

**Vakuolärer RNA-Abbau in *A. thaliana* und
Integration in den Nukleotid-Metabolismus
unter Berücksichtigung von
Nukleosidtransportprozessen**

**Vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation**

D 386

Vorgelegt von

Christopher Girke

Kaiserslautern, September 2015

Datum der wissenschaftlichen Aussprache

30. Oktober 2015

Berichterstatter:

Herr Professor Dr. H. Ekkehard Neuhaus

Herr Professor Dr. Matthias Hahn

Für Johann

* 10. Februar 1963

† 27. Juli 2014

"Death is nothing at all.

[...]

Life means all that it ever meant.

It is the same as it ever was.

There is absolute and unbroken continuity.

What is this death but a negligible accident?

Why should I be out of mind because I am out of sight?

I am just waiting for you, for an interval, somewhere very near, just round the corner.

All is well."

Henry Scott Holland (1910)

I Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 4 |
| 1.1 | T2-Typ Ribonukleasen in Pflanzen | 7 |
| 1.2 | Lokalisierung der T2-Typ Ribonukleasen | 8 |
| 1.3 | Integration des RNA-Abbaus in den Nukleotid-Stoffwechsel der Pflanze | 9 |
| 1.4 | Der Transport von RNA und RNA-Abbauprodukten | 11 |
| 1.4.1 | RNA- und Phosphattransport | 11 |
| 1.4.2 | Nukleobasen-, Nukleosid- und Nukleotidtransport | 12 |
| 1.5 | RNA-Analysen mit Hilfe von <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) | 15 |
| 1.6 | Ziele dieser Arbeit..... | 16 |
| 2 | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Chemikalien und Enzyme | 18 |
| 2.2 | Pflanzenanzucht | 18 |
| 2.2.1 | Pflanzenmaterial..... | 18 |
| 2.2.2 | Anzuchtbedingungen..... | 19 |
| 2.2.3 | Anzucht auf Erde..... | 19 |
| 2.2.4 | Oberflächensterilisation von Samen | 19 |
| 2.2.5 | Anzucht in Sterilkultur..... | 19 |
| 2.3 | Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden..... | 20 |
| 2.3.1 | Verwendete Bakterien- und Hefestämme..... | 20 |
| 2.3.2 | Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> | 21 |
| 2.3.3 | Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte | 23 |
| 2.3.4 | Oligonukleotide..... | 24 |
| 2.3.5 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> - und <i>P. pastoris</i> -Zellen..... | 26 |
| 2.3.6 | Transformation von <i>E. coli</i> | 26 |
| 2.3.7 | Transformation von <i>P. pastoris</i> | 26 |
| 2.3.8 | Herstellung von Glycerinkulturen..... | 27 |
| 2.3.9 | Isolation von RNA aus <i>A. thaliana</i> | 27 |
| 2.3.10 | cDNA-Erststrang-Synthese | 28 |
| 2.3.11 | RNA-PAGE und RNA-Agarose Gelelektrophorese | 28 |
| 2.3.12 | DNA-Isolierung und -Aufreinigung | 30 |
| 2.3.13 | DNA Amplifikation mittels PCR..... | 30 |
| 2.3.14 | Auftrennung von DNA Fragmenten (Agarose-Gelelektrophorese) | 31 |
| 2.3.15 | Quantitative <i>Real-Time</i> PCR | 31 |
| 2.3.16 | Quantitative Nukleinsäureanalyse | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3.17 | Qualitative Nukleinsäureanalyse mit Agilent 2100 Bioanalyzer | 32 |
| 2.4 | Biochemische und physiologische Methoden | 32 |
| 2.4.1 | Expression und Aufreinigung des ENT7 aus <i>A. thaliana</i> | 32 |
| 2.4.2 | Proteinbestimmung nach Bradford | 36 |
| 2.4.3 | SDS-PAGE | 36 |
| 2.4.4 | (Fluoreszenz) Gel-Permeations-Chromatographie | 37 |
| 2.4.5 | Microscale Thermophorese | 38 |
| 2.4.6 | Vakuolenisolation aus Blättern von <i>A. thaliana</i> | 38 |
| 2.4.7 | RNase A-Behandlung intakter Vakuolen | 45 |
| 2.4.8 | α -Mannosidase Aktivitätsmessung | 45 |
| 2.4.9 | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Aktivitätsmessung | 46 |
| 2.4.10 | UDP-Glucose-Pyrophosphorylase Aktivitätsmessung | 47 |
| 2.4.11 | Chromatographische Analyse der Adenylate | 48 |
| 2.4.12 | Chromatographische Messung des RNA-Abbaus | 50 |
| 2.4.13 | Photometrische Messung des RNA-Abbaus | 51 |
| 2.4.14 | Photometrische Messung der Phosphodiesterase-Aktivität | 52 |
| 2.5 | Licht- und fluoreszenzmikroskopische Analysen | 52 |
| 2.5.1 | Induktion und quantitative Analyse der Autophagie | 53 |
| 2.5.2 | Autophagosomfärbung mit Monodansylcadaverin | 53 |
| 2.5.3 | Membranfärbung mit FM4-64 | 53 |
| 2.5.4 | Selektive Färbung der RNA mit SYTO RNASelect™ | 54 |
| 2.5.5 | Neutralrotfärbung intakter Vakuolen | 54 |
| 2.6 | RNA-Sequenzierung über <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) | 54 |
| 2.6.1. | Herstellung der cDNA-Bibliotheken | 55 |
| 2.6.2 | <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) | 55 |
| 2.6.3 | Datenauswertung | 56 |
| 3 | Ergebnisse | 59 |
| 3.1 | Molekulare Charakterisierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien | 60 |
| 3.1.1 | Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion in das Gen <i>ENT1</i> | 60 |
| 3.1.2 | Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion in das Gen <i>RNS2</i> | 64 |
| 3.2 | Physiologische Untersuchungen der <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionslinien im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung | 67 |
| 3.3 | Untersuchungen an isolierten Vakuolen | 70 |
| 3.3.1 | Adenylatgehalte in Wildtyp-, <i>rns2-1</i> - und <i>rns2-2</i> -Vakuolen | 71 |
| 3.3.2 | RNA-Abbau mittels Enzymen aus Wildtyp-, <i>rns2-1</i> - und <i>rns2-2</i> -Vakuolen | 72 |
| 3.3.3 | Reinheit, Integrität und RNA-Vorkommen isolierter Vakuolen | 79 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.4 | Aufarbeitung der vakuolären RNA | 82 |
| 3.3.5 | Qualität der cDNA-Bibliotheken | 86 |
| 3.3.6 | Analyse der Rohdaten | 88 |
| 3.3.7 | Globaler Vergleich der Datensätze | 92 |
| 3.3.8 | RNA-Typ-Verteilung | 98 |
| 3.4 | Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des Equilibrativen Nukleosidtransporters 7 (ENT7) aus <i>A. thaliana</i> | 103 |
| 3.4.1 | Topographisches Modell des Equilibrativen Nukleosidtransporters 7 | 104 |
| 3.4.2 | Expression und Aufreinigung des ENT7 aus <i>A. thaliana</i> | 105 |
| 3.4.3 | Bindungscharakteristika des solubilisierten ENT7-eGFP | 113 |
| 4 | Diskussion | 116 |
| 4.1 | Die physiologische Auswirkung der T-DNA-Insertion in das <i>ENT1</i> -Gen | 118 |
| 4.2 | Transgene <i>RNS2</i> -Pflanzen zeigen eine verringerte vakuoläre RNase-Aktivität | 119 |
| 4.3 | Vakuolenisolation und Extraktion vakuolärer RNA: Eine Frage der Qualität? | 125 |
| 4.4 | <i>Next Generation Sequencing</i> | 129 |
| 4.4.1 | Datengenerierung und -verarbeitung | 129 |
| 4.4.2 | Analyse des vakuolären RNoms | 131 |
| 4.5 | Biochemische Analyse von rekombinant synthetisiertem ENT7-eGFP | 136 |
| 4.5.1 | Oligomerer Zustand des ENT7 | 137 |
| 4.5.2 | Bindfähigkeit des solubilisierten ENT7-eGFP | 137 |
| 4.6 | Ausblick | 140 |
| 5 | Zusammenfassung | 142 |
| 6 | Literatur | 144 |
| 7 | Anhang | IV |

1 Einleitung

Ribonukleinsäuren (RNA) sind wesentliche Bestandteile aller lebenden Organismen. Eine wichtige Funktion der RNA ist die Beteiligung an der Übersetzung der genetischen Information in Proteine. Ribosomale RNA (rRNA), *messenger* RNA (mRNA) und *transfer* RNA (tRNA) sind die primären Produkte der Genexpression und haben eine essentielle Bedeutung für die Proteinbiosynthese. *Micro* RNA (miRNA) und die eng verwandte *small interfering* RNA (siRNA) üben regulatorische Funktionen aus. *Small nuclear* RNA (snRNA) und die der snRNA untergeordnete *small nucleolar* RNA (snoRNA) sind an der Prozessierung anderer RNA-Sorten, wie tRNA, rRNA, mRNA und snRNA beteiligt. Darüber hinaus finden sich vor allem in Pflanzen transponierbare Desoxyribonukleinsäure- (DNA) Sequenzen der Klasse I (Retrotransposons), die sich über eine RNA-Zwischenstufe im Genom amplifizieren können. So besteht das Mais-Genom zu 49 bis 78 Prozent aus Retrotransposons (Sanmiguel & Bennetzen, 1998). An der Prozessierung von RNA und der Regulation des RNA-Pools, dem zellulären RNA-Metabolismus, sind Ribonukleasen (RNasen) wesentlich beteiligt. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen im Ribose-Phosphat-Rückgrat der RNA. Vertreter aus vielen Familien, u.a. Phospholipase C, Phosphodiesterasen, Restriktionsendonukleasen, DNasen oder auch RNasen sind in der Lage, diese Reaktion zu katalysieren. Die verschiedenen RNA-Typen unterliegen posttranskriptionellen Modifizierungen, wie *Splicing* von mRNA oder Prozessierung von rRNA bzw. tRNA. Im Wesentlichen wird dies von Proteinen des im Cytosol und Nukleus lokalisierten Exosoms ausgeführt. RNA-Polymerase I transkribiert beispielsweise rDNA, was zur Bildung der prä-rRNA (45S rRNA) führt (Abb. 1.1). Die Prozessierung der 45S rRNA unter Beteiligung von RNasen führt zur Freisetzung der für Pflanzen charakteristischen 25S, 5,8S und 18S rRNA. Auch die durch RNA-Polymerase III produzierten 5S rRNA- und tRNA-Transkripte werden durch RNasen zu reifen RNAs prozessiert (Abb. 1.1). Einige tRNA-Transkripte besitzen, ähnlich wie prä-mRNA, kurze Introns in einer konservierten Position im Anticodon Bereich. Für die mehrstufige Prozessierung bis hin zur reifen tRNA wird eine Phosphodiesterase benötigt, die in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) neben Adenosindiphosphatbose-1',2' zyklisches Phosphat auch 2',3'-zyklische Nukleotidmonophosphate als Substrat akzeptiert (Genschik *et al.*, 1997).

RNA-Abbau ist ein notwendiger Prozess, unter anderem zur Reorientierung des Transkriptoms, Regulation der Proteinsynthese, dem „normalen“ RNA-*turnover* und

Remobilisierung von Phosphat und stickstoffreichen Verbindungen durch nicht-selektiven RNA-Abbau (Abbasi *et al.*, 2013; Girke *et al.*, 2014; MacIntosh & Bassham, 2011; Welter & Elazar, 2014). Der überwiegende Anteil des mRNA-Abbaus findet in cytoplasmatischen Foci, den sogenannten *P-bodies* statt. In diesen *Hotspots* befinden sich unter anderem RNasen, aber auch Polymerasen und weitere Faktoren, die für den gezielten Abbau von mRNA notwendig sind (Chiba & Green, 2009; Xu & Chua, 2009).

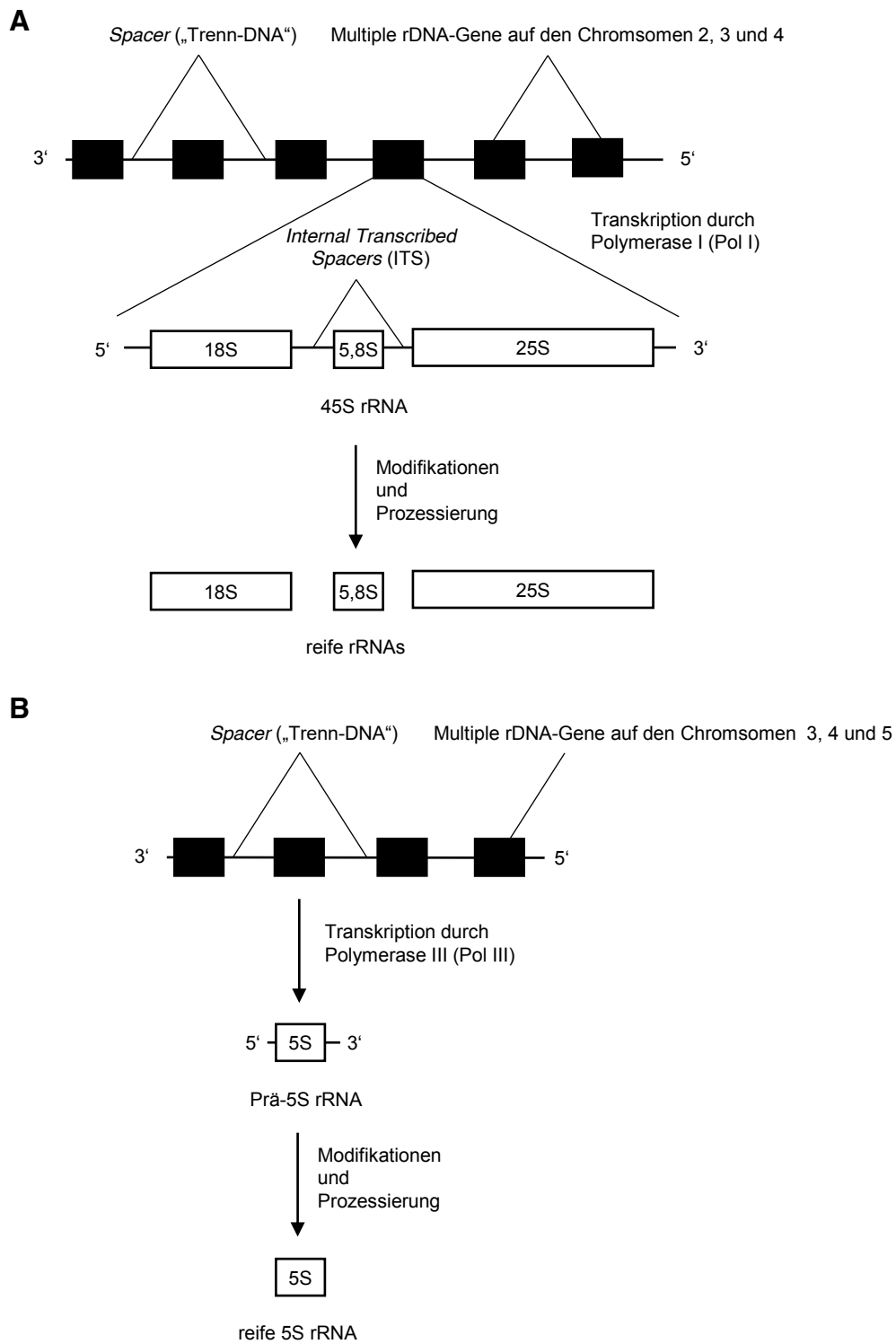


Abbildung 1.1: Transkription und nachfolgende Prozessierung (Reifung) der rRNA. Die Transkription der rDNA erfolgt durch Polymerasen (Pol I und Pol III) und führt zur Bildung von prä-rRNA. Durch Modifikation und Prozessierung, an der RNasen wesentlich beteiligt sind, entsteht die reife rRNA. Anders als hier exemplarisch dargestellt, werden in der Realität mehrere rDNA-Gene gleichzeitig transkribiert. Modifiziert nach Holletz *et al.* (2013)

Pflanzen besitzen neben den RNasen dieses „klassischen“ RNA-Metabolismus weitere Ribonukleasen, die entwicklungs- und stressabhängig oder konstitutionell exprimiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Genexpression durch

wechselnde Umweltbedingungen, abiotischen Stress, Pathogen-Befall oder Hormongabe induziert wird. Außerdem wirken RNasen bei Samenreifung, Wurzelwachstum, Pollenschlauchkeimung oder Seneszenz mit (Farkas, 1982; Green, 1994; Wilson, 1982). Alle RNasen die solche Funktionen außerhalb des „klassischen“ RNA-Metabolismus übernehmen, gehören der Superfamilie T2-Typ an. Auch konnte die Beteiligung von RNasen an der Selbstinkompatibilität in drei Pflanzenfamilien nachgewiesen werden (Anderson *et al.*, 1986). Auf dieser Funktion basiert die Eingliederung der T2-Typ RNasen in zwei Gruppen: S-RNasen und S-like-RNasen (McClure *et al.*, 1989).

1.1 T2-Typ Ribonukleasen in Pflanzen

RNase T2, eine extrazelluläre RNase aus *Aspergillus oryzae* (Sato & Egami, 1957) wurde als erster und namensgebender Vertreter der T2-Typ Superfamilie isoliert. Diese RNasen besitzen zwei konservierte Regionen, CAS1 und CAS2, die für die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich sind (Nicholson, 2001). Solch konservierte Regionen wurden auch in RNasen aus anderen Organismen, unter anderem im Reich der Pflanzen entdeckt. So weisen S-RNasen und S-like-RNasen typische Merkmale der T2-Typ Ribonukleasen auf. Alle pflanzlichen Vertreter dieser Familie sind Endoribonukleasen ohne Basenspezifität und im *Secretory Pathway* lokalisiert (MacIntosh *et al.*, 2010). RNase T2 Enzyme katalysieren eine endonukleolytische Spaltung der RNA in zwei Schritten: (1) Transphosphorylierung der 3',5'-Phosphodiesterbindung der RNA zur Bildung einer 2',3'-Phosphodiesterbindung, wobei einige Endonukleasen 2',3'-zyklische Nukleotidmonophosphate (2',3'-cNMPs) freisetzen. (2) Hydrolyse des zyklischen Intermediates zu 3'-Nukleotidmonophosphate (3'-NMPs) durch (zyklische Nukleotid-) Phosphodiesterase-Aktivität (Nicholson, 2001). Neben der Mitwirkung an Selbstinkompatibilität vollbringen pflanzliche T2-Typ RNasen eine Reihe von weiteren Funktionen bei der Phosphat-Remobilisierung, Pathogenabwehr, Verwundung und Seneszenz. Neben der Untergliederung auf Basis der Funktion für die Selbstinkompatibilität (S-RNasen und S-like-RNasen) unterscheidet Igic & Kohn (2001) alternativ in drei Klassen auf Basis der Intron/Exon Struktur. Klasse III beinhaltet ausschließlich S-RNasen der *Solanaceae*, *Rosaceae* und *Scrophulariaceae*. RNasen mit hochkonservierten Positionen von bis zu vier Introns sind als Klasse I Enzyme kategorisiert, wozu vier der fünf S-like-RNasen in *A thaliana* gehören. Neben diesen finden sich mit RNase LE, RNase LX, RNase LV1-3, RHS1 oder RNase1 auch Vertreter in *Lycopersicon esculentum* (*L. esculentum*),

Hordeum vulgare und *Oryza sativa*. Die Expression der RNasen aus Klasse I ist gewebespezifisch und stark abhängig von biotischen und abiotischen Faktoren (MacIntosh *et al.*, 2010). So werden Klasse I Ribonukleasen als Wundantwort lokal exprimiert und können durch den extrazellulären RNA-Abbau die zellulären Metabolite wiederverwerten und/oder als unspezifische Antwort an der Verwundungsstelle fungieren (Galiana *et al.*, 1997; Groß *et al.*, 2004). Unter Phosphatmangel wird die Synthese von extrazellulären Klasse I Enzymen induziert, um RNA aus der Umgebung abzubauen und das so gewonnene Phosphat aufzunehmen (Bariola *et al.*, 1999). Klasse II RNasen haben typischerweise sieben bis acht Introns und besitzen eine konservierte Disulfidbrücke am N-Terminus, wie es RNS2 aus *A. thaliana*, RNase LER2 aus *L. esculentum* und RNase NGR2 aus *Nicotiana glutinosa* aufweisen. Die in allen Geweben stark exprimierten Klasse II RNasen zeigen eine erhöhte Expression unter Seneszenz und Phosphatmangelbedingungen. Sie sind u.a. mitverantwortlich für den „normalen“ Umsatz von intrazellulärer rRNA und ermöglichen darüber hinaus durch verstärkten Abbau der rRNA in Stresssituationen eine Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit durch Freisetzung von Phosphat (Phosphatremobilisierung) und anderen Bestandteilen der RNA. Somit tragen Klasse II RNasen einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase bei (MacIntosh, 2011). RNS2, die einzige Klasse II RNase aus *A. thaliana*, ist unter Phosphatmangel erhöht exprimiert und essentiell für rRNA-Recycling (Hillwig *et al.*, 2011). *RNS2-Knockout*-Pflanzen akkumulieren rRNA intrazellulär und weisen konstitutive Autophagie auf (Hillwig *et al.*, 2011), wohingegen *RNS2-Antisense*-Pflanzen sowohl unter Kontroll- als auch unter Phosphatmangelbedingungen eine Akkumulation an Anthocyanen zeigen. Letzteres stellt einen Prozess dar, der durch zahlreiche Stressbedingungen (Verwundung, niedrige Temperaturen, hohe Lichtintensität, Pathogenbefall usw.) induziert wird (Bariola *et al.*, 1999). Der pH-Bereich von nativem RNS2-Protein liegt im sauren und neutralen Bereich, wohingegen das gereinigte Enzym eine pH-Präferenz bei pH 7,5 aufweist (Hillwig *et al.*, 2011). *In vivo* ist demnach eine Lokalisierung in sauren und neutralen Kompartimenten denkbar.

1.2 Lokalisierung der T2-Typ Ribonukleasen

Alle bekannten S-like-RNasen besitzen eine N-terminale Signalsequenz, welche die Enzyme in den *Secretory Pathway* dirigiert. Einige RNasen, wie RNS1 und RNS3 aus *A. thaliana* oder RNase LE aus *L. esculentum*, werden sekretiert (Bariola *et al.*, 1999; Nürnberger *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1993), während andere Vertreter der

Superfamilie T2 zusätzliche Signalsequenzen besitzen, die eine Lokalisierung in Endoplastmatische Reticulum (ER), Vakuole oder Lysosom ermöglichen. So besitzt RNase LX aus *L. esculentum* einen unikalen C-Terminus von neun Aminosäuren, von denen die letzten vier (HDEF) als Retentionssignal für die Dirigierung in das ER fungieren (Lehmann *et al.*, 2001). RNase LV1 - 3 aus *L. esculentum* sind unter Phosphatmangel verstärkt präsent und verantwortlich für die Bereitstellung von Phosphat durch RNA-Abbau (Köck *et al.*, 1995; Löffler *et al.*, 1992). Ebenso ist *A. thaliana* RNS2 für einen geregelten Abbau von rRNA essentiell und erfüllt eine ähnliche Funktion wie RNase LV1 - 3 (Hillwig *et al.*, 2011). RNS2 besitzt einen verlängerten C-Terminus mit putativem Signalpeptid (REAL), welches das Protein in das ER oder die Vakuole dirigieren kann (Green, 1994; Hillwig *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 1993). Durch Fusion des Cyan fluoreszierenden Proteins (CFP) mit dem RNS2-Protein konnte gezeigt werden, dass RNS2 im ER, in ER-ähnlichen Strukturen und der Vakuole lokalisiert ist. Die Funktion *in vivo* ist aufgrund der hohen Aktivität in saurem, wie in neutralem pH in beiden Kompartimenten vorstellbar. Neben den pflanzlichen Vertretern finden sich mit *Homo sapiens* RNASET2 und *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Rny1p auch RNase T2 Enzyme Vertreter aus der Klasse der Säugetiere und der *Saccharomyceten*, die im Lysosom lokalisiert sind – dem funktionellen Äquivalent der Vakuole in Pflanzen (MacIntosh *et al.*, 2001).

1.3 Integration des RNA-Abbaus in den Nukleotid-Stoffwechsel der Pflanze

Der Anteil ribosomaler RNA an der Gesamt-RNA beträgt bis zu 90 Prozent (Janning & Knust, 2008), sodass der Abbau dieses RNA-Typs von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die Nutzung der Abbauprodukte ist. In *S. cerevisiae* konnte unter Nährstoffmangel eine erhöhte Bildung von Autophagosomen beobachtet werden, die hauptsächlich Ribosome zum späteren Abbau in die Vakuole transportieren. Die selektive Aufnahme von Ribosomen wird in Anlehnung an Mitophagie (Abbau von Mitochondrien) und Pexophagie (Abbau von Peroxisomen) „Ribophagie“ genannt (Kraft *et al.*, 2008) und ermöglicht nicht nur den Abbau von ribosomalen Proteinen, sondern zusätzlich die Freisetzung von Phosphat und stickstoffreichen Verbindungen nach rRNA-Abbau, der zur Kompensation der Mangelsituationen dienen kann (Huang *et al.*, 2014). Ein ähnlicher Prozess wird sowohl für den normalen rRNA-Umsatz, als auch zur Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit unter Phosphatmangel und Seneszenz in Pflanzen diskutiert (Hillwig *et al.*, 2011). Eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge von *RNS2* und RNase LX während der Seneszenz bzw.

Phosphatmangel konnte durch entsprechende Analysen nachgewiesen werden (Bariola *et al.*, 1999; Köck *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 1993). Die ersten möglichen Produkte des RNA-Abbaus stellen 2',3'-cNMPs dar, die durch Enzyme mit Phosphodiesteraseaktivität zu 3'-NMPs dezyklisiert werden. RNasen sind zwar in der Lage diese Reaktion zu katalysieren, die Spaltung der zyklischen Verbindung verläuft jedoch 200- bis 1000-fach langsamer als die Bildung des 2',3'-cNMP (Abel *et al.*, 1989; Nürnberger *et al.*, 1990), sodass akzessorische Enzyme (Phosphodiesterasen) den weiteren Nukleotidabbau unterstützen können (Abel *et al.*, 2000). Phosphatasen ermöglichen die Hydrolyse zu Phosphat und Nukleosiden, die durch Nukleosid-Hydrolasen weiter zu Nukleobasen degradiert werden können. In Form der Base und des Nukleosids treten die Abbauprodukte der RNA in den Nukleotid-Stoffwechsel ein. Der *Salvage Pathway* findet hauptsächlich im Cytosol statt. Mit der Konvertierung von Uracil oder Uridin zu Uridinmonophosphat (UMP) über die entsprechenden Enzyme Uracilphosphoribosyltransferase (UPRT) bzw. Uridinkinase (UK) ist der Aufbau von Nukleotiden aus Pyrimidin-Nukleosiden und Nukleobasen grundsätzlich im Cytosol möglich. Mit UPP, einer plastidären UPRT, ist auch die Bildung von plastidärem UMP möglich, wobei der Transport von Uracil – das Substrat der UPP – in die Plastiden einen notwendigen Schritt darstellt. Sowohl für UPRT-, als auch für UK-Aktivität wird mit einem Molekül Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) bzw. Adenosintriphosphat (ATP), weitaus weniger Energie zur Synthese des entsprechenden Nukleotid-Moleküls benötigt als bei der *de novo* Synthese (Zrenner *et al.*, 2006). Im Vergleich zum Recycling findet die Pyrimidin *de novo*-Synthese in Plastiden statt und benötigt sechs energiereiche Verbindungen (Moffatt & Ashihara, 2002; Zrenner *et al.*, 2006). Der *Salvage Pathway* wird als Alternative zur *de novo*-Synthese für den Aufbau von Nukleotiden mit besserer Energiebilanz gesehen. Der Nukleotid-Abbau der Pyrimidin-Derivate findet hauptsächlich im Cytosol statt. Mit Pvd1 ist jedoch die Dihydrouracildehydrogenase in den Plastiden lokalisiert, die Uracil zu Dihydrouracil umwandelt. Zur Bildung der Endprodukte β -Alanin bzw. β -Aminobutyrate, sowie CO_2 und NH_3 ist demnach der Import von Uracil in die Plastide notwendig (Cornelius *et al.*, 2011).

Der Purin-Katabolismus ist wesentlich komplexer, findet im Cytosol und Peroxisomen statt und führt über Xanthin zur Bildung von Glyoxylat, CO_2 und NH_3 als Endprodukte (Zrenner *et al.*, 2006). Da die Enzyme in unterschiedlichen Organellen lokalisiert sind, kommt dem Transportsystem der Intermediate eine wichtige physiologische Bedeutung zu. Die beschriebenen Abbaureaktionen laufen unter Seneszenz und

Nährstoffmangel verstärkt ab, was durch stark erhöhte Transkriptgehalte bzw. Enzymaktivitäten der involvierten Gene bzw. Genprodukte, einschließlich der RNasen, deutlich wird (Bariola *et al.*, 1999; Brychkova *et al.*, 2008; Löffler *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1993; van der Graaff *et al.*, 2006). Die anfallenden Abbauprodukte werden unter anderem durch entsprechende Transportsysteme in der Pflanze verteilt und finden für Syntheseprozesse erneut Anwendung (Diaz *et al.*, 2008; Schelbert *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2003; van der Graaff *et al.*, 2006).

1.4 Der Transport von RNA und RNA-Abbauprodukten

1.4.1 RNA- und Phosphattransport

Der mRNA-Abbau findet im Cytosol vor allem in Foci, sogenannten *P-bodies* statt. Die Translokation der mRNA und anderer RNA-Typen aus dem Kern in das Cytosol wird durch die Kernporen ermöglicht, sodass keine speziellen Transportmechanismen notwendig sind. In *L. esculentum* Zellkultur wurde bis zu 80 Prozent der zellulären RNase-Aktivität in der Vakuole nachgewiesen (Abel & Glund, 1986), was einen Import der Ribonukleinsäure voraussetzt. Auch der Abbau in Lysosomen oder dem ER ist nur vorstellbar, wenn die im Nukleus synthetisierte RNA in die entsprechenden Kompartimente transportiert wird. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass der Abbau von kurzlebiger rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit im Nukleus und im Cytosol stattfindet (*non-functional ribosomal RNA decay*). Unter Nährstoffmangel oder während der Seneszenz läuft rRNA-Recycling jedoch in der Vakuole ab (MacIntosh & Bassham, 2011; Welter & Elazar, 2014). Der Transport erfolgt dabei über Autophagie. Die Kinase mTOR ist an der Regulation der Autophagosombildung beteiligt und ermöglicht durch Aktivierung der Autophagie Proteine 1 (ATG1) und 13 (ATG13) die Induktion der Autophagie. Unter Beteiligung von weiteren ATG-Proteinen erfolgt die Initiation der Vesikelformation, das *Docking* an die Vakuole und schließlich die Fusionierung der Autophagosomenmembran mit dem Tonoplasten. Durch Letzteres wird das *autophagic body* in die Vakuole entlassen, die Einzelmembran verdaut und der Autophagosomeninhalt freigesetzt (Thompson & Vierstra, 2005).

Im Falle der Ribophagie werden die beiden Untereinheiten eines Ribosoms zunächst getrennt und im Anschluss in Vesikeln zur Vakuole transportiert. Nach der Freisetzung des Vesikelinhaltes in die Vakuole spalten RNasen die vorhandene rRNA, was zur Freisetzung von 2',3'-cNMPs führt und letztlich bis zur Stufe der Nukleoside degradiert werden kann (Bernard, 2010). Für den Eintritt der Abbauprodukte in den Nukleotidstoffwechsel muss ein Export in das Cytosol gewährleistet sein. Erst im

Cytosol können die Nucleoside in Nucleobasen und Nucleotide konvertiert werden und stehen so zum Transport oder zur Beteiligung an einer der vielen Funktionen im Stoffwechsel der Pflanze zur Verfügung.

Ähnlich wie für *S. cerevisiae* vorgeschlagen, ist auch in *A. thaliana* ein Ribophagie-ähnlicher Prozess für den Transport von RNA in die Vakuole postuliert (MacIntosh & Bassham, 2011). Der Abbau von RNA in der Vakuole unter Normalbedingungen oder in verschiedenen Stresssituationen, wie Nährstoffmangel oder Seneszenz, ist eine Möglichkeit des Recyclings von Ribonucleinsäuren zu stickstoffreichen heterozyklischen Komponenten und Phosphat. Nucleinsäuren und ATP sind die wohl bekanntesten phosphathaltigen Komponenten und neben weiteren phosphathaltigen Biomolekülen essentiell für das Pflanzenwachstum. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Phosphat aus der Umwelt das Pflanzenwachstum und –entwicklung stimuliert. Der Import in die Pflanze wird dabei durch die protonenabhängigen PHT1-Typ Transporter realisiert (Shin *et al.*, 2004). PHT2-Typ und fünf der sechs PHT4-Typ Carrier sind in den Plastiden lokalisiert, PHT3-Typ Transporter in Mitochondrien und PHT4;6 im Golgi, wo sie die Phosphatkonzentrationen der Organelle regulieren können (Guo *et al.*, 2008; Hassler *et al.*, 2012; Rausch & Bucher, 2002; Weber *et al.*, 2005). Die plastidären Phosphat-Translokatoren (pPTs) ermöglichen einen Antiport zwischen Phosphat und anderen phosphorylierten Komponenten und tragen somit nicht zur Änderung der Phosphatkonzentration zwischen Plastid und Cytosol bei (Fischer *et al.*, 1997; Kammerer *et al.*, 1998). Ein tonoplastidär lokalisierter Carrier, der den Transport von Phosphat als Produkt vakuolären RNA-Abbaus aus der Vakuole in das Cytosol ermöglicht, ist nicht bekannt.

1.4.2 Nucleobasen-, Nucleosid- und Nucleotidtransport

Der Transport von Nucleobasen wird in *A. thaliana* von insgesamt 41 Transportern aus fünf Familien ermöglicht, die zusätzlich von physiologischer Bedeutung für den Cytokinin, Alkaloid und Vitamin B6 Metabolismus sind (Girke *et al.*, 2014).

Purin (*uptake*) Permeasen (PUPs) wurden in mehreren Pflanzenfamilien, wie *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* (*Z. mays*) identifiziert. In *A. thaliana* sind 21 Vertreter bekannt, von denen drei biochemisch charakterisiert wurden (Girke *et al.*, 2014). Sie sind involviert in der Wiederaufnahme ihrer Substrate aus der Guttationsflüssigkeit und darüber hinaus in der Beladung des Phloems mit Nucleobasen, und Cytokininen (Bürkle *et al.*, 2003). Folglich ermöglichen sie die Verteilung von RNA-Abbauprodukten in der Pflanze.

Die Familie der Ureid Permeasen (UPSs) transportieren Abbauprodukte des Nucleotidstoffwechsels, wie Uracil, Xanthin oder Allantoin, wobei letzteres in Leguminosen eine wichtige Transportform des Stickstoffs darstellt. Leguminosen gehen oft ein symbiontisches Verhältnis mit stickstofffixierenden Bakterien in speziell dafür ausdifferenzierten Geweben, den Wurzelknöllchen, ein. An *Glycine max* (*G. max*) UPS1-Knockdown Pflanzen konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstau von Allantoin in den Wurzelknöllchen kommt (Collier & Tegeder, 2012). UPS1 war dabei nicht nur wichtig für den Export des Allantoins, sondern auch für die Entwicklung der Wurzelknöllchen (Collier & Tegeder, 2012). In *A. thaliana* spielt der Allantoin Transport eine untergeordnete Rolle, sodass die hohe Uracil Transportaffinität der UPSs physiologisch bedeutsamer ist (Girke *et al.*, 2014). Die UPS1-Expression ist während der Keimung und frühen Keimlingsentwicklung erhöht, gefolgt von erhöhter UPS2-Expression. Diese Entwicklungsstadien zeigen eine gesteigerte Aktivität von Nucleotid-Salvage-Enzymen und nur geringe Aktivität von *de novo*-Synthese-Enzymen, sodass die Pflanze auf die Verteilung der Salvage-Produkte unter Beteiligung der UPSs angewiesen ist (Schmidt *et al.*, 2004; Stasolla *et al.*, 2003). Die zwei verbleibenden Familien der Nucleobasentransporter in Pflanzen sind die Nucleobasen:Kation Symporter NCS1 und NCS2. Azg1, Azg2, NAT3 und NAT12, Vertreter der NCS2 Familie aus *A. thaliana*, transportieren Purin-Nucleobasen (Adenin und Guanin), sowie Uracil. Sie sind ebenfalls plasmamembranständig und somit an der Verteilung von Nucleobasen beteiligt (Mansfield *et al.*, 2009; Maurino *et al.*, 2006; Niopek-Witz *et al.*, 2014). Mit PLUTO existiert lediglich ein Vertreter der NCS1-Familie in *A. thaliana*, der zudem in den Plastiden lokalisiert ist (Witz *et al.*, 2012). Keine dieser Transporter ist jedoch in der Lage, Nucleobasen aus der Zelle zu exportieren, da sie ausnahmslos einen protonengekoppelten Symport ihrer Substrate ermöglichen.

Nucleosidtransporter sind weit verbreitet in Eukaryoten und wurden bereits aus unterschiedlichen Organismen biochemisch charakterisiert. In Säugetieren wird der Transport durch zwei Familien ermöglicht: den Kationen-abhängigen konzentrativen Nucleosidtransportern (CNTs) und den Energie-unabhängigen equilibrativen Nucleosidtransportern (ENTs). Sie spielen eine wichtige Rolle im Nucleotidstoffwechsel und der Aufnahme von Therapeutika, die in der Krebstherapie eingesetzt werden (Young *et al.*, 2013). *Vibrio cholerae* CNT konnte kristallisiert werden und zeigte die Ausbildung von Homotrimeren, von denen jeder Protomer acht Transmembrandomänen aufwies (Johnson *et al.*, 2012). Die Kristallstruktur eines ENTs wurde bisher zwar nicht veröffentlicht; durch Antipeptid-Antikörper Analysen in Kombination mit Glykosylierungs-Scanning Mutagenese konnte jedoch gezeigt

werden, dass ENTs elf transmembrane Domänen mit einem cytosolischen *Loop* zwischen der Transmembrandomäne sechs und sieben, einem cytosolischen N-Terminus, sowie extrazellulärem C-Terminus besitzen (Young *et al.*, 2013). In *A. thaliana* existieren keine CNT Homologe, es konnten jedoch acht Transporter identifiziert werden, die den ENTs phylogenetisch verwandt sind (Hyde *et al.*, 2001). Alle acht ENTs besitzen ein breites Substratspektrum von Purin- und Pyrimidin-Nukleosiden und katalysieren die Nukleosidtranslokation fast ausschließlich über einen H⁺-gekoppelten Symport. Somit sind die meisten pflanzlichen Vertreter der ENT-Familie zwar den tierischen ENTs ähnlich, zeigen aber einen mit den CNTs vergleichbaren Transportmechanismus (Girke *et al.*, 2014). Da der pH-Wert des Apoplasten und der Vakuole niedriger ist als im Cytosol (Shen *et al.*, 2013), ist *in vivo* lediglich ein Transport von Nukleosiden in das Cytosol möglich. Der einzige Kandidat, der Nukleoside unabhängig eines Protonengradienten über die Plasmamembran transportiert, ist ENT7. Hefen, die ENT7 überexprimieren, zeigten nur eine schwache Änderung der Adenosinaufnahme nach Applikation des Protonenentkopplers CCCP (Wormit *et al.*, 2004). Außerdem konnte an *Xenopus laevis* (*X. laevis*) Oocyten gezeigt werden, dass der Adenosintransport ohne gekoppelten H⁺-Transport erfolgt (Girke *et al.*, 2015). ENT7 ist somit der einzig bekannte Transporter in *A. thaliana*, der den Export von Nukleosiden ermöglichen könnte, da er seine Substrate unabhängig eines Protonengradienten transportiert. ENT1 und ENT3 aus *A. thaliana* wurden zudem physiologisch untersucht. *ENT3*-T-DNA-Insertionspflanzen zeigten eine erhöhte Resistenz gegen das toxische Nukleosidanalogs 5-Fluorouridin, weshalb dieser Nukleosidtransporter als Hauptimporter in Keimlingen gilt (Chen *et al.*, 2006; Traub *et al.*, 2007). Neben ENT3 zeigen auch die plasmamembranständigen ENT4, ENT6, ENT7 und ENT8 eine hohe Expression während der Keimung (Chen *et al.*, 2006). Das ist ein Hinweis auf die Bedeutung des *Salvage Pathways* und die Verteilung der beteiligten Intermediate im gesamten Keimling während Entwicklungsphasen mit geringer Nukleotid *de novo*-Synthese-Aktivität. Lediglich ENT1 ist nicht in der Plasmamembran, sondern in der Vakuolenmembran, dem Tonoplasten, lokalisiert (Bernard *et al.*, 2011). Damit ist er der bislang einzig bekannte Transporter, der durch vakuoläre RNA-Abbauprozesse entstandene Produkte in das Cytosol transportieren kann, wo sie in den *Salvage Pathway* oder den katabolen Stoffwechselweg eintreten können (Bernard *et al.*, 2011). Die biochemischen Eigenschaften des Transporters, sowie die physiologischen Auswirkungen eines veränderten Transkriptgehaltes in *ENT1*-RNAi und 35S:*ENT1*-Pflanzen wurden bereits untersucht (Bernard *et al.*, 2011; Möhlmann *et al.*, 2001). So weisen *ENT1*-35S-Pflanzen einen erhöhten, *ENT1*-RNAi-

Pflanzen einen verringerten Gehalt an vakuolärem Adenosin und 2',3'-cAMP auf – beides Produkte des RNA-Abbaus. Darüber hinaus zeigte sich eine gesteigerte Aktivität von Enzymen des *Salvage Pathways* in den Überexpressionspflanzen und ein kleinerer Habitus im Vergleich zum Wildtyp. *ENT1*-RNAi-Pollen keimten schlechter als Wildtyp-Pollen und wiesen verringerte interne und externe ATP Gehalte auf (Bernard *et al.*, 2011).

