zeigte (siehe Abb. 3.4.10). Auch hier tritt wieder, wie bei dem AtMiR156 Überexpressions-Versuch, das Problem der schwachen Überexpression auf. Dies könnte darauf hin deuten, dass die SBP-Box Gene, über einen Schwellwert hinaus exprimiert, letal wirken.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten die extrachromosomalen Überexpressionslinien für *PpSBP1* und *PpSBP4* eine korkenzieherartige Aufwindung des Protonemas. Da die extrachromosomale Überexpressionslinien für AtmiR156b dies nicht zeigten und dieser Phänotyp auf Medium ohne Selektionsdruck verloren ging, resultiert er wahrscheinlich aus der Überexpression von *PpSBP1* und *PpSBP4*. Beide Gene sind auch normalerweise im Protonema exprimiert (siehe Abb. 3.3.1). Ursache der korkenzieherartigen Aufwindung der Protonemazellen könnte eine fehlerhafte Bildung der Mikrotubuli oder Actinfilamente des Cytoskeletts sein. Durch Cytoskelett-Inhibitoren könnte dies genauer untersucht werden. Die Verlustmutanten von ARPC1 einer Komponente des „Actin-related protein 2/3“ Komplex, der maßgeblich an der Regulation der Actin Polymerisierung und damit an der Bildung des Cytoskeletts beteiligt ist, zeigte allerdings anderen phänotypische Veränderungen (Harries *et al.*, 2005). Vielleicht sind die beiden Gene nicht direkt an diesem Prozess beteiligt, oder beeinflussen eine andere Komponente des Cytoskeletts.

Die extrachromosomalen Linien für *PpSBP1* und *PpSBP4* zeigten außerdem eine Störung in der Bildung von Sporophyten. Für die Linien Ex4-51 und Ex4-32 wurden die Eizellen genauer untersucht. Bei einer Zellkernfärbung mittels DAPI der Eizelle konnte man erkennen, dass eine Befruchtung in beiden Linien stattgefunden hatte (siehe Abb. 3.4.13). Es konnte aber kein sich entwickelnder Embryo gefunden werden. Dies könnte bedeuten, dass die Überexpression von *PpSBP4* in diesem Stadium die Teilung der Zygote

unterbindet. Diese Beobachtung ist ähnlich zu dem Phänotyp der Verlustmutante *pplfy1* und der Doppelmutante *pplfy1/pplfy2*. Auch in diesen Mutanten sieht man selten einen sich teilenden Embryo. Doch dies ist die einzigste Gemeinsamkeit, denn ansonsten zeigten diese Linien eine deutlich geringere Anzahl an Sporophyten und diese wiesen Abnormalitäten in der Anzahl der Zellen, der Zellform und Zellanordnung auf (Tanahashi *et al.*, 2005). *LFY* spielt in *A. thaliana* in einem Netzwerk, das die Blütenentwicklung kontrolliert, eine zentrale Rolle (Ng und Yanosfsky, 2000). Es integriert Umwelteinflüsse und endogene Signale die den Zeitpunkt der Transition von der vegetativen zur reproduktiven Phasen kontrollieren (Blazquez und Weigel, 2000) und interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren um die Transkription von floralen homeotischen Gene, welche die Identität von Blütenorganen festlegen, zu aktivieren (Parcy *et al.*, 1998., Busch *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999; Lohmann *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2002).

In wie weit die Funktion von *PpLFY* mit der von *PpSBP1* und *PpSBP4* in Verbindung steht ist sehr unklar, da sich die Phänotypen nur bei der Teilung der Zygote ähneln.

Bei den extrachromosomalen Linien besteht immer die Gefahr, dass sie das eingebrachte Konstrukt wieder verlieren. Aus diesem Grund wäre es doch besser Überexpressionskonstrukte für die beiden Gene stabil ins Genom zu integrieren. Der CaMV 35S Promotor könnte durch den Actin-Promotor aus Reis ersetzt werden, da dieser bei einer quantitativen Promotorstudie die stärkste Aktivität zeigte (Horstmann *et al.*, 2004)

4.9.2 Der Verlust von *PpSBP1* und *PpSBP4* führt zu einer höheren Verzweigungsrate im Protonema

Die extrachromosomalen Überexpressionslinien für die Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* zeigten einen einander ähnlichen abweichenden Phänotyp vom Wildtyp. Um die Funktion dieser Gene genauer zu untersuchen wurde am jeweiligen genomischen Locus ein Allelaustausch durchgeführt, der zu einer Unterbrechung dieser Gene führt. Für *PpSBP1* konnte nur für eine Linie eine Integration des Konstrukts am Locus nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.14). Im Fall der Unterbrechung von *PpSBP4* konnten sechs unabhängige Linien isoliert werden. Durch RT-PCR wurde in allen Fällen nachgewiesen, dass in diesen Linien kein vollständiges Transkript der jeweiligen Gene

mehr zustande kommt (siehe Abb. 3.4.16). An dieser Stelle möchte ich darauf hinweisen, dass die Herstellung dieser transgenen Linien nur durch eine Änderung des Transformationsprotokolls (Schaefer, 2001) erreicht werden konnte. Erstaunlicherweise zeigten nur die Linien eine Integration am richtigen Locus, die auf NO_3 -Medium aufgezogen wurden. Während die Linien die, wie im Protokoll von Schaefer (2001) beschrieben, auf NH_4 -Medium regenerierten nie eine Integration zeigten. Als später die Regeneration der Protoplasten von den Verlustmutanten für *PpSBP1* und *PpSBP4* im Vergleich zu Wildtyp-Protoplasten auf den beiden Medien genauer untersucht wurden, konnte festgestellt werden, dass die Protoplasten der Mutanten regenerierten. Nach 14 Tagen zeigten die Regeneranten der Verlustmutanten für *PpSBP1* und *PpSBP4* eine höhere Verzweigungsrate als die Wildtyp-Protoplasten. Dies wird durch die Zugaben von NH_4 ins Medium sogar noch verstärkt (siehe Abb. 3.4.17). Doch leider erklärt dies nicht, warum bei einer Transformation und anschließender Regeneration der Protoplasten auf NH_4 Medium keine genomische Integration stattgefunden hatten.

Unter dem Mikroskop wurde das Protonema der Mutanten genauer untersucht und dort zeigte sich das nicht nur die Verzweigungsrate an sich geändert hatte, sondern auch die Position der Seitentriebe nicht mehr so festgelegt war wie im Wildtyp (siehe Abb. 3.4.18).

Uneaka und Kollege (2005) konnten zeigen, dass die Verzweigungsrate und die Position der Seitentriebe abhängig von Lichtqualität sind. In unverzweigtem Protonema kann durch Bestrahlung für 24 Stunden mit weißem Licht die Bildung von Seitentrieben induziert werden. Für diese Induktion ist wahrscheinlich vor allem blaues Licht verantwortlich (siehe Abb. 4.9.1)

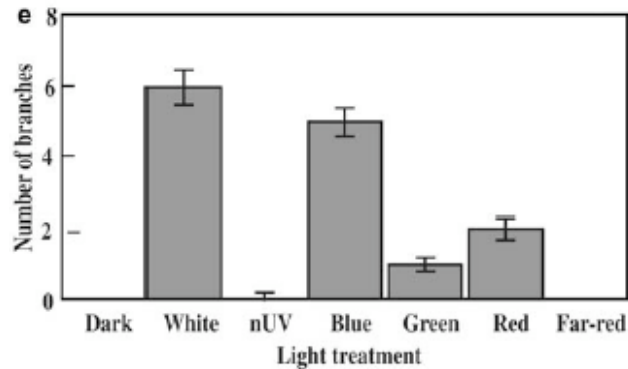


Abb. 4.9.1: Induktion von Seitentrieben an Protonema von *P. patens* in Reaktion auf verschiedene Lichtqualitäten. (Bild aus Uneaka *et al.*, 2005)

Außerdem konnten sie zeigen, dass die Position der Seitentriebe durch blaues Licht beeinflusst wird. In Bezug auf die höhere Verzweigungsrate und die Änderung der Position der Seitentriebe in den Verlustmutanten von *PpSBP1* und *PpSBP4* kann die Vermutung geäußert werden, dass diese beiden Gene vielleicht unter Einfluss von blauem Licht Seitentriebe initiieren und ihre Position bestimmen. Doch um diese Hypothese zu stützen, sollte die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf ihre Reaktion auf verschiedene Lichtqualitäten getestet werden.

Vier SBP-Box Gene aus *A. thaliana* zeigten bei einer Transkriptom-Analyse von in blauem Licht aufgezogene Keimlingen ein Induktion (Jiao *et al.*, 2003). Eine vergleichende Transkriptom-Analyse von Mutanten in *CRY1* (Cryptochrome 1 Photorezeptor) und Wildtyp Keimlingen aus *A. thaliana* zeigte, dass *AtSPL3* in dem Mutanten 3mal mehr exprimiert war, während *AtSPL8* und *AtSPL1* eine geringere Transkriptmenge in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Folta *et al.*, 2003). In *P. patens* wurden Mutanten in *CRY1* untersucht. Dort konnte gezeigt werden, dass *PpCRY1* die Transition von Chloronema zu Caulonema hemmt aber die Bildung von Seitentrieben fördert. Im Gametophoren unterstützt *PpCRY1* das Wachstum von Blättchen während das Wachstum von Stämmchen unterdrückt wird (Imaizumi *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen können die Hypothese stärken, dass *PpSBP1* und *PpSBP4* vielleicht unter dem Einfluss oder im Signalweg von blauem Licht eine Rolle spielen. Insgesamt lassen diese Beobachtungen die Vermutung zu, dass durch eine durch blaues Licht ausgelöste Signalkaskade die Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* inhibiert werden.

Vielleicht wirken die Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* als Repressoren, wenn diese durch CRY zusammen mit blauem Licht inhibiert werden kommt es zur Bildung von Seitentrieben.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung zeigte die Verlustmutante für *PpSBP1* eine reduzierte Koloniegröße. Dies könnte durch eine Unterdrückung von Caulonemazellen zustande kommen, da Caulonemazellen wahrscheinlich vor allem für die Ausbreitung der Kolonie verantwortlich sind (Cove *et al.*, 2006). *PpCRY* hemmt die Transition von Chloronema zu Caulonema (Imaizumi *et al.*, 2002). Es könnte sein, dass eine durch blaues Licht ausgelöste Signalkaskade *PpSBP1* hemmt und erst wenn keine Bestrahlung mit blauem Licht vorhanden ist wird die Hemmung aufgehoben.

Des Weiteren zeigte die Verlustmutanten für *PpSBP1* eine Störung des Gametophoren. Im Vergleich zum Wildtyp waren diese klein und bilden nur wenige Blättchen aus. Es scheint kein Stämmchen gebildet zu werden. Bei der Expressionsanalyse von *PpSBP1* zeigte sich die höchste Expression dieses Gens 44 Tage nach Propagation. Zusammen mit dem beobachteten Phänotyp könnte dies heißen, dass *PpSBP1* bei der Entwicklung des Gametophyten eine Rolle spielt. Und auch hier kann man eine Verknüpfung zu blauem Licht finden. Denn *PpCRY* hemmt die Ausbildung von Stämmchen, während *PpSBP1* dies fördert.

Die Gametophoren der Verlustmutanten für *PpSBP4* zeigten keinen abweichenden Phänotyp vom Wildtyp. Um noch weitere Information über diese SBP-Box Gene zu erhalten müssen die Linien weiter in ihrer Entwicklung beobachtet werden.

Bei der Transformation von Moos-Protoplasten kann es zu einer Erhöhung des Ploidygrades kommen, der Auswirkungen auf den Phänotyp hat (Schween *et al.*, 2005). Diploide *P. patens* zeigen eine reduzierte Koloniegröße und bilden weniger Knospen. Aus diesen entwickeln sich Gametophoren, die sich durch einzellige Auswüchse, gespaltenen und/ oder verdrehten Blattspitzen vom Wildtyp unterscheiden. Ein Sporophyt wird zwar gebildet enthält aber keine Sporen. Tetraploide Moose scheinen fast keine Knospen und Gametophoren zu bilden (Schween *et al.*, 2005).

Diese beschriebenen Phänotypen weichen von denen in dieser Arbeit vorgestellten Phänotypen ab. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Phänotypen nicht durch einen erhöhten Ploidygrad des Mooses zustande kommen.

4.10. Integrierung einiger SBP-Box Gene in den Lebenszyklus von *P.*

patens

Die bisherigen Ergebnisse lassen ein paar Schlüsse auf die Funktion der SBP-Box Gene während der Entwicklung von *P. patens* zu. Aus einer Spore entwickelt sich ein Chloronemafaden, der sich durch Licht und Auxin in einen Caulonemafaden entwickeln kann. Möglicherweise spielen *PpSBP1* und *PpSBP4* während dieses Stadiums eine wichtige Rolle, da der Verlust von beiden Genen zu einer veränderten Seitentriebbildung führt und die Überexpressionslinien für *PpSBP1* und *PpSBP4* in einigen Protonemazellen Missbildungen zeigten.

Die Verlustmutante von *PpSBP1* zeigte außerdem eine reduzierte Koloniegröße, die wahrscheinlich auf weniger Caulonemazellen, als im Wildtyp, zurückzuführen ist.

Das Protonema entwickelt sich weiter. Durch Licht und Cytokinin entwickelt sich aus einer Initialzelle eine Knospe, die den Gametophoren bildet (Ashton *et al.*, 1979, Schumaker und Dietrich, 1997 und 1998). Der Verlust der Funktion von *PpSBP1* führt zu einer Störung in der Bildung bzw. des Wachstums des Gametophoren. Diese Fehlentwicklung kann mehrer Gründe haben. Zum einen könnte die Anlage oder Bildung der Knospe gestört sein. Zum anderen könnte das Auswachsen des Gametophoren gestört sein. *PpSBP1* zeigte während der normalen Entwicklung 44DAP, ein Stadium in dem Gametophoren dominant sind, die höchste Expression (siehe Abb. 3.3.1). Deren Bildung wird in Reaktion auf Cytokinin initiiert. Da *PpSBP1* nach Behandlung mit Cytokinin keine Änderungen der Expression zeigte, ist es unwahrscheinlich, dass dieses Gen bei der Initiierung der Knospen eine Rolle spielt, sondern es wird wahrscheinlich bei dem Auswachsen des Gametophoren benötigt.

Bezüglich der Initiierung der Knospe könnten speziell die Gene *PpSBP3*, und *13* aber auch *PpSBP6* eine wichtige Rolle spielen, da sie nach Behandlung mit Cytokinin eine erhöhte Expression zeigten (siehe 3.3.2).