Neben der Möglichkeit der intrazellulären Verteilung von Nukleotiden durch Vertreter der AAC- und NTT-Familie ist auch der Export von Nukleotiden durch PmANT1 möglich – ein Transporter, der eine besondere Rolle für den Transport von ATP als extrazelluläres Signalmolekül spielt (Leroch *et al.*, 2008; Rieder & Neuhaus, 2011). In der Vakuolenmembran lokalisierte Nukleotidtransporter, die RNA-Abbauprodukte aus der Vakuole in das Cytosol transportieren könnten, sind nicht bekannt.

1.5 RNA-Analysen mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS)

Durch die rapide Weiterentwicklung der Sequenziermethoden der zweiten (*next*) Generation, steht heute eine revolutionäre Methode für umfassende Analysen von Transkriptomen oder RNA-Oligonukleotiden zur Verfügung (Wang *et al.*, 2009). Die drei konkurrierenden Plattformen Roche454, SOLiD™ und Illumina unterscheiden sich hauptsächlich bezüglich ihrer Funktionsweise, der maximal sequenzierbaren Nukleotidabfolge, der Sequenzierdauer, der Fehlerrate und den Kosten. Bei der Roche454-Technologie, die ersteingeführte der neuen Plattformen, werden die DNA-Moleküle an winzige Kugeln gebunden und per Emulsions-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Mikroreaktionsraum amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgt an einer Picotiterplatte und ermöglicht die Bestimmung von Sequenzen mit einer Länge von 400 bis 500 nt (Dressman *et al.*, 2003). Die SOLiD™ Technologie unterscheidet sich im Wesentlichen im Trägermaterial. Hier werden die DNA-Moleküle an einer Glasoberfläche immobilisiert. Die Sequenzierung erfolgt durch Einbau von fluoreszierenden Oktameren und ermöglicht eine sehr fehlerfreie Determination von Sequenzen mit einer Länge von bis zu 35 nt (Ansorge, 2009). Illumina ermöglicht mit dem HiSeq2000 die Sequenzierung von Oligonukleotiden einer Länge von bis zu 150 nt innerhalb weniger Tage, produziert hierbei jedoch eine gigantische Datenmenge, die im Anschluss einen hohen bioinformatischen Aufwand erfordert (Ansorge, 2009). Die zu sequenzierenden DNA-Moleküle werden auf einer *Flow Cell* hybridisiert und per Brückensynthese in *Clustern* amplifiziert. Die Sequenzierung basiert ebenfalls auf den Einbau von fluoreszierenden Nukleotiden. Für die

Sequenzierung von RNA können Adapter bekannter Sequenzen ligiert und anschließend in DNA umgeschrieben werden. Das Anwendungsspektrum von RNA-Sequenzierung ist sehr breit gefächert, bedarf nur eines geringen Laboraufwands und setzt keinerlei Kenntnisse des vorliegenden Transkriptoms oder der zu sequenzierenden RNA-Sequenzen voraus. So lassen sich beispielsweise Transkriptomanalysen in der Entwicklung der Blätter von *Z. mays* (Li *et al.*, 2010), Stoffwechselwege von Tee-spezifischen Komponenten in *Camellia sinensis* (Shi *et al.*, 2011) oder die Zusammensetzung von RNA-haltigen Vesikeln aus *Mus musculus*, die in den Extrazellularraum abgegeben werden, untersuchen (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2012).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Nachdem die physiologische Bedeutung des ENT1 durch Pflanzen mit verändertem Transkriptgehalt bereits untersucht wurde, sollen im Rahmen dieser Arbeit T-DNA-Insertionslinien identifiziert und der Einfluss des *Knockouts* auf den vakuolären RNA-Abbau analysiert werden. Neben *ENT1*-T-DNA-Insertionslinien sind auch *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien für diese Fragestellung von besonderem Interesse, da sie aufgrund ihrer vakuolären Lokalisierung einen Einfluss auf die vakuolären RNase-Aktivität haben.

In Vakuolen aus Tomaten-Zellkultur (*L. esculentum*) wurden RNA-abbauende Enzyme (Abel & Glund, 1986) detailliert untersucht. Darüber hinaus konnten auch RNA-Oligonukleotide identifiziert werden, die mehrheitlich kürzer als 80 nt waren und zu möglichen Produkten der Ribonuklease I zählen (Abel *et al.*, 1990). Durch neue Technologien sollen im Rahmen dieser Arbeit das vakuoläre RNom von *A. thaliana* identifiziert und die Länge der vorhandenen RNAs analysiert werden.

Die nur beim Abbau von RNA und DNA vorkommenden Nukleoside werden durch Transporter einer einzigen Proteinfamilie, den Equilibrativen Nukleosidtransportern (ENTs) intra- und interzellulär verteilt (Cornelius *et al.*, 2011). In *A. thaliana* sind zwar acht Vertreter dieser Familie bekannt, lediglich ENT7 ermöglicht jedoch einen equilibrativen Transport, wie die namensgebenden Vertreter aus Säugetieren. *A. thaliana* ENT7 ist daher der einzige Transporter, der den Export von RNA-Abbauprodukten aus der Zelle ermöglicht. In *H. sapiens* nehmen ENTs außerdem eine wichtige Rolle in Therapien gegen Krebs, AIDS, sowie parasitische und kardiovaskuläre Erkrankungen ein (Mohelnikova-Duchonova & Melichar, 2013; Valdes *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2008). ENT7 wurde zwar bereits biochemisch und physiologisch untersucht (Wormit *et al.*, 2004), die Proteinstruktur konnte allerdings

weder für diesen Vertreter noch von anderen Vertretern der ENT-Familie aufgeklärt werden. Da die Aufreinigung von funktionellem Protein aus der ENT-Transporterfamilie bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte (Hammond, 1997; Hammond & Zarenda, 1996; Young *et al.*, 2013), war es ein weiteres Ziel dieser Dissertation, ein optimiertes Expressions- und Aufreinigungssystem für ENTs zu etablieren. In der Folge sollten biochemische Eigenschaften, wie beispielsweise der oligomere Zustand oder die Bindungseigenschaften zu bekannten und potentiellen Substraten untersucht werden und eine Abschätzung für die Bedeutung im Hinblick auf den Transport von RNA-Abbauprodukten ermöglichen. Letztendlich sollten diese Untersuchungen darüber hinaus als Grundlage zukünftiger Mutations- und Kristallisationsstudien dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden von den Firmen BASF (Ludwigshafen), Biometra (Göttingen), BioRad (München), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Qiagen (Hilden), Peqlab (Erlangen), Roche (Penzberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Quanta Biosciences (Gaithersburg, USA), Clontech (Mountain View, USA), Illumina (San Diego, USA), Thermo Scientific (Karlsruhe) und Hartmann Analytics GmbH (Braunschweig) bezogen. Die verwendeten Enzyme zur *in vitro* Manipulation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) stammen von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Ipswich, USA).

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen zur Funktion der Ribonuklease RNS2, sowie zur Analyse vakuolärer Ribonukleinsäure (RNA) wurde die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, Ackerschmalwand) (L.) Heynh. der Varietät Columbia kultiviert. Es wurden sowohl Wildtyp-Pflanzen als auch T-DNA-Insertionslinien des *ENT1* (At2g36310), *RNS2* (At2g39780) und *ATG5* (At5g17290) verwendet. Bei den verwendeten T-DNA-Insertionslinien handelt es sich um die Linien SAIL_338_G11 (*rns2-1*), SALK_069588 (*rns2-2*), SALK_104866 (*ent1-1*), SALK_025174 (*ent1-2*) und SAIL_129_b07 (*atg5*). SAIL_129_b07 ist in Yoshimoto *et al.* (2009) beschrieben. Des Weiteren erfolgte die Analyse von vakuolärer RNA aus Pflanzen bei denen das Gen *ENT1* unter die Kontrolle des Cauliflower mosaic Virus 35S (CaMV 35S) Promotors gestellt wurden. Die Pflanzen sind in Bernard *et al.* (2011) ausführlich beschrieben und wurden dort 35S:*ENT1*-Linie 5 genannt. Für diese Linie wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit die vereinfachte Bezeichnung 35S:*ENT1* verwendet.

2.2.2 Anzuchtbedingungen

Alle *A. thaliana* Pflanzen wurden entweder auf Erde oder in Sterilkultur angezogen. Um die zeitgleiche Keimung aller Samen zu gewährleisten, erfolgte eine Inkubation für 48 h bei 4 °C. Nach der Stratifikation wurden die Samen in der Klimakammer bei einer Tageslänge von 10 h, einer Temperatur von 21 °C und einer Lichtintensität von 110 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen.

2.2.3 Anzucht auf Erde

Alle auf Erde angezogenen Pflanzen wurden auf ED-73 Einheitserde (DIN 11540-80T) kultiviert. Für die Samenanalysen wurden die Pflanzen für 28 Tage unter Kurztagbedingungen (Kap. 2.2.2) auf Erde angezogen. Anschließend wurde die Lichtphase zur Blühinduktion auf 16 Stunden verlängert. Nach weiteren 35 Tagen wurden die Pflanzen nicht mehr gewässert, so dass es zur Samenbildung und Abreifung kam. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Anzahl der Schoten pro Pflanze durch Auszählen bestimmt. Die Samen von Wildtyp und der *RNS2-T-DNA*-Insertionslinien wurden geerntet und standen für die weiteren Analysen zur Verfügung. Es wurde sowohl das Gewicht der gesamten Samenausbeute pro Pflanze als auch das Gewicht von 1.000 Samen der jeweiligen Linien gravitrometrisch bestimmt.

2.2.4 Oberflächensterilisation von Samen

Zur Sterilisation von Samen wurden diese mit 500 μl Ethanol (80 % (v/v)) für 2 min in einem Thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei 600 rpm geschüttelt. Anschließend wurde bei 12.500 rpm für 1 min zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf) und der Überstand abgenommen. Nach der Zugabe von 1 ml Natriumhypochlorit (3 % (v/v)) erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 600 rpm in einem Thermomixer. Nachdem erneut bei 12.500 rpm für 1 min zentrifugiert wurde, konnte der Überstand abgenommen werden. Zum Waschen wurde 1 ml steriles Wasser auf die Samen gegeben und diese erneut für 10 min bei 600 rpm in einem Thermomixer geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 12.500 rpm für 1 min und Abnahme des Überstandes wurde der Waschschrift zwei weitere Male wiederholt.

2.2.5 Anzucht in Sterilkultur

Die Anzucht von oberflächensterilisierten *A. thaliana*-Samen (Kap. 2.2.4) erfolgte in Petrischalen mit MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962).

MS-Medium (*A. thaliana*):

0,22 g l⁻¹ Murashige Skoog Medium mit Vitaminen

1 % (w/v) Saccharose

0,05 % (w/v) MES

0,8 % (w/v) Agar

pH-Wert 7,0 (KOH)

Saccharosefreies MS-Medium wurde wie oben angegeben, jedoch ohne Saccharose hergestellt.

2.3 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

Im folgenden Teil werden die verwendeten Bakterien- und Hefestämme, sowie Oligonukleotide und erzeugte Konstrukte aufgelistet. Des Weiteren werden die dafür angewandten Standardmethoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren beschrieben.

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch RNasen wurde bei allen Arbeiten, die ein RNase-freies Arbeiten voraussetzen, Einmalhandschuhe getragen und alle verwendeten Glas- und Plastikwaren, soweit möglich, autoklaviert oder gebacken (180°C). Alternativ erfolgte eine Inkubation in 3 % Wasserstoffperoxid für mindestens 1 h. Alle Lösungen und Wasser wurden mit 0,1 % DEPC über Nacht geschüttelt und anschließend autoklaviert. Oberflächen, sowie Geräte wurden mit RNase AWAY® (Sigma-Adrich, Taufkirchen) behandelt.

2.3.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Für die Vermehrung von Plasmidvektoren wurde der gramnegative Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-blue verwendet. Die Aufreinigung des Equilibrativen Nukleosidtransporters 7 (ENT7) erfolgte in der Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*).

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|-----------------------------|--|----------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1-blue | recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺), supE44, relA1, lac, [F ['] , proAB ⁺ , lacIqZΔM15, ::Tn10(tetr)] | Bullock (1987) |
| <i>P. pastoris</i> GS115 | his4 | Thermo Scientific (Karlsruhe) |

2.3.2 Anzucht von *E. coli* und *P. pastoris*

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-blue erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37°C in YT-Medium mit selektiven Antibiotika (Sambrook *et al.*, 1989). Nach der Transformation erfolgte die Anzucht unter aeroben Bedingungen bei 37 °C, in ψB-Medium für 1 h (Hanahan, 1983).

YT-Medium:

0,8 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 0,25 % (w/v) NaCl
 pH 7,0 (NaOH)

ψB-Medium:

2 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 0,4 % (w/v) MgSO₄
 10 mM KCl
 pH 7,6 (KOH)

Die Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Aus diesen Medien hergestellte Agarplatten enthielten 1,5 % (w/v) Agar.

Die Anzucht von *P. pastoris* GS115 erfolgte in YPDS- bzw. BMGY-Medium. Zur Induktion der nicht konstitutiven Genexpression wurden die Hefen in BMMY-Medium überführt und bei 28°C und 280 rpm für 48 h kultiviert.

YPDS-Medium:

2 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefe-Extrakt
2 % (w/v) Glucose
1 M Sorbitol
100 µg ml⁻¹ Zeocin

BMGY-Medium:

2 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefe-Extrakt
10 % (v/v) 10x YNB Stock
40 µM Biotin
10 % (v/v) 10x Kaliumphosphat Stock
1 % (v/v) Glyzerin

BMMY-Medium:

2 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefe-Extrakt
10 % (v/v) 10x YNB Stock
40 µM Biotin
10 % (v/v) 10x Kaliumphosphat Stock
0,5 % Methanol

Die Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Aus diesen Medien hergestellte Agarplatten enthielten 1,5 % (w/v) Agar.

10x YNB

3,4 % (w/v) „Yeast Nitrogen Base“ ohne Ammoniumsulfat

0,9 M KH_2PO_4

10x Kaliumphosphat

160 mM K_2HPO_4 1,1 M KH_2PO_4

pH 6,0 (KOH)

Die Stocklösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

Die Medien wurden vor der Zugabe der sterilen Stocklösungen bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 2.2: Antibiotika.

| Antibiotikum | Endkonzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$] |
|-------------------|--|
| Ampizillin (Amp) | 200 |
| Kanamycin (Kan) | 25 |
| Tetracyclin (Tet) | 10 |
| Zeocin (Zeo) | 100 |

2.3.3 Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte

In der nachfolgenden Tabelle sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren und hergestellten Konstrukte aufgelistet. Für die Herstellung des Vektors pPICZA-eGFP wurde eGFP von dem Vektor pEGFP-N1 amplifiziert und mit C-Terminalem His₈-Tag und N-terminaler TEV Schnittstelle in den Vektor pPICZA kloniert. ENT7 konnte aus dem Konstrukt pDR196-AtENT7 (Tab. 2.3) mit den Primern ENT7_EcoRI_fwd und ENT7_XhoI_rev amplifiziert und in den Endvektor kloniert werden.

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte.

| Vektor | Eigenschaften | Referenz |
|--------------------|---|-----------------------------|
| pBSK | zeo ^R , attP1 und attP2-Rekombinationsstellen, ccdB-Gen, Gateway-Donorvektor | Invitrogen, Karlsruhe |
| pPICZA | | Invitrogen, Karlsruhe |
| pEGFP-N1 | | Clontech |
| pPICZA-eGFP | | Diese Arbeit |
| Konstrukt | Vektor/Insert | Referenz |
| pYES-AtENT7 | pDR196/ENT7 | Wormit <i>et al.</i> (2004) |
| pPICZA-AtENT7-eGFP | pPICZA-eGFP/ENT7 | Diese Arbeit |
| pPICZA-mPEMT-eGFP | pPICZA-eGFP/mPEMT | Brooks <i>et al.</i> (2013) |

2.3.4 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit für PCR-Reaktionen (Kap. 2.3.13) verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide.

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Bemerkung |
|-------------------|------------------------------------|-----------|
| T3 | AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG | |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | |
| pPICZA_fwd | GACTGGTCCAATTGACAAGC | |
| pPICZA_rev | GCAAATGGCATTCTGACATCC | |
| GFP_rev | ATCACCTTCACCCTCTCCA | |
| LBb1.3 | ATTTTGCCGATTTCCGGAAC | |
| LB_3 | TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC | |
| Ef1 α _fwd | GAGACCACCAAGTACTACTGCAC | |
| Ef1 α _rev | GTTGGTCCCTTGTACCAGTCAAG | |
| RNS2_fwd | ATGGCGTCACGTTTATGTCTTCTCC | |
| RNS2_rev | TCAAAGAGCTTCTCTTTCTGTTGG | |
| RNS1_RT_fwd | AATCTTGCCTTCTGTCTTCTCTGC | |
| RNS1_RT_rev | GTCACAGTATGATCCTGGCCATTG | |
| RNS2_RT_fwd | CAAGCTGGCTATGTTGCTTCC | |
| RNS2_RT_rev | GCGTGTATTCCGGCAAACCTTACG | |
| RNS3_RT_fwd | GGCCTGGAGCGTATTGTGATT | |
| RNS3_RT_rev | GAGTCGCATCGACCATGCG | |
| RNS4_RT_fwd | GGCCAGGAGCAATATGCGATAG | |

| | | |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| RNS4_RT_rev | CGGGCATTCCACAAACTCTTTTGC | |
| RNS5_RT_fwd | GCGTGCTTGTTGCTATCCAAC | |
| RNS5_RT_rev | GATGGACAGCTTCCTCTAGG | |
| ENT7_EcoRI_fwd | CCCGAATT <u>C</u> ACCATGACTAATC | <i>EcoRI</i> Schnittstelle |
| ENT7_XhoI_rev | GGGCTCGAGAAACGAATCG | <i>XhoI</i> Schnittstelle |
| ENT1k_fwd | ATGACCACCACCGATAAATCC | |
| ENT1l_fwd | ATGACTCCCATTAGTCAACGAATTT | |
| ENT1_rev | TCAAATGACCCAGAACCAAGC | |
| SALK_104866_LP | TGCAATGCAACTTGATAATGG | |
| SALK_104866_RP | CACCATAACAACAATCCCCAC | |
| SALK_025174_LP | ACCGTTGTCCATGATTTTCAG | |
| SALK_025174_RP | GCGAGGCTCTTATGTGCATAG | |
| SALK_010828_LP | AGGAATTAATCCGGATGATGG | |
| SALK_010828_RP | TTTTTGGCTATCGCATATTGC | |
| SALK_053487_LP | AGGAATTAATCCGGATGATGG | |
| SALK_053487_RP | ATAAAATCCGACGCTGTGTTG | |
| SALK_059417_LP | TTGAACTGGGATCCGATAATG | |
| SALK_059417_RP | TGGAGCCTATTGCGATACATC | |
| SALK_064237_LP | CGATGGACCGATTGATATTTG | |
| SALK_064237_RP | ATCAAATTGGCTATCGGGATC | |
| ENT1_Intron_fwd | GCCGGAGAGGTATATGCAAG | |
| ENT1_Intron_rev | CAACAATCCCCACAGCAAAG | |
| NEBNext SR Primer | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCCAG AGTTCTACAGTCCG | |
| NEBNext Index 5 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CACTG</u> IGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 5 |
| NEBNext Index 6 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ATTGGC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 6 |
| NEBNext Index 7 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GATCTG</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 7 |
| NEBNext Index 13 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TTGACT</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 13 |
| NEBNext Index 14 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GGA</u> ACTGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 14 |
| NEBNext Index 15 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TGACAT</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 15 |
| NEBNext Index 16 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GGACGGG</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 16 |
| NEBNext Index 17 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CTCTAC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 17 |

| | | |
|----------------------------|--|----------|
| NEBNext Index 18 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GCGGAC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 18 |
| NEBNext Index 19 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TTTTCAC</u> GTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 19 |
| NEBNext Index 20 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GGCCAC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 20 |
| NEBNext Index 21 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CGAAAC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 21 |
| NEBNext Index 22 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CGTAC</u> GGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 22 |
| NEBNext Index 23 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CCACTC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 23 |
| NEBNext Index 24 Primer | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GCTACC</u> GTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC | Index 24 |

2.3.5 Herstellung kompetenter *E. coli*- und *P. pastoris*-Zellen

Für Transformationen wurden kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-blue nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983) hergestellt.

Kompetente *P. pastoris*-Zellen wurde nach dem „Pichia EasySelect™ Expression“-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.6 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli*-Zellen (120 µl) für 10 min auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit dem Ligationsansatz bzw. mit 100 ng des isolierten Plasmids vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 90 s. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt und 1 h lang in nichtselektivem ψB-Medium (Kap. 2.3.2) bei 37 °C regeneriert. Nach der einstündigen Inkubation, die den transformierten Zellen die Möglichkeit gibt, das für die Antibiotikaresistenz verantwortliche plasmidäre Gen zu exprimieren, wurden die Zellen auf YT-Agarplatten (Kap. 2.3.2) mit selektiven Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.7 Transformation von *P. pastoris*

Plasmid DNA wurde mit *SacI* linearisiert und mit 80 µl elektrokompenter *P. pastoris* GS115 Zellen auf Eis mit Hilfe des Gene Pulsers (BioRad, München) bei 2,5 kV, 25 µF und 100 Ω elektroporiert. Die Zellen wurden auf YPDS-Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert bis Kolonien erschienen (Kap. 2.3.2). 48 Einzelkolonien wurden gepickt und auf BMMY-Platten übertragen. Als Negativkontrolle dienten untransformierte GS115

Zellen. Kolonien des *M. musculus* PEMT (Brooks *et al.*, 2013) dienten als Positivkontrolle. Die Platten wurden für 3 Tage auf 30°C inkubiert und die Fluoreszenz über das Kamerasystem ImageQuant LAS4000 und Epi-Blaulicht von 460 nm (GE Healthcare, USA) mit einer Belichtungszeit von 0,125 s detektiert. Die Fluoreszenz wurde über ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) ausgewertet.

2.3.8 Herstellung von Glycerinkulturen

Selektionierte Bakterien- oder Hefekulturen wurden als Glycerinkultur konserviert. Dazu wurden 1275 µl Übernachtskultur mit 225 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -70°C eingefroren.

2.3.9 Isolation von RNA aus *A. thaliana*

Die Isolation von Gesamt-RNA zur Untersuchung des Transkriptgehaltes in *A. thaliana* Pflanzen erfolgte mit Hilfe des „RNeasy® Plant Mini“- Kits. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Isolation von RNA aus Vakuolen, die nach Robert *et al.* (2007) über Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden, erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Gentra Systems Inc. (Minneapolis, USA; US-Patent Nr. 5.973.137). Dazu wurden die in Stickstoff gelagerten Vakuolenlösungen zur Lyse mit 10x Lysepuffer versetzt, anschließend die Proteine mit 0,25 Vol Präzipitationspuffer gefällt und gemäß dem Protokoll weitergearbeitet. Da nur geringe Mengen von RNA (<10 µg) erwartet werden konnten, wurde Glykogen mit einer Endkonzentration von 0,05 - 1 µg µl⁻¹ als Carrier für die Präzipitation zugesetzt und die RNA durch Isopropanol gefällt.

10x Lysepuffer:

2 % (w/v) SDS
680 mM Natriumcitrat
1,32 M Zitronensäure
100 mM EDTA
pH 2,5 (NaOH/Essigsäure)

Präzipitationspuffer:

4 M NaCl

17 mM Natriumcitrat

33 mM Zitronensäure

pH 3,5 (NaOH/Essigsäure)

Die Isolation von RNA aus Vakuolen, die nach Burla *et al.* (2013) und über Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden, sowie die Isolation von RNA zur Analyse der RNA Produkte des RNase-Assays erfolgte über Chloroform-Phenol Extraktion mit peqGOLD TriFast™ FL (Peqlab, Erlangen). Die Zugabe des Reagenz erfolgte direkt auf die bei -80°C gelagerte Vakuolenlösung bzw. RNase-Assay Aliquot. Zur Entfernung hoher Ficoll-Konzentrationen wurden die Lösungen ausgewählter Proben (C4 bis C8) auf ein Amicon Ultra-0,5 ml Zentrifugierfilter (Merck Millipore, Darmstadt) gegeben und für 5 min bei RT und 14,000 *g* zentrifugiert. Das in das Reagenz enthaltene Guanidinisothiocyanat führte zur vollständigen Inhibierung jeglicher RNase-Aktivität. Die nach der nicht-wässrigen Isolationsmethode enthaltene vakuolenreiche Fraktion (Kap. 2.4.6.3) wurde durch Zugabe von 500 µl RNase-freies Wasser resuspendiert und die enthaltene RNA ebenfalls über Chloroform-Phenol-Extraktion isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Da nur geringe Mengen von RNA (<10 µg) erwartet werden konnten, wurde Glykogen mit einer Endkonzentration von 0,05 - 1 µg µl⁻¹ als Carrier für die Präzipitation zugesetzt.

2.3.10 cDNA-Erststrang-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels des „qScript™ cDNA Synthesis“-Kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA) nach Angaben des Herstellers. Bei der Synthese wurde ein Gemisch aus Oligo-(dT)-Primer und „Random“-Primer verwendet, die an die mRNA anlagern, was den Startpunkt der reversen Transkription darstellt.

2.3.11 RNA-PAGE und RNA-Agarose Gelelektrophorese

Die radioaktive Markierung der vakuolären RNA erfolgte durch die Verwendung der T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) und [γ -³²P]-ATP (Hartmann Analytic GmbH). 10 µM RNA wurde mit 1 µl [γ -³²P]-ATP (150 µCi µl⁻¹), 1 µl T4-PNK Reaktionspuffer (10x), 1,5 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U µl⁻¹) und 1,5 µl DEPC-H₂O für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die radioaktiv markierte RNA wurde im Anschluss mithilfe des „QIAquick Nucleotide Removal“-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl eluiert, mit 30 µl Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C

denaturiert, um anschließend mittels hochauflösender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt zu werden. Zum Gießen des Gels wurden zwei Glasplatten zusammengeklammert, die fertige 5 % Polyacrylamid-Gellösung zwischen beide Glasplatten gegossen und für 1 h auspolymerisiert. Zum Equilibrieren wurde das Gel für 1 h bei 1200 V, 500 mA und 12 W in 1x TBE-Puffer vorlaufen gelassen. Vor dem Beladen wurde der Harnstoff durch mehrmaliges Spülen mit 1x TBE-Puffer aus den Taschen entfernt. Neben 30 µl der Ribonukleinsäuren wurden als Laufkontrolle auch 29 nt, 48 nt, 75 nt und 380 nt Oligonukleotide geladen. Die Gele wurden bei 12 W für 3 - 6 h laufen gelassen. Nach dem Abbau wurde das Gel zwischen Klarsichtfolie und Whatman-Papier gelegt und unter Vakuum bei 80°C für 15 - 20 min getrocknet. Nach dem Trocknen des Gels wurde dieses in einer Expositionskassette einem Packard MP Storage Phosphoscreen ausgesetzt und mit einem Cyclone Phospho-Imager (Perkin-Elmer Life Sciences) analysiert.

10x TBE-Puffer:

0,89 M Borsäure
20 mM Na₂EDTA
0,89 M Tris
pH 8,9 (HCl)

Gellösung (5 %):

1x TBE-Puffer
5 % Acrylamidlösung
0,05 % TEMED
0,05 % APS
8 M Urea
ad 60 ml DEPC-H₂O

2x Ladepuffer:

0,17 g Harnsäure
10 µl 1M Tris-HCl (pH 7,5)

40 µl 50 % Saccharose
0,4 µl 0,5 M EDTA
10 µl 2X Farbstoff (XC, BB)
ad 120 µl H₂O

Die Auftrennung von Ribonukleinsäuren des RNA-Assays durch Elektrophorese wurde mittels Formaldehyd-Gelen, ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Lehrach *et al.*, 1977; Sambrook *et al.*, 1989).

2.3.12 DNA-Isolierung und -Aufreinigung

Die Isolation von Plasmid-DNA für DNA-Sequenzanalysen und Klonierungen, erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® Plasmid“-Kits (Macherey-Nagel, Düren). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Ob die hergestellten Konstrukte die richtigen Sequenzen aufwiesen, wurde von der Firma Seq-it GmbH (Kaiserslautern) über Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977).

T-DNA-Insertionslinien wurden auf Ebene der genomischen DNA (gDNA) auf Homozygotie überprüft. Die Isolierung erfolgte nach der „Simple DNA prep“-Methode des University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC), USA.

2.3.13 DNA Amplifikation mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, um DNA *in vitro* zu amplifizieren. Als Template für diese Reaktion dienen genomische DNA, cDNA oder Plasmid-DNA. Die zu vervielfältigende Sequenz wird durch zwei kurze, synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer (Tab. 2.4) festgelegt, die an dem *Sense*- bzw. *Antisense*-Strang binden können und als Startpunkt der Reaktion dienen. Durch die wiederholte Abfolge von Denaturierung, Annealing und Elongation wird in jedem Zyklus die Anzahl des gewünschten DNA-Fragments verdoppelt (Saiki *et al.*, 1988). Zur Durchführung wurde ein Thermocycler (Biometra, Göttingen) verwendet. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das „QIAQuick PCR Purification“-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes:

| | |
|-------------|---|
| x µl | Template-DNA (5 - 100 ng µl ⁻¹) |
| 2 µl | 10-fach Reaktionspuffer |
| 1 µl | Primer, forward (10 µM) |
| 1 µl | Primer, reverse (10 µM) |
| 1 µl | dNTP-Mix (10 µM) |
| 0,2 µl | Taq- bzw. Pfu-Polymerase |
| 14,8 - x µl | H ₂ O |

2.3.14 Auftrennung von DNA Fragmenten (Agarose-Gelelektrophorese)

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Lottspeich & Zorbas (1998) durchgeführt. Als Bezugsgröße diente GeneRuler Mix oder GeneRuler 1 kb plus DNA (Thermo Scientific, Karlsruhe). Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 320 nm (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Im Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente können aus dem Agarosegel wieder extrahiert werden. Dazu wurden die DNA Fragmente mit Hilfe eines X-TRACTA (Biozym Scientific GmbH, Hess) aus dem Gel entfernt und anschließend unter Verwendung des „NucleoSpin® Extract II“-Kits (Macherey-Nagel, Düren) extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.15 Quantitative *Real-Time* PCR

Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung des MyIQ-Cycler (BioRad, München) und des PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA) nach Angaben des Herstellers. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.5 aufgelistet. Die Expression des Gens At1g07930, welches für den Elongationsfaktor 1α (*Ef1α*) kodiert, diente als Normalisierung (Curie *et al.*, 1991). Alle PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) auf ihre korrekte Größe geprüft (Kap. 2.3.14).

2.3.16 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop® ND-1000 (PepLab, USA) photometrisch bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNA bzw. $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNA. Das 260 nm : 280 nm Verhältnis wird verwendet, um die Reinheit der RNA oder DNA Isolation zu bestimmen. Das Verhältnis reiner DNA liegt im Allgemeinen bei $\geq 1,8$, das Verhältnis reiner RNA bei $\geq 2,0$. Als ein weiteres Maß der Reinheit der Nukleinsäuren wird das 260 nm : 230 nm Verhältnis verwendet. Das 260 nm : 230 nm Verhältnis reiner Nukleinsäuren ist grundsätzlich höher als das entsprechende 260 nm : 280 nm Verhältnis (Lottspeich & Zorbas, 1998). Die quantitative Bestimmung der cDNA-Bibliotheken wurde mit dem Qubit® Fluorometer (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.17 Qualitative Nukleinsäureanalyse mit Agilent 2100 Bioanalyzer

Zur Qualitätssicherung wurden Nukleinsäuren nach der Isolation bzw. cDNA-Bibliotheken Herstellung mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, USA) mit dem „RNA 6000 Pico“-Kit, „Small RNA“-Kit oder „DNA 1000“-Kit elektrophoretisch aufgetrennt, über Fluoreszenz detektiert und die Daten mit Agilent 2100 Expert Software ausgewertet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA Integrität Nummer (RIN) wurde entwickelt, um eine standardisierte Interpretation der RNA-Qualität zu garantieren. Proben können so in 10 Klassen - von intakter RNA (RIN 10) bis hin zu degradierter RNA (RIN 1) eingeteilt werden (Schroeder *et al.*, 2006)

2.4 Biochemische und physiologische Methoden

2.4.1 Expression und Aufreinigung des ENT7 aus *A. thaliana*

Ausgewählte *P. pastoris* Kolonien, die mit dem Expressionskonstrukt pPICZ-AtENT7-eGFP transformiert worden waren, wurden in 100 ml BMGY-Medium inklusive 100 mg ml^{-1} Ampizilin angeimpft und bei 300 rpm und 28°C bis zu einer OD_{600} von 7 wachsen lassen. Diese Startkultur wurde zum Überimpfen in 6 l BMGY Medium genutzt. Die Kultur wurde bei 28°C und 280 rpm bis zu einer OD_{600} von 5 - 10 (log Phase) angezogen. Die Hefen wurden in 6 l BMMY Medium überführt und für weitere 24 h bei 280 rpm und 28°C inkubiert, sodass die Proteinsynthese ablaufen konnte.

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 500 *g* geerntet, das Pellet gewogen, in 5-fachen Volumen (w/v) LYS-Puffer resuspendiert und mit einem „TS model cells disruptor“ (Constant Systems Ltd., United Kingdom) bei 40 kpsi lysiert. Unerwünschte Zellbestandteile wurden durch Dichtegradientenzentrifugation sukzessive entfernt: Zunächst erfolgte die Pelletierung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 3.000 *g*. Der Überstand wurde ein weiteres Mal bei für 20 min 16.000 *g* zentrifugiert und der resultierende Überstand letztlich zur Pelletierung der Membranen für 1 h bei 100.000 *g* und 4°C zentrifugiert. Diese wurden anschließend in SOL-Puffer mit 1,5 % DDM aufgenommen (10 ml pro Gramm Membranpellet) und für 1 h auf Eis vorsichtig gerührt. Ungelöste Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation bei 100.000 *g* und 4°C für 30 min pelletiert und der Überstand gegen DIA1-Puffer dialysiert, um ideale Bindungsbedingungen für die nachfolgende Ni-NTA chromatographische Aufreinigung zu schaffen. Der Überstand wurde mit 1 ml Nickel-*Slurry* für 1,5 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend in einer Säule absetzen lassen. Der Durchfluss wurde abgelassen und zweimal mit 10 Säulenvolumen W1 bzw. W2 gewaschen. Über einen 4-stufigen Imidazol-Gradienten (100-1.000 mM) wurde das Protein eluiert und über SDS-PAGE (Kap. 2.4.3) und (Fluoreszenz-) Gel-Permeations-Chromatographie (Kap. 2.4.4) analysiert. Die Entfernung des Imidazols erfolgte durch Dialyse mit DIA2-Puffer.

LYS-Puffer:

100 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

Spatelspitze DNase

1 Tablette Protease Inhibitor (Roche, Penzberg)

50 mM Tris

pH 8,0 (HCl)

SOL-Puffer:

300 mM NaCl
20 % (v/v) Glyzerin
5 mM MgCl₂
10 mM Imidazol
1 Tablette Protease Inhibitor (Roche, Penzberg)
50 mM MES
pH 6,0 (KOH)

DIA1-Puffer:

150 mM NaCl
10 % (v/v) Glyzerin
50 mM Tris
pH 8,0 (HCl)

ELU-Puffer:

100 – 1.000 mM Imidazol
150 mM NaCl
20 % (v/v) Glyzerin
0,1 % (w/v) DDM
50 mM MES
pH 6,0 (KOH)

W1-Puffer:

5 mM Imidazol
150 mM NaCl
20 % (v/v) Glyzerin
0,1 % (w/v) DDM
50 mM MES
pH 6,0 (KOH)

W2-Puffer:

10 mM Imidazol
150 mM NaCl
20 % (v/v) Glyzerin
0,1 % (w/v) DDM
50 mM MES
pH 6,0 (KOH)

DIA2-Puffer:

150 mM NaCl
20 % (v/v) Glyzerin
0,1 % (w/v) DDM
50 mM Tris
pH 8,0 (HCl)

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte unter Verwendung des „BioPhotometers“ (Eppendorf, Hamburg) in Plastikküvetten (Eppendorf, Hamburg) nach der Methode von Bradford (1976). Als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgeraden diente Rinderserum-Albumin (BSA).

2.4.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Trennung von Proteinen erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern (Biorad, München) bei konstanter Spannung zwischen 80 und 200 V mit einem 14 %-igen Trenngel und einem 3 %-igen Sammelgel. Die Proben wurden vor der Trennung mit Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine wurde als Standard „Precision Plus Protein™ Dual Color Standards“ (BioRad, München) verwendet. Das Anfärben der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Zum Entfärben wurden die Gele in Entfärbelösung inkubiert. Die Detektion der In Gel Fluoreszenz von GFP getaggtten Proteinen erfolgte mit dem Kamerasystem ImageQuant LAS4000 und Epi-Blaulicht von 460 nm (GE Healthcare, USA).

Färbelösung:

0,4 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250

9 % (v/v) Essigsäure

45 % (v/v) Ethanol

Entfärbelösung:

9 % (v/v) Essigsäure

45 % (v/v) Ethanol

4x SDS-Ladepuffer:

400 mM DTT

8 % (w/v) SDS

0,2 % (w/v) Bromphenolblau
40 % (v/v) Glyzerin
200 mM Tris
pH 6,8 (HCl)

2.4.4 (Fluoreszenz) Gel-Permeations-Chromatographie

Die Gel-Permeations-Chromatographie erfolgte durch ein Äkta-System, bestehend aus P900 Pumpe, UV-900 Detektor, Frac-950 Fraktionskollektor und Superdex 200 10/30-Säule (GE Healthcare, USA). Die Flussgeschwindigkeit des SEC1-Puffers betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. $300 \mu\text{l}$ der Probe wurden appliziert und das Eluat in $300 \mu\text{l}$ Aliquots gesammelt. Das gesamte System wurde auf 4°C gekühlt. Die Fluoreszenz der Aliquots konnte durch einen FluoroSTAR Plate Reader mit Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion bei $\lambda_{\text{Em}} = 509 \text{ nm}$ quantifiziert werden. Zur Reinigung des Proteins für Bindungsstudien wurde SEC2-Puffer verwendet. Als Standards für die Berechnung der Molekulargewichte nach Auftrennung auf der Superdex 200 (10/30) Säule wurden Thyroglobulin (MW: 670 kDa; Stokes Radius: 86 Å; $V_E = 9,63 \text{ ml}$), IgG (MW: 158 kDa, Stokes Radius: 51 Å; $V_E = 12,95 \text{ ml}$), Ovalbumin (MW: 44 kDa; Stokes Radius: 28 Å; $V_E = 15,5 \text{ ml}$) und Myoglobin (MW: 17 kDa, Stokes Radius: 19 Å; $V_E = 17,3 \text{ ml}$) verwendet.

SEC1-Puffer:

200 mM NaCl
10 % (v/v) Glyzerin
0,1 % (w/v) DDM
50 mM MES
pH 6,0 (KOH)

SEC2-Puffer:

100 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin
0,1 % (w/v) DDM
50 mM Natriumphosphat
pH 6,0

2.4.5 Microscale Thermophorese

Vor den Bindungsstudien mittels Microscale Thermophorese (MST) wurde das Protein über Gel-Permeations-Chromatographie mit SEC2-Puffer aufgereinigt (Kap. 2.4.4) und die Eluate mit der höchsten Fluoreszenz vereinigt. Die Bindungsstudien wurden mit einem NanoTemper Monolith NT.115 Instrument (NanoTemper Technologies, München), Standardkapillaren, ENT7-eGFP mit einer Konzentration von 65 nM, 70 % LED und 20 % Infrarot-Laser Stärke durchgeführt. Die Laser-On Zeit betrug 30 s und die Laser-Off Zeit 5 s. Als Negativkontrolle wurden die Bindungspartner mit 65 nM eGFP inkubiert und die thermophoretische Bewegung detektiert.

2.4.6 Vakuolenisolation aus Blättern von *A. thaliana*

Zur Isolation und Sequenzierung vakuolärer RNA wurden Organellen über 3 verschiedenen Methoden aufgereinigt. Die Bestimmung der Reinheit, Intaktheit, RNase-Aktivität und der Anwesenheit von intra- sowie extravakuolärer RNA standen im Fokus der Analysen.

2.4.6.1 Vakuolenisolation nach der Methode von Robert *et al.* (2007)

Für die Vakuolenisolation nach Robert *et al.* (2007) wurden *A. thaliana*-Samen dicht auf Erde ausgesät und die Pflanzen für 4 - 6 Wochen in einer Klimakammer angezogen (Kap. 2.2.2). Kurz vor Beginn der Lichtphase wurden die Pflanzen geerntet. Für die Isolation der Protoplasten wurden 6 g Blattmaterial mit einer Rasierklinge klein geschnitten, in eine Zellkulturflasche (Greiner Bio One, Frickenhausen) mit 90 ml Enzymlösung überführt und für 10 min in einem Exsikkator infiltriert. Es folgte eine Inkubation für 3 h im Dunkeln auf einem Schüttler bei 30 rpm. Zum Entfernen nicht verdauter Blattstrukturen wurde die Protoplastenlösung über ein Metallsieb gegeben, das vorher mit Waschpuffer benetzt wurde. Der Durchlauf wurde für 20 min bei 70 g zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde durch

vorsichtiges Invertieren in 15 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zugabe von 15 ml Waschpuffer erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 70 *g*. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, der Überstand abgesaugt und das Pellet zur Lyse der Protoplasten in 10 ml 37°C warmem Lysepuffer resuspendiert. Jeweils 5 ml der Lösung wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und die Lösung vorsichtig mit 3 ml 4 % Ficoll überschichtet. Das Ficoll wurde wiederum mit 1 ml eiskaltem Vakuolenpuffer überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 1 h bei 10°C und 100.000 *g*. Aufgrund des Dichtegradients lagern sich die intakten Vakuolen zwischen Vakuolenpuffer (0 % Ficoll) und 4 % Ficoll an, wo sie mit einer abgeschnittenen Spitze abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff gefroren wurden. Schockfrost führt zur Zerstörung der Organellen und somit zur Freisetzung des Vakuoleninhaltes.

0,5 M EDTA:

0,5 M EDTA
pH 8,0 (NaOH)

Lösung A:

0,2 M NaH₂PO₄

Lösung B:

0,2 M Na₂HPO₄ · 7H₂O

NaP_i pH 8,0 :

5,3 ml Lösung A
94,7 ml Lösung B

NaP_i pH 7,5 :

16 ml Lösung A
84 ml Lösung B

Alle beschriebenen Stocklösungen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Waschpuffer:

10 mM MES
400 mM Mannitol
pH 5,6 (KOH)

Enzymlösung:

10 U ml⁻¹ Cellulase R-10
5,5 U ml⁻¹ Mazeroenzym R-10
0,4 % (w/v) CaCl₂
350 µl l⁻¹ β-Mercaptoethanol
in Waschpuffer angesetzt

Lysepuffer:

0,2 M Mannitol
10 % (w/v) Ficoll
10 mM EDTA
5 mM NaPi pH 8,0

Vakuolenpuffer:

0,45 M Mannitol
2 mM EDTA
5 mM NaPi pH 7,5

4 % Ficoll:

40 % (v/v) Lysepuffer
60 % (v/v) Vakuolenpuffer

2.4.6.2 Vakuolenisolation nach der Methode von Burla *et al.* (2013)

Die Vakuolenisolation aus Blättern von *A. thaliana* nach Burla *et al.* (2013) erfolgte aus Rosettenblätter von 4 - 6 Wochen alten Pflanzen. Die Blätter von vereinzelt gewachsenen Pflanzen wurden mit Sandpapier (P500 - 800) angeraut und in eine Petrischale mit 20 ml Mesophyll-Puffer gelegt. Nach Zugabe von 30 ml Enzymlösung erfolgte der Verdau für 2 h im Dunkeln auf einem Schüttler bei 30 rpm. Die Protoplastenlösung wurde in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen) aufgeteilt und mit 2 ml Percoll, pH 6 unterschichtet. Durch Zentrifugation für 8 min bei 400 *g* und 4°C sammelten sich die intakten Protoplasten an der Phasengrenze. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgesaugt und die Protoplasten in der verbliebenen Lösung resuspendiert, sodass eine 40 % Percoll Lösung entstand. Die 40 % Percoll Lösungen wurden vereinigt, mit 10 ml 3:7-Mix und 10 ml Sorbitol-Puffer überschichtet und anschließend für 8 min bei 250 *g* und 4°C zentrifugiert. Die gereinigten Protoplasten reicherten sich zwischen der mittleren und oberen Phase an, konnten in 10 ml abgenommen, in ein weiteres 50 ml Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen) überführt und mit 10 ml auf 37°C vorgewärmten Lysispuffer vermischt werden. Die Lyse erfolgte ebenfalls bei 37°C für maximal 10 min unter regelmäßigem Invertieren. Die Freisetzung der Vakuolen wurde mikroskopisch überprüft und so der genaue Zeitpunkt für die Beendigung der Lyse festgelegt. Nach erfolgter Lyse wurde das Röhrchen sofort auf Eis gestellt, zügig in 4 vorgekühlte Ultrazentrifugationsröhrchen aufgeteilt und mit 5 ml 1:1-Mix, gefolgt von 5 ml Betain-Puffer überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 1300 *g* und 4°C. Aufgrund des Dichtegradienten lagern sich die Vakuolen dabei zwischen 1:1-Mix und Betain-Puffer an. Sie wurden mit einer abgeschnittenen Spitze abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff gefroren. Schockfrost führt zur Zerstörung der Organellen und somit zur Freisetzung des Vakuoleninhaltes.

0,5 M EDTA:

0,5 M EDTA

pH 8,0 (NaOH)

100x BSA:

100 mg ml⁻¹ BSA

100x DTT:

100 mM DTT

Die Stocklösungen wurden frisch und in Wasser angesetzt.

Mesophyll-Puffer:

500 mM Sorbitol

1 mM CaCl₂

10 mM MES

1 mg ml⁻¹ BSA

pH 5,6 (KOH)

Enzymlösung :

16,67 mg ml⁻¹ Cellulase R-10

8,33 mg ml⁻¹ Macerozym R-10

in Mesophyll-Puffer angesetzt

Percoll, pH6 :

500 mM Sorbitol

1 mM CaCl₂

20 mM MES

in 100 % Percoll angesetzt

Percoll, pH 7,2:

500 mM Sorbitol
20 mM Hepes
in 100 % Percoll angesetzt

Sorbitol-Puffer:

400 mM Sorbitol
30 mM Kaliumgluconat
20 mM Hepes
1 mg ml⁻¹ BSA
1 mM DTT
pH 7,2 (Imidazol)

3:7-Mix:

3 Volumen Percoll, pH 7,2
7 Volumen Sorbitol-Puffer

Lysispuffer:

200 mM Sorbitol
20 mM EDTA
10 mM Hepes
10 % (v/v) Ficoll
0,2 mg ml⁻¹ BSA
1 mM DTT
pH 8,0 (KOH)

1:1-Mix:

1 Volumen Lysispuffer

1 Volumen Betain-Puffer

Betain-Puffer:

400 mM Betain

30 mM Kaliumgluconat

20 mM Hepes

1 mg ml⁻¹ BSA

1 mM DTT

pH 7,2 (Imidazol)

Die Zugabe von BSA und DTT erfolgte kurz vor Verwendung der Puffer.

2.4.6.3 Vakuolenisolation über nicht-wässrige Fraktionierung

Die Isolation von Vakuolen unter Bedingungen, in denen zelluläre Prozesse, wie der Abbau von RNA, vollständig gestoppt sind, ist durch sofortiges Gefrieren und Entwässerung der Proben möglich. Die Auftrennung unterschiedlicher subzellulärer Kompartimente in 10 Fraktionen erfolgt durch Dichtegradientenzentrifugation, beschrieben in Riens *et al.* (1991) mit Modifikationen aus Krüger *et al.* (2009). 8 g gefrorenes Blattmaterial von 4 - 6 Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen wurden in einer Retsch Schwingmühle (Retsch, Haan) homogenisiert und anschließend gefriergetrocknet (Christ Alpha 2 - 4 LD, SciQuip, Shrewsbury, UK). Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde in 20 ml TH-Mix resuspendiert und mit Bandolin Sonoplus (Bandolin, Berlin, Germany) für insgesamt 120 s, 6 x 10 Zyklen und 65 % Power sonifiziert. Nach der Ultraschallbehandlung wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (20 µm Porengröße) gefiltert, 1:3 mit Heptan verdünnt, für 10 min bei 4.000 g zentrifugiert und das Pellet in 3 ml TH-Mix resuspendiert. Der Gradient (30 ml, 1,43 - 1,62 g cm⁻³) wurde mit der Peristaltikpumpe Econo (Bio-Rad, München) in Zentrifugationsröhrchen aufgebaut. Nach der Beladung mit den Proben erfolgte die Zentrifugation für 50 min bei 5.000 rpm und 25°C. Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen der oberen Hälfte des Gradienten entnommen (F1-F10) und mit dem

dreifachen Volumen Heptan verdünnt. Die Fraktion mit der höchsten Dichte weist den größten Anteil an Vakuolen auf. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4.000 *g*. Die entstandenen Pellets wurden in 10 ml Heptan gelöst und aliquotiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 14.000 *g* wurde der Überstand verworfen, die Pellets in einem Exsikkator für 24h getrocknet und unter Vakuum gelagert.

TH-Mix:

66 % (v/v) Tetrachlorethylen

34 % (v/v) Heptan

$$\rho = 1,3 \text{ g cm}^{-3}$$

2.4.7 RNase A-Behandlung intakter Vakuolen

Trotz der nachweislich hohen Reinheit der Vakuolen wurde extravakuolär vorhandene RNA durch RNase A-Verdau entfernt. Hierzu wurden 3 ml Lösung mit intakten Vakuolen, die nach der Methode von Burla *et al.* (2013) isoliert wurden (Kap.2.4.6.2) für 1 h bei RT mit 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A inkubiert. Die Inaktivierung der RNase A erfolgte bei ausgewählten Ansätzen durch Inkubation der Lösung mit 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase K für 1 h bei RT. Die behandelten Vakuolen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Alternativ zur Proteinase K Behandlung konnte die RNase-Aktivität durch Zugabe des Reagenz peqGOLD TriFast™ FL (Kap. 2.3.9) inhibiert werden. Die Zugabe des Reagenz erfolgte direkt auf die bei -80°C gelagerte Vakuolenlösung. Das in das Reagenz enthaltene Guanidinisothiocyanat führt zur vollständigen Unterdrückung jeglicher RNase-Aktivität.

2.4.8 α -Mannosidase Aktivitätsmessung

Als vakuolärer Marker diente die Aktivität der α -Mannosidase, einem vakuolären Markerenzym (Boller & Kende, 1979). Die Messung wurde in einem Infinite® 200 PRO Multimode Reader (Tecan, Crailsheim) durchgeführt. 100 μl des Reaktionsmixes wurden in den Wells einer transparenten 96 Well Platte vorgelegt und 5 - 50 μl Vakuoleninhalt auf den Stempel geladen. Die Reaktion wurde durch Zugabe des

Vakuoleninhalte gestartet. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 50 µl 0,8 M Borsäure abgestoppt. Anschließend wurde die Extinktion bei $\lambda=405$ nm bestimmt. Als Leerwert diente gleichbehandelter, denaturierter Vakuoleninhalt.

Die Berechnung der α -Mannosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$(1) a = \frac{\Delta E_{405 \text{ nm}} \cdot \rho}{V \cdot t}$$

a: Aktivität [U ml⁻¹]

V: Volumen des Vakuoleninhalts [ml]

ρ : spezifischer Koeffizient (0.0189 µmol)

ΔE : Extinktion

t: Zeit [min]

Diese Formel behält ihre Gültigkeit für die Nutzung von 4-Nitrophenyl- α -mannopyranosid, Wells mit einem Durchmesser von 5,5 - 6,2 mm und der Einhaltung der oben angegebenen Volumina.

Durch Quantifizierung der Vakuolen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ergab sich ein Verhältnis von 10⁶ Vakuolen pro 27 mU α -Mannosidase Aktivität.

Reaktionsmix:

1 Volumen 10 mM 4-Nitrophenyl- α -mannopyranoside

1 Volumen 0,1 M Zitronensäure, pH 4,5 (NaOH)

Borsäure:

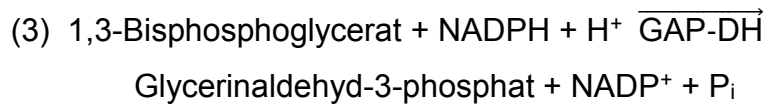
0,8 M Borsäure

pH 9,8 (KOH)

2.4.9 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Aktivitätsmessung

Die Messung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) Aktivität als Marker für Chloroplasten erfolgte nach Stitt *et al.* (1983). Hierzu wurde 20 µl Extrakt

für 10 min mit 175 µl Assay-Mix inkubiert. Folgende Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Phosphoglycerat gestartet:



Während der 10-minütigen Prä- und 30-minütigen Hauptinkubation wurde der GAP-DH abhängige Verbrauch der NADPH-Konzentration durch Ermittlung der Extinktion bei 340 nm in 30 s Intervallen in einem Infinite® 200 PRO Multimode Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen. Die Extinktion im linearen Bereich des Assays wurden zur Datenanalyse verwendet. Die Steigungen (m) während der Prä- und Hauptinkubation wurden ermittelt, um die Extinktionsänderung zu korrigieren ($m_{\text{korr.}} = m_{\text{Hauptinkubation}} - m_{\text{Präinkubation}}$). Die erhaltenen Änderungen in der Extinktion pro Minute wurden zunächst auf die α -Mannosidase Aktivität des im Assay eingesetzten Extraktes bezogen und im Folgenden relativ zur Aktivität in Protoplasten dargestellt.

GAPDH-Assay-Mix:

100 mM HEPES, pH 8,0 (KOH)

30 mM MgCl₂

20 mM KCl

2 mM EDTA, pH 8,0 (NaOH)

6,7 mM DTT

6,7 mM ATP

0,3 mM NADPH

600 nkat Phosphoglyceratkinase

2.4.10 UDP-Glucose-Pyrophosphorylase Aktivitätsmessung

Die Messung der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) Aktivität als cytosolischer Marker erfolgte nach Zrenner *et al.* (1993). Hierzu wurde 20 µl Extrakt für 10 min mit 175 µl Assay-Mix inkubiert. Folgende Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Natriumpyrophosphat gestartet:

(4) $\text{UDP-Glucose} + \text{P}_i \xrightarrow{\text{UGPase}} \text{Glucose-1-phosphat} + \text{UTP}$

(5) $\text{Glucose-1-phosphat} \xrightarrow{\text{PGM}} \text{Glucose-6-phosphat}$

(6) $\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{6-Phosphogluconolacton} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

Während der 10-minütigen Prä- und 30-minütigen Hauptinkubation wurde die UGPase Aktivität indirekt über den Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase vermittelten Aufbau von NADPH bestimmt. Die NADPH-Konzentration wurde photometrisch über die Extinktion bei 340 nm in 30 s Intervallen in einem Infinite® 200 PRO Multimode Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen. Die Extinktion im linearen Bereich des Assays wurden zur Datenanalyse verwendet. Die Steigungen (m) während der Prä- und Hauptinkubation wurden ermittelt, um die Extinktionsänderung zu korrigieren ($m_{\text{korr.}} = m_{\text{Hauptinkubation}} - m_{\text{Präinkubation}}$). Die erhaltenen Änderungen in der Extinktion pro Minute wurden zunächst auf die α -Mannosidase Aktivität des im Assay eingesetzten Extraktes bezogen und im Folgenden relativ zur Aktivität in Protoplasten dargestellt.

UGPase-Assay-Mix:

100 mM Tris-HCl, pH 8,0

2 mM MgCl_2

20 μM Glucose-1,6-bisphosphat

1,5 U ml^{-1} PGM

1,5 U ml^{-1} G6PDH

0,5 mM NADP^+

3 mM UDP-Glucose

2.4.11 Chromatographische Analyse der Adenylate

Um Nukleotide, Nukleoside und Nukleobasen mittels Fluoreszenzdetektion analysieren zu können, sind eine Reihe von Derivatisierungsreaktionen beschrieben, die sich jedoch nur auf eine bestimmte Base beschränken. Die Reaktion der Adenylate mit Chloracetaldehyd führt zur Bildung von fluoreszierenden 1,N⁶-Ethenoadenin-Derivaten, die über High Performance Liquid Chromatography (HPLC) nachgewiesen werden können. Zur Derivatisierung wurden zunächst *A. thaliana* Rosettenblätter von 4 - 6 Wochen alten Pflanzen in Stickstoff gemörsert, 100 mg

Pflanzenmaterial mit 400 µl Killmix vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit Anti-Killmix auf einen pH-Wert von 8 zurücktitriert. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 10 min wurde die Suspension bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand bis zur Verwendung auf Eis gelagert. 85 µl des Überstandes wurden mit 20 µl Citrat-Puffer und 20 µl Chloracetaldehyd-Lösung (50 % (v/v)) versetzt, gevortext und für 15 min bei 80 °C in einem Thermoblock (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) inkubiert. Zur Adenylatbestimmung der Vakuolen wurden 85 µl des Vakuoleninhaltes wie beschrieben derivatisiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese bei 18.000 g und Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert und 100 µl des Überstandes für die HPLC Analyse verwendet. Für die Identifizierung und Quantifizierung der Adenylate wurden Standards mit bekannter Konzentration gleichermaßen aufbereitet und gemessen. Die HPLC-Messung erfolgte durch ein DIONEX-System, bestehend aus P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 Automated Sample Injector, RF 2000 Fluoreszenzdetektor, UCI-50 Universal Chromatography Interface (Dionex, Sunnyvale, USA) und Nucleodur 100-5 C18 ec-Säule (Macherey-Nagel, Düren). Die Auftrennung der Derivate erfolgte über einen Gradienten von Laufmittel A zu Laufmittel B (Tab. 2.5). Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 1 ml min⁻¹ bei einer Temperatur von 30 °C (Tab. 2.6). Zur Analyse der Daten wurde die Software Chromeleon ver. 6.70 (Dionex, Sunnyvale, USA) verwendet.

Citrat-Puffer:

330 mM Zitronensäure

280 mM KH₂PO₄

pH 5,2 (KOH)

Kill-Mix:

7 % (v/v) Perchlorsäure

10 mM EDTA

Anti-Killmix:

5 M KOH

1 M Triethanolamin

Tabelle 2.5: Verwendeter Gradient für die HPLC-Analyse zur Bestimmung der Adenylatgehalte.

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|------------|--------------|--------------|
| 0 – 15 | 100 – 86 | 0 - 14 |
| 15 – 30 | 86 – 56 | 14 - 44 |
| 30 – 32 | 56 – 17,5 | 44 – 82,5 |
| 32 – 33 | 17,5 – 100 | 82,5 – 0 |
| 33 – 40 | 100 | 0 |

Tabelle 2.6: Daten zur HPLC-Messung der Adenylatgehalte.

| Gerät/Parameter | Spezifizierung |
|-----------------|---|
| Säule | Nucleodur 100-5 C18 ec-Säule |
| Flussrate | 1 ml min ⁻¹ |
| Laufmittel A | 10 mM KH ₂ PO ₄ , 5,7 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, pH 5,4 (KOH) |
| Laufmittel B | 90 % (v/v) Acetonitril |
| Temperatur | 30 °C |

2.4.12 Chromatographische Messung des RNA-Abbaus

RNase katalysierter Abbau von Ribonukleinsäuren kann zur Bildung von 2',3'-zyklischen Nukleotidmonophosphaten (2',3'-cNMPs) führen, die in den Puffer abgegeben werden. Zur Überprüfung eines solchen RNA-Abbaus in Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Vakuolen, wurde ein *in vitro* Test durchgeführt. Dabei wurden 10 µl pflanzliche RNA (0,5 µg µl⁻¹), 40 µl Citratpuffer und 50 µl Vakuoleninhalt (Kap. 2.4.6.1) für 16 h bei 22°C inkubiert. Als Referenz erfolgte die Inkubation von 50 µl denaturiertem Vakuoleninhalt mit 10 µl RNA (0,5 µg µl⁻¹) und 40 µl Citratpuffer für 16 h bei 22°C. Nach Abstoppen der Reaktion für 5 min bei 95°C im Thermoblock (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) wurden die entstandenen Abbauprodukte derivatisiert, mittels HPLC gemessen (Kap. 2.4.11), die Menge an gebildeten Adenylaten quantifiziert und die Produktion der Adenin-Derivate ausgerechnet.

Citrat-Puffer:

100 mM Zitronensäure

1 mM KCl

1 mM NaH₂PO₄

1 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

pH 4,5 (KOH)

2.4.13 Photometrische Messung des RNA-Abbaus

Die RNase-Aktivität in Vakuolen wurde zusätzlich über die Änderung der Konzentration an RNA in Anwesenheit vakuolärer Enzyme bestimmt. Der RNA-Abbau konnte dabei über die Fluoreszenzänderung von interkaliertem Ethidiumbromid in RNA (RNA-EtBr) photometrisch gemessen werden. Die verwendete RNA wurde aus *A. thaliana* isoliert und DNA Kontaminationen durch DNase Verdau entfernt (Kap. 2.3.9). 367 ng μl^{-1} RNA wurden für 30 min mit 77 μM EtBr inkubiert, anschließend mit 10x Volumen Natriumacetat-Puffer versetzt, gevortext und 120 μl in die Wells einer 96 Well Platte aus schwarzem Polystyrol (Greiner Bio One) pipettiert. Nach der 3-minütigen Präinkubation erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 30 μl Vakuoleninhalt. Als Referenzen dienten Wasser bzw. bekannte Mengen RNase A. Die Änderung der Fluoreszenz während der Prä- und Hauptinkubation bei einer Excitationswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 510$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 600$ nm wurde in einem Infinite[®] 200 PRO Multimode Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen. Für die Auswertung wurde eine nicht-lineare Regression mit Plateauphase zu Beginn angenommen und die Abbaurate K [s^{-1}], sowie der Determinationskoeffizient R^2 ausgerechnet. Um eine Aussage über die katalytische RNase-Aktivität in Vakuolen zu ermöglichen, wurde aus einer Konzentrationsreihe der RNase A eine Eichkurve erstellt, aus der man mit Hilfe der Abbaurate [s^{-1}] die katalytische Aktivität [μU] ablesen kann. Die katalytischen Aktivitäten der vakuolären Enzyme wurden auf die α -Mannosidase Aktivität des im Assay eingesetzten Extraktes normalisiert.

Natriumacetat-Puffer:

100 mM Natriumacetat

pH 5,5 (NaOH/Essigsäure)

2.4.14 Photometrische Messung der Phosphodiesterase-Aktivität

Die Messung der Phosphodiesterase-Aktivität erfolgte photometrisch in einem Infinite® 200 PRO Multimode Reader (Tecan, Crailsheim). Die Messung der Aktivität erfolgt indirekt über die Fluoreszenz von *p*-Nitrophenol, das durch Phosphodiesterasen aus Bis-(*p*-Nitrophenyl)-Phosphat Natrium Salz produziert wird. Die Durchführung erfolgte nach Abel *et al.* (2000).

2.5 Licht- und fluoreszenzmikroskopische Analysen

Die Auswertung der gefärbten Organellen erfolgte mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes (Leica TCS SP5 II, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Ein Argon-Laser ermöglichte die Anregung im Wellenlängenbereich von 351 nm bis 1092 nm, eine UV Diode im Ultraviolettbereich (405 nm). Für sämtliche Aufnahmen wurde ein „HCX PL APO lambda blue 63.0 x 1,2 Water UV“ Objektiv verwendet. Durch Aktivierung von Photomultipliern (PMT) konnte die Emission im Spektralbereich von 400 - 800 nm in definierten Wellenlängenbereichen (minimaler Detektionsbereich: 5 nm) detektiert und das Signal verstärkt werden. Die Anregungswellenlänge und der Detektionswellenlängenbereich unterschiedlicher (Fluoreszenz-) Farbstoffe sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen. Da das Chlorophyll der Chloroplasten bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, konnte die Chlorophyllfluoreszenz durch Aktivierung eines PMT im Wellenlängenbereich von 651 nm bis 704 nm sichtbar gemacht werden. Stellvertretend für die Fluoreszenzen wurden den Kanälen unterschiedliche Pseudofarben zugeordnet. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 400 Hz und die Auflösung 512x512 Pixel. Zur graphischen Darstellung wurde eine Serie von Bildern oder Einzelbilder digital aufgezeichnet, deren 3D-Rekonstruktion bzw. Einzelbildbearbeitung mit dem Programm „Leica Application Suite Advanced Fluorescence“ (LAS AF, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) erfolgte. Mit Neutralrot gefärbte Vakuolen wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Carl Zeiss Axioskop 50, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit einer Gesamtvergrößerung von 400x durchgeführt.

Tabelle 2.7: Anregungs- und Emissionseinstellungen unterschiedlicher Farbstoffe.

| Farbstoff | Anregung λ_{Ex} | Detektion λ_{Em} | Pseudofarbe |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|-------------|
| FM4-64 | 514 nm | 714 - 754 nm | Rot |
| MDC | 405 nm | 474 - 532 nm | Grün |
| SYTO RNASelect™ | 488 nm | 500 - 560 nm | Grün |

2.5.1 Induktion und quantitative Analyse der Autophagie

Für die Untersuchung des Einflusses der RNS2-Aktivität auf autophagische Prozesse wurden Keimlinge in Sterilkultur auf MS-Medium (Kap. 2.2.5) angezogen und die Keimlinge nach 7 Tagen auf frische Platten überführt und die Autophagie durch Dunkelinkubation induziert. Nach viertägiger Inkubation erfolgte die Analyse der Autophagosombildung der 11 Tage alten Keimlingswurzeln. Hierfür wurden die Autophagosome (ATGs) mit dem autophagosomspezifischen Farbstoff Monodansylcadaverin (MDC) gefärbt. Die Anzahl der freibeweglichen ATGs in der Fokusebene wurden gezählt und durch die Anzahl der sichtbaren Zellen in der Ebene dividiert. Der so erhaltene Wert entspricht der Anzahl der ATGs pro Zelle für die untersuchte Region. Die Daten aller Regionen aus mindestens 70 Zellen wurden gemittelt.

2.5.2 Autophagosomfärbung mit Monodansylcadaverin

Monodansylcadaverin ist ein autofluoreszierendes Amin, das zur Färbung von Autophagosomen verwendet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass das saure Milieu der Autophagosome, als auch die Interaktion des Farbstoffes mit Lipidmolekülen, die zu einem großen Anteil in Autophagosomen zu finden sind, zu einer spezifischen Färbung dieser Strukturen führt (Niemann *et al.*, 2000). *A. thaliana* Vakuolen wurden mit einer Monodansylcadaverin (MDC) Endkonzentration von 50 μ M gefärbt und umgehend analysiert, da die Autofluoreszenz von MDC mit der Zeit nachlässt. Aufnahme- und Auswertungseinstellungen sind Kap. 2.5 zu entnehmen.

2.5.3 Membranfärbung mit FM4-64

Der amphiphile Styryl-Farbstoff FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl-hexatrienyl)pyridiniumdibromid) kann genutzt werden, um Membranen selektiv zu markieren, da die Fluoreszenz in hydrophober Umgebung signifikant höher ist als in hydrophilem Milieu (Bolte *et al.*, 2004). 100x Stocklösungen

(5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, gelöst in Wasser) wurden lichtgeschützt bei -20°C für 2 Wochen gelagert. 100 μl Vakuolenlösung wurde mit 1 μl der Stocklösung durch vorsichtiges Pipettieren vermischt und sofort mikroskopisch analysiert. Aufnahme- und Auswertungseinstellungen sind Kap. 2.5 zu entnehmen.

2.5.4 Selektive Färbung der RNA mit SYTO RNASelect™

Der Farbstoff SYTO RNASelect™ ist ein membranpermeabler Nukleinsäurefarbstoff, der selektiv Ribonukleinsäure färbt. Lediglich schwache Fluoreszenz ist detektierbar bei Anwesenheit von DNA. Vakuolen wurden mit 50 μM SYTO RNASelect™ für 20 min inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert. Aufnahme- und Auswertungseinstellungen sind Kap. 2.5 zu entnehmen.

2.5.5 Neutralrotfärbung intakter Vakuolen

Neutralrot ist ein leicht kationischer Farbstoff, der durch Diffusion und Endozytose in die Zelle gelangt und dort an anionische Reste der Membranen bindet. Neutralrot wird in saurem Milieu zum Ion und färbt sich rot. Da intakte Vakuolen ein pH-Wert von circa 5,0 besitzen, erscheinen sie im Lichtmikroskop rot. Eine 0,1 % Neutralrot Stocklösung (1 g l^{-1} Neutralrot in 2 ml l^{-1} 1 % Essigsäure und 500 $\mu\text{l l}^{-1}$ Chloroform) wurde in Wasser angesetzt und bei RT gelagert. Vakuolenlösungen oder Lysispuffer wurden mit 1:100 der Stocklösung versetzt und lichtmikroskopisch analysiert. Aufnahmeeinstellungen sind Kap. 2.5 zu entnehmen.

2.6 RNA-Sequenzierung über *Next Generation Sequencing* (NGS)

Der Begriff RNA-Sequenzierung bezeichnet ein Verfahren, bei dem zunächst Adapter an einzelsträngige RNA ligiert werden und die RNA anschließend in cDNA umgeschrieben wird. Meist folgt ein Amplifikationsschritt durch PCR, sodass bei der nachfolgenden Sequenzierung mehr Ausgangsmaterial vorhanden ist. Der Begriff ist also leicht irreführend, da die sequenzierten Basen aus DNA-Molekülen stammen. Bei dem *Next Generation Sequencing* mit Brückensynthese von Illumina werden zu den Adaptern revers-komplementäre Sequenzen an eine zweidimensionale Trägerplatte (*Flow Cell*) immobilisiert. Somit können die cDNA-Sequenzen an die Trägerplatte hybridisieren und mittels PCR amplifiziert werden, wobei der neu amplifizierte Strang kovalent an der Trägerplatte verbleibt und der Ausgangsstrang abgewaschen wird. Die nun einzelsträngige, kovalent gebundene DNA-Sequenz kann mit einem

benachbarten Adapter hybridisieren und so eine Brücke ausbilden. Die nachfolgende PCR vervielfältigt den Strang und führt zur Bildung einer doppelsträngigen Brücke (Brückenamplifikation). Diese Brückenamplifikation wird wiederholt und letztendlich lediglich die reversen Stränge von der Oberfläche abgetrennt, sodass die Matrizenstränge auf der Oberfläche verbleiben (*Cluster*). Für die Sequenzierung der *Cluster* wird ein universeller Primer an die Adapter der DNA-Fragmente hybridisiert. Die Sequenzierung der generierten *Cluster* erfolgt auf Basis der Replikation des komplementären Strangs mit reversiblen Farbstoff-Terminatoren. Die vier unterschiedlichen Nukleotide besitzen eine Blockierungsgruppe, sowie vier unterschiedliche Fluorophore. In jedem Sequenzierzyklus wird nur ein Nukleotid komplementär zu der Matrize eingebaut. Anschließend wird das Fluorophor abgespalten, das folgende Lichtsignal der über 150 Millionen *Cluster* detektiert und die Terminatorgruppe entfernt, so dass ein weiteres Nukleotid im folgenden Zyklus eingebaut werden kann (Liu *et al.*, 2012).

2.6.1. Herstellung der cDNA-Bibliotheken

Die cDNA-Bibliotheken wurden nach dem „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit (New England Biolabs) mit einigen Anpassungen hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienten 2 µl der vakuolären RNA (DGZ) bzw. 2 µl einer 1:100 Verdünnung der NAF-vakuolären und protoplastidären RNA, an die zunächst der 3' SR Adapter ligiert wurde. Die Ligation erfolgte bei 16°C für 18 h, um die Ligationseffizienz von methylierter RNA zu erhöhen. Durch die nachfolgende Hybridisierung des 3' SR Primers wurde die Bildung von Adapterdimeren verhindert. Überschüssige Adapter hybridisieren mit dem Primer und bilden so doppelsträngige DNA, die nicht als Substrat für die anstehende Ligation des 5' SR Adapters dient. Nach der Adapterligation erfolgte die reverse Transkription und somit die Umschreibung der RNA in cDNA. Zur Vervielfältigung des Ausgangsmateriales und der Einführung der spezifischen Indices erfolgte eine PCR mit 15 Zyklen. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss aufgereinigt (Kap. 2.3.13) und die DANN-Konzentration fluorometrisch bestimmt (Kap. 2.3.16).

2.6.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Die Sequenzierinstrumente von Illumina der HiSeq-Serie, sowie der MiSeq verwenden als Sequenzierprinzip die Brückensynthese (Kap. 2.6). Die Sequenzierung der cDNA-

Bibliotheken erfolgte überwiegend im „Rapid-run“-Modus auf dem HiSeq2500. Hierfür wurde das „TruSeq Rapid SBS“-Kit mit dem „TruSeq Rapid SR Cluster“-Kit (Illumina) mit einer *Rapid Run Flow Cell* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Drei Bibliotheken wurden zusätzlich mit dem MiSeq sequenziert. Hierfür wurde das „MiSeq Reagent v2“-Kit (Illumina) mit einer *Standard Flow Cell* verwendet.

2.6.3 Datenauswertung

2.6.3.1 Trimming

Die Datenverarbeitung erfolgte in Anlehnung an Trapnell *et al.* (2012) mit einigen Anpassungen der Parameter. Zur Entfernung von Adaptersequenzen wurde die entsprechende Nukleotidabfolgen (Tab. 2.4) in Cutadapt hochgeladen und aus den Datensätzen entfernt. Dabei wurden, abhängig von der Sequenzlänge, Mismatches zugelassen. In Tabelle 2.8 sind die hierzu aufgestellten Regeln zusammengefasst.

Tabelle 2.8: Anzahl der erlaubten Mismatches in Abhängigkeit der sequenzierten Adapterlänge.

| Länge der Adaptersequenz [bp] | Anzahl der erlaubten Fehler |
|-------------------------------|-----------------------------|
| 0 - 4 | 0 |
| 5 - 9 | 1 |
| 10 - 14 | 2 |
| 15 - 19 | 3 |
| 20 - 24 | 4 |
| 25 - 29 | 5 |
| 30 - 34 | 6 |
| 35 - 39 | 7 |
| 40 - 44 | 8 |
| 45 - 49 | 9 |
| 50 - 54 | 10 |
| 55 - 59 | 11 |
| 60 - 64 | 12 |

2.6.3.2 Mapping

Nach der Prozessierung der Rohsequenzen erfolgte das Mapping gegen das *A. thaliana* Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit Hilfe des Software-Tools TopHat (Trapnell *et al.*, 2012). Die Parametereinstellungen von TopHat wurden dabei so gewählt, dass lediglich Sequenzen mit einer Mindestlänge von 12 bp gemappt und bis zu 20 multiple Positionen pro Sequenz gesucht und ausgegeben wurden. Das Tool ist für Transkriptom-Analysen optimiert und kann einzelne Sequenzen so auf das Referenz-Genom verteilen, dass Exon-Intron-Übergänge berücksichtigt werden. Die Ausgabe erfolgt im BAM-Format. Die Mapping-Ergebnisse wurden mit dem "Integrated Genomic Viewer" (Robinson *et al.*, 2011), erhältlich unter <https://www.broadinstitute.org/software/igv/home>, visualisiert.

2.6.3.3 Berechnung der Abundanzen bezüglich RNA-Loci

Die Berechnung der Abundanzen erfolgte mit dem Programm multicov aus der BEDTools-Suite (<http://bedtools.readthedocs.org>). Dieses Programm ordnet die von TopHat alignierten Sequenzen jeweils überlappenden RNA-Loci zu und zählt pro RNA-Locus die überlappenden Sequenzen (*Counts*). Dabei wurden duplizierte Sequenzen nicht gezählt. Die RNA-Loci wurden einer Annotierungsdatei im GFF3-Format entnommen. Grundlage dieser Annotierungsdatei war die aktuellste Veröffentlichung einer Arabidopsis-Genom-Annotierung, TAIR10, die von "The Arabidopsis Information Resource" bereitgestellt wird (Lamesch *et al.*, 2012). Diese wurde um die in der Literatur beschriebenen rRNA-Loci ergänzt (Layat *et al.*, 2012). Die im Genom annotierten rRNA-Bereiche auf Chromosom 2, 3, 4 und 5 sind in Tabelle 2.9 nachzulesen. Das Tool multicov verlangt die vorherige Sortierung der BAM-Dateien, was mit dem Programm sort aus der SAMTools-Suite durchgeführt wurde. Die weitere statistische Verarbeitung und Visualisierung erfolgte in der Skriptsprache R. Um die von BEDTools-multicov errechneten *Counts* pro RNA-Locus in Bezug auf die verschiedenen Bibliotheken (C1 - C15 HiSeq, C1 - C3 MiSeq) vergleichen zu können, müssen die *Counts* bezüglich der Größe der jeweiligen Bibliothek normalisiert werden. Diese Normalisierung erfolgt für jede Bibliothek bezüglich des 75%-Quantils der Verteilung der *Counts* auf die Gesamtmenge der RNA-Loci. Hierbei wurde das 75%-Quantil dem Median (50%-Quantil) vorgezogen, weil insbesondere bei den kleinen Bibliotheken die überwiegende Mehrheit der RNA-Loci mit keiner Sequenz überlappt (*Counts* = 0) und daher der Median den Wert 0 annimmt. Das 75%-Quantil liegt über

dieser Schwelle und ist daher für die Normalisierung besser geeignet. Die *Counts* wurden aber weder bezüglich der Sequenzlängen noch bezüglich der Länge des annotierten RNA-Locus normalisiert.

Tabelle 2.9: rRNA Bereiche auf den Chromosomen des Kerngenoms.

| Chromosom | Start | Ende | Bezeichnung | RNA-Typ |
|-----------|----------|----------|-------------|---------|
| Chr2 | 3706 | 5513 | AT2G01010.1 | 18S |
| Chr2 | 5782 | 5945 | AT2G01020.1 | 5,8S |
| Chr2 | 6134 | 9520 | AT2X25S00 | 25S |
| Chr3 | 14197677 | 14199484 | AT3G41768.1 | 18S |
| Chr3 | 14199753 | 14199916 | AT3G41979.1 | 5,8S |
| Chr3 | 14200105 | 14203491 | AT3X25S00 | 25S |
| Chr4 | 3054703 | 3054823 | AT4X05S01 | 5S |
| Chr4 | 3055201 | 3055321 | AT4X05S02 | 5S |
| Chr4 | 3057162 | 3057282 | AT4X05S03 | 5S |
| Chr4 | 3057660 | 3057780 | AT4X05S04 | 5S |
| Chr4 | 3058656 | 3058776 | AT4X05S05 | 5S |
| Chr4 | 3059154 | 3059274 | AT4X05S06 | 5S |
| Chr4 | 3060150 | 3060270 | AT4X05S07 | 5S |
| Chr4 | 3060648 | 3060768 | AT4X05S08 | 5S |
| Chr4 | 3055699 | 3055819 | AT4X05S09 | 5S |
| Chr4 | 3056197 | 3056317 | AT4X05S10 | 5S |
| Chr4 | 3058158 | 3058278 | AT4X05S11 | 5S |
| Chr4 | 3061146 | 3061266 | AT4X05S12 | 5S |
| Chr5 | 11185800 | 11185920 | AT5X05S01 | 5S |
| Chr5 | 11186302 | 11186422 | AT5X05S02 | 5S |
| Chr5 | 11184796 | 11184916 | AT5X05S03 | 5S |
| Chr5 | 11185298 | 11185418 | AT5X05S04 | 5S |
| Chr5 | 11186806 | 11186925 | AT5X05S05 | 5S |
| Chr5 | 11312442 | 11312557 | AT5X05S06 | 5S |
| Chr5 | 11314775 | 11314893 | AT5X05S07 | 5S |

3 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation gliedert sich im Wesentlichen in zwei Teile: (I) Vakuolärer Ribonukleinsäure (RNA) Metabolismus und (II) equilibrativer Transport von Nukleosiden – den Abbauprodukten der RNA.