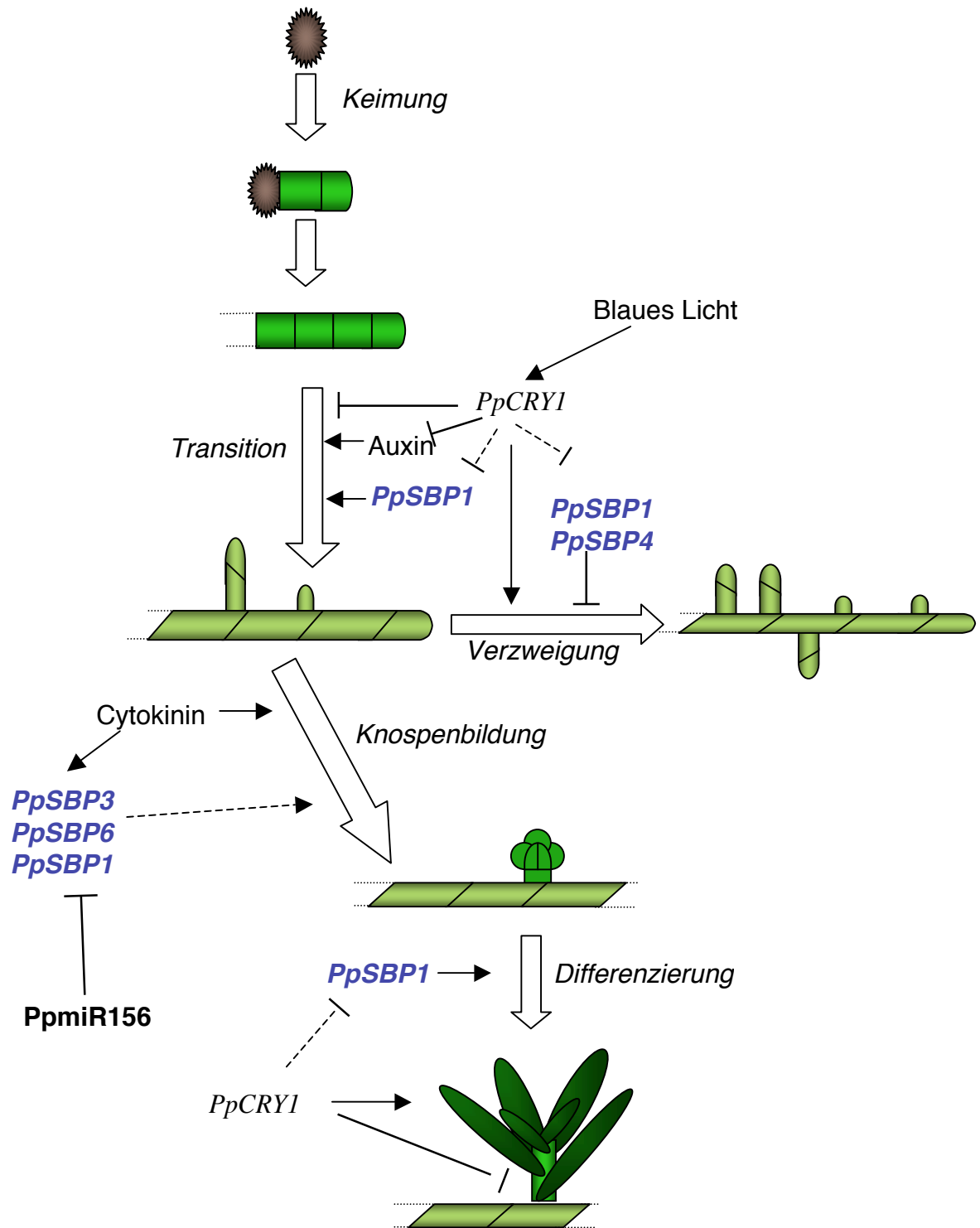


Abb. 4.10.1: Schematische Übersicht des Lebenszyklus und Integration einige SBP-Box Genfunktionen. Aus einer Spore entwickelt sich ein Chloronemafaden. Durch Auxin kommt es zu einer Transition zu einem neuen Zelltyp, dem Caulonema, bei dieser könnte *PpSBP1* eine Rolle spielen. Vielleicht agieren die Gene *PpSBP1* und *PpSBP4* zusammen mit blauem Licht und kontrollieren die Bildung der Seitentriebe. Durch Cytokinin kann sich aus einer Initialzelle eine Knospe entwickeln, die dann zum Gametophoren auswächst. Dieses Auswachsen zum Gametophoren ist vielleicht abhängig von *PpSBP1*. Weiße Pfeile zeigen Entwicklungsprozesse. Schwarze Pfeile zeigen Aktivierung/Förderung, schwarze Striche zeigen Reprimierung. Gestrichelte Pfeile zeigen eine mögliche Rolle der Gene.

4.11 Kann uns *P. patens* einen Hinweis auf die allgemeinen Funktionen der SBP-Box Gene liefern?

Während zu Beginn dieser Doktorarbeit, sieben Jahre nach Entdeckung dieser Genfamilie (Klein *et al.*, 196) nur wenige Mutanten für die SBP-Box Genen phänotypisch beschrieben waren, kam es im Laufe der letzten Jahre regelrecht zu einem Aufschwung in der Erforschung dieser Genfamilie. Mehrere neue Mutanten in den SBP-Box Genen wurden phänotypisch beschrieben.

Eine partielle Verlustmutante von *AtSPL14* zeigte eine höhere Resistenz gegen FumonisinB1 (Stone *et al.*, 2005). FumonisinB1 (FB1) ist ein pilzliches Toxin, das den Sphingolipid Stoffwechsel in Eukaryoten unterbricht (Desai *et al.*, 2002). FB1 induziert in Pflanzen und Tieren programmierten Zelltod (Asai *et al.*, 2000; Tolleson *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996). *AtSPL3*, 4 und 5 fördern den Wechsel der vegetativen zur generativen Phase und haben einen Effekt auf die Blütezeit (Wu und Poethig, 2006). Wang und Kollegen (2005) veröffentlichten, dass ein SBP-Box Gen, *TGAI*, bei der Architektur der Spelze und so bei der Domestikation von Mais eine wichtige Rolle spielt. *CRR1*, copper response regulator, ein SBP-Box Gen aus *Chlamydomonas reinhardtii* aktiviert und reprimiert Gene, die bei der Messung von Kupfer und Sauerstoff eine Rolle spielen (Kropat *et al.*, 2005). In *Solanum lycopersicum* wurde vor kurzem beschrieben, dass ein SBP-Box Gen (*CNR*) eine wichtige Rolle bei der Fruchtreife spielt (Manning *et al.*, 2006).

Die oben beschriebenen Beobachtungen zusammen mit denen in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen lassen nicht leicht Gemeinsamkeiten erkennen. Doch sie geben neue Hinweise um die SBP-box Gene in regulatorische Netzwerke zu integrieren. Vergleichende Studien, wie hier zwischen die Modellsysteme *A. thaliana* und *P. patens*, könnten in Zukunft gemeinsame Nenner in den Funktionen der SBP-Box Gene während der Pflanzenentwicklung aufdecken.

5. Zusammenfassung

SBP-Box Gene bilden eine pflanzenspezifische Genfamilie, die wahrscheinlich für Transkriptionsfaktoren codieren. Außer der DNA-Bindedomäne, genannt SBP-Domäne, zeigen sie wenige konservierte Bereiche (Cardon *et al.*, 1999). In *A. thaliana* gibt es 17 Mitglieder dieser Familie, die *AtSPL*-Gene genannt werden. Zu Beginn dieser Arbeit war über die Funktion der meisten SBP-Box Gene noch sehr wenig bekannt, da nur wenige vom Wildtyp abweichende Phänotypen beschrieben wurden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten 13 Mitglieder dieser Genfamilie in dem Laubmoos *P. patens* identifiziert werden, die *PpSBP1-13* genannt wurden. Anhand einer phylogenetischen Rekonstruktion, die durch einen Vergleich der Exon-Intron Strukturen unterstützt wurde und vorhandener konservierter Bereiche außerhalb der SBP-Domäne konnten zwischen den *PpSBP*- und *AtSPL*-Genen vier Gruppen identifiziert werden. Zwei dieser Gruppen konnten in schon beschriebene Subfamilien eingeordnet werden.

In allen *PpSBP*-Proteinen wurde ein Motiv ähnlich dem AHA-Motiv, eine bekannte Aktivierungsdomäne, gefunden werden. In den *AtSPLs* gibt es nur eine Variante dieses Motiv, AHA-like1 und dies zeigte eine transkriptionelle Aktivierung in Hefe. In den *PpSBP*-Proteinen gibt es drei Varianten von denen nur das AHA-like3 eine klare transkriptionelle Aktivierung in Hefe zeigte.

Die Gene *PpSBP3*, *6* und *13* tragen die gleiche microRNA Zielsequenz für die miR156 wie einige SBP-Box Gene aus Samenpflanzen. Zumindest *PpSBP3* ist ein Zielgen für die PpmiR156 (Arazi *et al.*, 2005). Für die microRNA156 konnten zwei potentiell codierende Loci identifiziert werden, von denen mindestens einer, *PpMIR156a*, funktionell ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, ein *PpMIR15* in Protoplasten aktiv ist und eine *A. thaliana* Zielsequenz erkennen kann.

Im Laufe dieser Arbeit wurde gezeigt werden, dass die Gene *PpSBP3*, *6* und *13* durch eine erhöhte Expression auf Cytokinin reagieren. Cytokinin fördert die Bildung von Knospen und wahrscheinlich spielen diese Gene in dem Prozess eine Rolle.

Durch Gewinn- und Verlustmutanten konnten zum Teil erste Einblicke in eine mögliche Funktion einiger SBP-Box Gene gewonnen werden. Anhand von Veränderungen in dem

Phänotyp der Gewinn- und Verlustmutanten für *PpSBP1* und *PpSBP4* kann die Vermutung geäußert werden, dass *PpSBP1* wahrscheinlich eine Rolle bei der Transition von Chloronema zu Caulonema spielt und bei dem Auswachsen der Gametophoren beteiligt ist. Des Weiteren könnte es sein, dass beiden Gene in der Signalkaskade von blauem Licht eine Rolle spielen und sie sich hemmend auf die Teilung der Zygote auswirken.

Somit kann die Erforschung der SBP-Box Gene an einem weniger komplexen System wie *P. patens* uns zusätzliche Einblicke in die Funktion der Genfamilie geben.

6. English Summary

SBP-box genes encode a family of plant specific putative transcription factors. Beside the conserved DNA-binding domain, the different family members share limited sequence homology (Cardon *et al.*, 1999). In *Arabidopsis thaliana* the SBP box genes are known as *SPL*-genes and form a family with 17 members. At the beginning of this thesis, only a few mutants were described and consequently there was little knowledge about the function of the SBP-box genes.

During this work, I identified 13 members of the SBP box gene family in the moss *P. patens*, named *PpSBP1-13*. On the basis of the phylogenetic reconstruction, supported by the exon-intron structures and conserved domains outside the SBP-domain four groups of SBP-domain proteins could be identified. Two of them belong to previous described subfamilies (Cardon *et al.*, 1999). In all PpSBP proteins a conserved motive, related to the AHA-motive described as an activation domain, was found. In the AtSPLs was only one variant found AHA-like1, which shows a transcriptional activation in yeast. In the PpSBPs I could discriminate three variants, of which only the AHA-like3 variant shows a transcriptional activation in yeast.

The genes *PpSBP3*, *6* and *13* show the same microRNA156 target site as known for several seed plants SBPs. At least *PpSBP3* was shown to be a target for the PpmiR156 (Arazi *et al.*, 2005). In addition, I identified two potential coding loci for the PpmiR156 and could show that at least PpMIR156a is likely to be functional. Furthermore, it was shown that the PpmiR156 can recognize an *A. thaliana* target site and that the *PpMIR156* is active in moss protoplasts.

In the course of this study I could demonstrate that the expression of the genes *PpSBP3*, *6* and *13* raises after application of cytokinin to the growth medium. As cytokinin plays a role in the formation of buds, this suggests that these genes play a role in bud formation.

Through the generation of gain and loss-of function transgenic lines for several of SBP-Box genes I got a first hint about their role in development. Based on changes in the phenotype in the gain- and loss-of function mutants for *PpSBP1* and *PpSBP4*, it is likely that *PpSBP1* play a role in the transition from chloronema to caulonema and in the growth of gametophores. In addition both genes could play a role in blue light signalling. Furthermore *PpSBP1* and *PpSBP4* probably repress division of the zygote. Consequently the investigation of the SBP-box genes in a less complex organism like *P. patens* could provide additional insights into the function of this genfamilie.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AIR	nach Induktion der reproduktiven Phasen
<i>al.</i>	alli
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Ausschläge pro Minute
DAP	Tage nach Propagierung
dCTP	Desoxycytidintiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	Expressed Sequence Tag
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunden
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Mol
MAP	Monate nach Propagierung
min	Minute
ml	Milliliter
MPIZ	Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure

OD	optische Dichte
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pre-miRNA	microRNA Vorstufe
pri-miRNA	primäres Transkript der microRNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8. Nomenklatur

Gen:	Großbuchstaben, kursiv, z.B. <i>PpSBP1</i>
Protein:	Großbuchstaben, z.B. PpSBP1
Mutanten:	Kleinbuchstaben, kursiv, z.B. <i>sbp1</i>

Anderssprachliche, im Deutschen nicht gebräuchliche Begriffe wurden kursiv geschrieben, z.B. *Physcomitrella patens*

9. Literaturverzeichnis

- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, J., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277-279.
- Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P., Baulcombe, D.C. (2005). Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *The Plant Journal* 43, 837-848.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., Ausubel, F.M. (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplast requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12, 1823-1836.
- Ashton, N.W., Grimsley, N.H., Cove, D.J. (1979). Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144, 427-435.
- Aukerman, M.J., Sakai, H. (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *The Plant Cell* 15, 2730-2741.
- Axtell, M.J., Bartel, D.P. (2005). Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants. *The Plant Cell* 17, 1658-1673.
- Bezanilla, M., Pan, A., Quatrano, R.S. (2003). RNA Interference in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 103, 470-474.
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P. (2005). Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *J. Mol Biol.* 352, 585-596.
- Blazquez, M., Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404, 889-892.
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., Rouzé, P. (2006). The small RNA world of plants. *New Phytologist* 171, 451.
- Busch, M.A., Bombilies, K., Weigel, D. (1999). Activation of floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285, 585-587.
- Cai, X., Zhang, Y. (2006) Molecular Evolution of the *Ankyrin* Gene Family. *Mol Biol. Evol.* 23(3), 550-558.
- Cardon, G., Höhmann, S., Klein, J., Nettlesheim, K., Saedler, H., Huijser, P. (1999).

- Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237, 91-104.
- Cardon, G.H., Höhmann, S., Nettesheim, K., Saedler, H., Huijser, P. (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in floral transition. *The Plant Journal* 12, 367-377.
- Cove, D.J. und Knight, C. (1993). The Moss *Physcomitrella patens*, a Model System with Potential for the Study of Plant Reproduction. *The Plant Cell* 5, 1483-1488.
- Cove, D.J., Knight, C., Lamparter, T. (1997). Mosses as model systems. *Trends in plant science*. 2(3), 99-105.
- Cove, D.J., Bezanilla, M., Harrues, P., Quatrano, R. (2006). Mosses as Model System for Study of Metabolism and Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 497-520.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E. (2004) WebLogo: A sequence logo generator, *Genome Research* 14, 1188-1190.
- Decker, E.L., W. Frank, E. Sarnighausen, R. Reski (2006): Moss systems biology en route: Phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* 8, 397-406.
- Desai, K., Sullards, M.C., Allegoog, J., Wang, E., Schmelz, E.M., Hartl, M., Humpf, H.U., Liotta, D.C., Peng, Q., Merrill, A.H. (2002). Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta* 1585, 188-195.
- Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., Chen, A., Nover, L. (2000). The Role of AHA Motifs in the Activator Function of Tomato Heat Stress Transcription Factors HsfA1 and HsfA2. *The Plant Cell* 12, 265-278.
- Folta, K.M., Pontin, M.A., Karlin-Neumann, G., Bottini, R., Spalding, E.P. (2003). Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate role for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. *The Plant Journal*, 36, 203-214.
- Frahm, J.P. (1994). Moose-lebende Fossilien. *BuZ* 24(3), 120-124.
- Hamer, D. (1986). Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- Harries, P.A., Pan, A., Quatrano, R.S. (2005). Actin-Related-Protein2/3 Complex Component ARPC1 is required for proper cell morphogenesis and polarized cell growth in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 17, 2327-2339.
- Henschel, K. (2002) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw) B.S.G. Dissertation Universität Köln.

- Hofmann, A.H., Codon, A.C., Ivascu, C., Russo, V.E.A., Knight, C., Cove, D., Schaefer, D.G., Chakhparonian, M., Zryd, J.P. (1999). A specific member of the *Cab* multigen family can be efficiently targeted and disrupted in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet* 261, 92-99.
- Hohe, A., Reski, R. (2003). A tool for understanding homologous recombination in plants. *Plant Cell Rep.* 21, 1135-1142.
- Horstmann, V., Huether, C.M., Jost, W., Reski, R., Decker, E.L. (2004). Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC Biotechnology* 4:13.
- Huijser, P., Klein, J., Lönnig, W. E., Meijer, H., Saedler, H and Sommer, H. (1992). Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 11, 1239–1249.
- Imaizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M., Wada, M. (2002). Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 14, 373-386.
- Jiao, Y., hongjuan, Y., Ma, L., Sun, N., Yu, H., Liu, T., Gao, Y., Gu, H., Chen, Z., Wada, m., Gerstein, M., Zhao, H., Qu, L.J., Deng, W.X. (2003). A Genome-wide Analysis of Blue-Light Regulation of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression during Seedling Development. *Plant Phys.* 133, 1480-1493.
- Kidner C.A, Martienssen R.A.(2005). The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Dev Biol* 280, 504-517.
- Klein, J., Saedler, H., Huijser, P. (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol. Gen. Genet.* 250, 7-16.
- Koetsier P. A., Schorr J. and Doerfler W. (1993). A Rapid Optimized Protocol for Downward Alkaline Southern Blotting of DNA. *Bio Feedback* 15, 260 – 262
- Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., Bicker, F., Koskull-Döring, P. (2004). Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *The Plant Journal* 39, 98-112.
- Kropat, J., Tootey, S., Birkenbihl, R.P., Depege, N., Huijser, P., Merchant, S. (2005). A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *PNAS* 102, 18730-18735.
- Lamb, R.S., Hill, T.A., Tan, Q.K.-G., Irish, V.F. (2002). Regulation of APETALA3 floral

homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 129, 2079-2086.

Lannenpaa, M., Janonen, I., Holtta-Vuori, M., Gardemeister, M., Porali, I., Sopanen, T. (2004) A new SBP-box gene *BpSPL1* in silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum* 120, 491-500.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., Carrington, J.C. (2002). Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *The Plant Cell* 14, 1605-1619.

Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 105, 793-803.

Long, Z., Wang, S.Y., Melson, N. (1989). Cloning and nucleotide sequence analysis of genes coding for the major chlorophyll-binding protein of the moss *Physcomitrella patens* and the halotolerant algae *Dunaliella salina*. *Gene* 76, 299-312.

Maher, C., Stein, L., Ware, D. (2006) Evolution of *Arabidopsis* microRNA families through duplication events. *Genome Research* 16, 510-519.

Manning, K., Tör, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J., Seymour, G.B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38, 948-952.

Moreno, A., Harper, L.C., Krueger, R.W., Dellaporta, S.L., Freeling, M. (1997) *liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes & Dev.* 11, 616 – 628

Murray, N.E. (1983). Phage lambda and molecular cloning. *LambdaII Monograph* 13, 395-432. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Ng, M., Yanofsky, M.F. (2000). Three ways to learn the ABCs. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 47-52.

Nover, L., Scharf, K.D. (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol. Life Sci.* 53, 80-103.

Nultsch, W. (1991). *Allgemeine Botanik*. Thieme.

Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I., Weigel, D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395, 561-566.

Parizotto, E.A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C., Voinnet, O. (2004). In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes and Dev.* 18, 2237-3342.

Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12, 1484-1495.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G.(2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.

Reinhart B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Dev.* 16, 1616-1626.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.(2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Rensin, S.A. Fritzowsky, D., Lang, D., Reski, R. (2005). Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens*. *BMC Genomics* 6, doi:10.1186/1471-2164-6-43.

Rensing, S.A, Rombauts, S., Van de Peer, Y., Reski, R. (2002). Moss transcriptome and beyond. *Trends in Plant Science* 12, 535-538.

Rhoades, M. W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., Bartel, D.P.(2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 110, 513-520.

Rhoades,R., Reinhart, B., Lim, L ., Burge, C., Bartel, B., Bartel, D. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 110, 513-520

Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. -Z. , Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., Yu, G. -L.(2000). *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290, 2105-2110.

Saidi, Y., Finka, A., Chakhporanian, M., Zryd, J-P., Schaefer, D.G., Goloubinoff,P. (2005). Controlled Expression of Recombinant Proteins in *Physcomitrella patens* by a Conditional Heat-shock Promoter: a Tool for Plant Research and Biotechnology. *Plant Mol. Biol.* 59, 697-711.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Schaefer, D.G. (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 143-150.
- Schaefer, D.G. (2001). Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens* (<http://www2.unil.ch/lpc/docs/pp.htm>).
- Schaefer, D.G., Zryd, J.P. (2001). The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then.
- Schumaker K.S., Dietrich, M.A. (1997). Programmed Changes in Form during Moss Development. *The Plant Cell* 9, 1099-1107.
- Schumaker, K., Dietrich, M.A. (1997). Programmed Changes in Form during Moss Development. *The Plant Cell* 9, 1009-1107.
- Schumaker, K., Dietrich, M.A. Hormone-Induced Signaling During Moss Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 501-523.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Rieter, M., Schommer, C., Schmid, M., Weigel, D. (2005) Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Dev. Cell* 8, 517-527
- Schwechheimer, C., Bvan, M. (1998). The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in plant science* 10, 378-383.
- Schween G., Schulte, J., Reski, R. (2005). Effect of Ploidy Level on Growth, Differentiation, and Morphology in *Physcomitrella patens*. *The Bryologist* 108, 27-35.
- Stone J., Liang, X., Nekl, E.R., Stiers, J.J. (2005). Arabidopsis ATSP14, a plant specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *The Plant Journal* 41, 744-754.
- Theissen G., Münster, T., Henschel, K., (2001). Why don't mosses flower? *New Phytologist* 150, 1-8.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* 15, 5890.
- Tolleson, W.H., Couch, L.H., Melchior, Jr. W.B., Jenkins, G.R., Muskhelishvili, M., Muskhelishvili, L., McGarrity, L.J., Domon, O., Morris, S.M., Howard, P.C. (1999). Fumonisin B1 induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. *Int. J. Oncol.* 14, 833-843.
- Ueoka, H., Wada, M., Kadota, A. (2005). Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch
- Unte U.S., Sorensen, A.M., Pesaresi, P., Gandikota, M., Leister, D., Saedler, H., Huijser, P. (2003). *SPL8*, an SBP-Box Gene That Affects Pollen Sac Development. *The Plant Cell*

15, 1009-1019.

Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., Nielsen, E. (2003) Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Phys.* 131, 1191-1208.

Wagner, D., Sablowski, R.W.M., Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* 285, 582-584.

Wang, W., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Holt, T., Gilchrist, D.G., Dickman, M.B. (1996). Fumonisin and Alternaria alternata lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxin induce apoptosis in monkey kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3461-3465.

Wang, H., Nussbaum-Wagler, T., Li, B., Zhao, Q., Vigouroux, Y., Faller, M., Bomblied, K., Lukens, L., Doebley, J.F. (2005). The origin of naked grains of maize. *Nature* 436, 714-719.

Wu, G., Poethig, R.S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development* 133, 3539-3547.

Xie, K., Wu, C., Xiong, L. (2006). Genomic organization, differential expression and interaction of SPL transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology* 142, 280-293.

Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan S.A., Carrington, J.C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA Genes. *Plant Physiology* 138, 2154-2154.

Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S. (2004). A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. *J Mol Biol.* 337, 49-63

Zhang, Y. (2005). The SBP-Box Gene SPL8 Affects Reproductive Development and Gibberellin Response in Arabidopsis. Dissertation Universität Köln.

Zuker, M., Mathews, D.H. Turner, D.H. (1999). Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers

10. Anhang

Anhang A: Zugangsnummern der SBP-Box Gene und Sequenzen der nicht eingetragenen Sequenzen

Name	Nummer
<i>PpSBP1</i>	AJ968320
<i>PpSBP2</i>	AJ968403
<i>PpSBP3</i>	AJ968318
<i>PpSBP4</i>	AJ968319
<i>PpSBP5</i>	EF016491
<i>PpSBP6</i>	EF016492
<i>PpSBP7</i>	EF016493
<i>PpSBP9</i>	EF016494
<i>PpSBP10</i>	EF016495
<i>PpSBP12</i>	EF016496
<i>PpSBP13</i>	EF016497

Genomische Sequenz von *PpSBP8*:

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
TTGCTAAGTTCAATTTTTGGAGGAACTCTACTGTATGATCCTGAGTTTGTAGAGGCAGAGACCACAGATATCACGCTAAGCTCATATTTAGCCCCAC
AACGATTCAAGTTAAAAAACCTCCTTTGAGATGACATACTAGGACTCAAACTCCCGTCTCTGGTGTCTATAGTGACAGATTTCAGTATAAATCGCGGGT

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
AGCTGGTTCAAAAGCACTTCCAATTGATTTCGGAGATGTTTCGAGTGCAGGGCTACTAAACAGGTAAGGTGATCAATCGGAAGGTTTGGCCGACGCCCT
TCGACCAAGTTTTCTGTGAAGGTTAACTAAGCCTCTACAAGCGCTACTGCCGCATGAGTTTGTCCATTCCACTAGTTAGCCTTCCAACCTCGCGTCCGGGA

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GCTGTTCTGATTGAAGTAATGCAAGAGGTTGACCGAACTTAGCTGTTGTCATCAATCATTAAACGAAAGTCATTATGCTTTGGTCTCATGGTCTAAGAAT
CGACAAGACTAACTTATTACGTTCTCCAACCTGGCTTGAATCGACAACAGTAGTTAGTAATTGCTTTTCAGTAAGTACGAAACCAGAGTACCAGATTCTTA

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
TTTTAACTAAGCTGAATGACGAATCATAGGTCAACCCCTCATGCAATGTAATAGTAGAGATTGATCAGCACATCGACTAATAGGGGAGTTCCGTCACG
AAAATTGGATTTCGACTTACTGCTTAGTATCCAGTTGGGGAGTACGTTACATTATCATCTCTAACTAGTCGTGAGTCTGATTATCCCTCCAAGGCAGTGC

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
TAGGGTAGTTCCTCGACCTCAGGCTTTGAAATTCATGTGTTGCCGTTAGAAAAGCTTCTTGAATGGAAGCTGGTACACGAATGACACGAAATGGAGGCTA
ATCCCATCAAGAAGCTGGAGTCCGAACTTAAAGTACACAACCGCAATCTTTCGGATGAACCTTCTTCGACCATGTGCTTACTGTGCTTTACCTCCGAT

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
TGAATAACTCCCAGCTATTGAGTATTATAGCTTATGTACTGCTGGCATTGTTATCAACAAGCGTAACATGATAGAATAATATGCTCCGATTATGACTTTT
ACTTATTGAGGGTCGATAACTATAAATCGAATACATGACGACCCGTAACAATAGTTGTTTCGATTGTACTATCTTATTATACAGAGCTAATACTGAAAG

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
AAAGAAAGCAGTACCTTGAATTGAACAAAATAAAATGATATTGTTTATTGACATCAGATGAGACATCTCCCTCCACATTTCAAAGTTACAGCGAGTTGC
TTCTTTTCGTCATGGAACCTAACTTGTATTTTTTACTATAACAAGTAACTGTAGTCTACTCTGTAGAGGGAGGTGAAAAGTTCAAATGTCGCTCAACG

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
AGGGACATATCTCGTAGAGAAATTAATGTAGGACTCTGAGAGCAATCTACCCTACTTTGTTGAGACACTTTAGCGTTAAAGCCCGCCAAATTTGCTGTT
TCCCTGTATAGAGCATCTTTAATTACATCCTGAGACTCTCGTTAGATGGCATGGAACAACCTCTGTGAAATCGCAATTTCCGGCGGTTTAAACGACAA

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
TCCGTGTTTACTGTCGTTGCTTGTGATTTAGTTTCGTAACCTGAGCACTTCCAAGTATCTGTATAGACCCGCTCATGTTGTCGGGACGATATTAGAGGA
AGGCACAATGACAGCCACGAACACTAAAATCAAAGCATGAACCTGTGAAAGGTTTATAGACAGTATCTGGCGAGTACAACAGCCCTGCTATAATCTCT

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
AGAATACCAAGGATCCTTTTTTTTTCTTCTGTTCTCGGCTTTCTGTTTCGTTTCAAGAGACAAAGTATAAATTTGTGGAATTTCTGTTATCTTTGAG
TCTTATGGTTCTTAGGAAAAAAGAAAAAGACAAGAGCCGAAAGACAAGCCAAAAGTTCTCTGTTTCAAGTATTGAAACACTTAAAGCAATAGAACTC

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
CTACTCGACATTAGCTGGAGTTGTATGTGCTAGGTTTGTGAATGAGAAATAAATTTTATATGTCGCTGCTCAATTTATTCGTTAAACCGCAGAGGT
GATGAGCTGTAATCGACCTCAACATACAGATCCAACCTACTTACTTTTATTATAAAGTATACACGACGAAGTTAAATAAGCAATTTGGCGTCTCCA

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
GCCTACTACTCAGGCACATCGACTTTAGAGTAATACACGAGCAAAAGTCATCATCCAACCTTAGAGGTGATGGGAACTGATTTAGAATGAATATCGAT
CGGATGATGAGTCCGTTGAGCTGAAATCTATTATGTCCTGTTTTTCAGTAGTAGGTTTGGAAATCTCCACTACCCTTTGACTAAATCTTACTTATAGCTA

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
TCGGATTTGAGAAAAATAATTTTCAAGAACATGAGGGAAAGTAGTGAAGTATCGCGGCTGTCAGGAAAGTATTATGAACGATTTCTACTTAGCTCTATCATC
AGCCTAAACTCTTTTATAAAGTCTGTACTCCCTTCAACCTTATAGCGCCGACAGTCTTTTATAAATCTTGTCTAAAGATGAATCGAGATAGTAG

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
TTGGTCAAAATAATGAGATTATAAACAGTTTGTATGAGAGTCTGATATTTTGGTGCCCTCTTTGGTTTACACTTTGGCCAAACAGAGGTTTCAGGAGAAAAG
AACAGTTTTTACTCTAATATTTGTCAAACCTACGCTCAGACTATAAAACACGGAGAGAAACAAATGTGAAACCGGTTGTCTCAAAGTCTCTTTTC

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
CGTGATTCATCAAGTGCACCTGTGGAATACAAAAAATATTGTGAAAGGCGTGCATTCTCCTCTGATTTTCGAGTTACAAGTGAACAACGCTCTTTTGGC
GCACTAAGTAGTTACGTTGACACCTTATGTTTTTTTAAACACCTTCCGCACGTAAGAGGAGACTAAAGCTCAATGTTCACTCTTGTGAGGAAAAACCG

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
GGTGACCTACATCAATAGTGGGACTGTGAGGGTTTGGGTTTATCATCTTTTGTATGGAGACGAGGTTTCAAAAAAGCGGCCAGCAAACTACACGTTT
CCACTGGATGTAGTTATCACCTGACAGTCCCAAACCAAGTAGTAAAAACTAACCTCTGCTCTCAAGTCTTTTTCGCCGGTCTTTGTATGTGCAAG

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
AACCCATTTACCAATGAAATGGGAGTCTTATTTCCGAATGCAAGTGTCCCAATACATCGCAGTACTGCTCAACAGTTGGTTTGGGGATTGAAATTT
TTGGGTAATGGTTACTTTAACCTCAGGATAAAGCTTACGTTTCAAGGGGTTATGTAGCGTACTGACGAGTTGGTCAACCAACCAACCTTAACTTTAA

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
GCAGCTGTAGTCTTCGCTGAAAGGCTTCTGTTGATTTCAAGCTTCTGAAACAGTGAATTAAGAACGCGTAGCTGCACCCAGCAGCCTGTGCCGATATGT
CGTCGACATCAGAAGCGACTTTCCGAAGACAACATAAAGTTTCAAGGACTTGTCACTTAATCTTGTGCGATCGACGTTGGTCTGCGACACGGCCATACA

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
CATCTACAACGTTGATCATATGAAGTATGCATGATTTCTTGGGGGAGATTGTATTTTGGTGTGCTTATAATTTTGAACATGAAGGACGTAGCCGCC
GTAGATGTTGCAACATAGTATACTTACATGACTTAAAGAACCCCTCTAACATAAGAACGAACACGAATTTAAGAACCTGTACTTCTGTCATCGCGG

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
TAATGAGTGGTACTAGTCCACGTATACCTTAAATATCAAAACCTTGGTTTACCCTTGTGATATTTAAATCTTCTGCTTCAATTCAGGTTGTTGAC
ATTACTACCCTATGATCAGGTGCATATGAATTTATAGTTTGGTAACCAAAATGGTGAACAACATAAAATTTAGAAAAGCAGGTTAAGTCCAACAACCTG

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
GGCTTTGATCAATATCATGTCTCAAGGTTCTTTTTGCGAGAGTTGTAGGAGCGTCTTATTGAAATGAAAACCATGAATAATGTTTACACTCGCAGATG
CCGAAACTAGTTATAGTACAGGAGTTCCAAAGAAAAACGCTCTCAACATCCTCGCAGAATAACTTTACTTTTGGTACTTATTACAATGTGAGCGCTACT

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
TCCGTTAACATGCAAATACATTGTTATTGCAAGCTCTATGTCTAGACTTTCTCAATGGGACTGTGAATTATGTTAGTAATGTAGTTATCCAGCTGATGA
AGGCAATTGTACGTTTATGTAACAATAACGTTTCGAGATACAGGATCTGAAAGAGTTACCCTGACACTTAATACAATCATTACATCAATAGGTCGACTACT

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
CATGATATATTCGATGCTTCTGAAGCGGCACTGGCATTGCAGCTGTAGAGGGCAGCTGTGGTTTTGAAAGCGGGATTGTGGTCATCAAAATGTCTGGCTCA
GTACTATATAAGCTACGAAGACTTCGCCGTGACCGTAACGTCGACATCTCCGCGTGACACCAAAACTTCGCCCTAACACCAGTAGTTTTACAGACCGAGT

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
TCAGTGCCAGTCTTTGTGGTTGTGCCAGGTTTGATCAAGAATATTTACCCTTCAGCTTATTGATAAAAAGGAGGTCCTCTGCTTACCTGAATCTTAAGCT
AGTCACGGTCAGAAACACCAACACGGTCCAAACTAGTTCTTATAAATGGGGAAGTCGAATAACTATTTTCTCCAGAGGACGAATGGACTTAGAATTCGA

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
CACTGGATCGAGGGATCGTTTTGTGCACGGATCGTAACCTTGCATTGACTGTAAAGAGGATACACCAATGCAACCGAATTTACATCCGTCGCTTAGT
GTGACCTAGCTCCCTAGCAAACACGTCCTAGCATTGAACGCTAAGTACTGACATTTCTCCTATGTGGTTACGTTGGCTTAAATGTAGGCAGCGAATCA

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
GAAATAAGCAAGCCCTTTCTTGTGGCTGGCCAACTCTCTTTGCTCCATTTACTTATTCTTCTTTCTTCCACCAGTGCAACCAAGTCTACTGCCGAGAC
CTTTATTGCTTCGGGAAAGAACACCGACCGTTGAGAGAAACGAGGTAATGAATAAGAAGAAAGAGAAGGTTGTCACGTTGGTTCAGATGACGGCTCTG