RNA-abbauende Enzyme oder Ribonukleasen (RNasen) aus Pflanzen werden seit den frühen 80er Jahren studiert (Wilson, 1982). So konnte bereits damals die Beteiligung von RNasen an der Selbstinkompatibilität in unterschiedlichen Pflanzenfamilien nachgewiesen werden, was für die Namensgebung dieser Proteinfamilie verantwortlich war: S-RNasen (McClure *et al.*, 1989). Doch auch in anderen Pflanzen, die in der Lage sind sich selbst zu befruchten, entdeckte man strukturell ähnliche RNasen (S-like-RNasen). So besitzt *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) fünf putative S-like-RNasen (Hillwig *et al.*, 2011). Diese Enzyme besitzen Funktionen abseits des „klassischen“ RNA-Metabolismus im Abbau von endogener RNA während der Seneszenz, der Keimung, bei Phosphatmangel oder anderen Stresssituationen. Die putative S-like-RNase 2 (RNS2) aus *A. thaliana*, ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER), ER-ähnlichen Strukturen und in der Vakuole lokalisiert (Hillwig *et al.*, 2011). Zwar konnte ein Zusammenhang zwischen RNS2-Aktivität und dem Abbau ribosomaler RNA (rRNA) gezeigt werden (Hillwig *et al.*, 2011), allerdings ist das Wissen über die Beteiligung an nukleolytischen Prozessen der vakuolären Enzyme sehr limitiert. Der erste Abschnitt der Dissertation beschäftigt sich daher unter anderem mit dem Nachweis und der Qualität vakuolärer RNA. Es ist nicht bekannt, welche RNA-Typen in *A. thaliana* Vakuolen zu finden sind, welche Größe diese RNA besitzt und ob das Fehlen der RNS2-Aktivität einen Einfluss auf die Zusammensetzung vakuolärer RNA besitzt.

Die nur beim Abbau von RNA und Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorkommenden Nukleoside werden durch Transporter einer einzigen Proteinfamilie, den Equilibrativen Nukleosidtransportern (ENTs) intra- und interzellulär verteilt (Cornelius *et al.*, 2011). Da der Abbau vakuolärer RNA zur Bildung von Nukleosiden führt, die Metabolisierung allerdings im Cytosol stattfindet, ist ein Transport aus der Vakuole zur Remobilisierung oder dem finalen Abbau notwendig (Bernard *et al.*, 2011; Vickers *et al.*, 2000). ENT1, ein tonoplastidär lokalisierter Nukleosidtransporter in *A. thaliana*, ist als einziger Vertreter der ENTs in der Lage, eine solche Funktion zu übernehmen. *ENT1*-T-DNA-Insertionslinien sollen daher charakterisiert und hinsichtlich der Veränderung der

vakuolären Zusammensetzung der RNA-Abbauprodukte und anderer, ENT1-typischer Parameter, untersucht werden. Neben ENT1 weisen vier der insgesamt acht Vertreter dieser Proteinfamilie in *A. thaliana* einen Protonen-abhängigen Transportmechanismus auf (Li *et al.*, 2003; Möhlmann *et al.*, 2001; Traub *et al.*, 2007; Wormit *et al.*, 2004). Somit unterscheiden sie sich funktionell klar von ihren namensgebenden Vertretern aus Säugetieren, die einen equilibrativen Transport abhängig von der Nukleosidkonzentration ermöglichen (Baldwin *et al.*, 2005; Visser *et al.*, 2007). Da zwischen Cytosol und Apoplast bzw. Cytosol und Vakuole pH-Unterschiede herrschen, ist *in vivo* durch diese ENT-Vertreter lediglich ein Transport in das Cytosol möglich. ENT7 scheint in Bezug auf dieses Merkmal die einzige Ausnahme in *A. thaliana* zu bilden und Substrate abhängig ihrer Konzentration sowohl in die Zelle hinein, als auch aus der Zelle hinaus transportieren zu können (Wormit *et al.*, 2004). Der putativ plasmamembranständige ENT7 und tonoplastidäre ENT1 spielen demnach eine Schlüsselrolle für die inter- wie intrazelluläre Verteilung der Produkte vakuolär abgebauter RNA. Beide Transporter wurden bereits in der Vergangenheit biochemisch und physiologisch untersucht (Bernard *et al.*, 2011; Möhlmann *et al.*, 2001; Wormit *et al.*, 2004)

Da die Aufreinigung von funktionellem Protein aus der ENT-Transporterfamilie bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, war es ein weiteres Ziel dieser Dissertation, ein optimiertes Expressions- und Aufreinigungssystem für ENTs zu etablieren. Das gereinigte Protein bietet die Möglichkeit, den oligomeren Zustand und die Bindungseigenschaften zu bekannten und potentiellen Substraten zu untersuchen. Letztendlich dient dieser Teil der Arbeit als erster Schritt für Mutations- und Kristallisationsstudien.

3.1 Molekulare Charakterisierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien

3.1.1 Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion in das Gen *ENT1*

Der Nukleosidtransporter ENT1 aus *A. thaliana* besitzt ein breites Substratspektrum und ist essentiell für eine effiziente Pollenkeimung, Pollenentwicklung sowie für das vegetative Wachstum der Pflanze (Bernard *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse konnten mit Hilfe von 35S:*ENT1*- und *ENT1*-RNAi-Linien gewonnen werden (Bernard *et al.*, 2011). Für weitere physiologische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit,

neben diesen bestehenden Linien, zwei weitere unabhängige *ENT1*-T-DNA-Insertionslinien identifiziert und analysiert.

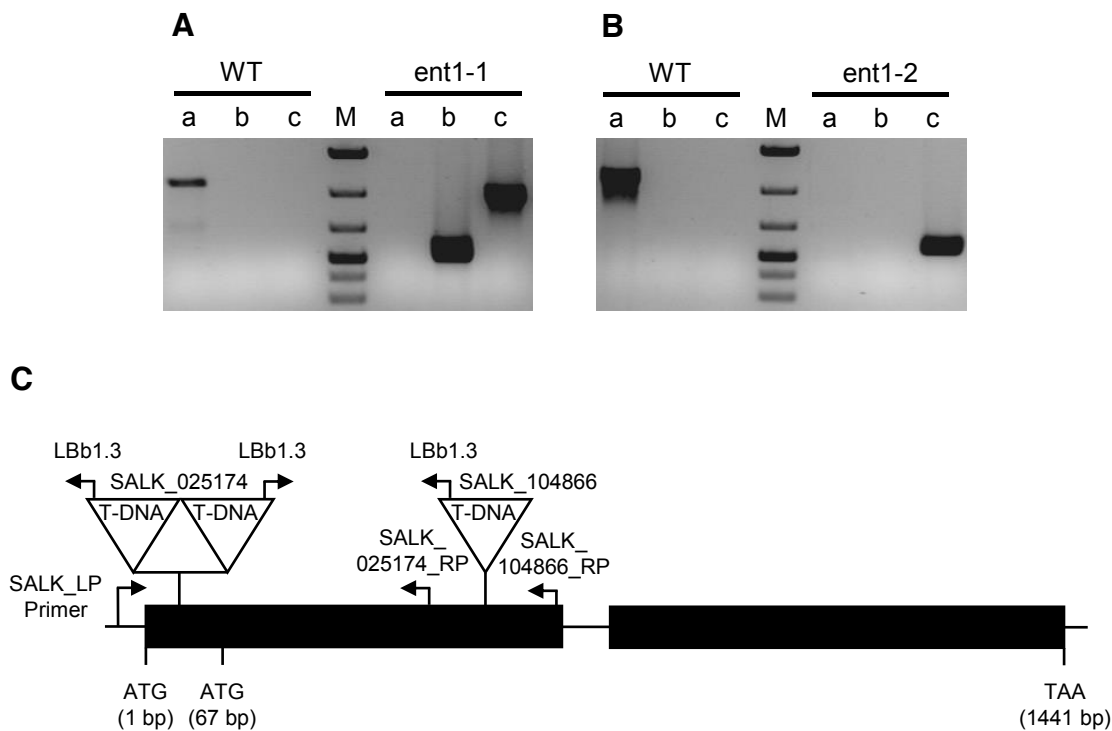


Abbildung 3.1: Genetische Charakterisierung der *ENT1*-T-DNA-Insertionsmutanten auf Ebene der genomischen DNA. (A) PCR-Analyse auf genomische DNA von Wildtyp-Pflanzen (WT) und der *ENT1*-T-DNA-Insertionsmutante ent1-1 (SALK_104866). a: Genspezifische Primerkombination Salk_104866_LP und Salk_104866_RP (1119 bp). b: T-DNA spezifische Primerkombination Salk_104866_LP und LBb1.3. c: T-DNA spezifische Primerkombination Salk_104866_RP und LBb1.3. (B) PCR-Analyse auf genomische DNA von Wildtyp-Pflanzen (WT) und der *ENT1*-T-DNA-Insertionsmutante ent1-2 (SALK_025174). a: Genspezifische Primerkombination Salk_025174_LP und Salk_025174_RP (1117 bp). b: T-DNA spezifische Primerkombination Salk_025174_LP und LBb1.3. c: T-DNA spezifische Primerkombination Salk_025174_RP und LBb1.3. GeneRuler 1 kb plus DNA (Thermo Scientific, Karlsruhe) diente als Größenstandard (M). (C) Schema der Exon- und Intronstruktur des *ENT1* Gens, sowie die Position der T-DNA-Insertionen in den Linien SALK_025174 und SALK_104866 im 1. Exon. Die schwarzen Rechtecke repräsentieren die Exons innerhalb des *ENT1* Gens. Introns, sowie nicht-translatierte Regionen sind durch die schwarze Linie, die Bindestellen der Primer durch Pfeile dargestellt.

Für die Bestätigung der Homozygotie der Linie Salk_104866 (ent1-1) und SALK_025174 (ent1-2) wurde genomische DNA (gDNA) von putativen *ENT1*-T-DNA-Insertionspflanzen isoliert (Kap. 2.3.12) und als Matrize für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) mit genspezifischen und T-DNA spezifischen Primerkombinationen eingesetzt. Unter Verwendung der genspezifischen Primer

erhielt man mit Wildtyp-DNA eine Bande mit der Größe von circa 1100 bp, was der erwarteten Größe von 1119 bp entsprach. Mit der gDNA der homozygoten ent1-1-, als auch der homozygoten ent1-2-Linie als Matrize entstand mit dieser Primerkombination kein Produkt (Abb. 3.1A,B). Nutzte man jedoch T-DNA-spezifische Primerkombinationen, konnte mit Matrizen-gDNA isoliert aus *ENT1*-T-DNA-Insertionspflanzen ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Bei Verwendung von gDNA aus Wildtyp-Pflanzen war dies nicht festzustellen. Damit handelte es sich auf genomischer Ebene um zwei homozygote T-DNA-Insertionslinien mit spezifischer T-DNA-Insertion im codierenden Bereich des *ENT1* (Abb. 3.1C).

Zur Überprüfung des vollständigen Transkriptverlustes, wurde die jeweilige RNA isoliert (Kap. 2.3.9) und mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Kap. 2.3.10). Diese diente für die anschließenden PCR-Reaktionen als Matrize. Das in der Datenbank Aramemnon (Schwacke *et al.*, 2003) annotierte *ENT1*-Gen besitzt eine Länge von 1353 bp (*ENT1l*). Bei der biochemischen Charakterisierung des *ENT1* im Jahr 2001 wurde jedoch ein auf 1287 bp verkürztes Gen exprimiert (Möhlmann *et al.*, 2001), das durch ein alternatives Start-Codon im annotierten Bereich transkribiert werden kann (*ENT1k*; Abb. 3.1C). Unter Verwendung spezifischer Primer sollte überprüft werden, welche Version des *ENT1* in Wildtyp-Pflanzen vorlag und ob die T-DNA-Insertion in den identifizierten Linien zum vollständigen Verlust des vorliegenden Transkripts führte.

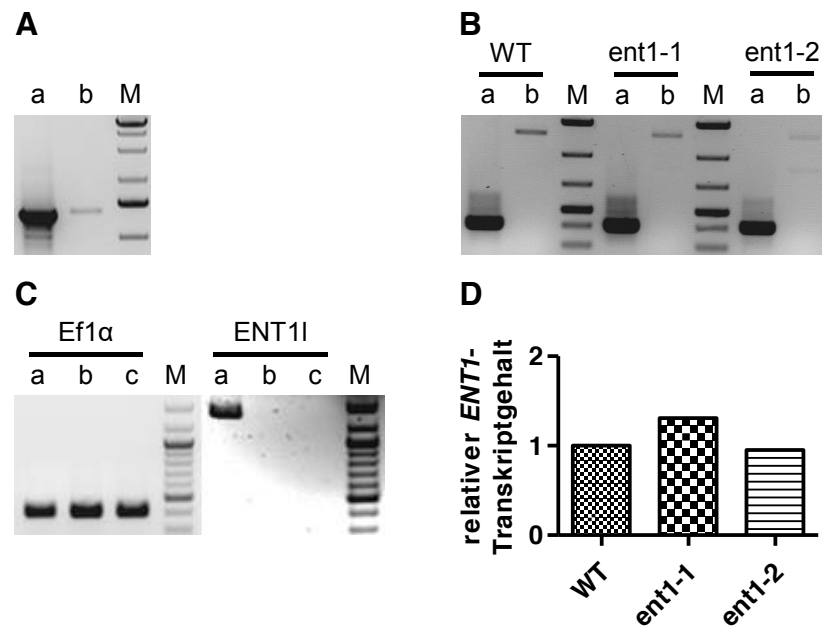


Abbildung 3.2: Genetische Charakterisierung der *ENT1*-T-DNA-Insertionsmutanten auf transkriptioneller Ebene. (A) PCR-Analyse auf cDNA von Wildtyp-Pflanzen mit Volllänge-Primern spezifisch für die verkürzte Version des *ENT1* (1287 bp; a) bzw. Volllänge-Primern spezifisch für die annotierte (lange) Version des *ENT1* (1353 bp; b). GeneRuler 1 kb plus DNA (Thermo Scientific, Karlsruhe) diente als Größenstandard (M). (B) PCR-Analyse zur Überprüfung des vollständigen Transkriptverlustes der verkürzten Version des *ENT1* in homozygoten *ENT1*-T-DNA-Insertionsmutanten. a: Kontroll-PCR mit den *Ef1α*-spezifischen Primern *Ef1α_fwd* und *Ef1α_rev* (404 bp). b: Genspezifische Primerkombination *ENT1k_fwd* und *ENT1_rev* (1287 bp). GeneRuler 1 kb plus DNA (Thermo Scientific, Karlsruhe) diente als Größenstandard (M). (C) PCR-Analyse zur Überprüfung des vollständigen Transkriptverlustes der annotierten Version des *ENT1* in homozygoten *ENT1*-T-DNA-Insertionsmutanten. Als Kontroll-PCR dienten Ansätze mit *Ef1α*-spezifischen Primern *Ef1α_fwd* und *Ef1α_rev* (*Ef1α*; 404 bp). Die Überprüfung des Transkriptgehaltes in Wildtyp-, *ent1-1*- und *ent1-2*-Pflanzen erfolgte unter Nutzung der Volllängeprimer *ENT1l_fwd* und *ENT1_rev* (*ENT1l*; 1353 bp). a: Wildtyp. b: *ent1-1*. c: *ent1-2*. GeneRuler Mix (Thermo Scientific, Karlsruhe) diente als Größenstandard (M). (D) Quantitative RT-PCR-Analysen. Mit Hilfe quantitativer RT-PCR-Analysen wurden die transgenen Pflanzenlinien zusätzlich auf ihren *ENT1*-Resttranskriptgehalt untersucht. Als Referenz diente das *Housekeeping*-Gen *EF1α* (*At1g07930*). Die Expression von *ENT1* im Wildtyp wurde gleich 1 gesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet.

Das Transkript der annotierten Version des *ENT1* diente lediglich für die Primerkombination *ENT1l_fwd* und *ENT1l_rev* als Matrize. Mit der Nutzung der Primerkombination der Kurzversion standen sowohl das Transkript der Kurzversion, als auch das Transkript der Langversion des *ENT1* als Matrize zur Verfügung. Die Primereffizienz beider Primerkombinationen lag im Bereich von 74 - 78 %. Aus Abbildung 3.2A ist zu schließen, dass die Kurzversion abundanter war als die Langversion. Sowohl mit cDNA aus *ent1-1*- als auch mit cDNA aus *ent1-2*-Pflanzen

konnte mit Volllänge Primer für die kurze Version Transkript mit der erwarteten Größe von circa 1300 bp amplifiziert werden (Abb. 3.2B). Die PCR mit spezifischen Primern für die annotierte Version führte ebenfalls zur Bildung von PCR-Produkten mit cDNA aus Wildtyp-Pflanzen, nicht jedoch mit cDNA aus ent1-1- oder ent1-2-Pflanzen (Abb. 3.2C). Zur Kontrolle der aus ent1-1- und ent1-2-Pflanzen isolierten cDNA wurde zudem eine PCR mit *Ef1 α* -spezifischen Primern durchgeführt. Diese lieferte bei allen Genotypen und verwendeten cDNA-Isolationen ein Produkt von 404 bp. Somit konnte bestätigt werden, dass die eingesetzte cDNA intakt war. Neben der PCR auf beide Volllängeprodukte wurden zusätzlich quantitative RT-PCR-Studien durchgeführt (Abb. 3.3D), mit deren Hilfe der Transkriptgehalt beider *ENT1*-Varianten erfasst werden konnte. Die eingesetzten Primer banden im 1. Exon hinter der T-DNA-Insertion der Linie SALK_104866 (vgl. Abb. 3.1C) und zu Beginn des 2. Exons. Die Linien ent1-1 und ent1-2 zeigten einen Transkriptgehalt von 100 - 120 % in Bezug auf Wildtyp-Pflanzen und bestätigten somit, dass es sich um T-DNA-Insertionslinien handelte, die allerdings zu keinem Verlust des Transkriptes führen. Alle durchgeführten Analysen zeigten keine Auswirkungen der T-DNA-Insertion im codierenden Bereich des *ENT1* auf zum Teil bereits beschriebene *ENT1*-kritische Parameter (Bernard *et al.*, 2011), wie Pollenmorphologie, Adenylatgehalte der Pflanzen, Adenylatgehalte der Vakuole, Ertragsparameter, Phosphatmangel, Stickstoffmangel, Seneszenz, Autophagie, Enzymaktivitäten der Adenosinkinase und Adeninphosphoribosyltransferase oder die Expression von Genen, die an Autophagie (*ATG5*, *ATG7*, *ATG8*), Nukleosidtransport (*ENT2* bis *ENT8*), Seneszenz (*SAG12*) oder RNA-Abbau (*RNS1*, *RNS2*) beteiligt sind (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion in das Gen *RNS2*

Die Expression der S-like-RNase *RNS2* in *A. thaliana* ist nicht auf einzelne Gewebe oder Entwicklungsstufen beschränkt, sondern wurde als konstitutiv beschrieben (Hruz *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl Phosphatmangel als auch Seneszenz zur Induktion der *RNS2*-Genexpression führen. Die Funktion im ER und in der Vakuole lokalisierten *RNS2* liegt dabei zum einen im „normalen“ rRNA-Umsatz, zum anderen ist sie verantwortlich für das Recycling von RNA, um die Nährstoffverfügbarkeit zu verbessern. In Untersuchungen an *RNS2*-*Antisense*- und *RNS2*-T-DNA-Insertionspflanzen konnte ein erhöhter Anthocyanengehalt (Bariola *et al.*, 1999) und ein veränderter Abbau von rRNA gezeigt werden (Hillwig *et al.*, 2011).

Neben einer schon bekannten *RNS2*-T-DNA-Insertionslinie (SALK_069588) wurde eine weitere, unabhängige *RNS2*-T-DNA-Insertionslinie identifiziert. Im weiteren Verlauf wird die Linie SAIL_338_G11 als *rns2-1* und die Linie SALK_069588 als *rns2-2* bezeichnet. Für die Bestätigung der Homozygotie beider Linien wurde zum einen die T-DNA-Insertion auf Ebene der gDNA und zum anderen der vollständige Verlust des Transkripts auf cDNA-Ebene überprüft.

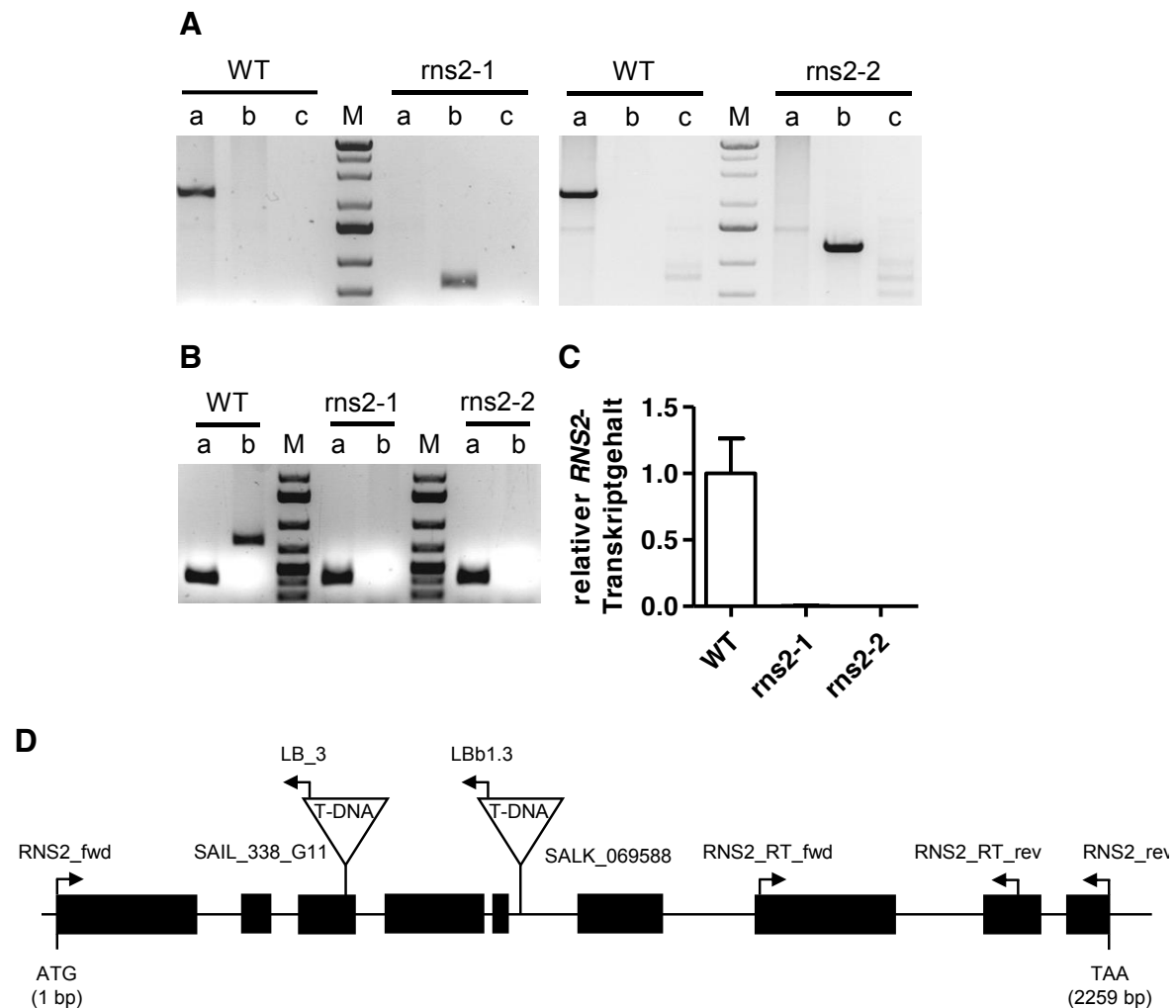


Abbildung 3.3: Genetische Charakterisierung der *RNS2*-T-DNA-Insertionsmutanten. (A) PCR-Analyse auf genomischer DNA von Wildtyp-Pflanzen und *RNS2*-T-DNA-Insertionsmutanten der Linie SAIL_338_G11, bezeichnet als *rns2-1* und der Linie SALK_069588, bezeichnet als *rns2-2*. a: Genspezifische Primerkombination *RNS2*_fwd und *RNS2*_rev. b: T-DNA spezifische Primerkombination *RNS2*_fwd und LB_3 für *rns2-1* bzw. *RNS2*_fwd und LBb1.3 für *rns2-2*. c: T-DNA spezifische Primerkombination LB_3 und *RNS2*_rev für *rns2-1* bzw. LBb1.3 und *RNS2*_rev für *rns2-2*. (B) PCR-Analyse zum Nachweis des vollständigen Transkriptverlustes in homozygoten *RNS2*-T-DNA-Insertionsmutanten. a: Kontroll-PCR mit den *Ef1 α* -spezifischen Primern *Ef1 α* _fwd und *Ef1 α* _rev. b: Genspezifische Primerkombination *RNS2*_fwd und *RNS2*_rev. (C) Mit Hilfe quantitativer RT-PCR-Analysen wurden die transgenen Pflanzenlinien zusätzlich auf ihren *RNS2*-Resttranskriptgehalt untersucht. Als Referenz diente das *Housekeeping*-Gen *EF1 α* (At1g07930). Die Expression von *RNS2*

im Wildtyp wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Daten aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. (D) Schema der Exon- und Intronstruktur des *RNS2*-Gens sowie die Position der T-DNA-Insertionen im 3. Exon der Linie SAIL_338_G11 und im 5. Intron der Linie SALK_069588 wurden durch Sequenzierung des T-DNA spezifischen PCR-Produktes bestätigt. Die schwarzen Rechtecke repräsentieren die Exons innerhalb des *RNS2*-Gens. Introns, sowie nicht-translatierte Regionen sind durch die schwarze Linie, die Bindestellen der Primer durch Pfeile dargestellt. GeneRuler 1 kb plus DNA (Thermo Scientific, Karlsruhe) diente als Größenstandard (M). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet.

Für die Bestätigung der Homozygotie der Linien *rns2-1* und *rns2-2* wurde zunächst gDNA von putativen T-DNA-Insertionspflanzen isoliert (Kap. 2.3.12) und als Matrize für PCR-Reaktionen mit genspezifischen und T-DNA spezifischen Primerkombinationen verwendet. Unter Verwendung der genspezifischen Primer erhielt man im Wildtyp ein Produkt mit der Größe von circa 2200 bp, was der erwarteten Größe von 2263 bp entsprach. Mit gDNA aus den Linien *rns2-1* und *rns2-2* als Matrize entstand mit dieser Primerkombination kein Produkt. Die Nutzung einer T-DNA-spezifischen Primerkombination, führte mit gDNA aus *rns2-1* bzw. *rns2-2* Pflanzen zur Bildung eines circa 320 bp bzw. 450 bp großen PCR-Produktes (Abb. 3.3A,B). Aufgrund dessen konnte von zwei homozygoten T-DNA-Insertionslinien mit spezifischer T-DNA-Insertion im codierenden Bereich des *RNS2*-Gens ausgegangen werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die Insertion der T-DNA im codierenden Bereich der *RNS2* auch zu einem Verlust der entsprechenden mRNA führt. Dies wurde mittels PCR auf cDNA von Wildtyp-, *rns2-1*- und *rns2-2*-Pflanzen gezeigt (Abb.3.3C). Mit genspezifischen Primerkombinationen konnte nur auf Wildtyp-cDNA, nicht aber auf cDNA aus *rns2-1*- oder *rns2-2*-Pflanzen, ein Produkt amplifiziert werden, welches die erwartete Produktgröße von circa 800 bp besaß. Zur Kontrolle der cDNA aus *rns2-1*- und *rns2-2*-Pflanzen wurde mittels *Ef1 α* -spezifischen Primern ein Produkt von circa 400 bp amplifiziert, welches auch in Wildtyp-Pflanzen amplifiziert werden konnte. Neben der PCR auf das Volllängeprodukt wurden zusätzlich quantitative RT-PCR-Studien durchgeführt (Abb. 3.3D). Diese zeigten eine Reduktion des Transkriptgehalts auf 0 % in Bezug auf Wildtyp-Pflanzen und bestätigten somit den vollständigen Transkriptverlust in den Linien *rns2-1* und *rns2-2*.

3.2 Physiologische Untersuchungen der *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung

RNS2 ist die einzige RNase in *A. thaliana*, die als konstitutiv exprimiert beschrieben ist (Bariola *et al.*, 1999). Der Verlust von *RNS2*-Aktivität in *RNS2*-Antisense-Pflanzen von bis zu 65 % führt zu einer starken Akkumulation von Anthocyanen in Keimlingen – ein Effekt der häufig in Stresssituationen, wie Phosphatmangel auftritt (Bariola *et al.*, 1999). Keimlinge der *rns2-2* zeigten eine Akkumulation von RNA in der Vakuole, verlangsamten rRNA-Abbau und konstitutive Autophagie (Hillwig *et al.*, 2011). Neben diesen Effekten ist bisher nicht bekannt, welche weiteren physiologischen Auswirkungen der komplette Verlust von *RNS2*-Aktivität besitzt. Zur Überprüfung der konstitutiven Autophagie in beiden homozygoten *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien, wurde die Zählung der Autophagosome in 11 Tage alten Keimlingen nach Hillwig *et al.* (2011) mit *rns2-2*-Keimlingen wiederholt und für *rns2-1*-Keimlinge ergänzt.

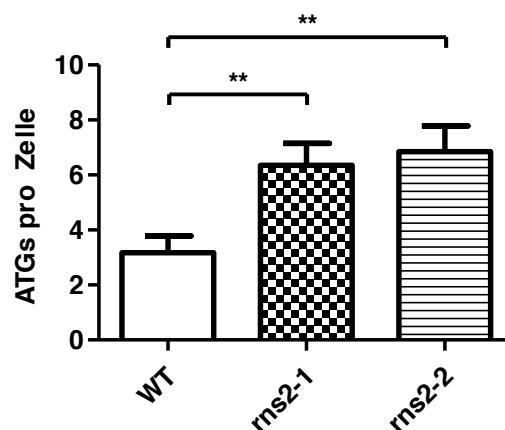


Abbildung 3.4: Autophagosomenbildung in Wurzeln von *RNS2*-T-DNA-Insertionspflanzen. Pflanzen wurden eine Woche nach der Keimung für 4 Tage in Dunkelheit inkubiert (Kap. 2.5.1). Nach der Färbung der Wurzeln mit dem Autophagosom-spezifischen Farbstoff Monodansylcadaverin (MDC) wurde die Anzahl der Autophagosome (ATGs) pro Zelle quantifiziert (Kap. 2.5.2). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 70 Zellen von mindestens 8 Keimlingen ± SE. Signifikanz gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA Test: ** = $p < 0,01$

Für die Untersuchungen wurden 11 Tage alte, dunkelinkubierte Keimlingswurzeln mit dem Autophagosom-spezifischen Farbstoff Monodansylcadaverin (MDC) gefärbt und die Anzahl der beweglichen Autophagosome (ATG) in mindestens 70 Zellen gezählt. Wurzeln von Wildtyp-Keimlingen zeigten mit $3,2 \pm 0,6$ ATGs pro Zelle eine leichte Autophagosomenformation, die jedoch mit $6,3 \pm 0,8$ ATGs pro Zelle in *rns2-1*-Wurzeln bzw. $6,8 \pm 0,9$ ATGs pro Zelle in *rns2-2*-Wurzeln um mehr als das Doppelte erhöht war

(Abb. 3.4). Somit konnte, wie bereits von Hillwig *et al.* (2011) für *rns2-2* gezeigt, auch für eine zweite unabhängige *RNS2*-T-DNA-Insertionslinie eine im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen signifikant erhöhte Autophagosombildung in den Wurzeln nachgewiesen werden.

In weiteren Analysen konnten keine zusätzlichen Effekte der T-DNA-Insertion z.B. auf die Keimungsgeschwindigkeit der Samen oder auf die spätere pflanzliche Entwicklung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die genauere Betrachtung des Expressionsmusters der *RNS2* zeigte jedoch eine erhöhte Expression in Pollen (Hruz *et al.*, 2008), was ein erster Hinweis auf die Bedeutung der *RNS2* für eine erfolgreiche Fortpflanzung sein kann. Aus diesem Grund wurden die Pflanzen auf entsprechende Ertragsparameter untersucht.

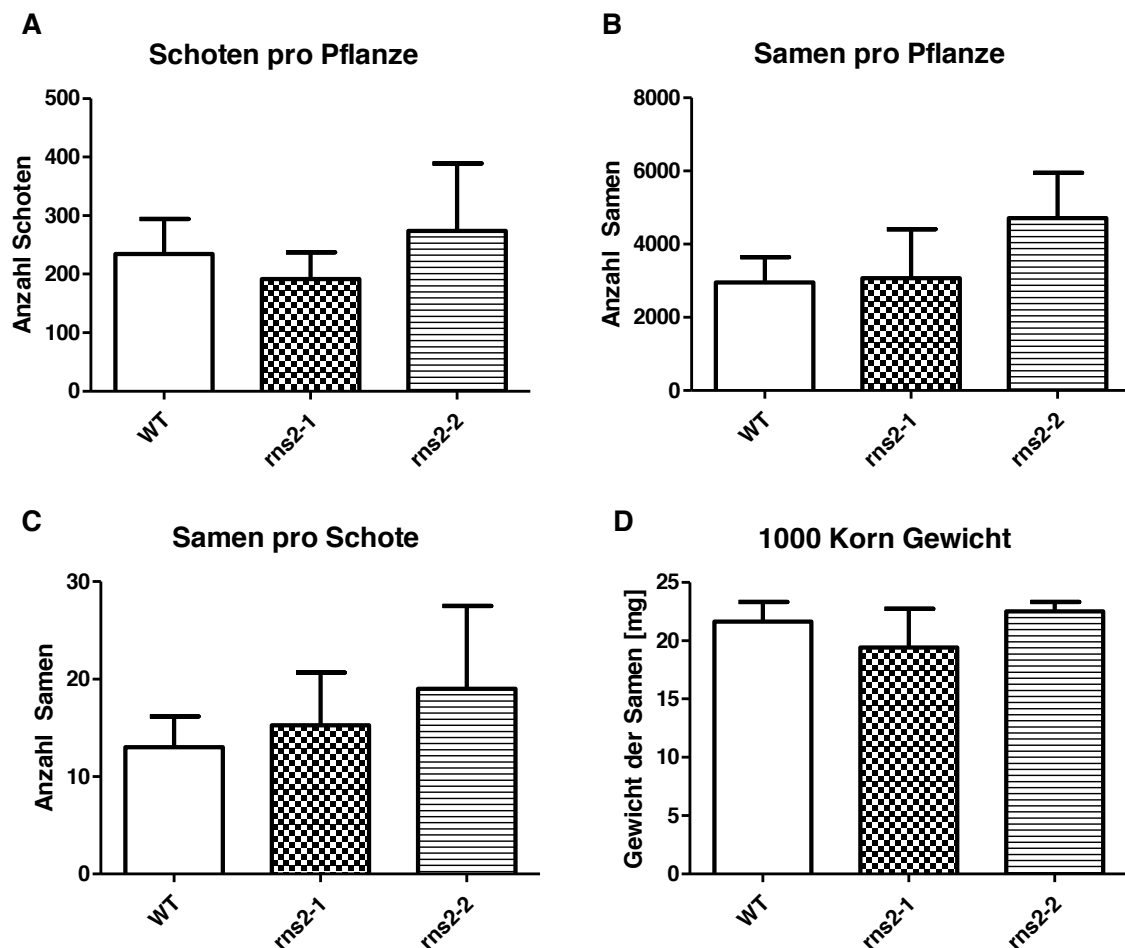


Abbildung 3.5: Ertragsparameter von *A. thaliana* Wildtyp- und *RNS2*-T-DNA-Insertionspflanzen.

Die Samen der Linien *rns2-1*, *rns2-2*, sowie des Wildtyps wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Kap. 2.2.3 aufgeführten Bedingungen zunächst 4 Wochen unter Kurztag-Bedingungen, danach weitere 6 Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Schoten pro Pflanze (A), Samen pro Pflanze (B), Samen pro Schote (C) und 1.000 Korn Gewicht (D). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SD) aus 4 biologischen Replikaten.

A. thaliana Wildtyp-Pflanzen besaßen 234 ± 30 Schoten pro Pflanze, 2.948 ± 346 Samen pro Pflanze und etwa 13 ± 2 Samen pro Schote. Das 1.000 Korn Gewicht betrug $21,6 \pm 0,8$ mg (Abb. 3.5). Pflanzen der Linien *rns2-1* und *rns2-2* besaßen im Durchschnitt mit 192 ± 23 bzw. 274 ± 58 ähnlich viele Schoten und mit 3.070 ± 672 bzw. 4.708 ± 622 ähnlich viele Samen pro Pflanze wie der Wildtyp. Auch die Anzahl der Samen pro Schote mit 15 ± 3 bzw. 19 ± 4 und das 1.000 Korn Gewicht mit $19,4 \pm 1,7$ bzw. $22,5 \pm 0,4$ lag im Bereich der Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.5).

Nukleoside werden von Pflanzen nicht direkt synthetisiert; allerdings entstehen sie während des RNA-Abbaus und stehen unter anderem für die Rückgewinnung von Stickstoff und Phosphat zur Verfügung. Neben der Bildung von Nukleosiden kommt es durch die Aktivität von einigen RNasen zur Freisetzung von 2',3'-zyklischen Nukleotidmonophosphaten (2',3'-cNMP). Im Folgenden sollte die Auswirkung des Verlustes der RNS2-Aktivität auf die Gehalte der Adenin-Derivate in Blättern von 4 - 6 Wochen alten Pflanzen untersucht werden. Die Derivatisierung der adeninhaltigen Bestandteile zu 1,N⁶-Ethenoadenin-Derivaten ermöglichte die hochsensitive Fluoreszenzdetektion mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Kap. 2.4.11).

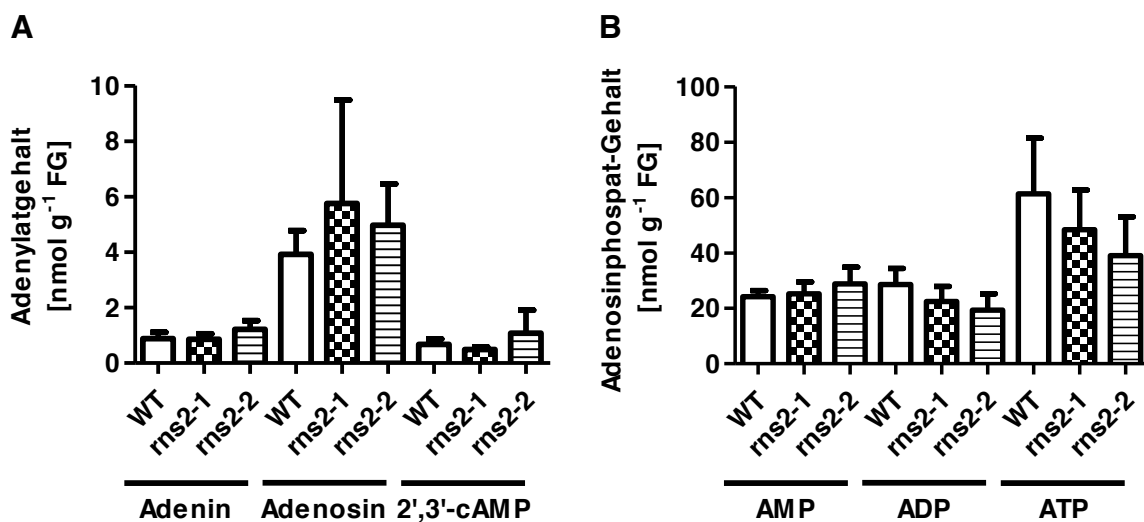


Abbildung 3.6 : Gehalte von Adenylaten in Blättern von Wildtyp sowie *RNS2*-T-DNA-Insertionspflanzen. Aus Blättern 4-6 Wochen alter Pflanzen wurden ein Rohextrakt hergestellt, Adenylate derivatisiert und mittels HPLC gemessen (Kap. 2.4.11). (A) Adenin, Adenosin und 2',3'-cAMP Gehalte. (B) AMP-, ADP- und ATP-Gehalte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen \pm SD.