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
AACTTCCGCATAGTCTGAACTATTTTCGGCGAGGGCAAACTTTGTACCAATGTTTCAACCATTCAAGCACCAGACCATGACAGGATAATGTGACAGTTC
TTGAAGGCGTATCAGGACTTGATAAAAAGCCGCTCCCGTTTGAACAATGGTTACAAGTTGGTAAGTTCGTGGTCTGGTACGCTCATTACACTGTCAAG

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
TTTGCAACTCAGATAACAGATGAGTATTGAAGAGGTGAATGGTGCTCTTGAACCTTGTGCTGTAGTGGACTTGTCTTCTAAGCAAGACTTTCTCTTCAA
AAACGTTGAGTCTATTGTCTACTCATAACTTCTCCACTTACCACGAGAACTTGAACAGCACATCACCTGAACAGGAAGATTGTTCTGAAAGGAGAAGTT

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
TCAAGACGCAGTGGCGACCAACGTAGGTGAATTTAGCCAAACAGCTTCAAGTGTACTTCCCTGCGGTGAAATATATCAAGAAGATTATTGAACCCCGC
AGTCTCTGCGTACCCTGCTTAAATCGGTTTGGTCAAGTTCACATGAAGGGGACGCCACTTTATATAGTTCTTCAATAAATTTGGGGCG

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
TCAAGTCTATTTCCGCAATCGTATTATGCTTCCATCGACATAATTAGGGGTTGGATCTTTCTAAAAAAATTCATGGTCAGTACATCTGAGGGTCAG
AGTTCAGATAAAGCCGTTAGCATAATACGAAGGTAGCTGTATTAATCCCAACCTAGAAAAGATTTTTTTAAGAGTACCAGTCATGTAGACTCCCAGT

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 CGTGATTGGGTGAATCCTCTCACTGGGGGAGTAAACGGGCAACCCGGATCCAGTTGGACTCAACAAGATAGTTTGAACCTTAACATTCCGCTGCACATGT
 GCACTAACCCACTTAGGAGAGTGACCCCTCATTTGCCGTTGGGCTAGGTCAACCTGAGTTGTTCTATCAAACGTTGGAATTGTAAGCGACGTGTACA

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 GATACTTTCCAAAAGTATAATTACATCTACTGTAGATTTGTTATCTGCACAACTTATTCAGCAATTTCTAGAGTGTGTCTACAGGTTATCTTTATTGGC
 CTATGAAAGGGTTTTCATATTAATGTAGATGACATCTAAACAATAGACTGTAGATAAGTCGTTAAAGATCTCACACAGATGTCCAATAGAAAATAAACCC

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 GTGTTCTCTCCCCTGTCACCTCAATCTTGTCTCAACTGTCTCTTGTATCAAGAAGACACTTGTAACTATCTCTCGTGGTATATGGGATGAACCC
 CACAAGAGAGAGGGGACAGTGAAGTTAGAACAGTAGGTTGACAGAGAACAATAGTTCTTCTGTAACATTATGATAGGAAGCACCATATACCTACTTGGG
 M N P>

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 TTCTGCAAAATACCAACGAGCAGCAAGGCGGCCACAGCTGGTCAACAGAGAATTGGGATAATCCAGGTGCAGTCTTACACTTGTATCAGGCGACAAGCCAG
 AAGACGTTTATGGTTGCTCGTCTGTTCCGCGGTGTCGACCAAGTGTCTTAAACCTTATTAGGTCACGTCAGCAATGTGAACATGATCCGCTGTTCCGGTC
 S A N T N E Q Q G G H S W S T E N W D N P G A V V T L D Q A T S Q>

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 TACAGTAGTCCGAATCGTTAGAGTGGAGTGGGATCCAATGATTTGACACAGCATCTTGGTAATGACATAACATCCACTGACGGCGGTGATGGAGATC
 ATGTCATCAGCTTAGCGAATCTCACCTCACCTAGGTTACTAAGAAGCGTGTCTGAGGACCTTACTGTATTGTAGGTTGACTGCCGCCACTACTCTAG
 Y S S A N R L E W E W D P M I L A Q H P G N D I T S T D G G D G D>

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 GAATGAAGAATCAAATATCTACAGGTAATCTTCTGTGCGGTAATGACATAACATTTCTGAAACGTAATTAATTAACCTCGGTTACCAGCTCACAGCTGCCTCT
 CTTACTTCTTAGTTATAGATGTCATGAGAAGACGCCATTACTGTATTGTAAGACTTGCATTAATTAATTGAGCAATGGTCGAGTGTGACGGAGA
 R M K N Q I S T G T L X>

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
 ACGTTTGTATCAGCCACAAGTAAACTGATTTTCAAATTTATTTTGTCCATGCGTTATTTTGCATTTTTGTAGTAACGCTTAAACCTTAGTGGCGGA
 TGCAAAACAATAGTCGGTGTTCATTTTGTACTAAAAGTTTAAATAAAACGAGGTACGCAATAAAACGCTAAAAATCATTGCAGAATTTGGTAATCACGCT

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
 ATGAAGAGACTAGCTGAGGATCATGGTAGTCCACCTGCTCAGATGTTGCTGAGGTTGCTGAGCTTGATACGCTATTCAAACGTTTTACAGGCACAATG
 TACTTCTGATCGACTCCTAGTACCATCAAGGTGGACGAGTCTACAACGACTCCAACGACTCGAACTATGCGATAAGTTTGCAAAATGTCGGTGTTC
 V A E L D T L F K R F T G T M>

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TCTAGTCTCCGAGCTTCTACAATATCAATATGCTGCCGCGCGCCACCATCAACTTTACCCAGAATCACATGGGAATTTACAGTTCTGCAGGGATCC
 AGATCAGAGGCTCGAAGGATGTTATAGTTATACGACGGCGCCGGATGGTAGGTTGAAATGGGCTTAGTGTACCCTTAAATGTCAAGACGTCCTTAGG
 S S L R A S Y N I N M L P A G L P S N F T Q N H M G I Y S S A G I>

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
 GGAGCTTTGGATCTAGACGGATCTGCGCAGCTCCCGGCAACATCAAACTCCACAATGTTCTTGGACGCTGCGCATCCAGGCTTGCAGCCAGGAG
 CCTCGAAACCTAGAGATCTGCCTAGACGCGTCGAGGGCCGTTGTAGTTGGAGGTTTACAAGAACCTGGCAGACCGTAGGTTCCGGAACGTCGGTGCTC
 R S F G S L D G S A Q L P A T S N L H N V L G P S G I P G L A A T S>

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
 TGGTCAGGTTTGAACATGATATTCGACGCTATGATCAACGTCGGCGCGAATTTTGCAGTTGGAATGCACGATCATCAGCTCAAGAGAGAGGAGGTA
 ACCAGCTCCAGAAGCTTACTATAAGCGTCGATACTAGTTGACGCGCGCTTAAAGAAACGTCACCTTACGTTGCTAGTAGTGCAGTTCTCTCCCTCCAT
 G A G L D N D I R S Y D Q R R R E F F A V G M H D H H V K R E E>

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 TGAGACCGTAGATTACATTAATGAGTCTACTTTTAAATAGCCAGTTTCCATGTACC TAAGAATATTTGCCACCTCCACCACAATCAAATTTCTCATGCCA
 ACTCTGGCATCTAATGTAATTACTCAAGATGAAAATTTATCGGTCAAAGGTACATGGATTCTTATAAACGGTGGAGGTTGGTATTAGTTAAGAGTACGGT

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
 GGGTGCATGTCTGCCGATGCAAAATTAACGTACAATGGAAATTTACAGATCGTTCCGAAAGTATCTATATAGCTGTCCATTTGTGTGGAAAGTGATGA
 CCCACGTACAGACAGGCTACGTTAATGACATGTTACCTTATAAATGTCTAGCAAGCTTTCATAGATATATCGACAGGTAACACACTTTCCTACTACT

4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
 TTTTACTTAGTCTGATTAAGAAATTTCCTAAGGAATAAATAATTCAAAAAATTTACAGGAGTCTGGAATGGTAAAAACATACACTCTTTGTGACAGTGAAT
 AAAATGAATCAGCATAATCTTAAAGGATTCCTTATTTATTAAGTTTTTGAATGTCTCAGACCTTACCATTTTGTATGTGGAGAAACACTGTCACCTTA

4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 TTGAAAATCTAACTAAATGTGCATCTTACAAAGGTCAATGATGGACATGCCGAATCGGGCTTAACTCGGTGTGCGAACCTACTTCTCCACCCGAAGAA
 AACTTTTAGATTGAATTTACACGTAGAATGTTCCAGTTACTACCTGTACGGGCTTAGCCCGAATTTGAGCCACACGCTTGGATGAAGAGGTGGCTTCTT
 V N D G H A R I G L N L G V R T Y F S T E E>

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
 ACAGCTACAAATCGGCTTGGAAAGCGACACCGTGCAGGATCACCTGGGTCAATAGCACCATGTGTCAAGCAGAAGGTTGCAAAATTCGATCTTAGCCTGG
 TGTCGATGTTAGCCGAACCTTTCGCTGTGGCAGCTCCTAGTGGACCCAGTTATCGTGGGTACACAGTTCGCTTCCAAAGCTTAAAGCTAGAATCGGACC
 T A T N R L G K R H R A G S P G S I A P M C Q A E G C K F D L S L>

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
 CCAAGCCGTACCATCGTCTCACAAAAGTTTGTAGCTCCACTCAAAGCTCCGAACGTCATAGCTGGGGCCAAAGCTCAAAGGTTTTGTGACGAAATGCAG
 GTTTCCGATGGTAGCAGAGTGTTCAAACACTCGAGGTGAGTTTTGAGGCTTGCAGTATCGACCCCGGTTTGAAGTTTTCAAACACTCGGTTACGTC
 A K P Y H R R H K V C E L H S K A P N V I A G G Q T Q R F C Q Q C S>

6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500
TTCTTCCAACCTCTCAGGTATGTGATCATTGATAAAAATTATAACAAGTTAAACTTGGTCGTCATTGATCGTTACGATCGGCAGAACAAAGATGCCGACA
AAGAAAGTTGAGAGTCCATACACTAGTAAGCTATTTTAAATAATTGTTCAATTTGAAACAGCAGTAACAGCAATGCTAGCCGCTCTTGTCTTACGGCTGT

6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
TTTTTGGAAATGTTTGTGATTCCATCGAGTGGTCATAATTATAAATTGGAAGCTAACTGCACGCAATATTTTACAGGAGCATGATGCGCAGGTTTTCTCGCC
AAAAACCTTACAAACACTAAGGTAGCTCACAGTATTAAGTATTAACCTTTCGATTGACGTGCGTTATAAAGTCTCTGACTACGCGTCCAAAAGAGCGG

6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700
GTC AAGCCAAAATCTAATACCCCGTGACATAGCAAGCCCTGAGTGGATGCTTGGAAAGCATGGCAGGACAGACACCACGCACAGAGTCGAACCATTTTGG
CAGTTCCGGTTTTAGATTATGGGGCACGTATCGTTCCGGACTCACCTACGAACCTTCTGACTCGTCTGTGTGGTGGTGTCTAGCTTGGTAAAACCT

6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800
AACTCCTCTTTGAACAATTTAAGTGGTAATGGTCAGCTAGAGTCTGGACATCCAGTATGTCATTGATTGATTCTCCTAAGGAGGGTGTGGTGGAAAGCA
TTGAGGAGAAACTTGTAAATTTGACCATACCAGTCGATCTCAGACCTGTAGGTCAATACAGTAACCTAACTAAGAGGATTCCTCCACATACCACCTTCGT

6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900
ATCAAGCTGGACAACCGCGACATACTCCAGTAGAATTATGCAGCAGCATAACTGGAGCAGATTCAGGAGGTGACAAACAATAGCCGTGGTGGTGGTAG
TAGTTCCGACTGTTGCGCTGTATGAGGTCATCTAAGTACGTCGTCGATTGTGACTCGTCTAAGTCTCCACTGTTGTTATCGGCACACCACCATC

6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000
CACAGTGGATAGCCCTGATATGAATATCTCGAGCTCCAGGCCCTTGGCACCATATGGCGGTGGTCCACCTTCCATTTATGAATCGCATAACAATCTAATG
GTGTCACCTATCGGGACTATACTTTATAGGACTCGAGGTCGGAACGCTGGTATACC GCCACCAGGTGGAAGGTAATACTTAGCGTATTGTTAGATTAC

7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100
TAAGCAGAAAAATACTAAAACCTATGAACCTTTGGTATATGATGTGCTTCCCGCTTTTTGTTCTGTTTGAATCCTTGC AAAACCTATTGCTTTATGACAAG
ATTCTGCTTTTTATGATTTGGTACTTGA AAAACCTATACTACACGAAGGGCGAAAAACAAGCAAACTTAGGAACGTTTGGATAACGAAAATACTGTTT

7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
TGATTTTTCGGAGCAACTTGATCCGTTCTCAGAGCTTTTTTTGTTGGAAACTGTGTAGATCCTTTGCGGAAACAAAAATTGATTGTTGTTGAATTTATGTA
ACTAAAAGCCTCGTTGAAC TAGGCAAGAAAGTCTCGAAAAAAACAACCTTTGACACATCTAGGAAACGCCCTTTGGTTTTAAACATAACCAACTTAATACAT

7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300
CTCGTCAAAAAGTATATTTGTAGAATTTCTTCTAATCCGATAAGGGCTTCCCTAGACTCCCTTCTAACTATCAGCTGAAAAGTTAAGAAAGGTAATGAT
GAGCAGTTTTCATATAAACATCTTAAAGAAAGATTAGGCTATTTCCGAAGGAGATCTGAGGGAAGAATTGATAGTGCAGCTTCAATCTTCCCATTA

7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400
AGACTAATCATTCAATTTCAATTCGAAGCATGTAAGACTACGATACGCGCATAGTTTTTGTCTACATGATTTTCTTGTGCCACAGATGTGCTTCAAC
TCTGATTAGTAAGTAAAGTAAAGACTTCGTACATTTCTGATGCTATGCGGTATCAAAAACGAGTGTACTAAAAGAACACGGTGTCTACACGAAGTGTG

7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500
TGAAAGAATTAAGTGTACCATCAACGTGCTATACCCCTAAATGAAGTTCAAGTCAATGATGATCTCGTTGTGAAAGATACTGGTCAATGTTGTAAC
ACTTTCTAAATTCACAATGGTAGTTGCACGATATGGGGGATTTACTTCAAGTTCAGTACTTAACTAGAGCAACACTTTCTATGACCAGTATCAACATG

7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600
TTTTTATTTATTTATTTATTTTTCATTCCGACTTTTAAAAAATTCATGAACCTCATGACTGCTTTTTACGAGTATGCAGGCCGTTGGAAATTTCTGTATGA
AAAAATAAATAAATAAATAAAGTAAGGCTGAAAATTTTTTAAGTACTTGGAGTACTGACAGAAAATGCTCATACGTCGCGACCTTAAAGGACATACT

7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700
GACAATGGCGTGACTGCGGACTTTCCAAAAGCGAGTAATCCACCTTCTTACAGGATTGCTATTAAGATAAACTTGAATATTTTTGCAAAATGGTGCAGTGT
CTGTTACCGCACTGACGCCGTAAGGTTTCGCTCATTAGGTGGAAGAAGTCTTACGATAATTTCTATTTGAACGTTATAAAAACGTTTACCACGTGACGA

7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
CTGGTTCACTAGAGATGGAGCACCCGACATTTTTGGTCCCATTGTTGATCAAAAAGCATGTGCACATTATACAAGGGAAGAATTTTGGAACTGTCTGT
GACCAAGTATCTCTACCTCGTGGGCTGTA AAAACAGGGTA AACCATAGTTTTCTGACACGTGTAATATGTTCCCTTTCTAAAACCTTGACAGGACA

7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900
CCCTGTGTTAGATTTCACTCTGAGAGTGCAGTGTGTTCCAAACAAAATACTTGTGTTGAGAACCCTCAACATTTTGATATATATATATATATATACACA
GGGACACAATCTAAAGTCAGGACTCTCACGCATCAACAAGGTTGTTTTATGAACACAACCTTGGCAGTTGTA AAACTATATATATATATATATGTT

7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000
CACATATATATGATTTATAAATACAAGGATACACTCACTTTTACAGGGTCTTGACAAGACTACTGACGGTACCAGACGATCGCTAGTGAACCTCAGT
GTGATATATACATAAATATTTGTTCTATGTGAGTGA AAAATGTTCCCAAGAACTGTTTCTGATGACTGCCATGGTCTGCTAGCGATCACTTGGAGTCA