Die Adeningehalte in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen betragen $0,89 \pm 0,09$ nmol g⁻¹ FG. Beide T-DNA-Insertionslinien wiesen mit $0,87 \pm 0,08$ nmol g⁻¹ FG bzw. $1,22 \pm 0,16$

nmol g⁻¹ FG ähnliche Gehalte an Adenin auf. Auch der Adenosingehalt der rns2-1- und rns2-2-Pflanzen lagen mit $5,76 \pm 1,52$ nmol g⁻¹ FG und $4,92 \pm 0,74$ nmol g⁻¹ FG im Bereich der für den Wildtyp gemessenen Werte ($3,92 \pm 0,43$ nmol g⁻¹ FG). Der Gehalt an zyklischem 2',3'-Adenosinmonophosphat (2',3'-cAMP) in Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Pflanzen lag mit $0,68 \pm 0,08$ nmol g⁻¹ FG, $0,49 \pm 0,04$ nmol g⁻¹ FG und $1,08 \pm 0,38$ nmol g⁻¹ FG im Bereich der Adenin-Gehalte. Auch in den Gehalten der Adenosinphosphate Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Linien. So bewegte sich der Gehalt an AMP und ADP in Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Pflanzen im Bereich von 19,38 bis 28,75 nmol g⁻¹ FG. Der ATP-Gehalt in Wildtyp-Pflanzen lag mit $61,41 \pm 10,01$ nmol g⁻¹ FG über dem Gehalt in rns2-1- und rns2-2-Pflanzen ($48,40 \pm 6,41$ nmol g⁻¹ FG bzw. $39,09 \pm 6,26$ nmol g⁻¹ FG).

3.3 Untersuchungen an isolierten Vakuolen

Im Folgenden werden Untersuchungen an Vakuolen präsentiert, die auf Basis unterschiedlicher Protokolle isoliert wurden. Des Weiteren umfasst dieses Kapitel Untersuchungen der in diesen Vakuolen vorhandenen RNA. Um den Lesefluss nicht zu behindern, wurden nachfolgende Abkürzungen benutzt. Die Isolation von Vakuolen mittels nicht-wässriger Fraktionierung (im Folgenden abgekürzt als NAF-Vakuolen) garantierte durch den sofortigen Wasserentzug die Inaktivierung jeglicher enzymatischer Aktivitäten sowie die Verhinderung von Zerfallsprozessen. Zwar kommt es nicht zur Durchmischung der einzelnen Kompartimente, die Intaktheit der Organelle geht jedoch verloren. Durch die Isolation nach Burla *et al.* (2013) mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) konnten intakte Vakuolen mit geringem Zeitaufwand aus Rosettenblättern älterer Pflanzen isoliert werden (im Folgenden abgekürzt als DGZ-Vakuolen). Beide Isolationsmethoden fanden Anwendung bei Fragestellungen zum vakuolären RNom. Die Vakuolenisolation nach Robert *et al.* (2007) ermöglichte die wässrige Isolation reiner Vakuolen aus Jungpflanzen. Da der RNA-Gehalt in diesen Vakuolen sehr gering und damit kaum nachweisbar war, wurden mit diesen Vakuolen physiologische Messungen durchgeführt.

3.3.1 Adenylatgehalte in Wildtyp-, *rns2-1*- und *rns2-2*-Vakuolen

Mit Hilfe der N-terminalen Verbindung des Cyan fluoreszierenden Proteins (CFP) mit der Proteinsequenz der RNS2 konnte gezeigt werden, dass RNS2 in endoplasmatischen Strukturen sowie der Vakuole lokalisiert ist (Hillwig *et al.*, 2011). Darüber hinaus wiesen *rns2-2*-Pflanzen RNA-Akkumulation in der Vakuole und einen verlangsamten rRNA-Abbau auf – ein intrazellulärer Prozess der in der Vakuole stattfinden soll (Hillwig *et al.*, 2011). Es ist beschrieben, dass vakuolärer RNA-Abbau, katalysiert durch RNasen, zur Bildung von 2',3'-cNMPs führen kann (Abel & Glund, 1986; Jackson, 2011; Mossakowska *et al.*, 1989; Nürnberger *et al.*, 1990). In Folgeaktionen kann dieses Zwischenprodukt über die entsprechenden Nukleotide, Nukleoside und Nukleobasen im katabolen Stoffwechselweg degradiert werden. Die Produkte des RNA-Abbaus können so zur Verbesserung v.a. der Phosphat-, aber auch der Stickstoffverfügbarkeit reassimiliert werden (Zrenner *et al.*, 2006). Neben diesen Reaktionen sind keine weiteren Prozesse bekannt, die zur Bildung von 2',3'-cNMPs führen (Nürnberger *et al.*, 1990). Der Abbau von RNA liefert demnach die einzig bekannte Erklärung für vakuolär vorkommende 2',3'-cNMPs. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob der Verlust von *RNS2*-Transkript zu veränderten Gehalten von Adenosin und 2',3'-cAMP in der Vakuole führt. Um unterschiedliche Vakuolenmengen in den Ansätzen zu berücksichtigen, wurden alle Daten auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase normalisiert (Boller & Kende, 1979).

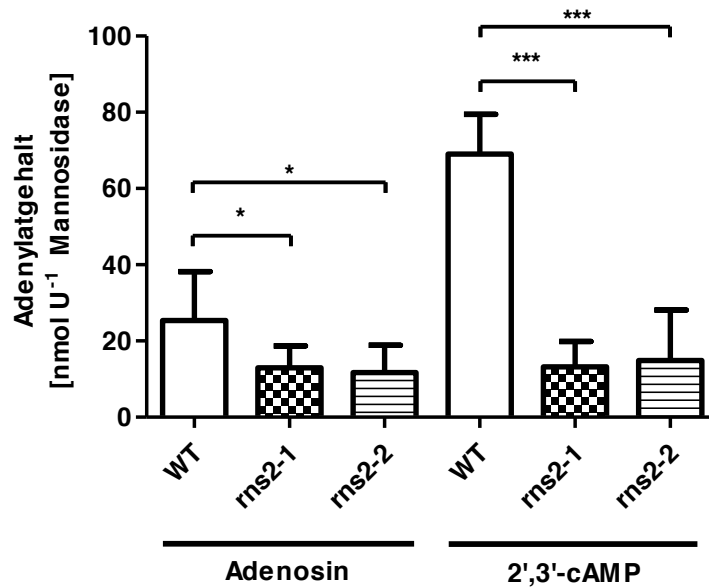


Abbildung 3.7: Adenylytgehalte in *A. thaliana* Wildtyp-, *rns2-1*- und *rns2-2*-Vakuolen. Es wurden Vakuolen aus Blättern von 4 Wochen alten Pflanzen isoliert (Kap. 2.4.6.1) und adeninhaltige Bestandteile derivatisiert. Die Derivate wurden mittels HPLC gemessen (Kap. 2.4.11). Alle Daten wurden auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 7 unabhängigen Versuchen \pm SD. Signifikanz gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA Test: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Der Adenosingehalt in Vakuolen von *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen lag bei $25,35 \pm 3,71$ nmol U⁻¹ Mannosidase, wohingegen Vakuolen der Linien *rns2-1* und *rns2-2* mit Gehalten von $13,00 \pm 2,16$ nmol U⁻¹ Mannosidase bzw. $11,70 \pm 2,70$ nmol U⁻¹ Mannosidase signifikant weniger Adenosin aufwiesen (Abb. 3.7). Gleichermäßen wiesen Wildtyp-Vakuolen mit $69,03 \pm 3,49$ nmol U⁻¹ Mannosidase mehr als das Vierfache an 2',3'-cAMP als Vakuolen der Linien *rns2-1* und *rns2-2* auf ($13,19 \pm 2,24$ nmol U⁻¹ Mannosidase und $14,84 \pm 5,02$ nmol U⁻¹ Mannosidase). Der Verlust von *RNS2*-Transkript führte demnach zu signifikant verringerten Gehalten an Adenosin und 2',3'-cAMP in der Vakuole.

3.3.2 RNA-Abbau mittels Enzymen aus Wildtyp-, *rns2-1*- und *rns2-2*-Vakuolen

Aus Untersuchungen an isolierten Vakuolen von Tomaten-Zellkultur ging hervor, dass diese Organellen die enzymatischen Grundvoraussetzungen besitzen, um RNA bis hin zum Nukleosid und Phosphat zu degradieren (Löffler *et al.*, 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Abbau ebenfalls in *A. thaliana*-Vakuolen stattfinden kann (Bernard, 2010). Da bisher nicht bekannt war, ob der Verlust der *RNS2*-Aktivität einen Einfluss auf die Gesamt-RNase-Aktivität vakuolärer Enzyme hat, wurde ein RNase-

Assay auf Basis der fluoreszenzspektroskopischen RNA-Detektion in Anlehnung an Tripathy *et al.* (2013) etabliert. Die RNase-Aktivität wurde durch die Änderung der Fluoreszenzintensität von Ethidiumbromid, gebunden an RNA (RNA-EtBr), untersucht. Dafür wurde pflanzliche Gesamt-RNA ($c_{\text{final}} = 26,6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) für 2 Minuten mit Ethidiumbromid ($c_{\text{final}} = 77 \text{ } \mu\text{M}$) inkubiert.

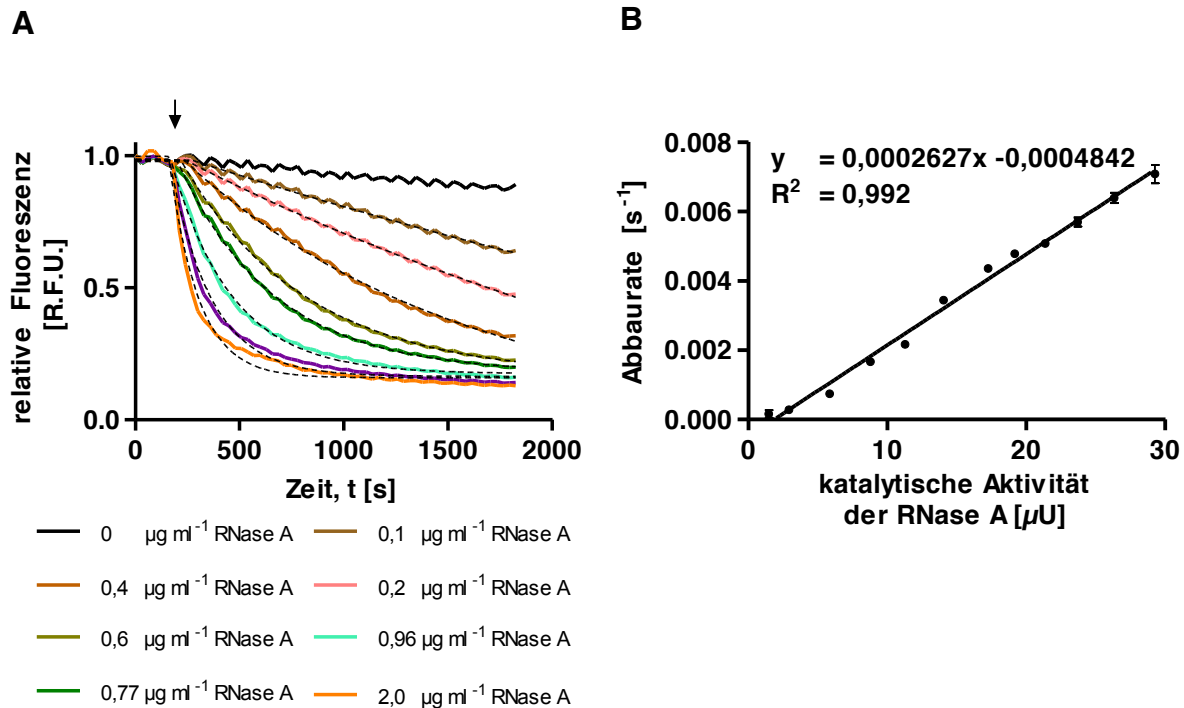


Abbildung 3.8: Enzymatischer Abbau von RNA durch RNase A. Unterschiedliche Konzentrationen RNase A wurde mit RNA-EtBr ($c_{\text{RNA}} = 26,6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; $c_{\text{EtBr}} = 5,12 \text{ } \mu\text{M}$) inkubiert und der Abbau der pflanzlichen RNA fluoreszenzspektroskopisch detektiert ($\lambda_{\text{Ex}} = 510 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 600 \text{ nm}$) (Kap. 2.4.13). (A) Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz bei steigenden RNase A-Konzentrationen. Nicht-lineare Regression eines einphasigen exponentiellen Abbaus nach Plateau-Phase (gestrichelte Linien). Determinationskoeffizienten $R^2 \geq 0,95$. Der Pfeil markiert den Start des RNA-Abbaus durch Zugabe der RNase A. (B) Ermittelte Abbastrate [s^{-1}] durch Anwendung einer nicht-linearen Regression zur Bestimmung der katalytischen Aktivität. Verhältnis zwischen der Abbastrate K [s^{-1}] und der katalytischen Aktivität der RNase A [μU]. Geradengleichung $y = 0,0002627x - 0,0004842$. Determinationskoeffizient $R^2 = 0,992$. Signifikanz $p < 0,0001$. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm SE.

Der Start des Assays erfolgte durch Zugabe von RNase A bekannter Konzentrationen ($0,1 - 2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), wobei die Fluoreszenzintensität für 30 Minuten gezeigt wurde (Abb. 3.8A). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von RNase A. Über den Zeitraum von 30 Minuten sank das Fluoreszenzsignal in Abwesenheit von RNase A um circa 12 %. Betrug die Konzentration der RNase A $0,1 - 0,4 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, so sank das Fluoreszenzsignal auf 65 % - 30 %, ohne dass der Sättigungsbereich erreicht wurde.

Bei RNase A-Konzentrationen von $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ kam es nach 400 s bis 1200 s zum Erreichen des Sättigungsbereiches (Abb. 3.8A). Zur Errechnung der katalytischen Aktivität [U] aus der Änderung der Fluoreszenzintensität wurde ein einphasiger exponentieller Abbau mit Plateauphase zu Beginn angenommen. Die Abbaurate [s^{-1}] wurde für die Messungen mit unterschiedlichen RNase A-Konzentrationen ermittelt. Die Determinationskonstante R^2 betrug dabei für den Ansatz mit $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A 0,9473; für alle anderen Ansätze über 0,98 (Abb. 3.8B). Bei Abwesenheit von RNase A konnte keine eindeutige Regression durchgeführt werden. Das lineare Verhältnis zwischen der Abbaurate K und der katalytischen Aktivität der RNase A a [μU] wurde mit der Geradengleichung

$$(7) \quad K = 0,0002627a - 0,0004842$$

beschrieben. Der Determinationskoeffizient R^2 betrug 0,992 und bestätigte damit den linearen Zusammenhang der Variablen und die Gültigkeit des Modells (Abb. 3.8B). Mit dieser Methode konnte folglich überprüft werden, ob die verringerte Produktion von 2',3'-cAMP der löslichen Proteine aus rns2-1- und rns2-2-Vakuolen nach Inkubation mit RNA mit einer verringerten RNS2-Aktivität korrelierte.

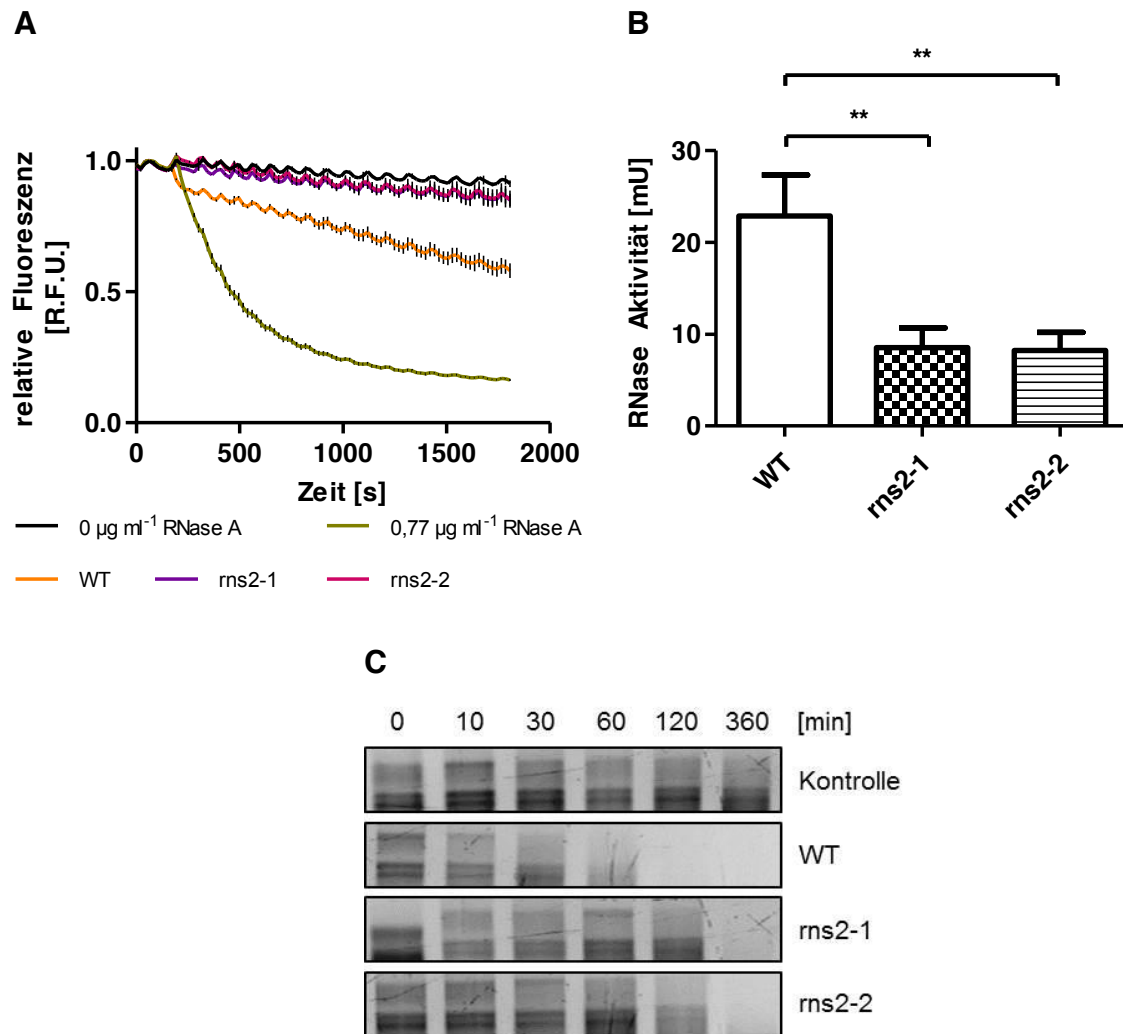


Abbildung 3.9: Enzymatischer Abbau von RNA durch vakuoläre Enzyme von *A. thaliana* Wildtyp- und *RNS2-T-DNA*-Insertionspflanzen. Vakuolen wurden aus Blättern 4 - 6 Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen isoliert und die löslichen Proteine daraus mit RNA-EtBr ($C_{\text{RNA}} = 26,6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; $C_{\text{EtBr}} = 5,12 \text{ } \mu\text{M}$) inkubiert (Kap. 2.4.13). (A) Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz bei Anwesenheit von löslichen Proteinen aus Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Vakuolen mit gleicher α -Mannosidase-Aktivität. Als Kontrolle dienten Ansätze mit RNase A bekannter Konzentration ($0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; $0,77 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm SE. (B) Die RNase-Aktivität in Anwesenheit von löslichen Proteinen aus Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Vakuolen wurde fluoreszenzspektroskopisch gemessen und quantifiziert (Kap. 2.4.13). Alle Daten wurden auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm SE. Signifikanz gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA Test: ** = $p < 0,01$. (C) Zeitabhängiger Abbau der rRNA ($m_{\text{RNA}} = 4 \text{ } \mu\text{g}$) bei Anwesenheit von löslichen Proteinen aus Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Vakuolen. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne RNasen. Nach Inkubation der Ansätze für 0, 10, 30, 60, 120 und 360 Minuten wurde die RNA isoliert (Kap. 2.3.9) und auf einem Agarose Gel aufgetrennt (Kap. 2.3.11).

Vakuoläre Enzyme von Wildtyp-, rns2-1- und rns2-2-Pflanzen wurden mit RNA-EtBr inkubiert und die Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf erfasst (Abb. 3.9A). Als Kontrolle

diente ein Ansatz mit $0,77 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A sowie ein RNase-freier Ansatz. Über einen Zeitraum von 30 Minuten konnte eine Reduzierung der RNA-EtBr abhängigen Fluoreszenz im Ansatz ohne RNase auf 91 % festgestellt werden (Abb. 3.9A). In den Ansätzen mit vakuolären Enzymen der *rns2-1*- und *rns2-2*-Pflanzen sank die Fluoreszenz auf 85 %, in Ansätzen mit Proteinen aus Wildtyp-Vakuolen durchschnittlich auf 58 % (Abb. 3.9A). Die Quantifizierung der Fluoreszenzänderung von RNA-EtBr in Anwesenheit von vakuolären Enzymen aus Wildtyp-Pflanzen ergab eine katalytische Aktivität von $22,87 \pm 4,50 \text{ mU U}^{-1}$ α -Mannosidase. Wurde RNA-EtBr mit vakuolären Enzymen aus *rns2-1*- oder *rns2-2*-Pflanzen inkubiert, so konnte eine um circa zwei Drittel verringerte RNase-Aktivität von $8,53 \pm 2,17 \text{ mU U}^{-1}$ α -Mannosidase bzw. $8,23 \pm 1,99 \text{ mU U}^{-1}$ α -Mannosidase detektiert werden (Abb. 3.9B). Die elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen RNA nach Inkubation mit vakuolären Enzymen aus Wildtyp-Pflanzen zwischen 0 und 360 Minuten zeigte, dass die rRNA nach 60 Minuten nahezu vollständig abgebaut wurde. In Ansätzen mit löslichen Proteinen aus *rns2-1*- bzw. *rns2-2*-Vakuolen erfolgte der vollständige Abbau der rRNA erst nach 360 Minuten (Abb. 3.9C).

Um zu überprüfen, ob in den *RNS2-T*-DNA-Insertionslinien verringerte Mengen an RNA-Abbauprodukten produziert werden, sollte das *in vitro* RNase-Assay auf Basis der Produktquantifikation mittels HPLC (Bernard, 2010) wiederholt werden. Hierbei wurden vakuoläre Enzyme mit RNA inkubiert und die Produktion der Adenin-Derivate mittels HPLC quantifiziert. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die vakuolären Enzyme aus *RNS2-T*-DNA-Insertionspflanzen in gleichem Maße in der Lage sind, 2',3'-cNMPs abzubauen. Die Phosphodiesterase Aktivität wurde mit dem Substratanalogon Bis-(*p*-Nitrophenyl)-Phosphat (BNP) photometrisch gemessen (Kap. 2.4.14).

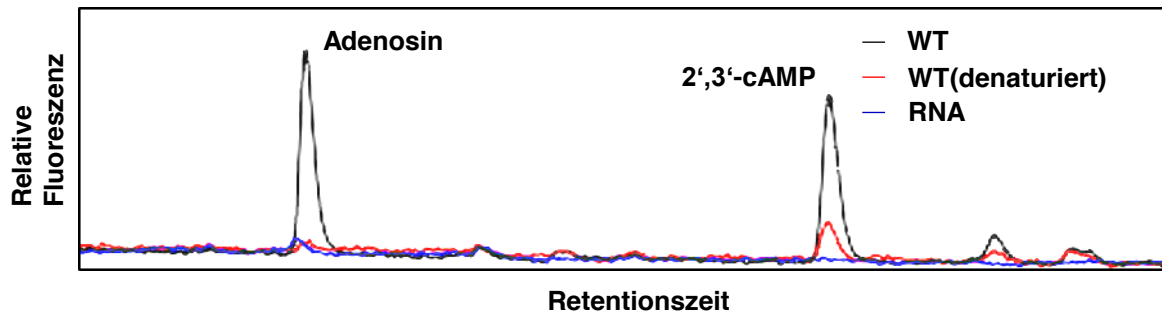


Abbildung 3.10: HPLC-Chromatogramme von adeninhaltigen RNA-Abbauprodukten. Wildtyp-Vakuolen wurden aus Blättern 4 - 6 Wochen alten Pflanzen isoliert (Kap. 2.4.6.1) und die vakuolären Enzyme mit RNA für 16 h inkubiert (Kap. 2.4.12). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne vakuoläre Enzyme (RNA) und ein Ansatz mit denaturierten vakuolären Enzymen (Wildtyp, denaturiert). Die adeninhaltigen Bestandteile wurden derivatisiert und mittels HPLC analysiert (Kap. 2.4.11).

Das Chromatogramm in Abb. 3.10 zeigt die detektierbaren Adenin-Derivate Adenosin und 2',3'-cAMP, nachdem RNA mit aus Wildtyp-Pflanzen isolierten vakuolären Enzymen für 16 h inkubiert wurden. Des Weiteren zeigt die Abbildung die Ergebnisse eines denaturierten Probenansatzes (denaturiert), sowie einer RNA-Kontrolle ohne pflanzliche Enzyme (RNA). Nach 16-stündiger Inkubation der RNA ohne pflanzliche Enzyme waren keine Adenin-Derivate als Folge von RNA-Zerfall oder -Abbau durch Kontaminanten detektierbar. Darüber hinaus ging aus den Chromatogrammen hervor, dass in Ansätzen mit denaturierten Enzymen ein geringer Anteil an Adenosin, sowie 2',3'-cAMP nachgewiesen werden konnten. Dabei war der Gehalt des zyklischen Nukleotids höher als der Gehalt des entsprechenden Nukleosids (vgl. Abb. 3.7). Wurde RNA mit Enzymen aus Wildtyp-Vakuolen inkubiert, so konnten mit Adenosin und 2',3'-cAMP ebenfalls lediglich 2 Adenin-Derivate identifiziert werden. Dabei war die Menge an gebildetem Adenosin nach 16 h höher als von 2',3'-cAMP (Abb. 3.10). Da es grundsätzlich möglich war die adeninhaltigen RNA-Abbauprodukte zu quantifizieren, sollte im Folgenden untersucht werden, ob es Unterschiede in der Umsatzrate bei Anwesenheit vakuolärer Enzyme des Wildtyps oder rns2-1 bzw. rns2-2 gab.

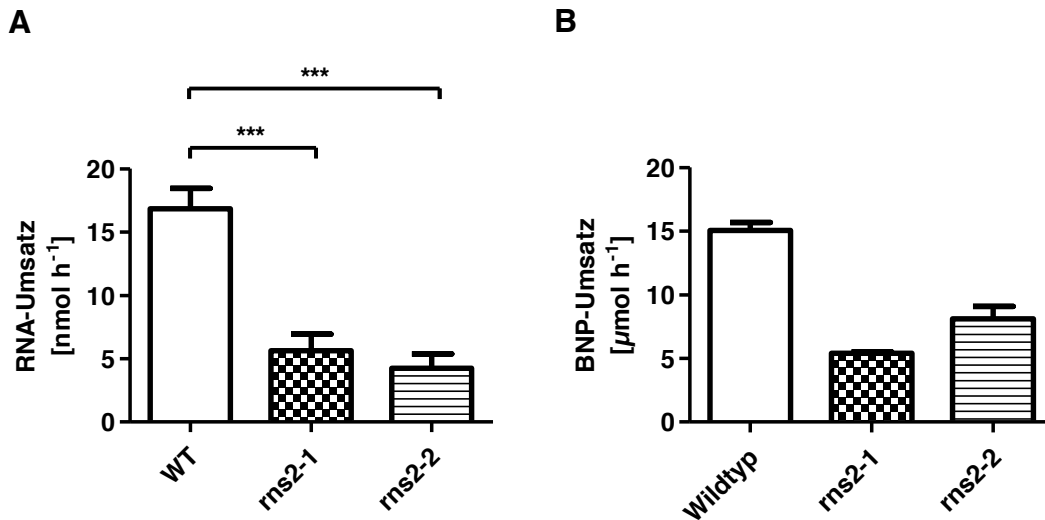


Abbildung 3.11: Quantifizierung der RNA-Abbauprodukte und des BNP-Umsatzes durch vakuoläre Enzyme von *A. thaliana* Wildtyp- und *RNS2*-T-DNA-Insertionspflanzen. (A) Vakuolen wurden aus Blättern 4 Wochen alter Pflanzen isoliert (Kap. 2.4.6.1) und RNA mit den löslichen Proteinen für 16 h inkubiert (Kap. 2.4.12). Das dabei gebildete 2',3'-cAMP und Adenosin wurde derivatisiert, mittels HPLC gemessen und die Gehalte in denaturierten Ansätzen von nicht-denaturierten Ansätzen subtrahiert. Der RNA-Umsatz entspricht der Summe aller gebildeten Adenin-Derivate. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen \pm SD. Signifikanz gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA Test: *** = $p < 0,001$. (B) Vakuolen wurden aus Blättern 4 Wochen alter Pflanzen isoliert (Kap. 2.4.6.1) und Bis-(*p*-Nitrophenyl)-Phosphat (BNP) mit den löslichen Proteinen für 17,5 h inkubiert (Kap. 2.4.12). Die Reaktion wurde mit Na_2CO_3 gestoppt und die Bildung von *p*-Nitrophenol photometrisch bestimmt (Kap. 2.4.14). Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen \pm SD. Alle Daten wurden auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase normalisiert

Die in der Vakuole von *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen befindlichen Enzyme waren in der Lage die extern zugegebene RNA zu 2',3'-cAMP und Adenosin mit einer Umsatzrate von $16,84 \pm 1,59 \text{ nmol h}^{-1} \text{ U}^{-1} \alpha\text{-Mannosidase}$ abzubauen (Abb. 3.11A). Vakuoläre Enzyme der Linien *rns2-1* und *rns2-2* hingegen zeigten mit $5,63 \pm 1,31 \text{ nmol h}^{-1} \text{ U}^{-1} \alpha\text{-Mannosidase}$ bzw. $4,26 \pm 1,11 \text{ nmol h}^{-1} \text{ U}^{-1} \alpha\text{-Mannosidase}$ im Vergleich zum Wildtyp eine um bis zu 75 % reduzierte RNA-Abbauraten (Abb. 3.11A). Die Phosphodiesterase-Aktivität von vakuolären Enzymen wurde über das Substratanalogon Bis-(*p*-Nitrophenyl)-Phosphat (BNP) gemessen und lag für Enzyme aus Wildtyp-Vakuolen bei $15,05 \pm 0,61 \text{ μmol h}^{-1} \text{ U}^{-1} \alpha\text{-Mannosidase}$ (Abb. 3.11B). Vakuoläre Enzyme der Linien *rns2-1* und *rns2-2* hingegen wiesen mit $5,41 \pm 0,11 \text{ μmol h}^{-1} \text{ U}^{-1} \alpha\text{-Mannosidase}$ bzw. $8,10 \pm 1,00 \text{ μmol h}^{-1} \text{ U}^{-1} \alpha\text{-Mannosidase}$ eine um bis zu 66 % verringerte Aktivität auf (Abb. 3.11B).

Sowohl über die Quantifizierung der Adenin-Derivat-Produktion, als auch über die Quantifizierung der Fluoreszenzänderung von RNA-EtBr konnte ermittelt werden, dass die in der Vakuole von *A. thaliana* rns2-1- und rns2-2-Pflanzen befindlichen Enzyme eine um 66 - 75 % verringerte RNase-Aktivität aufweisen als die entsprechenden vakuolären Enzyme des Wildtyps. Darüber hinaus liegt die Phosphodiesterase-Aktivität in Vakuolen der T-DNA-Insertionslinien ebenfalls weit unter der aus Wildtyp-Vakuolen.

3.3.3 Reinheit, Integrität und RNA-Vorkommen isolierter Vakuolen

Da in nachfolgenden Analysen die Existenz und die Zusammensetzung vakuolärer RNA überprüft werden sollte, wurde die Qualität der Vakuolenisolationen und der RNA untersucht. Zum einen wurden mikroskopische Analysen durchgeführt, um die Reinheit und Intaktheit der Vakuolen, wie auch das Vorhandensein vakuolärer RNA zu untersuchen. Zum anderen wurde die Aktivität bekannter Markerenzyme gemessen, um die Verunreinigung mit Chloroplasten und Cytosol zu analysieren.

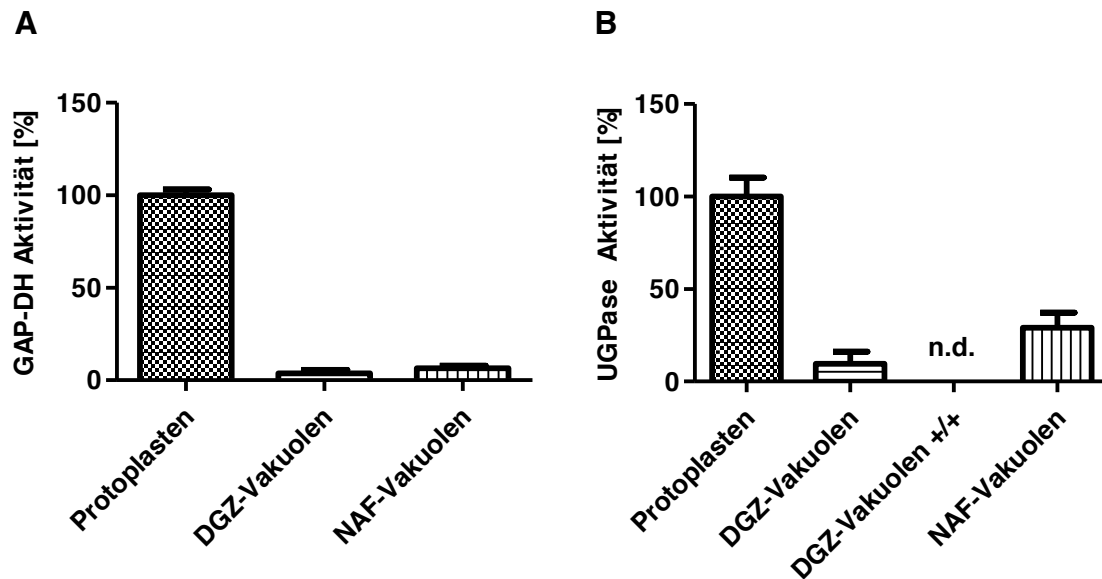


Abbildung 3.12: Aktivität chloroplastidärer und cytosolischer Markerenzyme in unterschiedlichen Vakuolenisolationen. Vakuolen 4 - 6 Wochen alter Pflanzen wurden über nicht-wässrige Fraktionierung (NAF) oder Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) isoliert (Kap. 2.4.6). DGZ-Vakuolen wurden zusätzlich mit RNase A und Proteinase K inkubiert (DGZ-Vakuolen +/+). (A) Die Aktivität des chloroplastidären Markerenzym GAP-DH wurde gemessen und auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase normalisiert. (B) Die Aktivität des cytosolischen Markerenzym UGPase wurde gemessen und auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase normalisiert. Die relative Enzymaktivität in Protoplastenisolationen entspricht 100 %. n.d. - nicht detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen \pm SD.

DGZ- und NAF-Vakuolen wiesen eine relative Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) von $3,54 \pm 0,78$ % bzw. $6,40 \pm 0,90$ % im Vergleich zu Protoplasten auf (Abb. 3.12A). Die Untersuchungen der cytosolischen Verunreinigung auf Basis der Enzymaktivität der cytosolisch lokalisierten Uridindiphosphat-glucosepyrophosphorylase (UGPase) ergaben in DGZ-Vakuolen eine Aktivität von $10,76 \pm 3,56$ % im Vergleich zu Protoplasten. NAF-Vakuolen wiesen mit $29,2 \pm 4,64$ % eine wesentlich höhere cytosolische Verunreinigung auf (Abb. 3.12B). Um extravakuoläre RNA im Ansatz zu entfernen, wurden intakte Vakuolen mit RNase A inkubiert. Erfolgte eine Inkubation von DGZ- Vakuolen für 1 h mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A und anschließend für 1 h mit $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase K (DGZ-Vakuolen +/+), so konnte keine UGPase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.12B). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DGZ-Vakuolen geringere chloroplastidäre und cytosolische Verunreinigungen aufweisen als NAF-Vakuolen.

Zur Überprüfung der Intaktheit der DGZ-Vakuolen wurden diese mit Neutralrot gefärbt. Intakte Vakuolen besitzen einen sauren pH-Wert, was durch die ionische Form des Neutralrot-Moleküls sichtbar wurde (Kap. 2.5.5). RNA wurde selektiv mit dem Farbstoff SYTO RNASelect™ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt (Kap. 2.5.4).

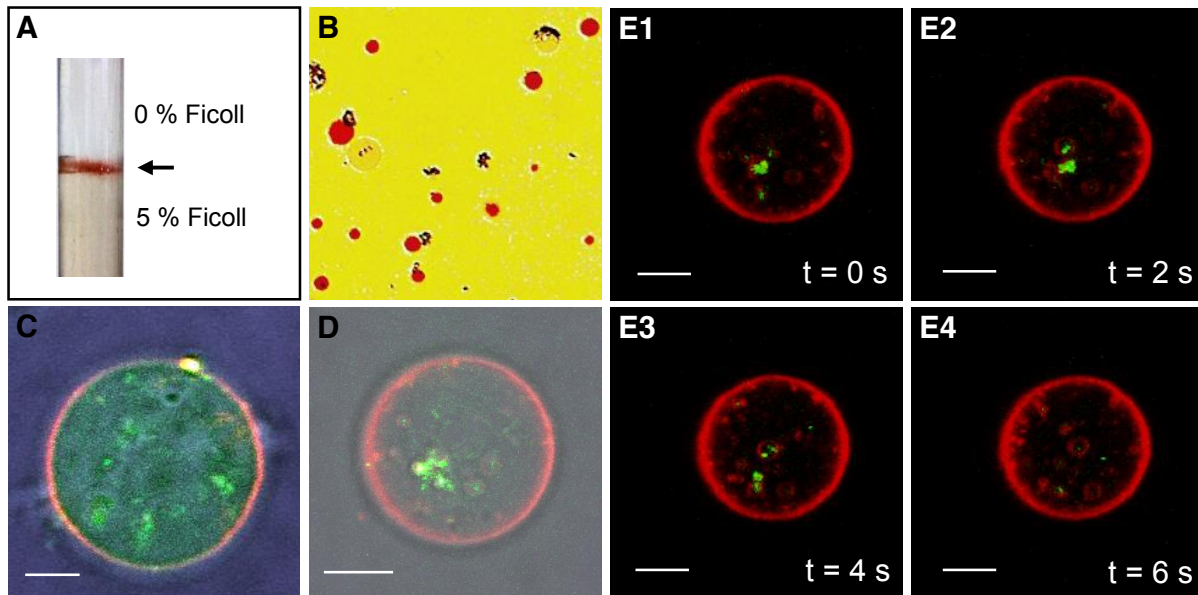


Abbildung 3.13: Reinheit, Intaktheit und RNA-Vorkommen in isolierten DGZ-Vakuolen. *A. thaliana* Vakuolen 4 - 6 Wochen alter Pflanzen wurden nach Burla *et al.* (2013) isoliert (Kap. 2.4.6.2). (A) Anreicherung der Vakuolen in der Interphase der 0 % und 5 % Ficoll-Schichten. Die Färbung der Vakuolen erfolgte durch Zugabe von Neutralrot zum Lysis-Puffer (Kap. 2.5.5). (B) Lichtmikroskopische Untersuchungen der Reinheit und Intaktheit der isolierten Vakuolen. RNA-Vorkommen in der Vakuole ohne (C) bzw. nach (D) Inkubation der Vakuolen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A für 1 h. (E) Bewegung von Vesikeln in Vakuolen nach 1-stündiger Inkubation der intakten Vakuolen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A und darauffolgender Inkubation mit $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase K. Die Membranen wurden mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 (rot) und RNA selektiv mit Syto RNASelect™ (grün) gefärbt. 1 - 4: Aufnahmen im zeitlichen Verlauf ($\Delta t = 2 \text{ s}$). Maßstab: $4 \mu\text{m}$.