8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100
ATTAACAGTTCGTAGAAGCCTTTTTCTAGTCGAATATAAAATCAAAACCTTGATTTATTTAATAGACAACTTGTTCAGGCTTTTAAATTTGCATCTGA
TAATTTGCAAGCATCTCGGAAAAAAGATCAGCTTATATTTAGTTTTGGAACATAAATAATATCTGTTTGAACAAGTCCGAAAAATTA AACCTGAGTACT

8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200
CAAAGATGAAGTGGGTTGCTTTGCTTAAAGTCAACTCTGATGTTGGGGCGTTGAGCAGTAACAACCTTCTGAGCGTCCATTTCTGTACAATAGATGTC
GTTTCTACTTCAACCAACAGAAAGAAATCAAGTTGAGACTACAACCCGCAACTCGTCAATTTGGAAGACTCGCAGGATTAAGACATGTTATCTACAGG

8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300
TGATTTCTGTTAGATTTGAGGTTTTGCATACAGCACAAAGTGGATTGTGCTCATGTGAGATATCTAAACATGTAGA ACTCCTAATCAACACACGCTCAA
ACTAAAAGACAATCTAACTCCCAAACGTATGTCGTTTCCACTAACACAGGTACTCTATAGATTTGTACATCTTGGAGTATTGTTGGTGGAGT

8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
AACTCCCCATTATGGGTTTTCAAACATGGCACTTTTGCAAAACCAATAATTAGGATTCAACACTTGATATTTTTAGGATCACTTGAAATATCAAATCC
TTGAAGGGGGTAATACCCAAAAGTTGTACCGTGAACCGTTTTGGTTATTAATCCTAAGTTGTGAACATAAAAAATCCTAGTGAACCTTATAGTTTAGG

8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500
AAAATATATTAATCAAATTTGTACCCATTGATATTACCCCTGACTCAAACATTATTACTACCTGGTATGGAGTCAAAGAGGGAAAGAGCTTAGG
TTTTATATAATTAAGTTTTAAACAATGGGTAACATAATGGGGACTGAGTTTGAATAATGATGGAACCATACCTCAGTTTCTCCCTTCTCAGAAATCC

8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600
CAAGTGACACAATTTTTGATATTTTTGATTTTTGAACTTCTTTTTGATATTTCAATTTTAAAATTATCCACCTTGAAAGGTGGGTGATTTGGTGAAGTAT
GTTCACTGTGTTAAAACTATAAAAACTAAAACTTGAAGAAAACTATAAAGTTAAAATTTAATAGGTGGAACCTTCCACCCTAAACCCTTCATA

8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700
CAAGTAATATTTCAAATATGATAGAATCTTTGAGATCTACACGAGTGAAATATTACCCAAAAGGCCCTTATTTGAAACCTATTGAGTTCACATTT
GTTCAATATAAAGTTTTATACTATCTTATGAACTCTAGAGTAGTGCTCACTTTATAATGGGTTTTCCGGAATAAACTTTGGGATAACTCAAGTGTA

8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800
AGGGTCCATAGTTTTGTAGATTGTGGATTATGGACAAGTCATTGTGTATTATCAATTTAAAGTATGGCAAGGTGATGGATTATGTTGAATACAATTTT
TCCAGGTATCAAACATCTAACACCTAATACCTGTTTCAGTAACACATAATAGTTAATTTTCATACCGTTCCAACCTACCTAATACAACCTATGTTAAAA

8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900
CTTGAATACATGAATGCTAAATATATCTTATCAAGTCTTTTATTAATTTCTAAAATCAAATTAATATTAATATTTGGGATGTATGACTTCTACAATA
GAACATTATGTACTTACGATTTATAGAATAGTTCAGGAAATAATTAAGAAATTTAGTTTTAATTATAATTTATAACCTACATACTGAAGATGTTTT

8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
TTATGAGATTTTTCTAAATTAATCAAGTCACATTAAGAAATCCAAAGTTGAATAGTTTTTTTTAAAATCATCCGAAATTAAGGGAGTTAAATCTTTTTT
AATACTTAAAAAGATTTAATTAGTTCAGTGAATCTTTAGGTTTCAACTATCAAAAAATTTTAGTAGGCTTAATTTCCCTCAATTTAGAAAAA

9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100
ATTAATGAGAATATTTGATGAACTTTTATTTTTATTTAAAATTCATATATATATATAATAAATATTTTTTTGTAAGAAAGATTATGCTTAAT
TAATTAATCTTTATAAACTACTTGAATAAAAAATAAATTTTAAAGTATATATATATATATATTTTATAAAAAAACATTCTTCTAATACGAATTA

9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200
TAGTCAAATACATATTTCAATTTGATAAGCGAAAAGATGTAGGTTTTAAATATTTAATAATTAATATTTACATTGTGTGATATTATTGTTTCATT
ATCAGTTTTAATGTATAAAGTTAACTATTCGCTTTTCTTACATCCAAAAATTTATAAAATTTAATTAATAAATGTAACACACTATAATAACAAAGTAA

9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300
AAAATATTTTATGCAATTAAAAAATAAAATTTTATACTATTAATATATGAAAAAGATTTGATTATTTAAGTATTTGTAATAATAATTTATTTTGA
TTTTATAAAATACGTTAATTTTTTATTTAAAATATGATAATTTATATACTTTTTCTAAACTAATAAATTCATAAACATTATTATTAATAAACTT

9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400
ATGGATTGTATACCTTCAGTTTCAAAGTTGTCAGAACCTTAAATAAGTTATCAATAAAGTTATAATTTTTAAAAATGGATTTTTAATATTATAGTGT
TACCTAACATATGAAAGTCAAAGTTTTCAACAGTTCTTGGAAATTTATCAATAGTTATTTCAATATTAATAAATTTTACCATAAAATTTAATATCACA

9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500
TGTAATATTTTTAAAAAATGAATGAAATAAAATCCTATATATGATCTTAAATTAATTTCTTTTTTTCATATAAAATTTAAAAATATTATATATT
ACATTATAAAAAATTTTTAACTTACTTTATTTTAGGATATATACTAGAAATTTAATTTAAAGAAAAAAGTATATTTAAATTTTTTATAATATATA

9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600
CAAATGTACATAGAAAAGGAACCTTATTTAATTTATAATCTTTAACTAATATTTCTTGCTTAGCTAATAAACTTTCTTAGAGTAGAAGTTATTTTTAGGT
GTTTACATGTATCTTTTCTTGAATAAATTAATATTAAGAAATGATTATAAAGAACGAATCGATTATTTGAAAGAACTCATCTTCAATAAAAAATCCA

9610 9620 9630 9640 9650
TATCATATAAACCCTTATTTTTGTTTTATCAAAAAAAGAAAAAATGATAAAAA
ATAGTATATTATGGAATAAAAAACAAAATAGTTTTTTTTCTTTTTTACTATTTTT

Genomische Sequenz von *PpSBP11*:

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATCCCTGGCTGTAGCGGATTATCCTCGTAATGTCGTTCTTGTTCAGGGAGCTTGAGTTTTTCC
CCCCGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCCGAAGTAGGGACCGACATCGCTAATAGGAGCATTACAGCAAGAACAACGCTCCCTCGAACTCAAAAAGG

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGGAGTGTTTTAGCACACAAGTGTAGAGCGCCCGGACTGTTCTGAATTTTTCCCTTAGATATTGCTGGGGTTCGATCTTCGTAGAATCTATGTTTCGA
CCCTCACAAAATCGTGTTCACATCTCGCGGGCCCTGACAAGACTTAAAAAGGAAGATCTATAACGACCCCAAGCTAGAAGCATCTTAGATACAAAAGCT

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GAAATGCAAATTTTTACCCCTGTTAATTTTACAGTTAGAAGCTTTCACGTGATCGTTGAAGTCCATATTTAGGTTCCGAATGAAATCCTCGTGAAGAT
CCTTTACGTTTAAAAATGGGGACAATTAAATGTCAATCTTGCAAGGTGCACTAGCAACTTCAGGTATAAAATCCAAGCCTTACTTTAGGAGCACTTCTA

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ATGAAATGTGGCGATATCGATCTCAGTTAGTGGTATGGCTGGGTTTGTCTCTATTTTCTTGTACTAATTAGCTACTTTTTTGTAGCTCAA
TACTTTACACCCGCTATAGCTAGAGTCAATCACCATACCGACCCAAATCAAAACAGAGGATAAAAGGAACAATGATTAATCGATGAAAAAATCATCGAGTTT

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CACTTTCGCTGCTTAGGGGTGCTCGCCGCTGTAAGAAAGTGAAGTCTAGCGCTCATAGTTGTTTATTATTTTCGTTTCAAGCGTGAGCGTATTTTGTAG
GTGAAAGCGACGAATCCCCACGGACGGCGACATTTCTTTCACTTGAGATCGCGAGTATCAACAAGTAATAAAAGCCAAAGAGTTCGCACTCGCATAAAATC

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TTTTCTAGGACACAGCTTGGATATTTCAACAGCATTCTACACTGAAAACATGTTAAGGGTTCCGCTTATTAATATCGTTCGATCGGTCATGATACCCCA
AAAAGTCCGTGTGCAACTCATAAAGTTGTCGTAAGATGTGACTTTTGTACAATTTCCAAAGCGAATAATTTATAGCAGCATGCCAGTTACTATGGGT

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TCTTTTTACACAAGGAGATTACTGTTTAGTTTATGCTTCTCGCTTTTCAAAATGTTTGAAGTGGTCTATTCTCTCTTTTTTATTTTTTTTTATTTTTCAGG
AGAAAAATGTGTTCTCTAATGACAAATCAAAATACGAAGACGGAAAAGTTTTACAACTTGACCAGATAAGAGAGAAAAAATAAAAAAATAAAAGTCC

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
TTTTGCTTAAATGCTGATGCTGTTTCGAGTTTCTTTTTAAAATCTTTGGCAATATGTTATCCTGAACATTGATGCAGGGAGTGACGAAGCATAATATGA
AAAACGAATTTACGACTACGACAAGCTCAAAGAGAAAAATTTAAGAAACCGTTATACAATAGGACTTGTAACACGTCCTCAGTCTCGTATTACT

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
AGGGTCATGTATTATGGAGGACTGATTCACAGTGGAGTAGCATACTGTATGATGGAACATATCAGACCTCTACATTCTGCACTTAAACAGGATCGGTT
TCCAGTACATAAATACCTCCGACTAAGTTCACCTCATCGTATGACATACTACCTTGATAGTCTGGAGATGTAAGACGTGAATTGGTCTTAGACCAA

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
CGTCTCAGGATAAAGGATACGGTCGAAGGTGCTATGCAAGAACGAGCTAAACCTACGAGGGATTCATGAAGTGTATGACGGCATATGATGTACATTTACTC
GCAGAGTCTTATCTATGCCAGCTCCACGATACGTTCTTGCTCGATTGGATGCTCCCTAAGTACTTCACTACATGCCGTATACTACATGTAATGAG

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
AATCAAGGTTTATATACTTCTTGAATGTACTGCTATCGTTATTTATCCCTCGGGGCTTTCGCACAGCTGGAGTCTGGAGCCATCACTCGGAAGTGGAA
TTAGTTCAAAATATATGAAGAACGTTTACAATGACGATAGCAATAATAGGAGACCCGAAAGCGTGTGACCTCAGACCTCGGTAGTGAGCTTCCACCTT

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
AATGGGATTTTTCTGTAGAAGGGTACTTTTTGTGAGTACGATTGGGCTGCGCAAGTTGTTTCAGCACTATAAAAAACAGTGGAGGTTCTGTATGTAATCTAAGC
TTACCTTAAAAAGACATCTCCCATGAAAACACTCATGCTAACCCGGACGGTTCAACAAGTCTGTATTTTTGTCACCTCCAGACATACATTAGATTCC

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
TTGCCGTACAGCGAGGACGGCTTGAGGTTGTTTCAAGTAACGGCACCGATCTCATCTATTGACCTGTATTACCCTCAGTTTGGCGAAGTTTGTAGCAAT
AACGGCAGTGTGCTCTCGCCGGAACCTCAACAAGTATTGCGTGGCTAGAGTAGATAAATGGACATAATGGAGGTCAAACGGCTTCAAACATCGTTAA

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
TCTCTCATGAAGTCCATGACAAAAGCAGAGCAGGTGGAATTGAAGTAGTGTCTAGAAGAGATTTATTCTGATTGCGGAGGGTTGATGCTCCAGTTTGCTA
AGAGAGTACTTCAGGTACTGTTTCGTTCTCGTCCACCTTAACCTCATCAGAGTCTTCTCAAATAAGACTAACGCCCTCCCAACTACGAGGTCAAAACGAT

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
TAGGGATAGCTTCTCTTTGGGTTAGACGGTGACTTGGCGAAGGATGCACTCTGAGAAAGCATGGATGCGTGGGTGGTACAGGCTGTTTGTGTCAGA
ATCCCTATCGAAGAGAGAAACCAATCTGCACTGAAACCGCTTCTAACGCTAGGACTTCTTCTGATACCTACGCACCACCATGTCCGACAAAACAGACTC

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
TGGTGTTTTTTTGGTTTTTTCATTCAAGTTGTGATTAAGCTTGTGGTTTTCTTTTCTTAATTGAGGCGCTTGGTTCAATCTACTCCATCAAATTAG
ACCACAAAAAAACCAAAGTAAAGTGTCAACACTAATTTCGAACCCCAAAGAAAAGAAATTAACCTCCGCGGAACCAAGTTAGATGAGGTAGTTTAAATC

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
CCACTGTTCCCTCTCCCTGGAAGTTTAGCATGGTTACATTCACATTCGGACAGGAACGATGTTTATGCTTGTATATGAGTCTTGGTTTTCTTTGGAGCAAGTT
GGTGACAAGGGGAGAGGGGACCTCAAATCGTACCAAGGTGAAGGGCTGTCTTGTACAAATACGAACATATACTCAGAACCAAAGAAAACCTCGTTCAA

1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
AATACTATTCCCTATAGCATCAATCACCTCCATAAGCTCAAATGCTGTTTCGTAAGGCTATCTTCTGTTAGGGTCAAGTCAAAGATGCAGATATTTTTT
TTATGAGTAAGGGATATCGTAGTTAGTGGAGGTATTCGAGGTTACGACGAAGCATTTTCGATAGAAGCAATCCAGTCAAGTTTCTACGCTATAAAAAA

1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870    1880    1890    1900
TCCGTGGATCAGCTGGAGTATGCTTTGTCTTACATGAAGAACCTGCTCATCGATTTGCACTGGTCTGTTATGCTGTTGCACGTTACTGCTTAGACACATC
AGGCACCTAGTCGACCTCATACGAACAGAATGACTTCTTGAAGCAGTAGCTAAACGTGACCAGACAATACGACAACGTGCAATGACGAATCTGTGTAG