DGZ-Vakuolen wurden über einen Ficoll-Gradienten isoliert und zwischen der 0 % und 5 % Ficoll-Phase abgenommen (Abb. 3.13A). Die Neutralrotfärbung der Vakuolen zeigte, dass die Mehrheit der Vakuolen (ca. 90 %) intakt war (Abb. 3.13B). Mit Hilfe des Farbstoffes SYTO RNASelect™ (Invitrogen, Karlsruhe) wurde die Ribonukleinsäure selektiv gefärbt. Es zeigte sich eine diskrete Färbung des Vakuoleninhalts (Abb. 3.13C), die auch nach einstündiger Inkubation intakter Vakuolen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A detektierbar war (Abb. 3.13D). Die mit RNase A inkubierten Vakuolen zeigten zudem bewegliche, Autophagosom-ähnliche Vesikel im Vakuoleninneren, die durch den Membranfarbstoff FM4-64 sichtbar wurden (Abb. 3.13E).

3.3.4 Aufarbeitung der vakuolären RNA

Um zu überprüfen welche Auswirkungen die Isolationsmethode auf die Zusammensetzung der vakuolären RNA hatte, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Die Isolation von Vakuolen unter Bedingungen, in denen zelluläre Prozesse, wie der Abbau von RNA, vollständig abgestoppt wurden, war durch sofortiges Gefrieren und Entwässerung der Proben möglich. Über eine nicht-wässrige Fraktionierung erhielt man isolierten Vakuoleninhalt (NAF-Vakuolen), der jedoch nachweislich relativ stark mit chloroplastidären und cytosolischen Bestandteilen kontaminiert war (Abb. 3.12). Dagegen waren die intakten Vakuolen aus adulten Pflanzen über die Dichtegradientenzentrifugation nach Burla *et al.* (2013) (DGZ-Vakuolen) lediglich mit geringen Mengen an chloroplastidären, wie cytosolischen Bestandteilen verunreinigt (Abb. 3.12). Darüber hinaus konnte durch selektive Färbung der RNA gezeigt werden, dass diese intravakuolär vorhanden und nach RNase-Behandlung intakter Vakuolen immer noch nachweisbar war (Abb. 3.13).

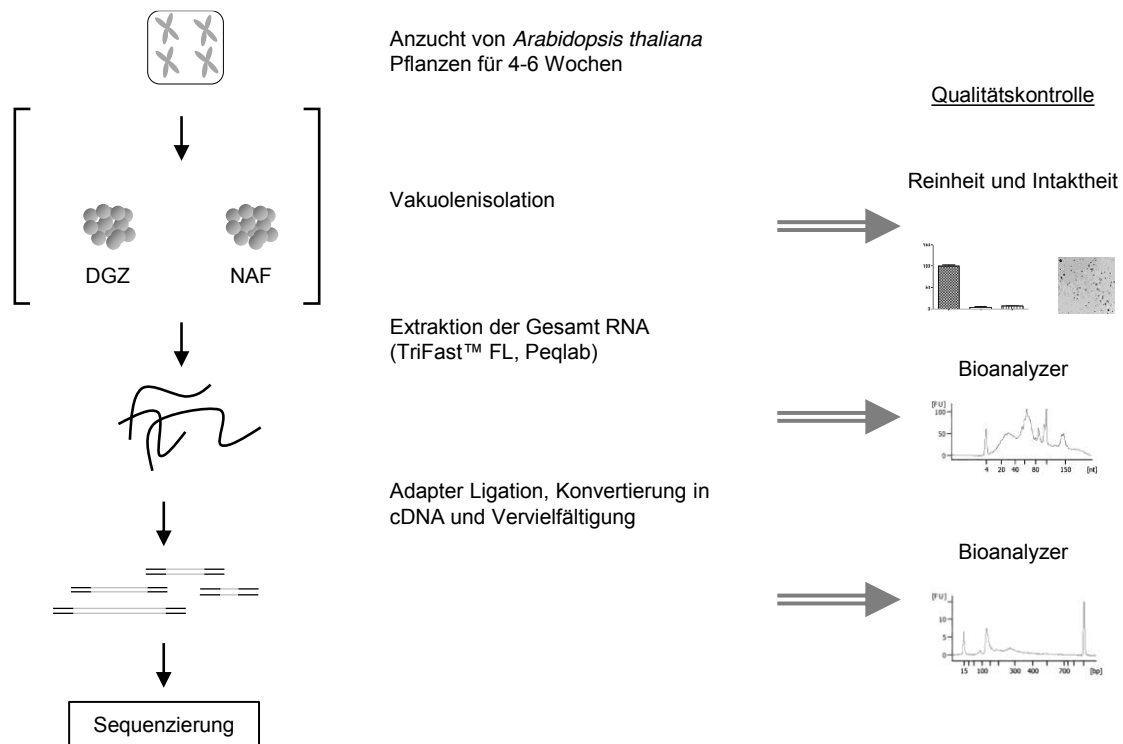


Abbildung 3.14: Workflow der Probenaufarbeitung und Datengenerierung. Schematischer Ablauf der cDNA-Bibliothek-Herstellung. Vakuolen wurden über zwei verschiedene Methoden (DGZ, NAF) isoliert (Kap. 2.4.6). Die Intaktheit und Reinheit der DGZ-Vakuolen konnte durch Neutralrot-Färbung (Kap. 2.5.5) und der Messung der Enzymaktivität Organell-spezifischer Markerenzyme (Kap. 2.4.9 und Kap. 2.4.10) bestätigt werden. Gesamt-RNA wurde extrahiert (Kap. 2.3.9) und Aliquots verwendet, um die Größenverteilung am Agilent 2100 Bioanalyzer zu untersuchen (Kap. 2.3.17). Die cDNA wurde daraufhin nach Angaben des Herstellers angefertigt (Kap. 2.6.1). Die Größenverteilung der cDNA-Bibliothek konnte ebenfalls am Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft werden. Die Sequenzierung erfolgte über *Next Generation Sequencing* mit Brückensynthese (Kap. 2.6.2).

Nach der Bestimmung der Reinheit und Intaktheit der Vakuolen, sowie dem mikroskopischen Nachweis intravakuolärer RNA erfolgte die Extraktion der RNA über die organische Phenol/Chloroform-Extraktion (Abb. 3.14). Die chaotrope Substanz Guanidinisothiocyanat fungierte dabei als RNase-Inhibitor während der Extraktion der Gesamt-RNA, sodass jegliche RNase-Aktivität während der Isolation unterdrückt wurde (Wenzel & Amann, 2013).

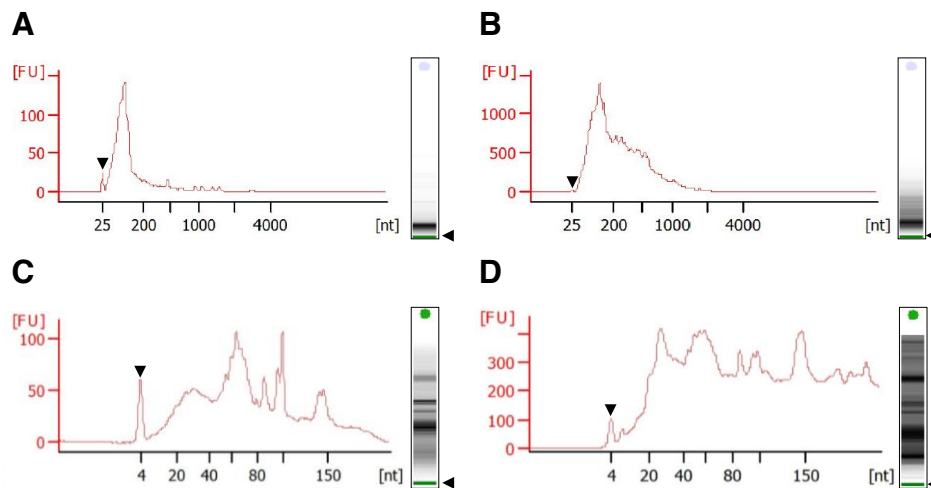


Abbildung 3.15: Elektrophoretische Auftrennung vakuolärer RNA aus *A. thaliana*. Die Vakuolen aus 4 - 6 Wochen alten Pflanzen wurden über (A, C) wässrige Dichtegradientenzentrifugation (24 mU) oder (B, D) nicht-wässrige Fraktionierung (0,1 mU) isoliert und über den Agilent 2100 Bioanalyzer und dem „Pico RNA“-Kit (A, B) bzw. dem „Small RNA“-Kit (C, D) elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.3.17). *Abszissenachse:* Fragmentgröße in Nukleotiden [nt]. *Ordinatenachse:* relative Fluoreszenz [FU]; *Dreieck:* Marker-Peak bei 25 nt (A, B) bzw. 4 nt (C, D).

Die Nutzung des „Pico RNA“-Kits ermöglichte die Auftrennung von RNA von 25 nt bis 4000 nt Länge (Abb. 3.15A,B). Als Bezugsgröße für die Vakuolenmenge wurde die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase [U] bestimmt. Aus DGZ-Vakuolen mit einer α -Mannosidase-Aktivität von 24 mU konnte RNA der mit einer Länge von maximal 200 nt isoliert werden (Abb. 3.15A). Das „Small RNA“-Kit ermöglichte eine exaktere Auftrennung kleiner RNA-Oligonukleotide im Bereich von 4 - 150 nt und zeigte im Falle der DGZ-Vakuolen, dass RNA-Oligonukleotide mit einer Größe von 30 nt, 60 nt, 100 nt und 150 nt überrepräsentiert waren (Abb. 3.15C). Die hochauflösende Auftrennung der kleinen RNAs zeigte, dass diese in hoher Konzentration über den gesamten Messbereich verteilt waren (Abb. 3.15D).

Die Entfernung extern vorhandener RNA erfolgte durch Inkubation intakter Vakuolen für 1 h mit RNase A. Zur Inaktivierung der RNase wurde eine anschließende Inkubation für 1 h mit Proteinase K durchgeführt und die aus behandelten und unbehandelten Vakuolen gewonnene RNA über zwei Methoden elektrophoretisch aufgetrennt.

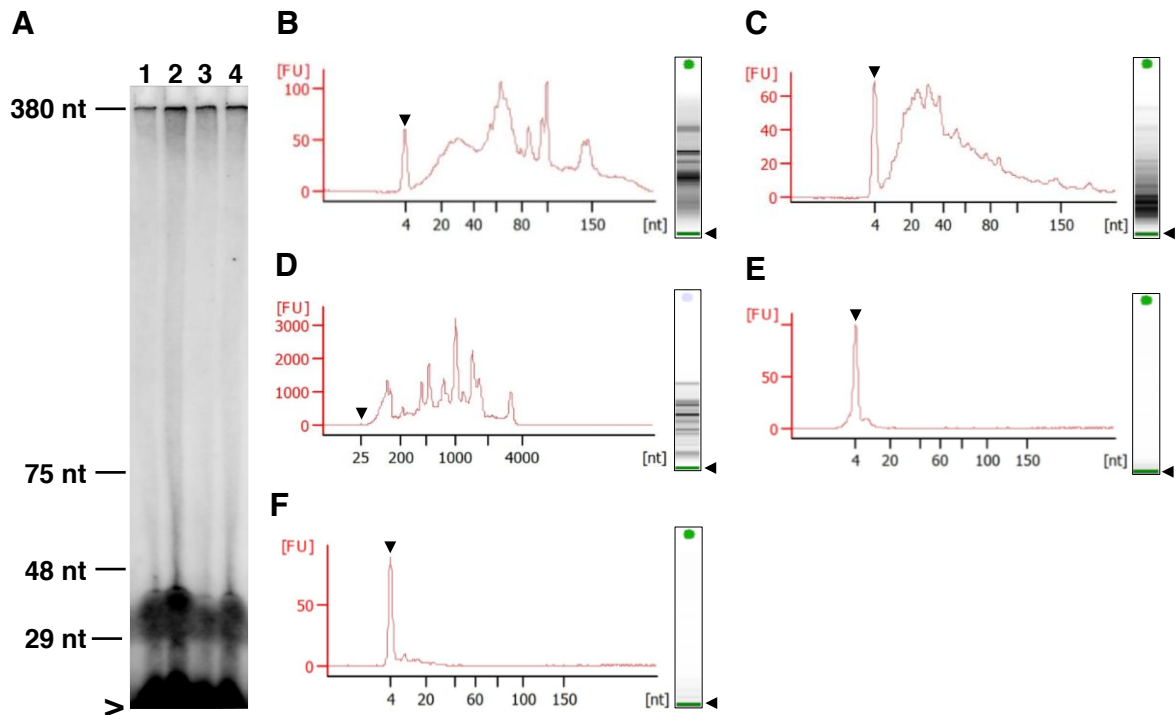


Abbildung 3.16: Elektrophoretische Auftrennung vakuolärer RNA nach RNase A-Behandlung intakter Vakuolen. (A) DGZ-Vakuolen 4 - 6 Wochen alter Pflanzen wurden nach Robert *et al.* (2007) isoliert (Kap. 2.4.6.1) und die RNA aus unbehandelten (1), mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (2) bzw. mit $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ RNase A behandelten (3) und während der Zelllysis mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A behandelten (4) Vakuolen isoliert (Kap. 2.4.7). Die RNA wurde radioaktiv endmarkiert und mittels hochauflösender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE) aufgetrennt (Kap. 2.3.11). Es wurden 29 nt, 48 nt, 75 nt und 380 nt Markeroligos verwendet. Pfeilkopf – überschüssiges $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. (B-E) DGZ-Vakuolen 4 - 6 Wochen alter Pflanzen wurden nach Burla *et al.* (2013) isoliert (Kap. 2.4.6.2) und ohne Inkubation (B) oder nach Inkubation für 1 h mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A und für 1 h mit $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase K (C) analysiert. Die Vakuolen wurden nach der Inkubation schockgefroren und RNA wie in Kap. 2.3.9 beschrieben isoliert. Als Kontrolle wurden 200 ng protoplastidäre RNA (D) und die Produkte nach Inkubation von 400 ng protoplastidäre RNA für 15 min mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A (E) analysiert. (F) zeigt ein Elektropherogramm einer Kontrollprobe ohne RNA. *Abszissenachse:* Fragmentgröße in Nukleotiden [nt]. *Ordinatenachse:* relative Fluoreszenz [FU]. *Dreieck:* Marker-Peak bei 4 nt (B, C, E, F) bzw. 25 nt (D).

RNA aus Vakuolen, die nach Robert *et al.* (2007) isoliert wurden, wiesen kaum ($< 4 \%$) Aktivität des cytosolischen Markerenzym auf (Daten nicht gezeigt), konnten allerdings nicht über den Agilent 2100 Bioanalyzer aufgetrennt werden. Darum wurde die vakuoläre RNA radioaktiv endmarkiert und mittels hochauflösender RNA-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Vakuolen wiesen lediglich kleine RNA-Oligonukleotide mit einer Länge von unter 50 nt auf (Abb. 3.16A1). Die Inkubation der intakten Vakuolen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A (Abb. 3.16A2), $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ RNase A (Abb. 3.16A3) oder Inkubation der Vakuolen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A während der

Zelllysis (Abb. 3.16A4) vor der RNA-Isolation, führte zu keiner Änderung der Oligonukleotide im Hinblick auf ihre Größe. Durch die Inkubation von DGZ-Vakuolen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A erfolgte ein Verlust der Mehrheit der RNA-Oligonukleotide im Größenbereich 50 - 150 nt (Abb. 3.16C). Die Menge der kleineren RNA-Fragmente blieb dabei unverändert (Abb. 3.16B,C). Als Kontrolle wurde protoplastidäre RNA elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.16D). Ein Verdau der RNA (200 ng) mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A für 15 min führte zum Verlust des RNA-spezifischen Fluoreszenzsignals (Abb. 3.16E). Die elektrophoretische Auftrennung war allerdings erfolgreich und lieferte ein Fluoreszenzsignal vergleichbar der Wasserkontrolle (Abb. 3.16F).

Es lässt sich festhalten, dass durch unterschiedliche Isolationsmethoden Vakuolen isoliert werden konnten, die stets kleine Fragmente im Größenbereich bis 150 nt besaßen. RNA aus NAF-Vakuolen wies dabei einen größeren Anteil längerer RNAs (bis 1000 nt) auf als RNA aus DGZ-Vakuolen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation intakter Vakuolen mit RNase A die großen RNA-Oligonukleotide entfernt wurden, Fragmente einer Größe bis etwa 50 nt jedoch in vergleichbarer Menge verblieben.

3.3.5 Qualität der cDNA-Bibliotheken

Vor der Konvertierung der RNA in cDNA wurden die unbekanntes RNA-Oligonukleotide mit Adaptoren bekannter Sequenzen flankiert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR vervielfältigt. Die entstandene cDNA besteht aus einem 50 bp großen 5'-Adapter, einem 64 bp großen 3'-Adapter und der cDNA-Sequenz, die aus der unbekanntes RNA resultierte. Somit trugen beispielsweise cDNAs einer Länge von 134 bp ein 20 bp langes DNA-Stück unbekannter Sequenz.

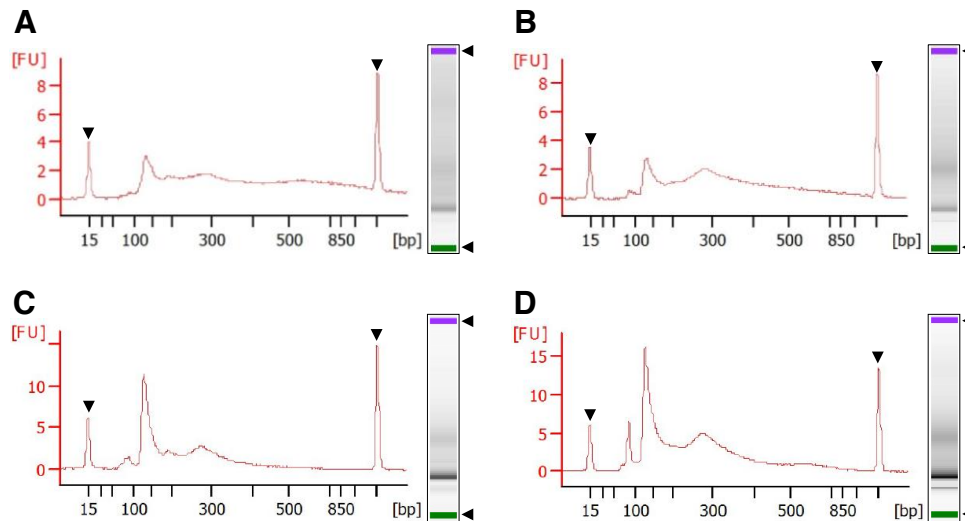


Abbildung 3.17: Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken vor der Sequenzierung. Dargestellt sind Elektropherogramme von verschiedenen cDNA-Bibliotheken. Protoplastidäre RNA (A), RNA aus NAF-Vakuolen (B), RNA aus DGZ-Vakuolen (C) und RNA aus DGZ-Vakuolen mit vorheriger, einstündiger Inkubation mit 10 µg ml⁻¹ RNase A (D) wurden mittels Agilent 2100 Bioanalyzer elektrophoretisch aufgetrennt. *Abszissenachse:* Fragmentgröße in Nukleotiden [bp]. *Ordinatenachse:* relative Fluoreszenz [FU]. *Dreiecke:* Marker-Peaks (unterer Marker – 15 bp, oberer Marker – 1500 bp).

Die cDNA-Bibliothek aus protoplastidärer RNA wies Oligonukleotide im gesamten Messbereich (15 bp - 1500 bp) auf, wobei Fragmente einer Größe von ca. 150 bp, 280 bp und 600 bp am stärksten vertreten waren (Abb. 3.17A). Die erzeugte cDNA aus RNA von NAF-Vakuolen zeigte eine ähnliche Größenverteilung mit einem geringeren Anteil der Fragmente, die größer als 400 bp waren (Abb. 3.17B). Sowohl cDNA aus DGZ-vakuolärer RNA (Abb. 3.17C), als auch cDNA aus DGZ-Vakuolen, die zuvor mit RNase A behandelt wurden (Abb. 3.17D), wiesen hauptsächlich DNA-Stücke einer Größe von circa 150 bp und 290 bp auf (Abb. 3.17C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl auf Ebene der RNA als auch auf Ebene der cDNA ähnliche Größencharakteristika nachgewiesen wurden. Zwar schien die dominanteste RNA-Größe < 16 nt zu sein (< 150 bp auf Ebene der cDNA), DGZ-Vakuolen wiesen jedoch auch RNA-Sequenzen einer Länge < 150 nt (< 264 bp auf Ebene der cDNA) auf. RNA-Isolationen aus NAF-Vakuolen, sowie Protoplasten enthielten zusätzlich wesentlich größere Sequenzen. Unterschiede in der Größenverteilung zwischen cDNA unbehandelter und mit RNase A behandelter Vakuolen konnten nicht festgestellt werden.

3.3.6 Analyse der Rohdaten

Es wurden mit den in Tab. S2 aufgelisteten cDNAs insgesamt 18 Sequenzierungen von 15 Bibliotheken (C1 - C15) durchgeführt. Drei Bibliotheken (C1 - C3) wurden sowohl mittels MiSeq (*), als auch mittels HiSeq2500 (°) sequenziert. Die restlichen Sequenzierungen erfolgten ausschließlich mittels HiSeq2500. Die statistische Auswertung der Rohdaten aller Sequenzierungen ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Vergleichbarkeit der durch drei verschiedene Protokolle isolierten Vakuolen (C1: DGZ-Vakuolen, Jungpflanzen, C9: DGZ-Vakuolen, adulte Pflanzen, C14: NAF-Vakuolen; Kap. 2.4.6) sollte im Folgenden überprüft werden. Des Weiteren wurden biologische Replikate produziert (C4, C9) und ein Datensatz aus protoplastidärer RNA generiert (C15). Zur Verifizierung der intravakuolären Lokalisierung der RNA wurden intakte Vakuolen mit RNase A behandelt (C10). Außerdem wurde RNA aus Vakuolen von genetisch veränderten Pflanzenlinien isoliert (C5 - C8).

Tabelle 3.1: Illumina Rohdaten (Statistik). Statistische Auswertung der Rohdaten von den cDNA-Bibliotheken C1-C15, sequenziert mit dem HiSeq (°) oder MiSeq(*) Sequenzierer.

| | Gesamt-anzahl Sequenzen | Gesamt-anzahl Basen | Median der Sequenzlänge [bp] | Durchschnitt der Sequenzlänge [bp] | durchschnittl. Phred Score | G/C-Gehalt [%] | nicht identif. Basen [%] | Anteil der Sequenzen ≥ 50 bp [%] |
|------|-------------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------|--------------------------|---------------------------------------|
| C1° | 5.973.833 | 122.112.557 | 17 | 20 | 36,5 | 56,2 | 0,004 | 5,5 |
| C2° | 5.280.397 | 83.661.660 | 13 | 16 | 36,1 | 58,5 | 0,0049 | 2,7 |
| C3° | 6.930.600 | 122.131.155 | 14 | 18 | 36,3 | 56,5 | 0,0044 | 3,9 |
| C4° | 3.126.868 | 41.030.855 | 12 | 13 | 35,7 | 58,7 | 0,0056 | 1,2 |
| C5° | 4.545.665 | 58.408.741 | 12 | 13 | 35,7 | 58,5 | 0,0058 | 1 |
| C6° | 5.887.444 | 87.527.861 | 13 | 15 | 35,9 | 56,5 | 0,005 | 1,8 |
| C7° | 11.764.023 | 175.086.852 | 13 | 15 | 35,9 | 60,7 | 0,005 | 0,9 |
| C8° | 2.975.128 | 45.279.335 | 13 | 15 | 35,9 | 56,9 | 0,0047 | 2 |
| C9° | 9.043.250 | 165.334.141 | 13 | 18 | 36,5 | 51,8 | 0,0044 | 6,9 |
| C10° | 12.176.788 | 242.965.756 | 15 | 20 | 36,6 | 52,7 | 0,004 | 7,2 |
| C11° | 7.810.550 | 155.274.077 | 16 | 20 | 36,5 | 53,2 | 0,0041 | 6 |
| C12° | 9.811.294 | 189.063.280 | 15 | 19 | 36,4 | 53,7 | 0,0041 | 5,8 |
| C13° | 10.910.661 | 196.662.559 | 14 | 18 | 36,4 | 53,3 | 0,0045 | 5,9 |
| C14° | 11.242.969 | 268.921.925 | 19 | 24 | 36,8 | 51 | 0,0035 | 13,7 |
| C15° | 10.840.855 | 315.648.767 | 27 | 29 | 37,1 | 51,2 | 0,0032 | 23,1 |
| C1* | 229.862 | 4.561.170 | 16 | 20 | 34,5 | 57,9 | 0,1607 | 5 |
| C2* | 195.517 | 2.998.173 | 13 | 15 | 34 | 60,6 | 0,1277 | 2,3 |
| C3* | 162.912 | 2.797.982 | 14 | 17 | 34,3 | 58,4 | 0,1426 | 3,6 |

Alle Sequenzierungen des HiSeq2500 (°) lieferten über 2,5 Mio. Sequenzen und über 41 Megabasen (Mb) an Sequenzinformationen, wohingegen die MiSeq-Daten (*) mit 230.000 Sequenzen und bis zu 4,5 Mb wesentlich weniger Informationen generierten. Die Leseweite der HiSeq2500-Sequenzierung betrug technisch bedingt maximal 51 bp nach der Entfernung der technischen Sequenzbereiche (vgl. Kap. 3.3.7), wohingegen der MiSeq-Sequenzierer Sequenzen einer Länge von bis zu 100 bp generierte. C14 und C15 hatten mit 13,7 % bzw. 23,1 % den größten Anteil an Sequenzen einer Länge von mindestens 50 bp. In allen anderen Datensätzen lag der Anteil weit unter 10 % (Tab. 3.1). Dieses Verhältnis spiegelte sich auch in der durchschnittlichen Sequenzlänge wieder, die für C14 und C15 mit 24 bp bzw. 29 bp weit über der durchschnittlichen Länge der anderen Datensätze (13 bp - 20 bp) lagen. Die Sequenzqualität wird üblicherweise über den Phred Score angegeben (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) und lag für diese Sequenzierungen bei ≥ 34 , was einer Basengenauigkeit von $\geq 99,96$ % entspricht.

Im Folgenden sollte die Sequenzlängenverteilung ausgewählter Datensätze genauer betrachtet werden.

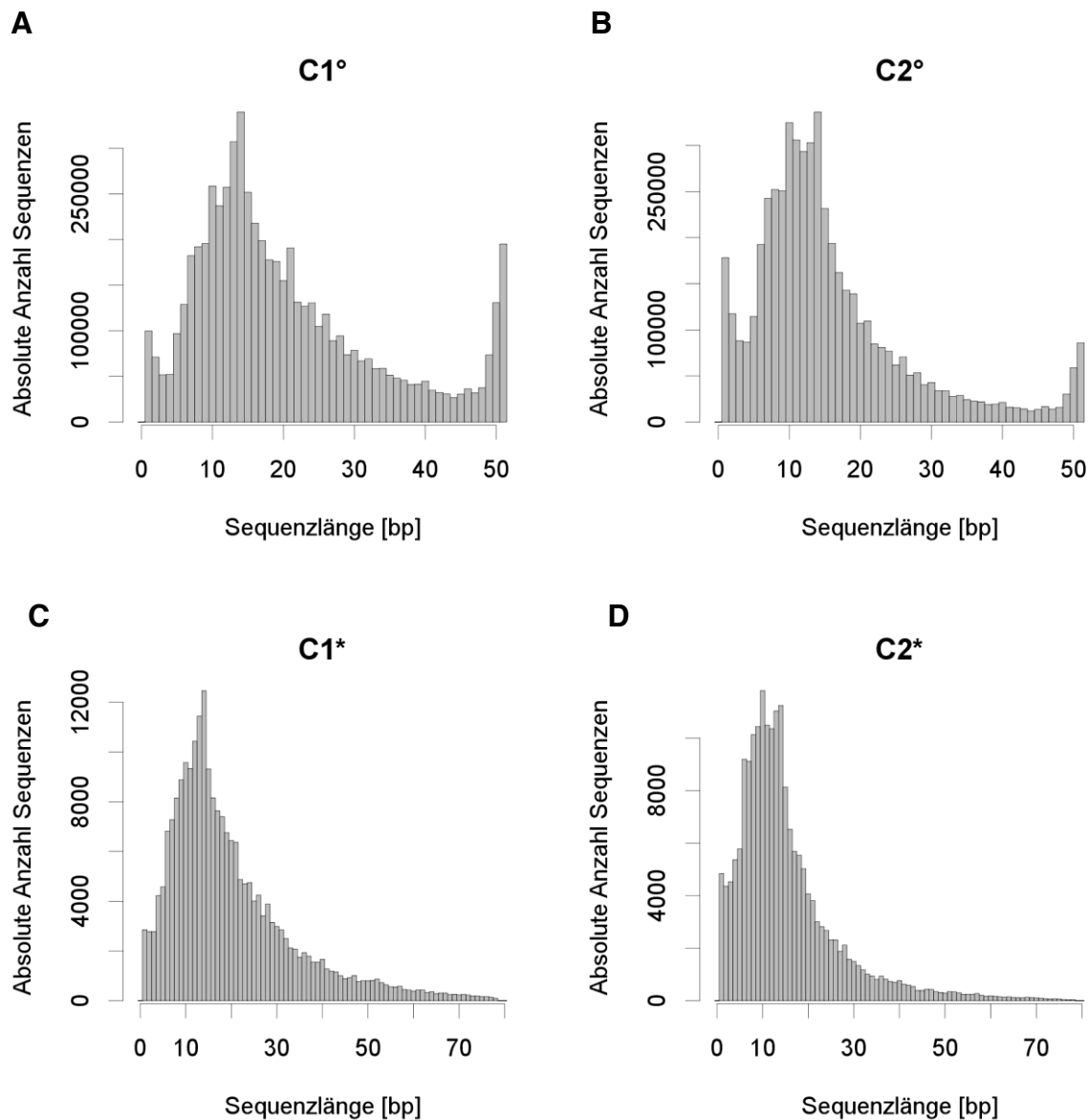


Abbildung 3.18: Sequenzlängenverteilung MiSeq vs. HiSeq2500, exemplarisch für C1 und C2. Die Anzahl der Sequenzen für C1 (A, C) und C2 (B, D) wurden gegen die jeweilige Sequenzlänge aufgetragen. °: HiSeq2500-Sequenzierung; *: MiSeq-Sequenzierung.

Die Sequenzierung der gleichen cDNA-Bibliothek (C1, C2) mit dem MiSeq (*) sowie mit dem HiSeq2500 (°) führte in allen Datensätzen und für beide Sequenzierer zu einer ähnlichen Längenverteilung mit Unterschieden im Bereich von langen Sequenzen (Abb. 3.18). Die Maxima in allen Datensätzen lagen bei einer Länge von 10 - 14 bp, wobei C2 zusätzlich einen großen Anteil an Sequenzen einer Größe von 10 bp aufwies (Abb, 3.18C2°, C2*). Nach den Maxima fielen alle Kurven zu kleineren und größeren Sequenzen hin rasch ab. Lediglich die HiSeq2500-Datensätze wiesen technisch bedingt Sequenzen einer Maximallänge von 51 bp auf und besaßen dort ein weiteres lokales Maximum. Die MiSeq-Sequenzierung führte zur Generierung von Sequenzen

einer Länge von bis zu 80 bp (Abb. 3.18C, D), sodass nur ein geringer Verlust von Sequenzierinformationen durch die verkürzte Sequenzierlänge des HiSeq2500 zu erwarten war (Abb. 3.18A, B).

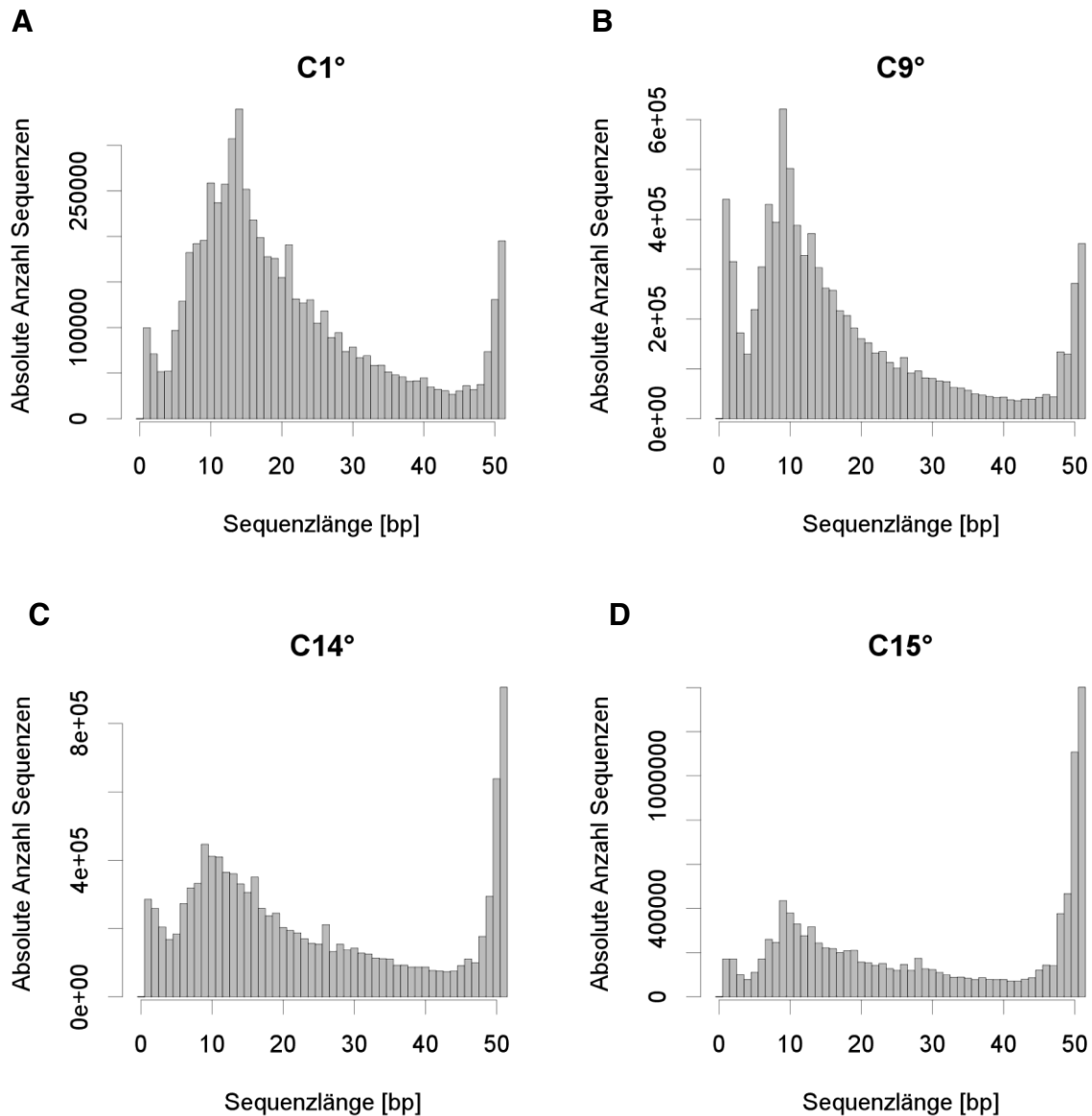


Abbildung 3.19: Sequenzlängenverteilung ausgewählter Datensätze. Die Anzahl der Sequenzen in C1 (A), C9 (B), C14 (C) und C15 (D) wurden gegen die Sequenzlänge aufgetragen. °:HiSeq2500-Sequenzierung.

C1 (DGZ-Vakuolen, Jungpflanzen), C9 (DGZ-Vakuolen, adulte Pflanzen), C14 (NAF-Vakuolen) und C15 (Protoplasten) wiesen sehr ähnliche Längenverteilungen mit Maxima bei 14 bp (Abb. 3.19A) bzw. 9 bp (Abb. 3.19B,C,D) auf. Zusätzlich ergaben sich im Bereich von 51 bp und 0 - 4 bp weitere Maxima. Letzteres war in C9 am stärksten ausgeprägt (Abb. 3.19, C9). C14 enthielt im Gegensatz zu C1 und C9 wesentlich mehr Sequenzen einer Länge von 51 bp. Dieser Trend war in C15 noch

stärker ausgeprägt (vgl. dazu Tab. 3.1). Die nicht gezeigten Datensätze (C2 - C8 und C10 - C13) wiesen ähnliche Leseweitenverteilungen auf wie C1 und C9 (Abb. S4).

Es bleibt festzuhalten, dass die Sequenzierdaten eine hohe Qualität und hohe Sequenziertiefe aufwiesen. Datensätze aus vakuolärer RNA besaßen grundsätzlich kürzere Sequenzen als Datensätze aus protoplastidärer RNA.

3.3.7 Globaler Vergleich der Datensätze

Es existieren universelle und systemübergreifende Protokolle zur Prozessierung, Analyse und Visualisierung von Sequenzierdatensätzen; um gezielte Fragestellungen zu beantworten war jedoch eine individuell angepasste Prozessierung notwendig. Um die Herkunft der vakuolären RNA-Produkte zu bestimmen wurde ein dafür vorgesehener *Workflow* von der Abteilung „Systemanalyse, Prognose und Regelung“ des Fraunhofer-Instituts für Techno- und Wirtschaftsmathematik ITWM entwickelt (Abb. 3.18) und die in dieser Arbeit beschriebenen Datensätze hiermit ausgewertet.

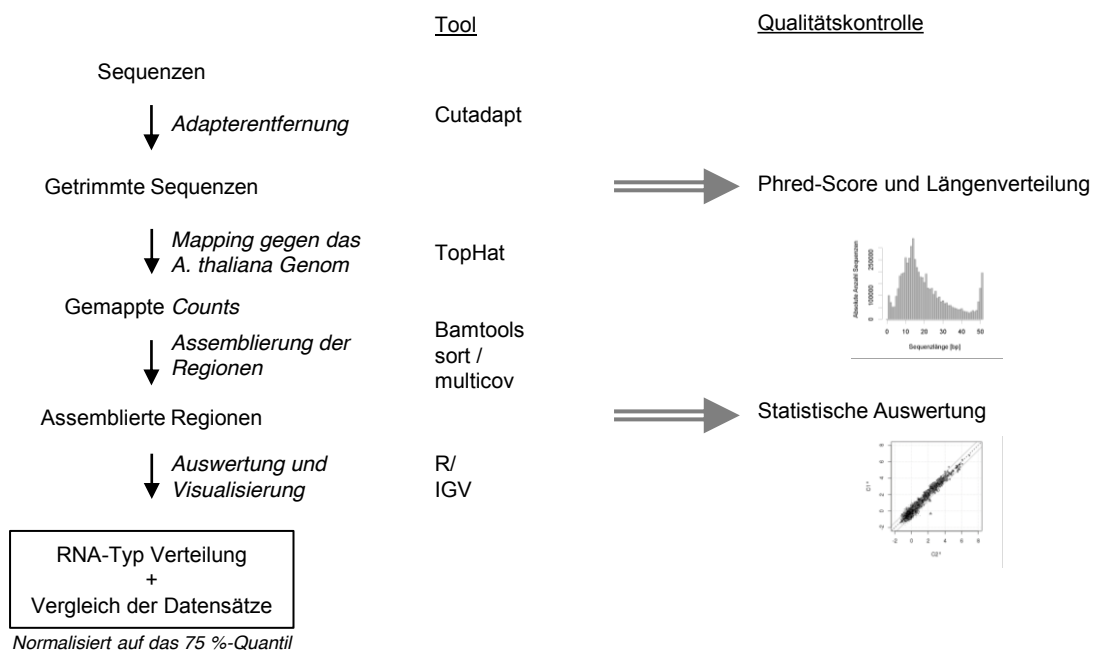


Abbildung 3.20: Workflow der Datenverarbeitung und -auswertung. Die Adaptersequenzen wurden mit Cutadapt entfernt und die so getrimmten Sequenzen mit TopHat gegen das *A. thaliana*-Genom (TAIR10) gemappt. Die gemappten Sequenzen wurden mit multicov aus der BEDTools-Suite mit annotierten RNA-Loci überlappt und die überlappenden Sequenzen pro Locus gezählt. Die statistische Auswertung und Visualisierung dieser *Counts* über die RNA-Loci erfolgte hauptsächlich in R (Kap. 2.6.3).