1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980    1990    2000
CACCTTTGGGGTGGGGTGGAACTTTTAGTATTGGACCAATCTAGGAGTCCGTGAAGGACACAATGGAGAGAGATATCCGTCAAGCTGGGTGATAGAT
GTGGAAAACCCACCCACTTGAATAACCTGGTTAGACTCTCAGGCACTTCCCTGTGTTACCTCTCTATAGGACAGTTGACCCACATCTGA

```

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CACGCAGCCACATTAGTCCCTCCTCTTTCAACACCAATTCTTTCCAGGTTAGTCTCAGCTCAGAAGGTCTGTTGTTTGCATCCACATAAGTTAAAAA
 GTGCGTCGGTGAATCAGGAGGAGAGAAAAGTTGTGGTTAAGAAAAGTCCAATCAGAGTCGAGCTTCCAGGACAACAAACGTAGGTGATTCAATTTTTT

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TGGCAGCAACTTAACCCATCACACTCTTTCTGAGCGATCGATAGAAAATTTATCTTCAAAAAATGTTTTCTTTGGCAATCTTTCTTTGTGAATATATTTAA
 ACCGTGCTTGAATTGGTAGTGTGAGAAAAGACTCGCTAGCTATCTTTAAATAGAAGTTTTTTACAAAAGAAACCGTTAGAAAAGAAACACTTATATAATT

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 TCTTTATTCCTAGTATCAATTTTGCACGCTTGTGTTCTGTTGAGTAGTTTTTTTTTTCATGGTTCACTAGTCATTGCTGGTACTCTAGTCCGTCATCACATT
 AGAAAATAAGGATCATAGTTAAAAACGTGCGAACGACAAAGACAACCTATCAAAAAAAAAGTACCAAGTCAGTAACGACCATGAGATCAGGACGAGTAGTGTA

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 AATGAACCTTCCGACACTTGAACCTTATCTAGATAAAAACTGTTCAATATGTTGACCATGGTTTACATCTTTTCTTGAAAAAGCTCTTCAAGATGTA

TTACTTGAAAAGGCTGTGAACTTGAGAATAGATCTATTTTTGACAAGTATAACAACCTGGTACCAAAATGTAGAAAAGGAACTTTTTCTGAGAAGTTCTACATT

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 ATTTCACTTAGAGATGTTATATTTTGCAGCTGGTGGAGTGCAGCCATCGATCGCAAAATGTTGAAAACTCGAATGGAGTCTATCTTCCGGCAGATGGGA
 TAAAGTGAATCTCTACAATATAAAACGTGACCACTCACGTCGGTAGCTAGCGTTTTATTACAACCTTTTGAAGCTTACCTGCAGATAGAAAGCCGCTACCT

M L Y F A A G G V Q P S I A N N V E N S N G R L S S A D G >

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 GGTCAATAACTGAAGAAGGATTGAACATCCTTCTACTGGGACATGAAAACGTGGAATTGGGATTCTATACAGTTTGTGCTCAACGTGACGGTGAAA
 CCAGTATTATGACTTCTTCCCTAACTTGTAGGAAGAGTGACCTGTACTTTTGCACCTTAAACCTAAGATATGTCAAAACAACGAGTTGCACGTCACCTT

G H N T E E G I E H P S H W D M K T W N W D S I Q F V A Q R A G E >

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 GAGGGGATGGTTCTTTGAGGAACAAAGAGAACATGGAAATAATGGAAGTGTGGCAATCATAGAGCTTCAAGCAACTGTAGTTACTATAGATAGGCCTTG
 CTCCTTACCAAGAAAACCTCTTGTCTTCTTGTACCTTTATTACCTTCACTACCGTTAGTATCTCGAAGTCGTTGACATCAATGATATCTATCCGGAAC

R G D G S F E E Q R E H G N N G S D G N H R A S A T V V T I D R P C >

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 TTCAGGAGAGCGCGCTCGCAGATCTAATGAGGAAGATGAGAGAGGCAAAATTTTTTGGAAATGGAACCTCCCTCTCCCTCTAAATGACGGGCACGCC
 AAGTCTCTCGCCGACGCTAGATTACTCTTCTACTCTCTCCGTTTTATAAAAAACCTTTACCTTTGAGGGAGAGGGGGAGATTTACTGCTCCCGTGCGG

S G E R R R R S N E E D E R G K Y F L E M E T P S P P L N D G H A >

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 TTTCTGGAGACGATGACTCACAAGAAGCAGTTGGGTCTCTTAGCCTGAAACTTGGAGGAGATGCATATGCCCATATCGAAGAAAACGGAGGTGGCTCTC
 AAAGGACCTCTGCTACTGAGTGTCTTCGTC AACCCAGAGAATCGGACTTTGAACTCTCTACGTATACGGGTATAGCTTCTTTTGCCTCCACCGAGAG

F P G D D D S Q E A V G S L S L K L G G D A Y A H I E E N G G G S >

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GAAATGGCAAGCGAAACCGTTCTTATCACCCAGTATCAAGTCCCATGTGCCAAGTCGATGCTTGAAGGCAGATCTCAGTAAAGCAAAGGATTATTA
 CTTTACCCTTCCGTTTGGCAAGAAGTAGTGGGGTCATAGTTACGGGGTACACGGTTCAGCTACGAACGTTCCGCTAGAGTCAATTTCTTTCTTAATAAT

R N G K R N R S S S P Q Y Q V P M C Q V D A C K A D L S K A K D Y Y >

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 TAGGCGTCAACAAGTTTTGTGAGACGCATTTAAAAGCCACGAAGGCCCCCGTTTTACGCTCATGCAACGTTTTCTGTCAGCAATGCAGCAGGTGAATGACT
 ATCCGACGTGTTCCAAACACTCTGCGTAAGTTTTCCGGTCTTCCGGGGCAAAGTCCGGAGTACGTTGCAAAAGACAGTCTGTTACGTCGTCACCTACTGA

R R H K V C E T H S K A T K A P V S R L M Q R F C Q Q C S X >

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 TAGTTTTAGTCTTTCAGAGTGATCTTTGGTTAGTTTCAAGCATTATATGAGAGATTATCTACGTGAATTTTAAAGCAGAACTTATTAGCTTCCATCATGT
 ATCAAAATCAGAAAGTCTCACTAGAAAACCAATCAAGCTTGTAAATATACTCTAATAGATGCATTTAAAATTTCTGCTTGAATAATCGAAGGTAGTACA

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 TTGTCCAGAATATATTACGAGAGCCATGTAAGCTATTACGGATGATGATCATTAGTGCACAGGGCAGATCAGTCTTTTTTTTTCTGTTTTCTTTGTA
 AACAGGCTTATATAAGTGCTCTCGGTACATTTGATAATGCCTACATCAGTAAGTCACGTGTCCCGTCTAGTCAGAAAAAAAAGACAAAAGAGAACAT

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 CTTCACAATGTCAAATGCTGGAGTAGATGCTTGTGCTTAGCCGTTGTTGGTGACTGCCTTTGTAAGCATCACTATTTTGTGGCATGTCATTTTCCAC
 GAAGTGTACAGTTTACGACCTCATCTACGAACAACCGAATCGGCAACAACCACTGACGGAAACATTCGTAGTGATAAACTACCGTACAGTAAAAGGTC

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 TCAGTTGGTTGCTGCTACATGTGCAGATTCCATCCATTGCAAGATTTGATGAAGGCAACGGAGCTGTCGGAGACGCTTGTGGACATAACAGGCGC
 AGTCAACCAACAGCAGATGTACAGCTTAAAGGTAGTAACGTTCTCAAACACTCTCCGTTTGCCTGACAGCCTCTGCGGAACGACCTGTATTGTCCGCG

R F H P L Q E F D E G K R S C R R R L A G H N R R >

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
AGGAGAAAACTCAACAGATGCAGCGGCTGCCAGGCACTTCTCGTGGCTGAAGAAGAGCGCCTTAGTAAAGGTGGCTCAGGGTTGATTGGAAGCCTCC
TCCTCTTTTTGAGTTGGTCTACGTCCCGACGGTCCGTGAAGAGCACCAGCTTCTTCTCGCGGAATCATTCCACCAGTCCCAACTAACCTTCGGAGG
R R K T Q P D A A A A Q A L L V A E E E R L S K G G S G L I G S L >

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
TCAATATCTTATCTCATCTTATGGGTAAACATCACAAATCACAATGGCCAATTTTCTTTCTTTCTTTTGTATATTTTTGAATGTATTCAAATAGTA
AGTTATAGAATAGAGTAGAATACCCATTTTGTAGTGTTTAGTGTTAACCGGTTAAAAAGAAAGAAAGAAAACAATATAAAAACTTACATAAGTTTATCAT
L N I L S H L M G K T S Q I T I G Q F F F L S F V I F L N >

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
ACTATAACAAATACTTACATGTCTATTTTTGCGCCCTTCTTTAACGGTTTCTCTACGCTCAAATCAATCCTTACTTTAGGGTTTACAGACCTTACGAAAG
TGATATTGTTTATGAATGTACAGATAAAAACGCGGAAGAAATGCCAAAGAGATGCGAGTTTGTAGTTAGGAATGAAATCCCAAAATGTCTGGAATGCTTTCT

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
TCACATGCGCTGGTTTATTGCGCGAGTATGTTGTAGATGTGTAATAATTTGTTAACACCATGATGCAGGAACAATAATTTGGATCGGTTCAATGCCCA
AGGTACGCGACCAATAACGCGCTACATAACATCTACACATTATTAACAATTTGGTACTACGTCCTTGTGATTAAACCTAGCCAAGTTACGGGGT

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
GTTTTGGACAGAGAAGCGCTTCTAAGAAAAAGTTATTACTGCTTCTTGGAGGATATAAATCGAACACACCCCTTGTGGGCTCAGTTGCTAGCAAATCCAC
CAAAACCTGTCTCTTCGCGAAGATTCTTTCAATAATGACGAAGTAACTCCTATATTTAGCTTGGTGTGGAAACACCCGAGTCAACGATCGTTTAGGTG

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
ATCACCTAACCTTCTTACTGGGTCAACAGCCGCAACAGTTGGCAGCTAGTAATGGTCACGTAGCTAATGTGAATGTGGATACACAGCATCTTCTTTCCAG
TAGTGGATTGAAGAAATGACCCAGTTGTCGGCGTTGTCAACCGTCGATCATTACCAGTGCATCGATTACACTTACACCTATGTGTCGTAGAAGAAAGGTC

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
ACTAACTAGTCCATCGCCAGAGGCCCTCCTTCTTATGCTTCAAATAGCCTTGTAGCTCAAATAGCTGCAGCATCAATAACCATTCAAAATAACCTTGGGA
TGATTGATCAGGTAGCGGCTCCCGGAGGAAGAATACGAAGTTTATCGGAACACGAGTTTATCGACGTCGTAGTTATTGGTAAGTTTTATTGGAACCT

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
TCTCAGATGCATGGAGCAAGTGGACTTGGGAACCTCCCCCTAGGGTCCACATGTGGACTAGAGACACAGCTTGCCTCCTCGCACTACTGAAACATGTG
AGAGTCTACGTACCTCGTTCACCTGAACCTTGAAGGGGGATCCCAGGTGTACACCTGATCTCTGTGTCGAACGAGGAGGAGCGTGATGACTTTGTACAC

4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
TTGCACCTACCAGTGCAGGGGTTTCTCACTCTCTTCTTCTTCCAAATGCTAGCGAGAGGCTTCTCTGAAAGACGTCGTGAGACCTACTCCAATGGT
AACGTGGATGGTCACGTCCCCAAAGAGTGAGAGAAGAAAGAGGTTACGATCGCTCTCCGAGAAGAGACTTCTGCGACACTCTGGATGAGGTTACCA

4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
ACCTAAGCCGTTGCCACAGCTGAACTCCGAGCAGTTAGTTCAACATGGTGAGGAGTTTCCCTTTGATGAACATTGTTTTGATGTAATTTGTCTATTCTT
TGGATTCCGGCAACGGTGTGCACTTGAGGCTCGTCAATCAAGTTGTACCCTCCTCAAAGGAAACTACTTGTAAACAAAACACTACATTTAAACAGATAAGAA

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
 GACTTTTCAATAAGTGTCTTCATGATCGGATTCATAGTCAATTTGCTCGTGGTAAAGTAAATTTGAAAAGAGTCCATAATCATAGTAATCATGATTTCTTCAGT
 CTGAAAAGTTATTCACAGAAGTACTAGCCTAAGTATCAGTAAACGAGCACCATTTCATTAACATTTTCTCAGGTATTAGTATCATTAGTACTAAGAAGTCA

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
 CAACCTAATGATATCTTGGTGGTGGTCCACTTCTTACGAAACCACGCCACTATTTGGGTGATTATCCATCTGACGCCGTAGAAATATCCAGGTA
 GTTGATTACTATAGAACCACCAACTGGACCAGGTGAAGAAGTCTTGGTGGCGGTATAAAACCCACTAATAGGTAGACTGCGGCATCTTATAGTCCAT

4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 TACCTGCCGTTCAAAGTTCGTTTCATGCCGATCAAGCGCATGCTGGATCTCCAAACAAAAACATGCCAGCAATGGTCTTGGGCCACAAATATTCATCA
 ATGGACGGCAAGTTTCAAGCAAGTACGGCATAGTTCGCGTACGACCTAGAGGTTGTTTTTTGTACGGTCTTACCAGAAACCCGGATGTTATAAGTTAGT

4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 TTTTCCAATGACGGAAGTGTCTTCCAATATCACCACCTGGGACCGTCTTCTAGTGGTCCGCCAGGAGTGAATCTTCAACTACCTTCCGCCAATCT
 AAAAGGTTGACTGCCTTCCAAACGAAGGTTATAGTGGTTGACACCTGGGGCAGAAGATCAGGAGCGGTCCTCCACTTAGAAGTTGATGGAGAAGCGGTTAGA

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
 AGTGGCAGTTCACAGTCCGGATCAGATGAGCCTTTGCCATCAAGTTCATGCGGAGAGGTTGGCTTTTCTTTCATATACACTCAGACCCACCACGCGT
 TCACCGTCAAGTGTACGGCCTAGTCTACTCGGAAACGGTAGTTCAAGAGTACGCGCTCTCCACCGAAAAGAGAAGTATATGTGAGTCTGGGTGGTGGCGA

5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 TTGTATGTTGAATTCATTTTTAAAAATAAAAAAGTTGATTAGTGTCTTATGCTGGTTTTTATCAATGTCATGGTTTCATGATTTCTTATATGTTTTGT
 AACATACAACCTAAGTAAAAATTTTTTTTTTCAACTAATCACGAAATACGACCAAAAAATAGTTACAGTACCAAAGTACTAAAGAAATATACACAAAAACA

5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200
 TAGCAACTCCGTAATTTGCATTCGCTTTATTTTTGATGTTTTTACTTGTCTTATACATTTAGCCAAGGAACTGGACTCGCCCGATTGCAATGAAGCTATT
 ATCGTTGAGGCATTAACGTAAGCGAAATAAAACTACAAAAATGAACAAGAAATATGATAATCGGTTCTTGACCTGAGCGGCGTAACGTTACTTTCGATAA

5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300
 CGAAAGGAATCCAGAGGAACCTCCCTCAGATCTACGGTTTCAGGTACTCATTGGGTTTGTCTTATTTTATTGACACCGTATTACTGACAGTTGATTTCAA
 GCTTTCCTTAGGTCCTTGAGGGAGATCTAGATGCCAAAGTCCATGAGTAACCCAAACAAGATAAAAAAATCTGGGCATAAATGACGTCAACTAAAGTT

5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 TGACCGAAAGCAGTAGTGTCTTTCAGATGTTTTAGTTGTCTCAAGAAATGATGCAATTCGGGAAAACCAATTAGCAAGTGGTTTTTCAGTACTTACTG
 ACTGGCTTTCTTCTGCTCATCACGAGAAGTCTACAAAATCAACAGAGTCTTTACTACGTAAGCCCTTTTGGTTAATCGTTACCAAAAAGTCATGAATGAC
 L S Q E M M H S G K P I S K W F S V L T>

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500
 CATGTTCCGGATTAGATACTAATTTACCCCTTGTCTCTCAGATTGATTCCTGGTGGCGCATCTTCCCTGACATGGAGAGCTACATTCGGCCTGGATG
 GTACAAGCCCTAATCTATGATTAATGGGGAACAGAGAGTCTAACTAAGGACCAACCGCGTAGAAGGGAGACTGTACCTCTCGATGTAAGCCGGACCTAC
 A C S G L D T N L P L V S Q I D S W L A H L P S D M E S Y I R P G C>

5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600
 TCTTGTCTTACAATATTTGTGTCATGCCAGTGTGGATGGGCAGAGGTGCACCTTTCTAGCTGAAACCGCTTCGTCATCTTAATGTTTTCTATTGTGG
 AGAACAAAGTGTATAAACACAGGTACGGTCAAACACCTACCCTCTCCACGTGAAAAGATCGACTTTGGCGAAGCAGTAGAATTAACAAAAGTAAACACC
 L V L T I F V S M P V C G W A E V H F X>

5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 TGGTTGTGAAACTGATATCTCAGTTTCAGAGTGTGTTCTTATTCGCTCTTGCATTCTGATTCCCTAAGTATAGGATGCTGTCAGCAGTTAGATGCAGATCTG
 ACCAACACTTTGACTATAGAGTCAAAGTCTCACACAAGAATAAGCAGAAACGTAAGACTAAGGATTGAATCCTACGACAGTCTGCAATCTACGCTAGAC

5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800
 CAAGGCAGTGTACAGAGGCTGCTCGATTTACACGAAGGTGATTTTTGGCACAAAGTCCGCATTCTGGTTCAAGTTGAACGTCAAACGGTATTGATAGTTG
 GTTCCGTCACATGCTCCGACGAGCTAAATGTGCTTCCACTAAAAACCGTGTTCACGCGTAAGACCAAGTTCAACTTGCAGTTTCCATAACTATCAAC

5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900
 ATGGTTAGTCTTTTGGCACTTGGCTTTGCATCACCACGGTTACCCATCCAAGCTTTATTAGAGAAAACGGTTTATGTTTCAACATGGAGTTGTCTAGCT
 TACCAATCAAGAAAACGGTGAACGAGAACGTAGTGGTGGCAATGGGTAGGTTGAAATAATCTCTTTGCCAAATACAAGTGTGACCTCAACAGATCGA

5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
 TTAATTTTCAGGGGGTCTCTCTGCAAGTATTTTATTACTTGTACCTAAGTATCACTCTGGTTCTGGATAGGCTACAGTTGTGAATTTTTCAGAAATCAA
 AATTAAGTCCCCACGAGAGAGCTCAGTAAAAATAATGAACATGGATTATAGTGGAGACCAAGACCTATCCGATGCAACACTTAAAAACGCTTATAGTT

6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100
 TTACAGATGTGATGCTCTCATGCAATGTAAGTGCCTTCATGCAAGTCTTGTAAATCTTTGTCGACAGATGGCTAAGATGAATTCGTCAGGATTTAT
 AATGCTACACATACAGGAGTACGTTACATTCACGGAGAGTACGTTCAAGAAATAGAAACAGCTGTCTACCGATTCTACTTAAAGGCACGTCCTAATA

6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200
 TCAGGATAAACGACTGGTGGATTCTGGAGTCTGCTTACATTTCAATCTGTGAGACCCCTTGGTGTGAAGCTGATCAAGCAGCGAACATCACTGTCAAAA
 AGTCTTATTTGCTGACCACCTAAGGACCTCAGCAGGAATGTAAGTTAGACACTCTGGGGAACGACAACCTTCCGACTAGTTCGTCGCTTGTAGTGACAGTTT

6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300
 GGATTCATCTTACACTTCTGACACAAGGTATGGCGTTCCTCATTTTTACCAAGACATTTGGGCTTAGGATGGTATTGTTGAGACTATGAGAGGTTGCTG
 CCTAAGTTAGAATGTGAAGGACTGTGTTCCATACCAGGAGTAAAAATGGTCTGTAACCCGAATCTACCATAACAACCTCTGATACTCTCAACGAC

	BJ595668 BJ593470 BJ609217 BJ584653 BJ170484 BJ172545 BJ607059 BJ611687 BJ201979 BJ186446 BJ978033 BJ596919 BJ969759 BJ948174 BJ599867 BJ598765 BJ166389
<i>PpSBP7</i>	BJ585858
<i>PpSBP11</i>	BJ186965
<i>PpSBP13</i>	BJ160296 BJ968972

Anhang C: Oligunkleotide

Name	Sequenz	Zielsequenz
MR001	GTCTTAACGCTTCATATCTTGCGAG	<i>PpSBP4</i>
MR007	CAAATTGCCGACGTGAACTTGAGGACG	<i>PpSBP3</i>
MR009	TGAGGAGCCCGACGAAGATTTG	<i>PpSBP3</i>
MR014	CCAGTCAACACTTACGCCAAGAG	Phage NM1149
MR015	TCGCCTCCATCAACAAACTTTC	Phage NM1149
MR024	TCCTCACCTTCCTTCGTCACTC	<i>PpSBP3</i>
MR025	GATTCTGAACCAAGGGGTGACG	<i>PpSBP4</i>
MR029	AATCAGGCTGGTAGTAACCCCG	<i>PpSBP1</i>
MR044	AATGGCTACAGAAACAGCGTTC	<i>PpSBP1</i>
MR049	CCGACACGACTTTGTTCCAAGC	<i>PpSBP3</i>
MR057	ATGTTCCCAAATGCGTGC	<i>PpSBP3</i>
MR064	GCTCCAGGTTTCAAATGGGAAC	<i>PpSBP4</i>
MR067	CGCACTTCAAACCTTGTCATCGTTG	<i>PpRAN</i>
MR068	CCTGTGGAAAGTCACCTGCTTC	<i>PpRAN</i>
MR069	ATTGAGATCTCGAACATCTGGTCCTGGCTATT G	<i>PpSBP1</i>
MR070	ATAGGCTCGAGTGGTACTTCCCATCGTTACC G	<i>PpSBP1</i>

MR071	AATTGGTACCATGAACCCTTCTGTAAGTTCTA A	<i>PpSBP1</i>
MR072	TTAGATCTCCACCTGAAGTAGAGGCATTTAG	<i>PpSBP1</i>
MR073	TATAAGATCTTGCATTGTTGACAAAACCTCTG AG	<i>PpSBP4</i>
MR074	TTAAGGTACCATGCACTAATCATGTAAAAG AGAAGAGG	<i>PpSBP4</i>
MR075	TATAGCTCGAGGTCTTAACGCTTCAATATCTT GCGAG	<i>PpSBP4</i>
MR076	TAGTAGATCTTTCATGGTCCAGGGATCACG	<i>PpSBP4</i>
MR110	CCCCTGATCAGGTCGACGGTATCGATAAGC	Zeocin Selektionskassette
MR111	AGAATGATCAGATCCCCGTCACCGGTGTGAG	Zeocin Selektionskassette
MR112	TATCCATGGGTTGCAGTTCAGATCCATTAG	<i>PpSBP2</i>
MR113	TATGAATTCAGCCCTTACATCCAACCTGTAAG	<i>PpSBP2</i>
MR114	TATCCATGGCATTGAAGACCAACCTTGTC	<i>PpSBP3</i>
MR115	TATGAATTCAGCAGCTAAGCTCACTGCACTG	<i>PpSBP3</i>
MR12	ATGGCGATGGCATTGAAGACCAACC	<i>PpSBP3</i>
MR138	GCTGTGATCACCTCTGGTAAGGTTGGGAAG	Hygromycin Selektionskassette
MR139	TCGATGATCATACCCGAAATATAAAACAACCT GT	Hygromycin Selektionskassette
MR146	GCTAGAAGAGGGAGAGATGGTG	<i>AtmiR156b</i>
MR147	GCCAAATTTGAGAGAGAGAGAGAG	<i>AtmiR156b</i>
MR155	GAATTCAAACAGTTTCTACAAACGTG	<i>ZLAB1</i>
MR156	GTAATTCGAGATGCACGATCATGTCAAAGAG	<i>PpSBP4</i>
MR157	TAAGGTACCTTACAAAAGGTTGTGGTTCGAG TC	<i>PpSBP4</i>
MR158	GTTCTCGAGATGAACCCTTCTGCAAGTTC	<i>PpSBP1</i>
MR159	ACGGGTACCTTACTTCCCATCGTTACCGGGG	<i>PpSBP1</i>
MR194	TATTCTGGTGTCTTAGGCGTAG	<i>5S rRNA</i>
MR195	ATCCTGGCGTCGAGCTATTTTC	<i>5S rRNA</i>
MR223	TCTGAATTCCTCAGGTGCCCTCTACTAG	<i>PpSBP3</i>
MR224	ATACCATGGTATGAAAATCTCGCGGAATCAT GGG AATGGGAGGATGAATTCAC	<i>PpSBP3</i>
MR226	TATCCATGGAACCCTTCTGCAAGTTC	<i>PpSBP1</i>
MR227	ACCGAATTCCTGTGCGAGAATCATTGGATC	<i>PpSBP1</i>
MR228	AATCCATGGTGGGACAACAGCCACCCTCAAG AAGGTGGTGGGA GATCAATAAATAGGAGTGAAGTGAACGCTAA CTCATGGCGTTG GGATGAATTCATC	<i>PpSBP2</i>
MR229	ACTGAATTCCTGCGCACTAAGTGCGGCACC	<i>PpSBP2</i>

MR230	TATATCCATGGTTGAATGTCCTTTTACTCATG G	<i>PpSBP2</i>
MR245	CTTCAGATTACATTCTCGGC	<i>PpSBP13</i>
MR252	CAGATTTTGCTGTGGGGCAG	<i>PpSBP5</i>
MR253	ACTATTGAGGCTGGCTTTATCGC	<i>PpSBP5</i>
MR260	GCAGTTATCTATCCAATCTGGTGG	<i>PpSBP13</i>
MR265	TCCCACATCCTCCACCGCCAC	<i>PpmiR156a</i>
MR266	AAGAAAGGCGGACTGTCTCATG	<i>PpmiR156a</i>
MR267	ACTCCCGCTCCCCCGCCAC	<i>PpmiR156b</i>
MR268	GCGGGGTTTGG AACATTTGC	<i>PpmiR156b</i>
MR269	TCCCGTAGAAGAAGACAGCG	<i>PpSBP6</i>
MR274	TATTCAGACAGCCTAAAGCG	<i>PpSBP6</i>
PV038	CTTCCTCGTGCTTTACGGTATC	NPTII Selektionskassette
SH079	GCTTGATCCTCAACTCGAGGTGTCG	<i>PpSBP2</i>
SH143	CATACTCCGTCTCCACCTTCAAAC	<i>PpSBP2</i>
SH176	GAGTGC GCCTGTATGAGACGAAGG	<i>PpSBP1</i>
SH178	CATCGTCGACACAAAGTGTGTGAGC	<i>PpSBP1</i>
SH191	TTGGGAAAGAGACATCGGGCAGG	<i>PpSBP4</i>
w192	CCGCGGCCGCAACATGGTGGAGCACGACACT CTCG	pRT100
w193	ATGCGGCCGCGTCACTGGATTTTGGTTTTAGG AATTAG	pRT100
w282	CCATCGGCGCAGCTATTTACCCGC	Hygromycin Selektionskassette
w283	TGTCCTGACGGACAATGGCCGC	Hygromycin Selektionskassette
w349	AGATTTTCTTCTTGTCATTGAGTCG	Zeocin Selektionskassette
w355	CCAGACACGAGACGACTAAACCTGG	Zeocin Selektionskassette

Anhang D: Potentielle Codierende Loci für PpmiR156

Die miRNA wurde mit rot markiert. Die blaue Sequenz zeigt die gegenläufige Basenpaarung.

PpMIR156a:

AAGAGAGAGAAAAATCAGCTGGTATTGTAAGACGGAACGTGAGAACAGTC
AAACATAAATTCAGATTTCTAGAACACGCTATATCATTAAGTTTAGAGCTAG
ATGGTATACTACCTAGGTTTAATAACCTTACCAAGTTCAGTGCAGCACTGATA
ACCGCAAAAAGAGTTGGAAAATAATACCAGTTCATAAATTGCTTCCAAGGG
GAAGAAGTCCAGAATATTTAATCATTCGAAGAACGATTTACATGGACAGTAT
GCAGTCAGGATTTATTCGAAACACACATATATATATACGCATCATTTAAACTT

AGGGTCAATGAGAGCCAGGACTCCGATGTCTGCTAACATGGATGCAGACATT
GTGTTGCAAGAGCCGACTGATGTTTTAAGATTGGAACATGTAATATGAAGCA
ACTCGCGTTTTTATATTATCAGATGCAGTCGCAATCCTTGCAAGGCTCTTTTTA
GTGGTTAAATTGAGTTTGTCTATTCCAGTAGTATCAAAGAACTATAACTTACT
TAGAATTACATGTCAACATTTCTGCGGATGATTTACAAGTGACACAGGGTTCC
AAAGTTAGCCAATTAATTATGCCAGGTGACCGCAGACATGAAGCAATATTGA
TGCCTGACGGAATACAGTACATAGCTAGTTACAAGAGCTTTCTTTGATAGGCT
TGATTGATTGATTCCATCTACGATATTCAATATGAGGTCTAATAAAAGAAGAT
CCCAAATTTACACTTTTCGATTTGGTAGCGAAATTTGGCGTGCTCATGTGATAA
ATTCATGAATCCAACACGGGATCTATAGAGACCATCTACATACACTGTGAGT
GACAGTTTCGAGTTCGTATCAATACATGTATTGACCACTCAACTCATGTAGGC
TTCATTCCAGTGACTGAATTCGGTTACACCCTTGAAACAGTTTCATATCCTTG
AACTATGCGCATCATGATCTTACAAGAACCGACCTCCAGTGTGCTCACTAGCT
TCATGCTTAGCAGAAATAACTTTGCCAACACAGTCATCAAATGCACAAATAA
CTATGCCTTGATCATTTCATGACAGACGAAAGACAAAAGTGATGTTTCGTAAT
AACACCTTCAGTGAACAATAAAGTTGTCTTTCATACACCGCATTACTGAGTCG
AAAAATGCTGTTTACCAGTCTCGAGCGAGCTCCAATTGATGAATTCGTCCAGT
TTGATGAGGTCAAATCATTTACTTCAATGATTGAGAGAAAATGAGCATGAA
ATCATGAGTATTTAATCCAGAAGTCAAGTTCACAAGCTCACGATCACCACAA
GATTATTTCAAACCTGTTGATTACATTGAATCTATGAAACGAAAGTGACTCCT
GTCATCAACACAGGGAAAAGAAGATAAGCTAACAACGTATTACGTACCCAC
TTGGCACTGATCTGCATTTCAGAACAGAAGAATCCTCTTTGGAATCGAACAG
GACATTTAAAGAAGAAACCAGGACACAAGAATTCGATTTCTCGGAGAGATTT
GAAAAAAAAGAACTCAAAGACGCTCAGTACTTCAAATAGTATGGTTTGAATT
TCAATCAGCCAAATCTTTTACAAATCTGAAAGGTATTCAATGGAAATCGTATC
TACGTGCACTGGAAAAGCATGGACTCTATCTGACCGAATTCACACCTACCAC
TTGCTTAGGAACAAGAGCACATCTCTGAAATGAACTGGTTGAAGTTGTGCAC
GAGTAAACTCCGTGTGTGCAAGCCTGGCATTCTATAACCACACTCGATGCAAG
GTTAATACTTATTAGAATAATATTAGATGGCCTGCATGTGTACAATCAACGGA
CTTGGCTGCAATTTCAAACAATGCACTCACTGCAAGCTTGAAGTGATATCCCG
AGAGAAAATATTGACAACAGTAAACTAAAATCATGGCAACTTTTTTAAAAA
CATCGCAACTGTTAGAAGAATCGATAGCTACTGCAAATCGTACTAAAACCGC
AGAAATAAGTGGAGGTAGTCTTCAAATCCTGCCTATGTCTCCACGTTCTCTTA
GTAAAAACCTCCGAAGGTTTACCAGTTTGCAGATCAAACAGGTGAAAAGACA
CTCGTAATGAACCTTGTATGAGATGTGATCGGTTGCAAACAAGCGAAAAGT
ACGGTTACAGGGAGTAGCGAACTATTTATGTATGCTTCGACACACTTGCGGTC
TCTAATATTAATACCGGTTCTGTAAACAATTCTTAAATTCAGCTTACAGTCGC
AACTTCATGTTCTGCGCAAACACACACTCCTTCCTGTGAGCTTCCTAGAGGT
CGAGCAAGTTGATAAGGGGAGATTATCCCTTGCTAGGTTGTAGCATAGAATC
TTCTATGTTGCAGGTGAACGTTCCAGACGCTTGTTGTATAAAGGCATTCTTGT
AGCTTCACATCCTCACAACGGTTCATTTCGACTCACTGAGATCATAGTGACGA
AATCCGTAGTTACCCGAACCTCAGAGTTTGTATGGGAACTGCACAGAGGAATT
ATACTTGATTTTTCAAATCAGGTTTGCATAAGTTTTTCGTAAACTGAAAGGATG
GCTAAGGAGGAATGTTCTTCTGCAAGCAGTTAAATGAATATCCGCGTCTCCTC
TCATGACAATACTCCAAGGGAAGTGACCTACAATATGTGAGATCGGTTTCTTT
CTTACTGATGTTGGACAGAACAATCCACACCAGAATCCACGGCACGCCAAG

TCACTCCAAAGTTCACTGAATATCTGTTTCACTAGACATCTGTTTCCCTTCAG
ATCCACTAACAAGAGAACGACGATGTCCAAACGCTTTCGGTTATGATTATTGT
AAGAATGGCACACATCAAAGAAGCAGCATTATACAACAAGCAACTACAAAT
CTTTCACAGGATGCGCAATCTCTAATGAAGACATGTATCTTGACCAAGTCAG
GAACATGGCAAACGGAGGCGAATAGTGAACAAAAGCTGGCTACGAGCAT
AAAATCTGTTTCGTAACCAATATTGGCTACATGCAAACACTTGCAACAGATCG
GAACATGAATTGTAGAATACGGTGCCTTACTACGAAGCAACATGCTTTCCTTG
AAAGTATATAAGAACGTATAAATTGAGGGGCTCTCAAGTGCCGAAGGTCG
GTAATTTTTTCACTCGACGACATAGTGTCTCCTGCTCTCAACTCACACTACAT
ACTTCATCAACTGCGAAGTCACAGCACCTGTTTACGCCACAAGTACAACATGG
ATAAGCTCTAGTGCAGTGAGGAACGAACTTGCAATCCAATCGTTGTGCGGGA
CTTATGGCACATGAACAGATTCCATGTGCATCCCATCTCAAGTTCAAGAAAT
GCCGACAGACCAATCTCAAGCGTGTGAATCGTATTCTCAAAGAAAGGATGTA
ATAAAACGAGAAGGTATTCCTCTGTTGCACTGCGTGTGGACAATGTCACCAA
TGCACAAGTTGACCTCCGGCTCTTGGAGCACAGAATCTATGAAGCGGGAGTG
AGGCACGGAACATTGATCTTGGGCGATGAATTTCTGCACACTGACGTTAGC
CCAAGAAGGAAGCATGCATCCAACGGGAGCACATCACACTGACCATTTGCTG
CGCTTGTGCTTCAGGCAGTCGCACGCACGTTCTGGGACAACAATTACGCAT
GATGTGCCGGCGCTGTATTGCCGTCGTATCCCTTTGGCTTGATACTTGCCAGA
AGCACTGCAAGCCAATTCATCGTCACAAGGGCACTCTACCTTCGTACATGC
ATCGTCAGAATCGACGCCACTCACACTCACCTCACGCTGGCTTTCTCTGTT