Zur besseren Datenverarbeitung wurden die Rohdaten zunächst mit geeigneter Software prozessiert. Die Entfernung technischer Sequenzen (Trimmen) erfolgte in

Cutadapt (Kap. 2.6.3) und war notwendig, um die für die cDNA-Herstellung und Sequenzierung benötigten Adapter nicht mit in die Analyse zu übernehmen. Abhängig von der Sequenzlänge wurden unterschiedlich viele *Missmatches* zugelassen (Tab. 2.8). Die Anlagerung der Sequenzen an das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) erfolgte mit TopHat (Kap. 2.6.3). Ein globaler Vergleich mehrerer Datensätze ermöglichte eine Abschätzung der Datenqualität und globale Unterschiede in den Datensätzen zu erkennen. Zur Normalisierung der Datensätze wurde das 75 %-Quantil herangezogen und die Anzahl der *Counts* darauf bezogen. Für die Beschreibung und spätere Interpretation der globalen Vergleiche ist darauf zu achten, dass aufgrund der fehlenden Berücksichtigung der verschiedenen Locuslängen, Abundanzaussagen innerhalb eines Datensatzes nicht zulässig sind. Dies ändert jedoch nichts an der Legitimität des Vergleiches der Loci innerhalb mehrerer Datensätze. Die Abundanz wurde in gering (10^{-2} bis 10^0), mittel (10^0 bis 10^2) und hoch (10^2 bis 10^4) unterteilt.

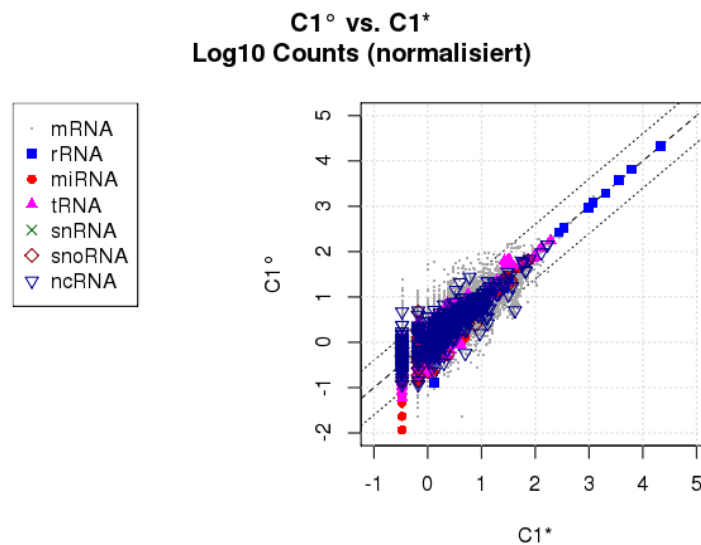


Abbildung 3.21: Streudiagramm normalisierter *Counts* von C1. Verglichen wurde die Anzahl der normalisierten *Counts* pro Locus der unterschiedlichen RNA-Typen in C1, die durch zwei verschiedene Sequenzierer generiert wurden (°: HiSeq2500, *: MiSeq). Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Diagonale (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktirt) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. *: MiSeq-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Wurde C1 mit zwei verschiedenen Sequenzierern analysiert, so ergaben sich Unterschiede der normalisierten *Counts* über die vierfache differentielle Änderung hinaus lediglich im Bereich bis 10^2 (Abb. 3.21). Die minimale Locus-Abundanz lag bei

dem MiSeq-Sequenzierer bei circa $10^{-0,5}$, Sequenzierungen mit dem HiSeq2500 erreichten eine Mindestanzahl von 10^{-2} normalisierten *Counts* pro Locus. Die Varianz der *Counts* für die rRNA-Loci im hoch-abundanten Bereich war so gering, dass die Punkteschar im Bereich von 10^2 bis 10^5 auf der Diagonale angesiedelt war (Abb. 3.21). Die gerätespezifisch hohe Varianz im niedrigen bis mittleren Abundanzbereich (10^{-2} bis 10^2) musste für die folgenden Vergleiche berücksichtigt werden.

Der globale Vergleich zweier biologischer Replikate (C4 und C9) erlaubte die Abschätzung der biologischen und technischen Variabilität während der Datenauswertung.

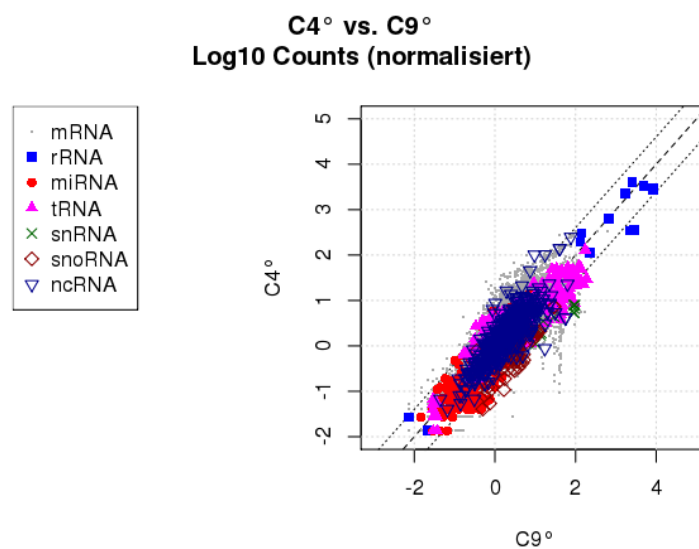


Abbildung 3.22: Streudiagramm normalisierter *Counts* von zwei biologischen Replikaten (C4, C9). Verglichen wurde die Anzahl der normalisierten *Counts* pro Locus der unterschiedlichen RNA-Typen in den Datensätzen C4 und C9. Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Diagonale (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktirt) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Der globale Vergleich von C4 und C9 offenbarte zunächst erneut eine hohe Anzahl an *Counts* für mehrere rRNA-Loci im Bereich von 10^2 bis 10^4 , wobei zwei dieser rRNAs in C9 mehr *Counts* aufwiesen als in C4 (Abb. 3.22). Diesen folgten vereinzelte mRNAs, tRNAs und ncRNAs, deren Anzahl an *Counts* sich in beiden Datensätzen um mehr als die vierfach differentielle Änderung unterschied (Abb. 3.22). Die Mehrheit der Loci im Bereich von 10^{-2} bis 10^2 wies weniger als eine vierfach differentielle Änderung auf (Abb. 3.22). Loci, bei denen die Varianzen zwischen C4 und C9 darüber hinaus gingen wiesen mehrheitlich Änderungen im Bereich der gerätespezifischen Varianz auf.

Die biologische Varianz fiel stärker aus als die gerätespezifische Varianz, was für weitere Aussagen zur Abundanzänderung in zwei Datensätzen zu berücksichtigen ist. Zur Bestätigung der intravakuolären Lokalisierung der isolierten RNA wurden vor der RNA-Isolation und cDNA-Bank-Herstellung intakte Vakuolen mit RNase A inkubiert (C10). Als Kontrolle diente eine Vakuolenprobe ohne RNase A-Inkubation (C9).

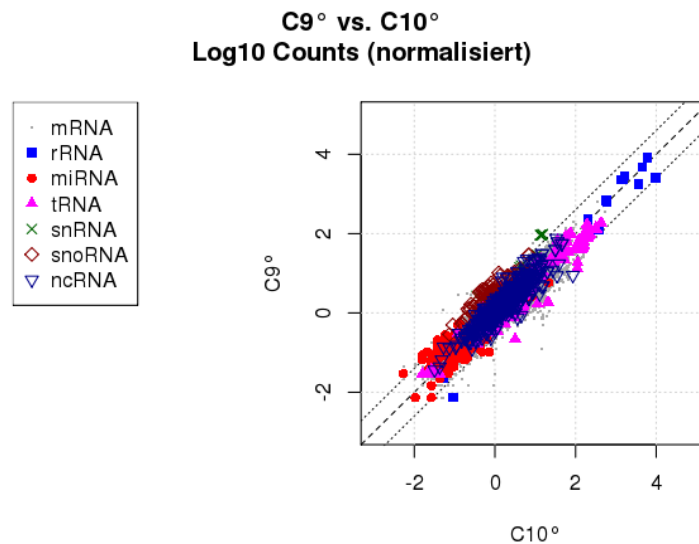


Abbildung 3.23: Streudiagramm normalisierter *Counts* einer RNase A behandelten Probe (C10) im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (C9). Verglichen wurde die Anzahl der normalisierten *Counts* pro Locus der unterschiedlichen RNA-Typen in den Datensätzen C9 und C10. Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Diagonale (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktirt) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Das Streudiagramm zeigte eine hohe Ähnlichkeit in Bezug auf die Anzahl der normalisierten *Counts* pro Locus in C9 und C10. C9 wies im Abundanzbereich von 10^{-2} bis 10^2 im Vergleich zu C10, ähnlich wie zuvor im Vergleich zu C4, überwiegend Loci auf, die lediglich eine geringe Varianz zeigten (Abb. 3.23). Im hoch-abundanten Bereich (10^2 bis 10^4) schwankte änderte sich die Anzahl an *Counts* für die rRNA-Loci nicht über die vierfache differentielle Änderung hinaus. Die RNase A-Inkubation einer weiteren Vakuolenisolation lieferte ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der *Counts* pro Locus im Vergleich einer nicht behandelten Probe (Abb. S5). Folglich bleibt festzuhalten, dass die RNase A-Behandlung keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung der intravakuolären RNA-Fragmente hatte.

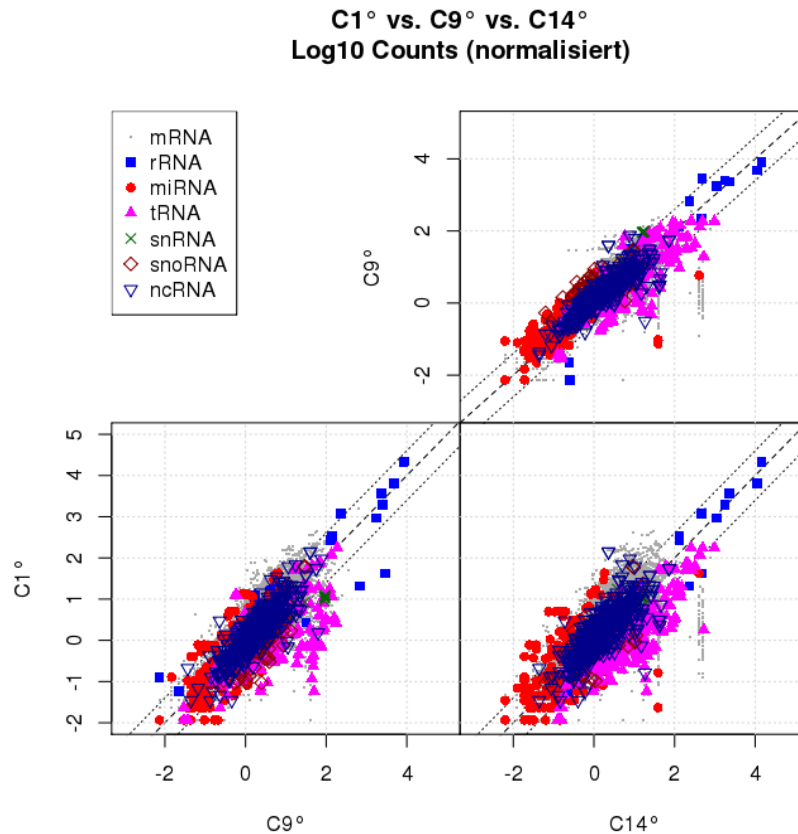


Abbildung 3.24: Streudiagramme normalisierter *Counts* von Proben aus unterschiedlichen Vakuolenisolation (C1, C9 und C14). Verglichen wurde die Anzahl der normalisierten *Counts* pro Locus der unterschiedlichen RNA-Typen in den Datensätzen C1 (DGZ-Vakuolen aus Jungpflanzen), C9 (DGZ-Vakuolen aus adulten Pflanzen) und C14 (NAF-Vakuolen aus adulten Pflanzen; Kap. 2.4.6). Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Diagonale (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktirt) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Es wurden Vakuolen über verschiedene Protokolle isoliert und die enthaltene RNA zur cDNA-Herstellung verwendet (C1: DGZ-Vakuolen aus Jungpflanzen; C9: DGZ-Vakuolen aus adulten Pflanzen; C14: NAF-Vakuolen aus adulten Pflanzen; Kap. 2.4.6). Die Anzahl an *Counts* vieler tRNAs im Bereich von 10^0 bis 10^2 war in C9 und C14 wesentlich höher als in C1 (Abb. 3.24). Darüber hinaus schwankte die Anzahl an *Counts* von weiteren Loci in den Datensätzen weit über die vierfache differentielle Änderung hinaus. Die 5 rRNA-Loci mit den meisten *Counts* wies in allen Vergleichen eine Änderung unter der vierfachen differentielle Änderung auf (Abb. 3.24).

Über die nicht-wässrige Fraktionierung aufbereitete Vakuolen (C14) wiesen im hoch-abundanten Bereich (10^2 - 10^5) eine verstärkte Varianz einzelner Loci im Vergleich zu DGZ-vakuolärer RNA auf. Viele tRNA- und einige rRNA-Transkripte waren auch in

Jungpflanzen (C1) im hoch-abundanten Bereich mit weniger *Counts* vertreten als in adulten Pflanzen (C9).

Neben der Analyse von cDNA-Bibliotheken, die aus vakuolärer RNA stammten (C1, C9, C14) erfolgte die Analyse einer cDNA-Bibliothek aus protoplastidärer (zellulärer) RNA (C15).

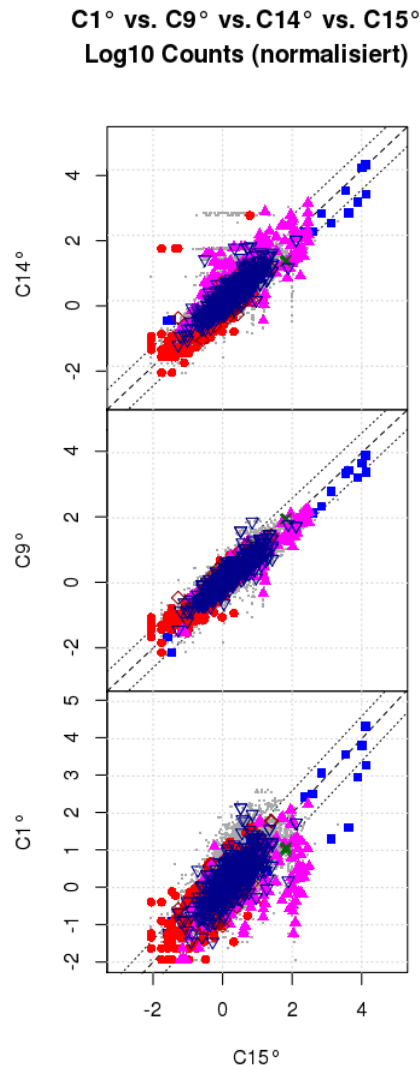


Abbildung 3.25: Streudiagramme normalisierter *Counts* von vakuolären (C1, C9, C14) und protoplastidären (C15) Proben. Verglichen wurde die Anzahl der normalisierten *Counts* pro Locus der unterschiedlichen RNA-Typen in den Datensätzen C15, C1, C9 und C14. Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arapidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Nulllinie (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktirt) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Die Änderung der Anzahl an *Counts* pro Locus in C1 vs. C15 war größer als in C9 bzw. C14 vs. C15 (Abb. 3.25). Die Anzahl der *Counts* von vielen tRNAs im Bereich von 10^0 bis 10^2 war in C15 wesentlich höher als in C1 (Abb. 3.25). Darüber hinaus schwankte die Anzahl an *Counts* vieler anderer Loci im Vergleich dieser beiden Datensätze weit

über die vierfache differentielle Änderung hinaus. Die Anzahl der normalisierten *Counts* zweier hoch-abundanter rRNAs war in C1 im Vergleich zu C15 um das 100-fache reduziert. Die Streuung in den Datensätzen C15/C9 lag im hoch-abundanten Bereich kaum über der vierfach differentiellen Änderung. In den Datensätzen C15/C14 wiesen einige dieser hoch-abundanten rRNA-Loci eine erhöhte Anzahl an *Counts* in C15 auf.

Folglich zeigte vor allem der Vergleich von C9 und C15, dass die Anzahl der *Counts* pro Locus für vakuoläre und protoplastidäre RNA kaum unterschiedlich war. C1 und C14 hingegen wiesen vermehrt Loci auf, die im Vergleich zu C15 weniger stark abgedeckt waren.

3.3.8 RNA-Typ-Verteilung

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung des vakuolärer RNoms im Hinblick auf die unterschiedlichen RNA-Typen. Mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* war es möglich, Sequenzinformationen zu erhalten, die in Form von normalisierten Daten eine Zuordnung der RNA-Fragmente zu verschiedener RNA-Typen ermöglichten. In der globalen Betrachtung der Datensätze fiel bereits auf, dass die *Counts* von rRNA-Loci im Vergleich zu allen anderen RNA-Typen wesentlich höher war (Abb. 3.21 bis Abb. 3.25). Die Darstellung in Form von Histogrammen ermöglicht zudem eine Aussage über gering-abundanter RNA-Typen zu treffen. Im Folgenden ist daher die Verteilung der normalisierten *Counts* auf ausgewählte RNA-Typen von C4 und C9 gezeigt. Die Abundanz wurde in gering (10^{-2} bis 10^0), mittel (10^0 bis 10^2) und hoch (10^2 bis 10^4) unterteilt.

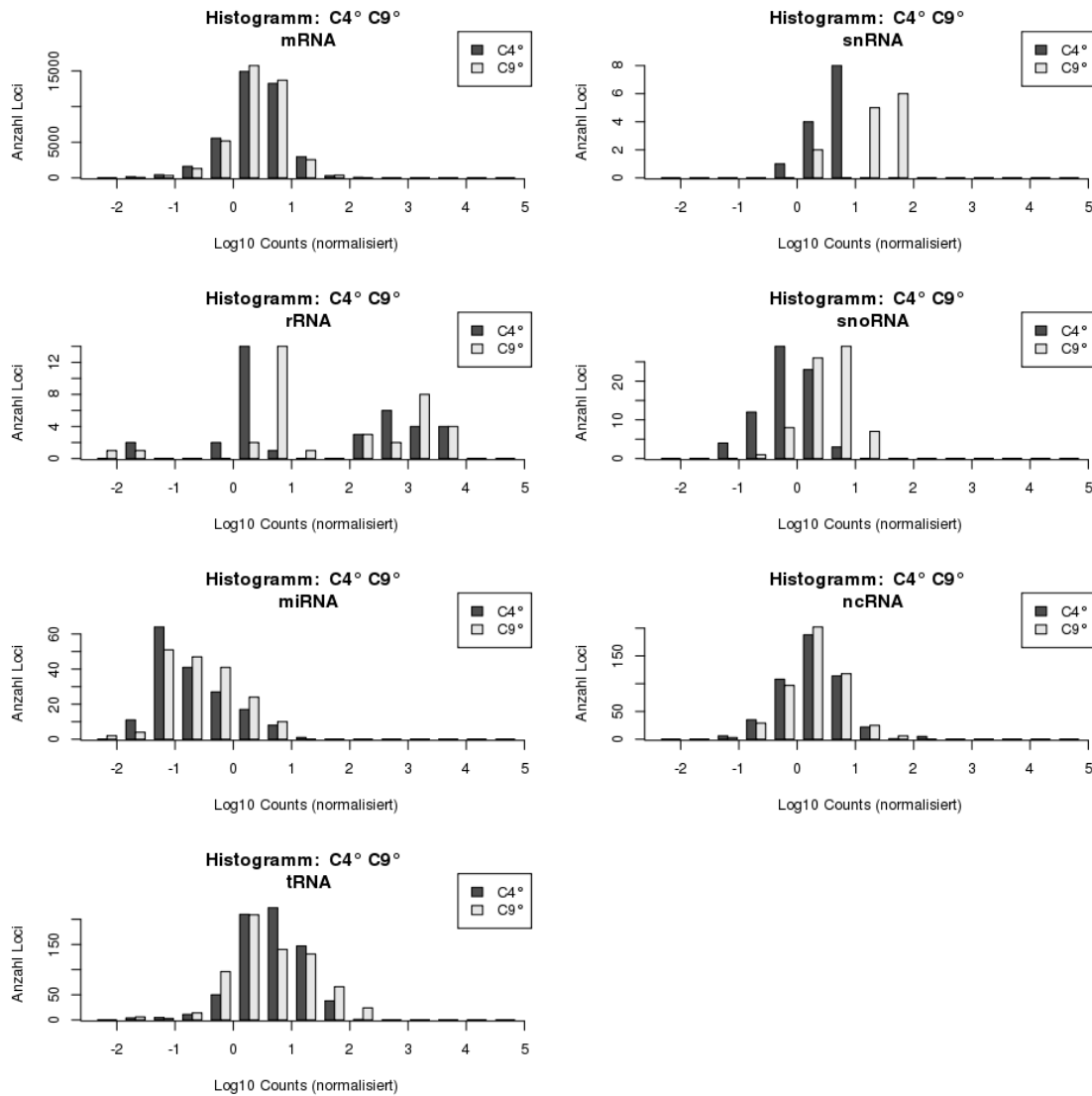


Abbildung 3.26: Histogramme der normalisierten Counts der biologischen Replikaten (C4, C9).

Verglichen wurden die Abundanz der Loci von unterschiedlichen RNA-Typen in den Datensätzen C4 und C9. Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Die Verteilung der normalisierten Counts erfolgte auf unterschiedliche Anzahlen von Loci für die dargestellten RNA-Typen (Abb. 3.26). Die Counts wurden auf > 30.000 mRNAs, > 500 tRNAs, > 400 ncRNAs, > 100 miRNAs, > 60 snoRNAs, > 30 rRNAs und bis zu 13 snRNAs in C4 bzw. C9 aligniert (Abb. 3.26, Tab. 3.2). Die mRNAs waren zwar mit einer großen Anzahl an Loci vertreten, die Anzahl der darauf verteilten Counts lag in beiden Datensätzen jedoch mit 10^0 bis 10^1 im mittleren Bereich (Abb. 3.26, mRNA). Auch die Anzahl der Counts für tRNA- und ncRNA-Loci lag in C4 und C9 überwiegend im mittleren Abundanzbereich von 10^0 bis 10^2 , wobei vereinzelte Loci in

C9 mehr als 10^2 *Counts* aufwies (Abb. 3.26). *Counts* der miRNA-Loci waren mit 10^{-1} bis 10^0 überwiegend gering repräsentiert (Abb. 3.26, miRNA). Die Anzahl der *Counts* für snoRNAs, sowie snRNAs war in C9 höher als in C4. Während in C4 den meisten snRNA-Loci 10^1 normalisierte *Counts* zugeordnet wurden, war der Anteil in C9 um das zehnfache größer. Der überwiegende Teil der snoRNAs in C4 war mit 10^0 normalisierte *Counts* abgedeckt, wobei in C9 erneut eine um circa das Zehnfache erhöhte Anzahl an *Counts* zu verzeichnen war. Die mit Abstand meisten *Counts* wurden den verschiedenen rRNA-Loci zugeordnet (Abb. 3.26, rRNA). In beiden Datensätzen konnten für die über 36 Loci eine Anzahl von 10^{-2} bis 10^4 *Counts* ermittelt werden (Abb. 3.26, rRNA).

Tabelle 3.2: Statistik der Assemblierung. Die *Counts* wurden gegen das *A. thaliana*-Genom assembliert und der Anteil assemblierter Sequenzen der Loci pro RNA-Typ zusammengefasst.

| | Anteil <i>Counts</i> [%] | | | | Anzahl Loci | | | |
|------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|
| | C1 | C9 | C14 | C15 | C1 | C9 | C14 | C15 |
| rRNA | 23,91 | 20,23 | 21,5 | 34,16 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Cytosolische rRNA | 21,76 | 13,39 | 19,01 | 17,07 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 18S | 4,3 | 4,13 | 7,68 | 6,36 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5,8S | 2,49 | 1,97 | 1,55 | 2,16 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 25S | 14,47 | 7,16 | 9,57 | 8,28 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5S | 0,5 | 0,13 | 0,22 | 0,27 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| chloroplastidäre rRNA | 1,96 | 6,71 | 2,4 | 16,9 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 16S | 0,62 | 1,48 | 0,72 | 4,86 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 23S | 1,3 | 2,2 | 1,2 | 8,5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4,5S | 0,03 | 2,46 | 0,32 | 2,69 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5S | 0,01 | 0,57 | 0,16 | 0,85 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| mitochondriale rRNA | 0,2 | 0,13 | 0,09 | 0,2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 26S | 0,09 | 0,06 | 0,04 | 0,07 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5S | 0 | 0,01 | 0 | 0,01 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 18S | 0,11 | 0,06 | 0,04 | 0,12 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| mRNA | 72,52 | 73,67 | 68,11 | 59,26 | 39265 | 39296 | 39296 | 39289 |
| miRNA | 0,14 | 0,06 | 0,21 | 0,05 | 174 | 179 | 180 | 179 |
| tRNA | 2,57 | 4,83 | 9,44 | 5,69 | 689 | 689 | 689 | 689 |
| snRNA | 0,04 | 0,28 | 0,04 | 0,14 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| snoRNA | 0,09 | 0,13 | 0,07 | 0,08 | 71 | 71 | 71 | 71 |
| ncRNA | 0,73 | 0,8 | 0,64 | 0,61 | 479 | 480 | 480 | 479 |

Neben der Betrachtung der einzelnen Loci konnten die zugeordneten *Counts* nach RNA-Typ zusammengefasst werden. Der größte Anteil der *Counts* in C1, C9, C14 und C15 war mit 59 bis 74 % der mRNA-Fraktion zuzuschreiben (Tab. 3.2) – verteilt auf nahezu 40.000 mRNAs. C15 (59,26 %) wies dabei den geringsten Anteil, C1 (73,67 %) den größten Anteil auf. rRNA-*Counts* kamen mit 20 - 34 % am zweithäufigsten vor, wobei der Anteil in C9 am niedrigsten (20,23 %) und in C15 (34,16 %) am höchsten war. Die *Counts* wurden in C1, C9, C14 und C15 auf insgesamt 36 rRNA-Loci aligniert. Den tRNAs konnten 3 - 9 % der *Counts* zugeordnet werden, welche sich in allen

Datensätzen auf 689 Loci verteilt. SnoRNA, snRNA und ncRNA kamen zusammen auf 0,49 % bis 0,86 % (Tab. 3.2).

Da die Anzahl der *Counts* pro Locus für die rRNA-Loci mit Abstand am höchsten war, wurden diese Genombereiche genauer analysiert. Hierzu erfolgte die Betrachtung der alignierten Sequenzen in den Datensätzen C4 und C9.

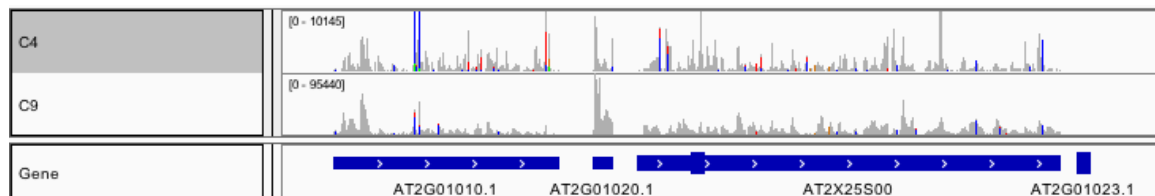


Abbildung 3.27: Abdeckung repräsentativer, kerncodierter rRNA-Loci auf Chromosom 2 in C4 und C9. Verglichen wurde die Abdeckung des 45S rRNA-Locus im Bereich von AT2G01010.1 bis AT2G01023.1 in C4 und C9. Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3).

Sowohl in C4 als auch in C9 zeigte sich unter anderem auf Chromosom 2 eine hohe Abdeckung im Bereich der 18S rRNA (AT2G01010.1), 5,8S rRNA (AT2G01020.1) und 25S rRNA (AT2X25S00). Die Bereiche der internen und externen *Spacer* waren hingegen gering bis gar nicht mit Sequenzen abgedeckt (Abb. 3.27).

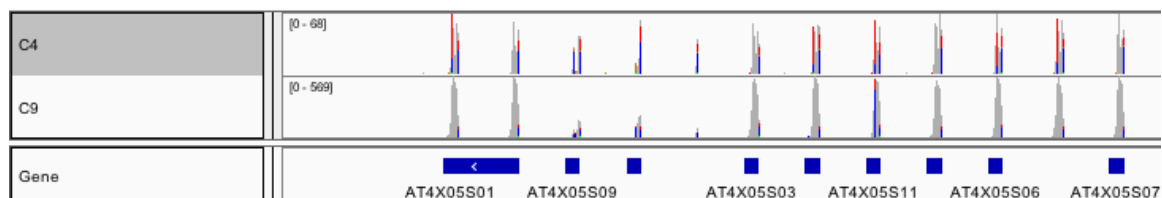


Abbildung 3.28: Abdeckung repräsentativer, kerncodierter rRNA-Loci auf Chromosom 4 in C4 und C9. Verglichen wurde die Abdeckung der multiplen 5S rRNA-Loci von AT4S05S01 bis AT4X05S07 in C4 und C9. Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3).

Auch die multiplen 5S rRNA-Bereiche auf Chromosom 4 wiesen eine hohe Abdeckung in beiden Datensätzen auf (Abb. 3.28). Auch hier wurden kaum *Counts* in Bereichen außerhalb der rRNA-Loci aligniert.

Für den ersten Abschnitt dieser Arbeit, der sich mit dem vakuolären RNom und dem Einfluss der RNS2 auf die vakuoläre RNase-Aktivität befasste, bleibt festzuhalten, dass in *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien sowohl die vakuolären RNA-Abbauprodukte (Abb. 3.7), als auch die vakuoläre RNase-Aktivität (Abb. 3.9 und Abb. 3.11) im Vergleich zum Wildtyp verringert war. Die im Rahmen dieser Experimente isolierten

Vakuolen wiesen, je nach Isolationsmethode, RNA und unterschiedliche Grade an chloroplastidärer und cytosolischer Verunreinigungen auf, was durch selektive Färbung bzw. Aktivitätsmessungen entsprechender Markerenzyme quantifiziert wurde (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Je nach Isolationsmethode wurde darüber hinaus vakuoläre RNA unterschiedlicher Größenordnungen isoliert (Abb. 3.15). Während RNA aus NAF-Vakuolen bis zu 1000 nt groß war, wiesen DGZ-Vakuolen aus Jungpflanzen kleine Fragmente im Bereich bis 50 nt auf. Aus DGZ-Vakuolen adulter Pflanzen konnte hingegen RNA einer Größe bis zu 150 nt isoliert werden. Wurden intakte Vakuolen mit RNase A inkubiert, so blieben von den ursprünglich bis zu 150 nt großen RNA-Fragmenten, lediglich die einer Größe von 50 nt übrig (Abb. 3.16). Es kann also eine Korrelation zwischen dem Grad der methodisch bedingten Verunreinigung und der Größe der vakuolären RNA angenommen werden. Sowohl die cDNA als auch die sequenzierten cDNA-Bibliotheken wiesen eine Vielzahl an Fragmentgrößen ≤ 50 nt auf, wenngleich der Anteil an größeren Sequenzen in den Sequenzierdaten unterrepräsentiert war (Abb. 3.17 bis Abb. 3.19). Hinsichtlich der globalen Verteilung unterschieden sich die Sequenzdaten aus den unterschiedlichen Vakuolenisolationen relativ stark im niedrig- bis mittel-abundanten Bereich (Abb. 3.24). Die RNase A-Behandlung intakter Vakuolen führte zu keiner auffälligen Veränderung der Anzahl der *Counts* einzelner Loci bzw. RNA-Typen in vakuolärer RNA (Abb. 3.23). Die Anzahl der *Counts* pro Locus für vakuoläre und protoplastidäre RNA unterschieden sich kaum (Abb. 3.25). Der Anteil an mRNA-*Counts* war zwar mit Abstand am höchsten (bis zu 74 % der Gesamt-*Counts*), allerdings verteilten sich diese *Counts* auf nahezu 40.000 mRNAs (Tab. 3.2). Im Gegensatz dazu verteilte sich der Anteil an rRNA-*Counts* (24 % der Gesamt-*Counts*) auf nur 36 Loci.

3.4 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des Equilibrativen Nucleosidtransporters 7 (ENT7) aus *A. thaliana*

Nucleoside treten unter anderem als Produkte des RNA-Abbaus in der Zelle auf und können zur Remobilisierung von Stickstoff dienen (Cornelius *et al.*, 2011). Die Familie der Equilibrativen Nucleosidtransporter in *A. thaliana* besitzt 8 Vertreter, wobei die meisten Transporter eine Protonen-abhängigen Symport ermöglichen (Girke *et al.*, 2014). Somit ist die Transportrichtung durch den Protonengradienten über der Membran determiniert. Lediglich ENT7 zeigt nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Ähnlichkeit zu den namensgebenden Vertretern aus Säugetieren, da er

einen equilibrativen Transport seiner Substrate ermöglicht (Girke *et al.*, 2015; Wormit *et al.*, 2004). Folglich existiert in *A. thaliana* mit ENT7 lediglich ein Vertreter, der einen Export von RNA-Abbauprodukten in Form von Nucleosiden aus der Zelle ermöglicht. Mit ENT1 und ENT2 in *H. sapiens* existieren zwei ENT-Proteine die einen equilibrativen Transport von Nucleosiden über die Plasmamembran in menschlichen Zellen gewährleisten. Sie stehen weniger durch ihre Fähigkeit RNA-Abbauprodukte zu exportieren im Fokus, als vielmehr dadurch, dass sie durch Transport gängiger Therapeutika oder Inhibierbarkeit von Nucleosid- und Nucleosid-Derivat-Transport ein wichtiges Ziel im Kampf gegen Krebs, AIDS, sowie parasitische und kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen (Mohelnikova-Duchonova & Melichar, 2013; Valdes *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2008). Bis dato ist es nicht gelungen, ein ENT-Gen heterolog zu exprimieren und in Detergens solubilisiertes Protein ohne Funktionsverlust zu isolieren (Hammond, 1997; Hammond *et al.*, 1996; Young *et al.*, 2013). Dies ist jedoch notwendig, um die vorhergesagte Struktur auf Basis von Kristallisationsstudien zu verifizieren. So besteht ein besonderes Interesse an der Expression und Aufreinigung von ENT Proteinen.

3.4.1 Topographisches Modell des Equilibrativen Nucleosidtransporters 7

Aus der Familie der Equilibrativen Nucleosidtransporter, die ausschließlich in Eukaryoten vertreten sind, weist *A. thaliana* ENT7 mit 29,7 % den größten Anteil an identischen Aminosäuren zu *A. thaliana* ENT8 auf, gefolgt von ENT1 und ENT2 aus *Mus musculus* (*M. musculus*), *Homo sapiens* (*H. sapiens*) und *Rattus norvegicus* (20,5 - 18,2 %) (Li *et al.*, 2003). Für *A. thaliana* ENT7 ist mit 11 Transmembrandomänen eine ähnliche Topologie vorhergesagt wie für ENT1 aus *H. sapiens* (Abb. 3.29).

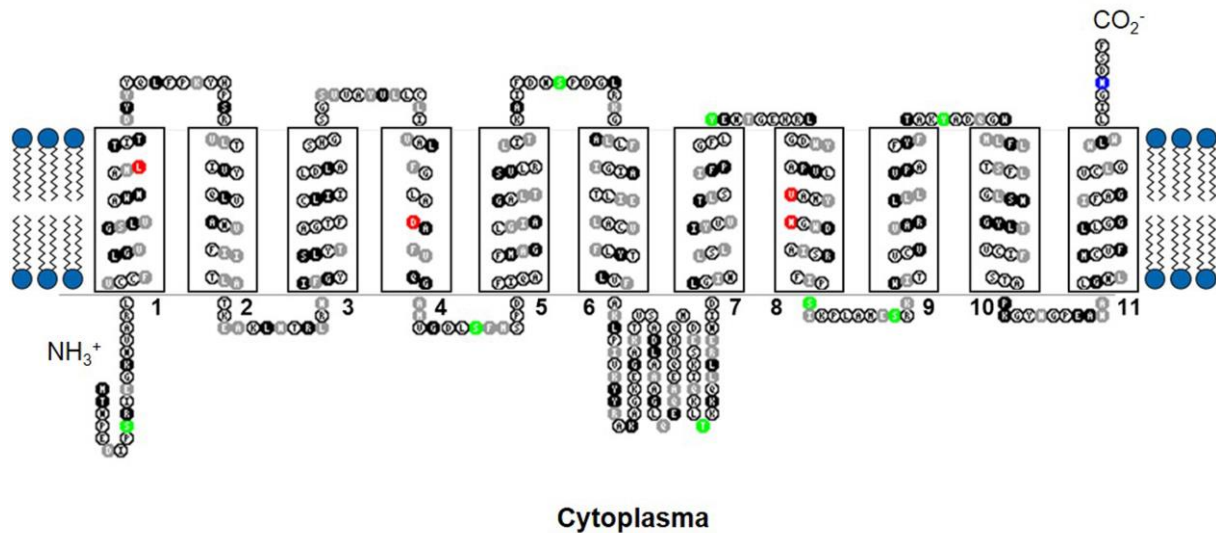


Abbildung 3.29: Topographisches Modell des ENT7 aus *A. thaliana*. Vorhergesagte α -helikale Bereiche sind nummeriert (Rechtecke). Identische (schwarz) und ähnliche Aminosäuren (grau) zum hENT1 wurden ebenso hervorgehoben wie die vorhergesagte N-Glykolisierungsstellen (blau), Phosphorylierungsstellen (grün) und die zum hENT1 korrespondierenden und für Inhibitorerkennung und Substrattranslokation notwendigen Aminosäuren M33, G154, F334 und N338 (rot). Das Topologiemodell wurde mit dem TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>; Stand: 31.5.2015) und "TOPO2 transmembrane protein" Software (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2>; Stand: 31.5.2015) erstellt. Putative N-Glykolisierungsstellen wurden mit NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>; Stand: 31.5.2015), putative Phosphorylierungsstellen mit NetPhos 2.0 Server (Blom *et al.*, 2004) identifiziert.

Zwischen der 6. und 7. Transmembrandomäne ist auch für den ENT7 aus *A. thaliana* ein großer cytosolischer *Loop* vorhergesagt (Abb. 3.29). Der extrazelluläre C-Terminus besitzt eine putative Glykolisierungsstelle (blau) und der ins Cytosol orientierte N-Terminus eine putative Phosphorylierungsstelle (grün). Innerhalb der hydrophilen *Loop*-Bereiche liegen 7 weitere putative Phosphorylierungsstellen. Die im hENT1 als wichtig für Inhibitor- und Substratbindung identifizierten Aminosäuren M33, G154, F334 und N338 sind rot hervorgehoben und liegen in den Transmembrandomänen 1, 4 und 8 (Abb. 3.29). Da diese Aminosäuren identifiziert wurden, bieten Mutagenesestudien am insensitiven ENT7 ein großes Potential für vielversprechende Kristallisationsstudien, sofern eine Expression und Aufreinigung des ENT7 erfolgreich durchgeführt werden kann.

3.4.2 Expression und Aufreinigung des ENT7 aus *A. thaliana*

Der eukaryotische Expressionsorganismus *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) eignet sich zur Expression von komplexen eukaryotischen Membranproteinen und hat gegenüber

bakteriellen Expressionssystemen verschiedene Vorteile. So wurde die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation, wie Glykosylierung, Lipidierung oder Phosphorylierung als wichtig für die Expression stabiler, funktionaler Membranproteine bewertet (Hesketh *et al.*, 2002). ENT7 wurde mit einem C-terminalen eGFP und His₈-Tag in *P. pastoris* synthetisiert. Um die Kolonie mit der höchsten Proteinsynthese zu identifizieren, wurde ein eGFP-basierter Expressionscreen angewandt. Dazu wurden Kolonien auf BMMY-Platten übertragen, um die Proteinsynthese zu induzieren. Nicht-transformierte *P. pastoris*-Zellen wurden als Negativkontrolle (Abb. 3.30A, Position 1 - 2), *PEMT* exprimierende Zellen als Positivkontrolle (Abb. 3.30A, Position 3 - 4) aufgetragen.