TTTTCCAACCTCTCCGAGCGTCAAAGGAGAGGTGCGACAGGAAGAGAGTGAG
CACACATGGGCAAGTACTTCCTCATGTACATGCTCAGCTGTGCTCACTCTCT
TCTGTCACTCCACATCCTCCACCGCCACTCTACGTGCTGACGCACCCCCAC
CTCAACCTACCATAACCAACTCACAATCATGGTGGCCAAGGGACCTCAAACCC
CGCCCCCGCCAAACCCCGACCCTTGCTTCACCCCGCGACTACTACGCTGTCA
TGAGACAGTCCGCCTTTCTTTCTTTCGAACCCCGCCACTGACCTCCCGCCAT
CATTACCTGGCCATGCTGCTGCTGATGCCGCTCCTCCCCCGGGCCAGACCG
TAGACGGCCAACATACAGCAATTCCGCAGATGTGCACGATCCCAGACAAAGG
TAGCCCAAACGCACAAAGGCAGGCTCGACTCACATACGCTGGAAAAGAG
TATCATCGCCACGCACTTATACCCTCTCATTCTACTCGGAGCTGACGGCCCTA
AAGATAGATAGCAAGGGCATTTCATCCGCCAACACTCGAGCCAGCCTTCTTTT
CCCCCTCGGCGGCAGAGCAGCAGACGCGTGTCTTTCCCCTTCGGCCTATTGCC
CGACCCTGGCGCAGTAATATTAAGGCCCTGTATTGTAGCACTGGGAACTCCA
CTTTCCCTCTCTCCCTCCCTCCCTCCTTCTGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGG
CACCTCCCCCATTTCCACTTCTGCCAGCTACATATCCCACCCAATATATTCA
TTTATATTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TTATTATCATTCTTCGTATATTTGTGTGTACAAGATAAAAAGTCTATTCTGTGA
CATCTACGTGTTTTCTCATCAATATCAGTTTACAACACTGCTAAAAATTTCG
GAGGAAATGTTTTCTGAAATTTACTTAACTATAGCTATTCTGGAAATTTAGTT
ATGCTGATGTTATTATGTTAGCAGCTTCTTGTGCATATTATGCATATTCATTT
TTAGGAAACTGAATTGTATTACTGGAATGGGCAACCATGTGGAGGGGACATC
ATGAGTTCTAATTGTTGGCTTACCTATCCTAATGGGTTCTATTTAGTTCAAGTGT
TGCTTATTATTTTTTGCATGTGACAAACTATTCTGGCAAATGTAATATAAA
GTGAAATGTATATTCACTATTTACATATGCATATTTACTTGAAATTGCAATTG
ATATTTATACAAGATAAGAAATATTTTGCATCACTTTTGAGTAGCAAAGGGG

AGTACAAGTAAAGTGCTATCAAGTATTGTTAAAATTGGATGATTTCTACAATC
TAGAAACATCATTGTTTCAAATTGTTAATACATGTGCATCATTTTTTATGAA
AAATCAAGTATTTCTTTCATCAAAGTCACTAAGATTTTGAAGGATTTTACAAC
CTCATAAACAATTTTACCACATTAACCTTATCTACACAAAATACAAAAAATATT
GAAGAGCAAATGCACACTCAACACCAATATGGAGTAAGAATAGACTCAAAT
GTGTGAAAACATGGATGATTTTCTTGATCTTTCATACATCATCCATCCAAAGG
CTAGTGTAGAAATGGAAGAATGTGAAGACTCAAGGACAATGGAGCTTGAT
AGGATGTGAAGCACTACAATCTATTCATCTATGCTATACATATTTTCATATAGA
ACAAAAAACAACAAAAAACAACATTGATATATATATATATATATATATATCC
AAGAATGATAAAGCAACCCATATTAAGCTTCTCATTCTTACAAAATCATCAT
TACATTTTGTATGCCTTGTCTTGATTCTTACCATGCCTTGTCTTGATTCTACC
ATATCTTGTATCCGTAACCTTCTTATTCTTCAATCAATCCTCTCTGACCCT
ATTTACAACCTTCTTTCATACACAATTAAGTTTTTCCACCCAAGCTAAAAGTT
GAATCTTAGAGCTCTAAGCTATGTACTTGCCTTGCTCTTCAATGTCACAC
ATCTCAACAACACGGATCCAATCATATTTTCAACAAGCTTGAAAAGCTGGATA
TAGGAATATATCTTAGACAAGTTGTAAGTCAACTATAATCAAGACTTTATTGAC
GACTACTTAAAATATGGAGCTGATATAAACACATTGCTATTATTAATGGCAA
CATGGATATGATGAGTTTTTTAGTACCCCAAAGGACAAACCTTTATATTAAGC
TTGGTGATAAGACTACCCTTATATCATCTTATCAAAAAGCTTGGAGATAAGT
ATATTGATGGTTTTGTAAGGATGGATTTTTTTACTAAAAAATTAACTTTTTTA
TTATTTTCATGTATATATATATATATATATATATAATTGGCGCTCTGATT
TCTTTGATTTTGGCCAAATTATACAAAATTCTCTTGTTGCTTCAAGACAAGG
AAGCCAAATTCGGTTCTAGAACTCACAAGTTGAAGTTACCTCCTCCTATCAA
TACATCATCTTCTTCTTAGGTGTCGCTAGCTCTACTCCATAAGCCTCCCTCT
TCACCATCTTTTTTCTTCTACACATTGCATCTCCATCTACTATCATCTTCGCTG
CTCTAAAAAATACTCTCTATGCCTCAATAGGTGCTTCAAATCCCACCTCCTT
CTACAATTCACACTTTATGTAATCACAAGTGCATCTTTTTTGGCAAAGTAGAC
CAATTCTAACATATCATATACTACACCATTAAGAAATTTTCTATCCAACAT
TCTTTAGTGTTTCTTAAAGACAACTTGATTAATAAGTTTCTGCATCAATCTTC
TCTGTTTAAAAATTATATCTTCAAAGTATTTGTGACTTCATCCATTGACAAA
AATTCTCCTCACTAAATAAAGCCTTAACTTTGAAAGTTACAATCATATCATT
TCTATTGTGATTAATTTCTTTTGCATACGTACATATATGCATATATATATATA
TATATATATATTATTAATTTATCTAAGTATTTATTAATTTGATCCACTCATT
TAACCATTATCAAATAATTTTCTACAATTAGATCTATACTAGTCAAATCAAT
GAAAATTGATTGGATCTTCAACCAATGATGATGGATAGATTAATTTAGTAC
ATATCTAGATCAATTTAATAATTATATATATATGTATATATAGAAAATTTACA
AGAATAAAAAAATATGACATTTTGTACAATAAATTTTACTTGAAGAGAA
TAATTAAGGTGGATAGTCTTATGAAATGTAATATGTTACTAATGAATACATA
CGTGCAAATAACAAAATGAAATTGATGTTGATAGATGTAGCACTAGTGTTA
AGATTAATAATGTAATAATAAATAATTATAATAATATATATATTTTTTCATATTAT
TTTTATTCTTCAGAGAAAAAAGTTATATATTTGAAAATAATAATAATAA
TAATAATATCATCATCATCATCAGATATAACAGCTTATAGAATATGTGTT
TGTCATGATTTTTTTTTATAAGACAAATGAAGCTATTATGGTATTTTACAAA
CTTTTTATTCCATAAAAAAAGTATGTTAATTTAAATATTTTAGACCAATAAAT
TAAGTAGGACTAATCATCAATTTCTTCTTAGAAATAATTCATAAAGAATCT
TAATACAAGGACATTTTATCAAACAATGTCTATTAGATGATAAATCATATA

AAAGAAAAAAAAATCAATAAAAAGGGTATATATAAATATATATATATATATATAT
ATATATGCATACACTTTGCATATTAAGACATTGGTGCATATCTTTTTTTAT
ACATATAATTATTTATGAGTTCATTCAAAAATATTATGCATATTTTGCATCATT
TAAGTGTTCATAATAAGAAAAGTAGAAAAGACACTCAATAAGTAAGTTTGA
TGCTCATAGCCACATTCTATGAGCTTTGACTATTTTTTGTGTTATCTAGAGCTG
CATTCTATGAGCTTTAATTATATTAAGGGGATTTAACTTAAGGTTTATGGAT
GATATTTCACTTGTGATGATATCTCCAGAATTATATAATATTTTGAATATC
ACTTGATACTTCAAATCACCCACCTTACAAAGTAGATGATTTTAAAATCCAA
ATATCAAAGAGGGACCGGTGAAATATCAAAAACCTCCTTAATTGCCTTAAT
TATCTTTTCTTTGCCTTAAGTGCCTGACTTTTTAAATTACCAAATATCAAGT
GATACT

PpMIR156b:

TACTACGACGTTCAAGGGTACTGCACTGTCTTCCGGGAATGAAGGCGAGGGT
ACGGCATAACAGTTCTTGAACGACTCCATACAAAATTCCTTCACAAATACGTCT
AGAACATCAAGTTCAAGCGATTGAAATTGGCAGCTTGCTAGTTGAAACATGA
ACTGTTAGATGTTTCATGTTTCAGCGGTTAAGACGTTTTGTACATGCAAACT
TGTCGACAATGATTGACATGTCATCGACGATCTTTGGGTAAGTGAATGCAGCT
CCTGCATGCAACTTTACAGGGATGAGACGAAGGATCATTTTAAAATCAGACA
CGCCATTGAAGATAAGGAGATAATCTATTAGAGACTTCTCACGATGTGACGA
AGTTTATTCTGCAGCACCAATACGTACTGTAATTCTTCCCGAATTTACATCAC
AAAACACACATGCTTTCTTGTGCATTCCTTAAAAGTAGGGTGTAAAGGGTGT
AACCTGACAATAATTCCTGTCAACTATAGGTCTCTCTTGCTGCCAGAAAAACA
CTCCAGATGACTGATTCGAGAACATCTACGTCTTAGATTCGCAGAGAGAGAG
TATTGATTATTCGATTCTCTGTTTTTCAGTTTGAGACTCCTTGACCAACGCCGAA
GTCAGAGTACCGATGTAGCAAACATTAATCTAGACGCCGTCCGTTCCAGGTG
AATCTGCGTGCCTCCTGTACATATGAAGATGACATGTGAAGGCAAGAGTAAG
CTTCAAACCATGAGGTCCGAATCACACAGTGAAGCTTGGCTTTAACGGTCCG
TGAAATACGAATTGATAAAAAGCTGCTCTACAATCTCACAACATGTTCAATCA
ACGACTGACTCACCGTTCTGTCTGTTTGGTCACACAGATACTAAGATGATTCG
CTGGTTCCGGCGAGGGACAAGCTGGAACAAGAATCTCGATTTGCACAGGTTTT
TTACATGGCGAATGAGTAGAATGCACATGAACCTCAACTCCAGTTATAGAAA
TGCTGATCGGATCATTCGTGTAGATACTAATCGTGTTCCTAACACAACAGAT
CGCCGATCGCCGAACAGGCGCAGGACGTTTCTCACTTGTTCGCGGTTGTATGA
TGTCATCATTGTACAGGTTACCTGAGGCCAACAAATCGGTGATGTTGCACCCT
TGAAAGTTCAGCAGCATCGAAAGACACATTTCCGTAATAATCTCGACGATAT
CGTGCGACCTAGAGCTGCGTGGCAAACGTAACATCCCAAGAAGTAAGCATG
AAGCAAACCAGGCAGTGCACCGACCATCTCTGCGATAGCTTTTGCTGCAGT
CGATCACGCGCACGTTCTCCAGCAACCGTTACACATCATGTGCCGGCACTGT
GTATTGATGTTACCCGTCACCTTCATACTTGTACATATGCTGCGCACGATTTT
TTAATCACACTTGTAACATTCACACCTACTTATCACCATCAACTTCCCCCAC
ATGCTCACACACCCTTCACCTCCCCTCCTCCTCCCTCACACACCCCCCTCCC
ACCCTCTCATCAAATGACGTCACAACGACGAGGGAGAGGCGCGACATGA
AGAGAGTGAGCACACTTGAGCAAGTACGTTATCCTCGTACAGGCGCAACCG
TGCTCACTCTCTTCTGTCACTCCCGCTCCCCCGCCACACTTGAATAGTGT
CTGCACTCGAGCCTCACCTTCCACATCCCCACACGAGCCCGCGACGCGCAC

CACCCGCCCAACCCCAAACCCCGCCCCGCCCCGCCCCCTTCCAACCGGCC
CGCGCAAATGTTCCAAACCCCGCCACTATGGCTTCCTCCCGTCCTTATACTGC
CCCCGCCGCAACTCCCATCACTTGCCATCAGCTGTCCATGCTCCTCCAGCGC
CAGAGGCCGTACTCTGGCAACATACAGCAATTCGCATCACATCCCCACAATG
CCAAACAAAGTGGCAGGCCGTGAGGGGTCACAGCCCCACGCTGCACCATTCG
ATATCGGCATCCCCGGGCTCGGTGTTCTGGTACATTACTTACTGCTCTTCCTTC
CCCCACACTCGCTCCTCCTAAATATAGAAGTGGGGCTGAGGGGGGGGGGGGA
GGTGTGTGTAACACCCCTTCCTTTTCGTGTTCCGTGTTATTCCCCTGTGACCC
CCTTCGCCATTCACTTCCGTCACTCTCCATGGCATGCAAACGTGTGACGGTCT
CACTGGATCTGAAAGTGGTCACGGACTGGCAACCTGTCGCTCCAAGGGGGCT
GCTACTTTCATCCCCCTTTCTGGCCCCATCCCCACCCTGATTTCCAACACTC
GCACCCACTTCTACACTTGGCCAAGTTGTAAACAAAATCATAATCCTGACTC
CATCTCACCCACTCCCTATGGGCCCTCTCCAAATCCAAACTCAAATCTGAATC
CATATATTTGCATGCATACACAACCTTTCCTTTTTCCCGTTTTAGCTTTTTGGTG
TTGTGTCTGGTAAGGTGGTGTAACATGAGAGTGGAGCCCTGCTGCTACTGAT
GGTGAGATTTGGCTCCGTGCCGGCCCGTCCCCCTGTCCTACATACATCAAAAA
CAAAACTGTACTATTCTTAGAGGCTCTATGGGTACGTGCCGGCCTGGTCATGC
TTAACCAGGGTTTGCCGGAATCCAATCCTGCAAACACCAGCTTTTGAAAGTG
ATCCCTTCCCCATTGCCAATAGTTGTGGACTCTAGTCCCCAAAGAGTGAATGA
CCGATATCTTCTCCTTCAAAGTTCCTCTCTATCACTCATGGGCTCAAAGTCC
ATGGTCTAATCAATCCTATGGGNAAGGCTG

Eidestattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H. Saedler (Abteilung Molekulare Pflanzengenetik, Max-Planck Institut für Züchtungsforschung) betreut worden.

Teilpublikation:

Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P., Baulcombe, D.C. (2005). Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *The Plant Journal* 43, 837-848.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Saedler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an diesem Institut und für seine Unterstützung und Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Werr danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dr. P. Huijser möchte ich für sein Interesse, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung danken. Vor allem bedanke ich mich für seine unermüdliche Geduld bei mikroskopischen Fragen und bei der Bearbeitung meiner Bilder.

Dr. T. Münster danke ich für die vielen Hilfestellungen, die Diskussionen und seinem Interesse. Besonderer Dank gilt ihm für die vielen Verbesserungsvorschläge und seiner Bereitschaft mich in die Moos Welt einzuführen.

Besonderst herzlich möchte ich mich bei Daniela Liebsch für die Diskussionen und ihre Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank geht an Susanne Höhmann, die mir bei der Laborarbeit immer mit Rat zur Seite stand.

Bedanken will ich mich auch bei allen meine Laborkollegen, die mir gerade in der letzten Phase dieser Arbeit immer helfend zu Seite standen und unermüdliche Korrektur gelesen haben.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, die mich unterstützt hat und ohne die ich nicht soweit gekommen wäre.

Und natürlich bedanke ich mich bei all meinen Freunden, die mich auch an schlechten Tagen unterstützt haben und mir die Kraft gegeben haben diese Arbeit zu schreiben.

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Maike Riese
Anschrift: Alsdorferstr.1, 50933 Köln
Geburtsdatum: 07.07.1979
Geburtsort: Stuttgart Bad-Cannstatt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1995 Realschulabschluß, Korntal-Münchingen
1998 Abitur, Hedwig-Dohm Schule
(Ernährungswissenschaftliches Gymnasium)
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

Okt. 1998 – Aug. 2003 Hochschulstudium an der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität
Hohenheim.
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Nebenfächer: Genetik, Membranphysiologie,
Biochemie
Abschluss: Diplom-Biologin

Seit Nov. 2003 Promotionsstudium im Fach Biologie an der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
Experimentelle Arbeiten im Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung, Köln Vogelsang
Arbeitsgruppe: Dr Peter Huijser und Dr. T Münster
Betreuer: Prof. Dr. Heinz Saedler