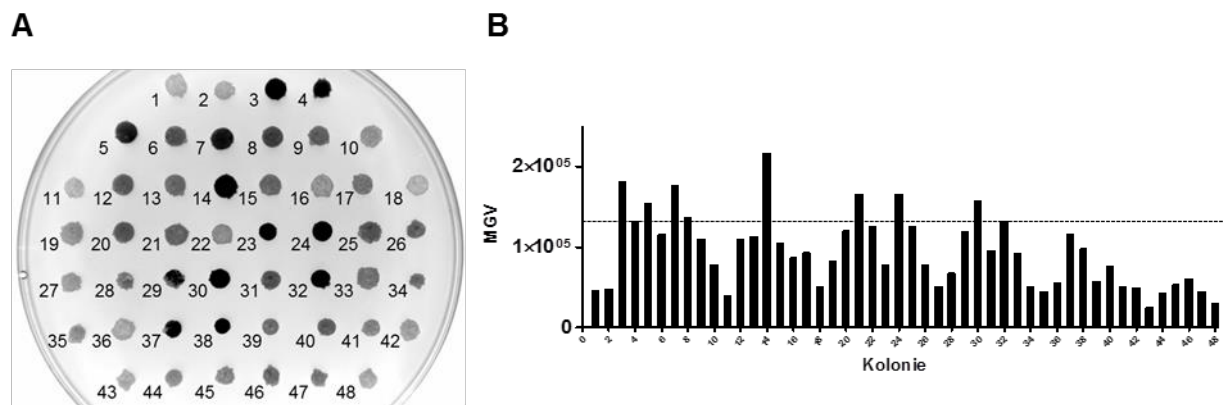


Abbildung 3.30: Plattenbasierter Expressionscreen von ENT7-eGFP Kolonien. (A) ENT7-eGFP Kolonien wurden auf BMMY-Platten für 72 h bei 30°C inkubiert. *P. pastoris* GS115 auf Position 1 und 2 wurden als Negativkontrolle und *M. musculus* *PEMT* auf Position 3 und 4 als Positivkontrolle aufgetragen. Die eGFP-Fluoreszenz wurde über das Kamerasystem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, USA) und Epi-Blaulicht von 460 nm mit einer Belichtungszeit von 0,125 s detektiert (B) Quantifizierung der eGFP-Fluoreszenz mittels ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). MGV: Mean Gray Value. Die eGFP-Fluoreszenz korreliert mit der relativen Genexpression.

Die Fluoreszenz jeder Kolonie wurde mit dem Kamerasystem ImageQuant LAS 4000 festgehalten (Abb. 3.30A) und anschließend quantifiziert (Abb. 3.30B). Kolonie 5, 7, 8, 14, 21, 24, 30 und 32 zeigten eine Fluoreszenz die der Höhe der Positivkontrolle entsprach oder übertraf (Abb. 3.30B). Da Kolonie 14 die höchste Fluoreszenz zeigte, wurde diese für die weiteren Studien ausgewählt. Dafür wurde die Genexpression durch Methanol induziert und so die Proteinsynthese für 24 h bei 250 rpm und 28°C eingeleitet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 500 g gerntet und mit einem „TS model cells disruptor“ (Constant Systems Ltd.,

United Kingdom) lysiert. Die Isolation der Membranen, in die das Zielprotein integriert war, erfolgte mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation.

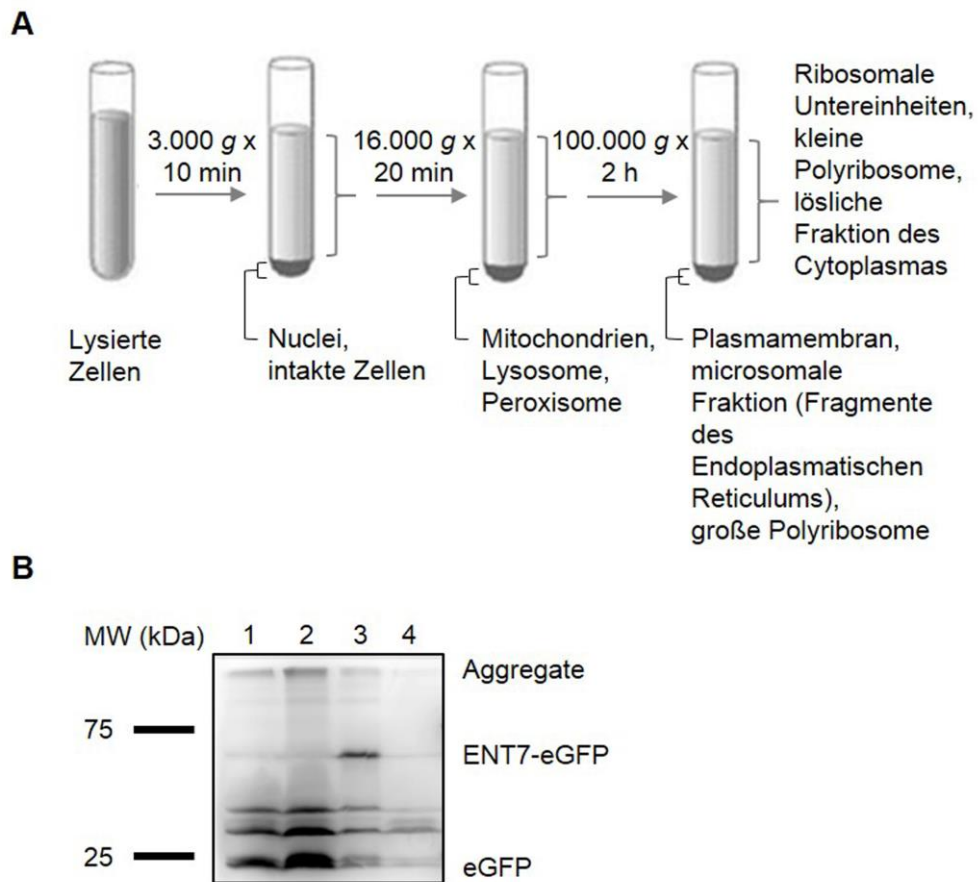


Abbildung 3.31: *P. pastoris* Organellfraktionierung über Dichtegradientenzentrifugation. (A) Schematische Darstellung der Zentrifugationsschritte zur Entfernung von intakten Zellen, Nuclei und weiteren Bestandteilen des Cytoplasmas. (B) Die nach den Zentrifugationsschritten erhaltenen Pellets wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die In-Gel Fluoreszenz mit dem Kamerasystem ImageQuant LAS 4000 bei 0,25 ms Belichtung aufgenommen. 1: Pellet nach Zentrifugation bei 3.000 *g* für 10 min. 2: Pellet nach Zentrifugation bei 16.000 *g* für 20 min. 3: Pellet nach Zentrifugation bei 100.000 *g* für 2 h. 4: Überstand nach Zentrifugation bei 100.000 *g* für 2 h. Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color. Das Molekulargewicht (MW) in kDa der fluoreszierenden Banden ist angegeben.

Lysierte Zellen wurden zunächst bei 3.000 *g* zentrifugiert um intakte Zellen, Nuclei und Zelltrümmer zu entfernen (Abb. 3.31A). Der Überstand wurde zur Entfernung von Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen bei 16.000 *g* zentrifugiert und der resultierende Überstand einer letzten Zentrifugation unterzogen. Bei 100.000 *g* erfolgte die Pelettierung der Membranen (Abb. 3.31A). Der Großteil des degradierten und aggregierten Fusionsproteins (ca. 74 %) wurde durch die ersten beiden Zentrifugationsschritte entfernt (Abb. 3,31B, Spur 1 und 2), sodass nach der

Ultrazentrifugation das ENT7-eGFP Protein mit nur geringen Anteilen an unerwünschten Degradationsprodukten in der Pelletfraktion vorlag (Abb. 3.31B, Spur 3). Der Überstand enthielt mit ca. 8 % nur geringe Mengen an ENT7-eGFP (Abb. 3.31B, Spur 4).

Die Trennung des Membranproteins von den Membranlipiden erfolgte durch Solubilisierung mit Hilfe von Detergens. Die richtige Wahl des Detergens ist entscheidend bei der Isolation und Aufreinigung von Membranproteinen. Aliquots der isolierten Membranen wurden mit verschiedenen Detergenzien solubilisiert und der Grad der Solubilisierung bestimmt.

Tabelle 3.3: Solubilisierung von ENT7-eGFP mit Hilfe von ausgewählten Detergenzien.

Membranen wurden für 2 h bei 4°C solubilisiert und unlösliche Membranen durch Zentrifugation bei 100.000 g für 30 min entfernt. Die Fluoreszenz des Überstandes wurde vor und nach der Zentrifugation bestimmt und die Solubilisierungseffizienz errechnet.

| Detergens | Fluoreszenz vor Solubilisierung [RFU] | Fluoreszenz nach Solubilisierung [RFU] | Solubilisierungseffizienz [%] |
|------------------|---------------------------------------|--|-------------------------------|
| DDM | 57865 | 29416 | 51 |
| TX-100 | 40683 | 15148 | 37 |
| CYMAL-1 | 43435 | 12457 | 29 |
| OG | 50226 | 10677 | 21 |
| DM | 59590 | 2158 | 3,6 |
| LDAO | 55364 | 1560 | 2,8 |
| H ₂ O | 58471 | 968 | 1,7 |

Tabelle 3.3 zeigt, dass die Solubilisierungseffizienz zwischen 51 % (DDM) und 2,8 % (LDAO) betrug, sodass DDM als Detergens gewählt wurde. Es zeigte sich kein Unterschied in der Solubilisierungseffizienz zwischen ein- und zweistündiger Inkubation; längere Solubilisierung resultierte in Proteinaggregation, wohingegen eine Verkürzung der Solubilisierung unter 1 h zu einer geringeren Solubilisierungseffizienz führte. Daher wurde die Inkubation auf 1 h festgelegt. Um zu überprüfen, ob es sich im Falle des solubilisierten Fusionsproteins um monodisperses Protein handelte,

wurde Fluoreszenz-Gel-Permeations-Chromatographie (FGPC) angewandt. Dadurch trennten sich die Proteine im nativen Umfeld abhängig ihres Molekulargewichtes auf und konnten direkt im Anschluss an die Solubilisierung über die Absorption bei 280 nm sowie die Fluoreszenz des eGFP-Fusionsproteins detektiert werden.

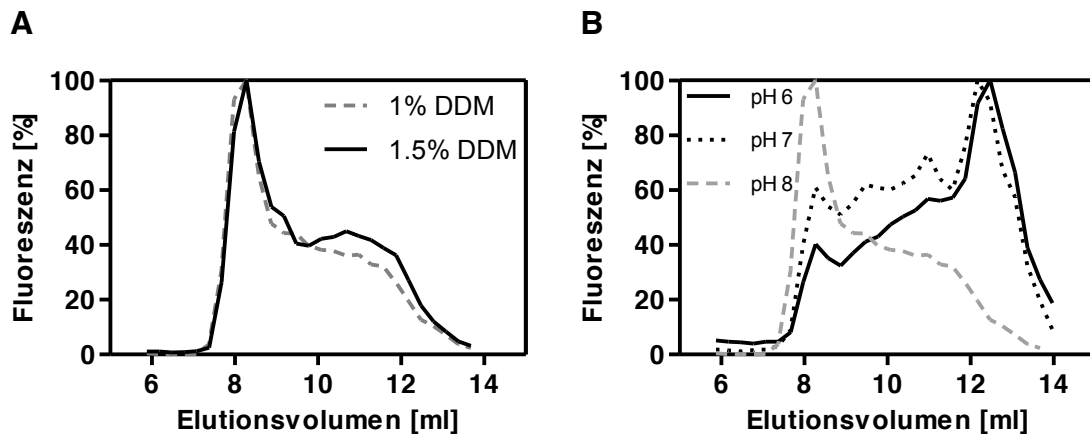


Abbildung 3.32: Optimierung der Solubilisierung von ENT7-eGFP. (A) FGPC-Elutionsprofil von *P. pastoris* Membranen, die ENT7-eGFP enthalten und mit dem Detergens DDM bei pH 8 in unterschiedlichen Konzentrationen solubilisiert wurden. (B) FGPC-Elutionsprofil von *P. pastoris* Membranen, die mit 1 % DDM in unterschiedlichen pH-Werten solubilisiert wurden. Die Maximalfluoreszenz einer jeden Messung wurde auf 100 % gesetzt.

Die Erhöhung der Konzentration an DDM von 1 % auf 1,5 % zeigte keine Auswirkungen auf das FGPC-Elutionsprofil des Fusionsproteins direkt nach der Solubilisierung. Die höchste Fluoreszenz wurde bei einem Elutionsvolumen $V_E = 8$ ml erreicht, was der Größe des Fusionsproteins als großen Oligomeren oder Aggregaten entsprach (Abb. 3.32A). Lediglich ein kleiner Teil des Fusionsproteins eluierte nach 10 bis 12 ml und war somit als nicht-aggregiert anzusehen. Da die DDM-Konzentration keine Auswirkungen auf die Oligomerisierung des Fusionsproteins hatte, wurde die Solubilisierung mit 1 % DDM fortgeführt. Zur Verbesserung des Solubilisierungs-Verhaltens des Proteins erfolgte ein Test in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten. Während Solubilisierungsbedingungen bei pH 8 hauptsächlich große Oligomere ($V_E = 8 - 9$ ml) erzeugten, lag bei pH 7 ein Großteil des Fusionsproteins als kleinere Oligomere ($V_E \geq 9$ ml) vor. Wurde die Solubilisierung bei einem pH-Wert von 6 durchgeführt, so konnte die Mehrheit des Fusionsproteins im Bereich von $V_E = 13$ ml mit nur geringen Mengen an Aggregaten detektiert werden (Abb. 3.32B). Durch die Wahl des leicht sauren Puffers während der Solubilisierung konnte somit eine massive Proteinaggregation vermieden werden.

Die Aufreinigung des ENT7-eGFP-Proteins erfolgte durch immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Um eine optimale Bindung an die Nickel-Kationen zu gewährleisten, wurde die Probe mittels Dialyse auf einen pH-Wert von 7,5 umgepuffert und das Zielprotein durch einen Imidazol-haltigen Puffer mit einem pH-Wert von 6 eluiert (Kap. 2.4.1).

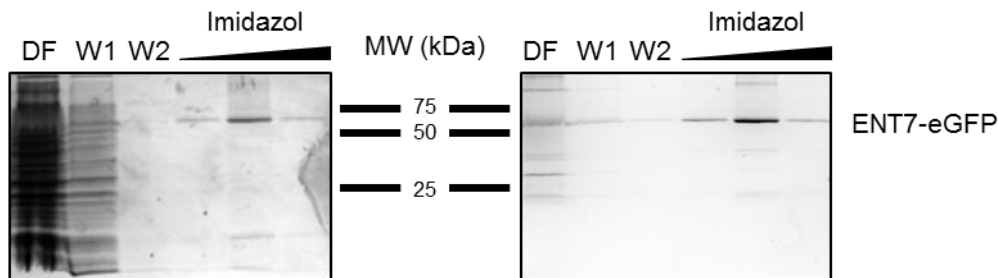


Abbildung 3.33: Aufreinigung des ENT7-eGFP durch Nickel-Affinitätschromatographie. Das Protein wurde durch einen Imidazolgradienten (100 – 500 mM) eluiert. DF: Durchfluss. W1/W2: Durchfluss nach Waschstritten mit 15 mM (W1) bzw. 30 mM Imidazol (W2). Links: Coomassie-Brillant-Blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel. Rechts: In-Gel Fluoreszenz desselben Gels, aufgenommen mit dem Kamerasystem ImageQuant LAS 4000 bei 0,25 ms Belichtung. Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color. Das Molekulargewicht (MW) in kDa ist angegeben.

Das SDS-PAGE Gel nach der Nickel Affinitätschromatographie zeigte einen hohen Gehalt an Proteinen im Durchfluss (Abb. 3.33, DF). Nach zweimaligem Waschen (W1, W2) konnte im Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gel keine Proteine mehr detektiert werden. Abb. 3.33 zeigt zudem, dass Protein mit einem Molekulargewicht von circa 60 kDa durch steigende Imidazol-Konzentrationen von der Säule eluiert wurde, was sowohl durch Coomassie-Brillant-Blau-Färbung, als auch mittels In-Gel Fluoreszenz sichtbar war.

Um zu überprüfen, ob es sich im Falle des aufgereinigten Fusionsproteins um monodisperses Protein handelte, wurde erneut Fluoreszenz-Gel-Permeations-Chromatographie angewandt und der oligomere Zustand der eluierten Proteine durch Zuhilfenahme der Molekulargewichte und das Elutionsvolumen bekannter Proteine und errechneter Molekulargewichte des eGFP, ENT7 und DDM kalkuliert (siehe Tab. S3).

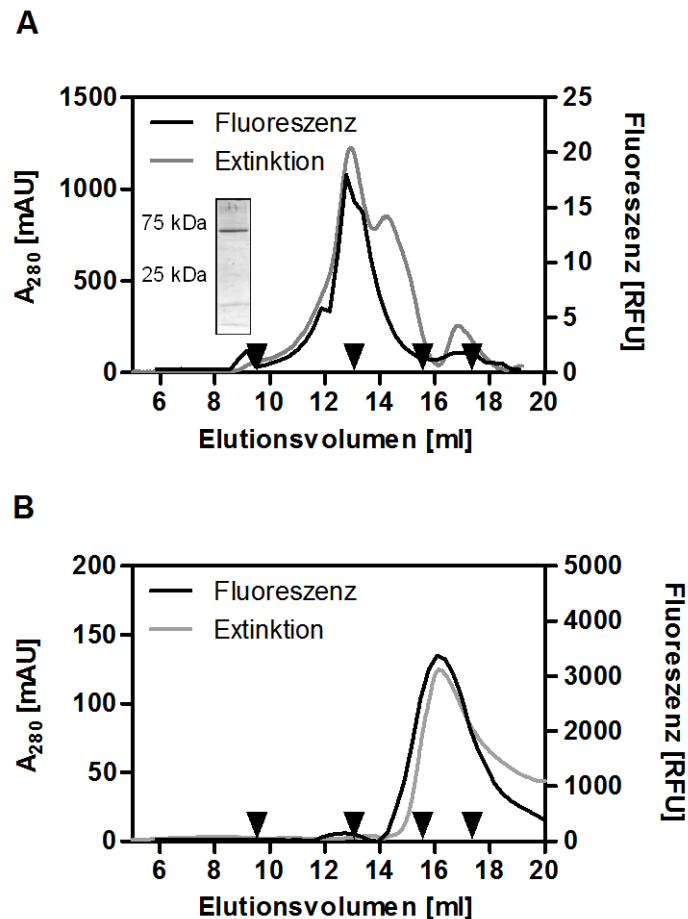


Abbildung 3.34: Aufreinigung und Überprüfung der Dispersität des ENT7-eGFP mittels Fluoreszenz-Gel-Permeations-Chromatographie. (A). Elutionsprofil von ENT7-eGFP, solubilisiert bei pH 6 und aufgereinigt über Nickel-Affinitätschromatographie. Einsatz: Coomassie-Brillant-Blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel des aufgereinigten ENT7-eGFP. (B) Elutionsprofil von über Nickel Affinitätschromatographie aufgereinigtem eGFP. Dreiecke markieren die Standards für Superdex 200 (10/30). von links nach rechts: Thyroglobulin, 9,63 ml (MW: 670 kDa; Stokes Radius: 86 Å), IgG, 12,95 ml (MW: 158 kDa, Stokes Radius: 51 Å), Ovalbumin, 15,5 ml (MW: 44 kDa; Stokes Radius: 28 Å), Myoglobin, 17,3 ml (MW: 17 kDa, Stokes Radius: 19 Å).

Sowohl die eGFP-Fluoreszenz, als auch die Absorption bei 280 nm des aufgereinigten Fusionsproteins zeigten ein Elutionsprofil mit dominantem Peak bei $V_E = 12 - 13$ ml und geringen Anteilen an Aggregaten ($V_E = 8 - 10$ ml), sowie freiem eGFP ($V_E = 16 - 17$ ml) (Abb. 3.34A). Das Elutionsvolumen des ENT7-Fusionsproteins solubilisiert in DDM wurde auf $V_E = 12,6$ ml errechnet, sodass es sich im Falle des Hauptpeaks aller Wahrscheinlichkeit nach um ENT7-eGFP im dimeren Zustand handelte (siehe dazu auch Tab. S3). Um zu zeigen, dass eGFP nicht der Grund der Dimerisierung war, wurde freies eGFP aufgereinigt und ebenfalls mittels Gel-Permeations-Chromatographie analysiert. Die Elution bei $V_E = 16$ ml entsprach dem errechneten

monomeren Zustand des Proteins, sodass eine Begünstigung der Dimerisierung von ENT7 durch die Fusion mit eGFP ausgeschlossen werden konnte.

Nach der proteolytischen Trennung des eGFP von ENT7 durch TEV-Protease erfolgte die Entfernung des eGFP, ungeschnittenen Fusionsproteins und der TEV-Protease mittels Nickel Affinitätschromatographie.

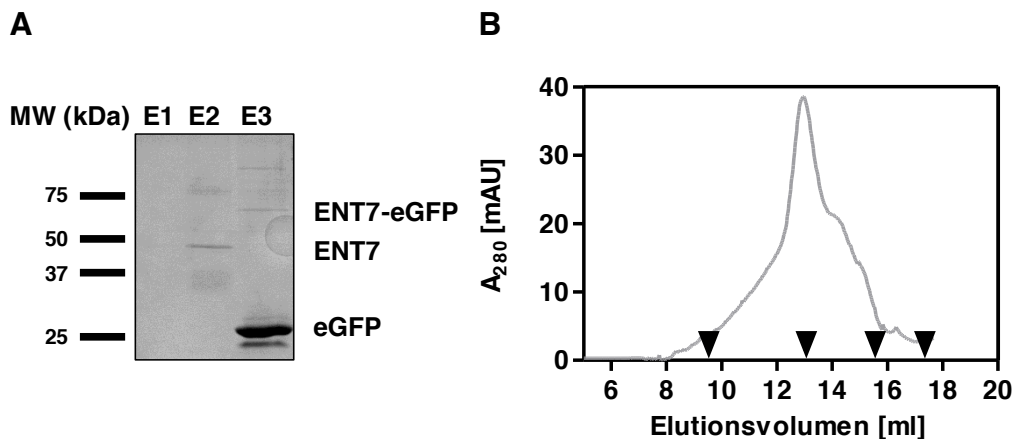


Abbildung 3.35: SDS-PAGE Gel und Elutionsprofil des ENT7 nach Entfernung des eGFP. ENT7-eGFP wurde für 2 h bei 4°C bei einem Verhältnis von 1:10 (w/w) TEV:ENT7-eGFP zur Entfernung des eGFP inkubiert. (A) Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Färbung des Gels mit Coomassie-Brillant-Blau. TEV Protease, eGFP und ungeschnittenes Fusionsprotein wurden durch Nickel-Affinitätschromatographie entfernt. E1/E2: Elution mit Puffer ohne Imidazol. E3: Elution mit 1 M Imidazol. (B) Elutionsprofil von ENT7 nach der Entfernung des eGFP durch TEV Protease. Dreiecke markieren die Standards für Superdex 200 (10/30). von links nach rechts: Thyroglobulin, 9,63 ml (MW: 670 kDa; Stokes Radius: 86 Å), IgG, 12,95 ml (MW: 158 kDa, Stokes Radius: 51 Å), Ovalbumin, 15,5 ml (MW: 44 kDa; Stokes Radius: 28 Å), Myoglobin, 17,3 ml (MW: 17 kDa, Stokes Radius: 19 Å).

Die im Eluat ohne Imidazol vorhandenen Proteine konnten im SDS-PAGE Gel als eine diskrete Bande auf Höhe von unter 50 kDa detektiert werden (Abb. 3.35A, E1 und E2), was dem Molekulargewicht des ENT7 (45,7 kDa) entsprach. Die durch Imidazol eluierten Polyhistidin-tragenden Proteine waren in Eluat 3 wiederzufinden (Abb. 3.35, E3). Stabilität, sowie der oligomere Zustand wurden erneut mittels Gel-Permeations-Chromatographie überprüft. Aufgereinigtes ENT7-Protein eluierte in einem diskreten Peak bei $V_E = 13,1$ ml, was dem Molekulargewicht des ENT7 in DDM im dimeren Zustand entsprach (siehe Tab. S3).

Die Expression des ENT7 als Fusionsprotein mit eGFP in *P. pastoris*, Solubilisierung mit DDM in leicht saurem Milieu und Aufreinigung mittels IMAC mit anschließender Entfernung des eGFP stellt eine Möglichkeit dar, um stabiles ENT7-Protein im dimeren

Zustand zu generieren – ein wichtiger Schritt zu Mutagenese- und Kristallisationsstudien.

3.4.3 Bindungscharakteristika des solubilisierten ENT7-eGFP

Die Bindung von bekannten Substraten in der Bindetasche des ENT7 setzt eine korrekte Proteinstruktur bzw. -faltung voraus. Durch Aufnahmeversuche an *ENT7*-exprimierenden Hefen konnte gezeigt werden, dass Nukleoside, vor allem Adenosin und Guanosin als Substrate des ENT7 fungieren (Wormit *et al.*, 2004). Mit Hilfe von Microscale Thermophorese (MST) sollte überprüft werden, ob die Fähigkeit zur Bindung an diese bekannten Substrate an gereinigtem, in DDM solubilisiertem Protein unverändert war. Das Vorhandensein des eGFP-Tags ermöglichte die direkte Detektion der thermophoretischen Bewegung von Protein-Substrat-Komplexen (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011). Darüber hinaus ermöglichte MST, Proteinaggregation und Artefakte anhand des Fluoreszenzsignals zu identifizieren und klar von tatsächlichen Bindungsereignissen zu differenzieren (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011; Seidel *et al.*, 2013). Die Konzentration des ENT7-eGFP lag stets bei 65 nM, wohingegen die Konzentration der Nukleoside variierte.

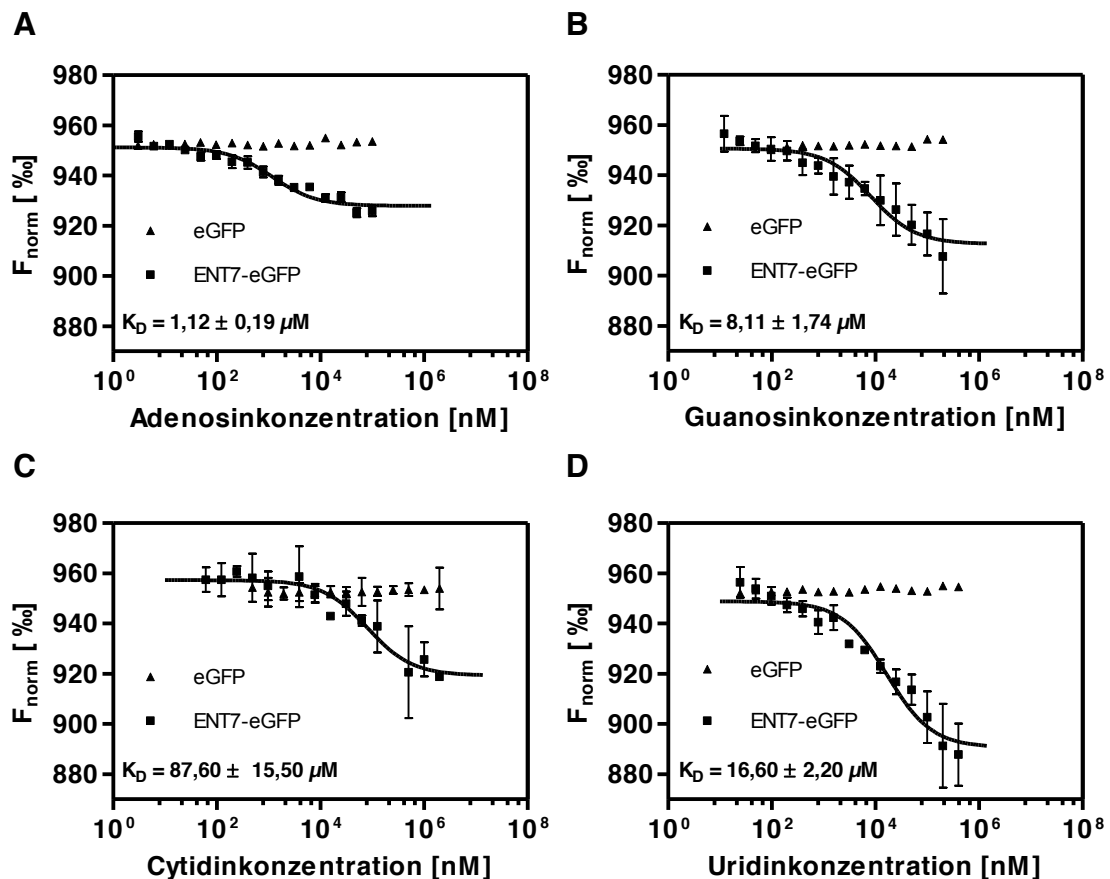


Abbildung 3.36: Thermophorese-Messung zur Bestimmung der Bindungsaffinität von ENT7-eGFP zu Nucleosiden. Die normalisierte Fluoreszenz F_{norm} [%] wurde in Abhängigkeit der Nucleosidkonzentration dargestellt. Die Bindungsaffinitäten von ENT7-eGFP zu (A) Adenosin, (B) Guanosin, (C) Cytidin und (D) Uridin wurden untersucht. Als Kontrolle diente eGFP. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen \pm SD.

Während der Laser aktiv war, wurde ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal detektiert, was auf die Abwesenheit von Aggregate hinwies. Die Substrat-Protein-Komplexbildung führte zu Fluoreszenzsignalen, die die Errechnung von Bindungsaffinitäten ermöglichten. Mit steigender Adenosinkonzentration kam es zu einer Verringerung der normalisierten Fluoreszenz F_{norm} . Die Bindungsaffinität lag bei $K_D = 1,12 \pm 0,19 \mu\text{M}$ (Abb. 3.36A). Einen ähnlichen Dosis-abhängigen Fluoreszenzverlauf zeigte die thermophoretischen Messungen der ENT7-eGFP-Guanosin Bindung, mit ebenfalls hoher Affinität von $K_D = 8,11 \pm 1,74 \mu\text{M}$ (Abb. 3.36B). Wesentlich geringere Affinitäten zeigten Cytidin ($K_D = 87,60 \pm 15,50 \mu\text{M}$) und Uridin ($K_D = 16,60 \pm 2,20 \mu\text{M}$; Abb. 3.36C - D). Kontrollmessungen mit eGFP zeigten keine Nucleosidkonzentration-abhängige Änderung der Fluoreszenz.

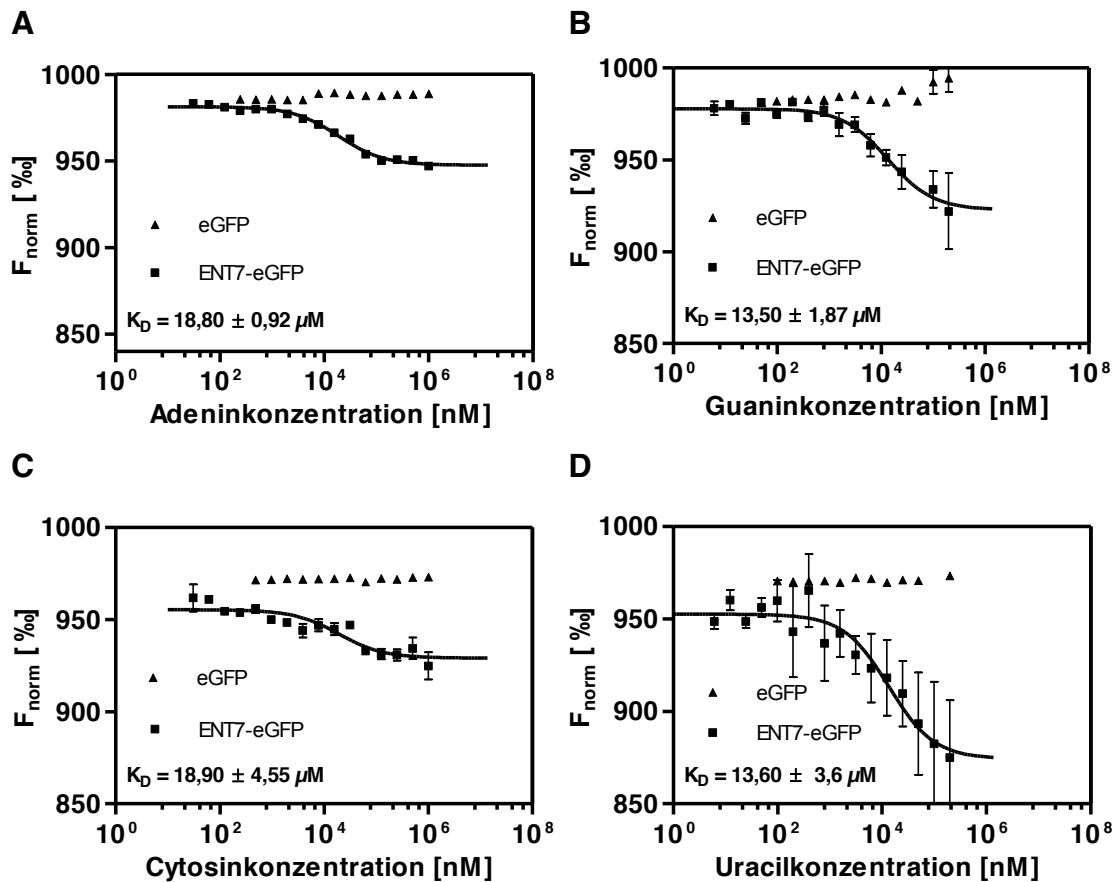


Abbildung 3.37: Thermophorese-Messung zur Bestimmung der Bindungsaffinität von ENT7-eGFP zu Nucleobasen. Die normalisierte Fluoreszenz F_{norm} [%] wurde in Abhängigkeit der Nucleobasenkonzentration dargestellt. Die Bindungsaffinitäten von ENT7-eGFP zu (A) Adenin, (B) Guanin, (C) Cytosin und (D) Uracil wurden untersucht. Als Kontrolle diente eGFP. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen \pm SD.

Zusätzlich zu der Bindung der Nucleoside wurde die Bindung der korrespondierenden Nucleobasen überprüft. Auch hier zeigte sich eine Änderung des Fluoreszenzsignals, das abhängig von der Konzentration der Nucleobase war. Die entsprechenden Bindungsaffinitäten K_D waren für Adenin $18,80 \pm 0,92 \mu\text{M}$, für Guanin $13,50 \pm 1,87 \mu\text{M}$, für Cytosin $18,90 \pm 4,55 \mu\text{M}$ und für Uracil $13,60 \pm 3,60 \mu\text{M}$ (Abb. 3.37A - D). Kontrollmessungen mit eGFP bei Anwesenheit von Nucleobasen zeigten ebenfalls keine konzentrationsabhängige Änderung der Fluoreszenz.

Durch die Microscale Thermophorese-Analysen konnte gezeigt werden, dass das ENT7-eGFP Fusionsprotein eine Proteinstruktur besaß, die keine Anzeichen von Aggregatbildung aufwies. Des Weiteren konnte für das Fusionsprotein die Bindung mit bekannten Substraten des ENT7 nachgewiesen und Affinitäten berechnet werden (vgl. Tab. S4). Darüber hinaus wurde zum ersten Mal die Bindung von Nucleobasen am ENT7 demonstriert.

4 Diskussion

Die Prozessierung von Ribonukleinsäuren (RNA) und die Regulation des RNA-Pools sind von elementarer Bedeutung für die Homöostase des pflanzlichen Nukleotidstoffwechsels. Neben dem „klassischen“ zellulären RNA-Metabolismus ist der Abbau von intrazellulärer RNA ein notwendiger Prozess zum normalen RNA-*turnover* und zur Remobilisierung von Nährstoffen (Bariola *et al.*, 1999; Hillwig *et al.*, 2011; Löffler *et al.*, 1992; MacIntosh & Bassham, 2011). Diese und weitere Aufgaben werden in Pflanzen von Ribonukleasen der T2-Typ Familie übernommen (Nicholson, 2001). Untersuchungen im Pflanzenreich wurden hauptsächlich an *Lycopersicon esculentum* (*L. esculentum*) und *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) durchgeführt. So konnten in *L. esculentum* vier intrazellulär vorkommende RNasen charakterisiert werden. RNase LX ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert, wird während der Seneszenz stark synthetisiert und ist im Recycling intrazellulärer RNA involviert (Lehmann *et al.*, 2001). Neben RNase LX wird auch die Expression der RNase LV1, RNase LV2 und RNase LV3 durch Phosphatmangel induziert. RNase LV1 - 3 sind vakuolär lokalisierte Enzyme und ebenso an der Remobilisierung von Nährstoffen unter Mangelbedingungen beteiligt (Löffler *et al.*, 1992). Auch in *A. thaliana* ist eine intrazelluläre RNase der T2-Typ Familie bekannt, die ähnliche Funktionen übernimmt und vergleichbare Expressionsmuster zeigt wie RNase LV1 - 3 und RNase LX in *L. esculentum*. An *RNS2-Antisense*-Pflanzen konnte eine verstärkte Akkumulation von Anthocyanen festgestellt werden; ein Prozess, der durch zahlreiche Stressbedingungen (Verwundung, niedrige Temperaturen, hohe Lichtintensität, Pathogenbefall usw.) induziert wird (Bariola *et al.*, 1999). Außerdem zeigten Studien mit fluoreszierenden Fusionsproteinen, dass RNS2-CFP im ER, ER-ähnlichen Strukturen und der Vakuole lokalisiert ist (Hillwig *et al.*, 2011). Der Abbau radioaktiv markierter ribosomaler RNA verlief in den Mutanten verzögert und RNA akkumulierte in der Vakuole. RNS2 spielt dort neben dem intrazellulärem Recycling zelleigener Bestandteile auch eine Rolle im normalen *turnover* von rRNA (Hillwig *et al.*, 2011; MacIntosh, 2011; MacIntosh & Bassham, 2011). Das Vorkommen von RNA in Vakuolen konnte zwar in *L. esculentum* verifiziert werden, in *A. thaliana* Vakuolen gab es diesbezüglich jedoch noch keine genaueren Untersuchungen.

In der hier vorgelegten Dissertation konnte vakuoläre RNA in *A. thaliana* detektiert und die Größenverteilung dieser RNA bestimmt werden. Des Weiteren wurde über *Next*

Generation Sequencing das Vorkommen unterschiedlicher RNA-Typen und RNA-Muster analysiert. Diese Untersuchungen tragen zum Verständnis der in der Vakuole ablaufenden Abbauprozesse bei. Des Weiteren wurden zwei *RNS2-T-DNA*-Insertionslinien charakterisiert und ergänzende physiologische Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es, den Einfluss der Aktivität der RNS2 auf vakuoläre RNA-Abbauprozesse zu untersuchen.

Neben den Abbauprozessen spielen auch Transportprozesse der Abbauprodukte eine wichtige Rolle für die Nährstoffremobilisierung in der Pflanze. Nukleobasen- und Nukleosid-Transportproteine werden seit mehr als 15 Jahren biochemisch und physiologisch untersucht. Neben Nukleobasentransportern, wie den Purin-Permeasen (PUPs) (Gillissen *et al.*, 2000), Ureid-Permeasen (UPSs) (Schmidt *et al.*, 2004), oder den Nukleobasen:Kationen Symporter PLUTO, NAT3 und NAT12 (Niopek-Witz *et al.*, 2014; Witz *et al.*, 2012) sind auch Nukleosidtransporter der Familie der Equilibrativen Nukleosidtransporter (ENT) beschrieben (Li *et al.*, 2003; Möhlmann *et al.*, 2001; Traub *et al.*, 2007; Wormit *et al.*, 2004). Aus diesen Familien ist jedoch mit ENT7 lediglich ein Vertreter bekannt, der Nukleobasen bzw. Nukleoside nicht im Symport mit einem Proton transportiert. Folglich ist ENT7 der einzig bekannte Transporter, der die Verteilung von stickstoffreichen, heterozyklischen Komponenten von Zelle zu Zelle ermöglicht (vgl. Abb 4.1). Vertreter der ENT-Familie werden auch in Säugetieren intensiv studiert, unter anderem aufgrund ihrer pharmakologischen Bedeutung. Trotzdem ist es bisher nicht gelungen, detaillierte Strukturanalysen durchzuführen, da ENTs nicht funktionell synthetisiert und aufgereinigt werden konnten (Hammond, 1997; Hammond & Zarenda, 1996; Young *et al.*, 2013). Teile dieser Dissertation greifen dies auf und beschäftigen sich mit der Etablierung eines optimierten Expressions- und Aufreinigungssystems für ENTs. In der Folge sollten biochemische Eigenschaften, wie beispielsweise der oligomere Zustand oder die Bindungseigenschaften zu bekannten und potentiellen Substraten untersucht werden und eine Abschätzung für die Bedeutung im Hinblick auf den Transport von RNA-Abbauprodukten ermöglichen. Letztendlich sollten diese Untersuchungen darüber hinaus als Grundlage zukünftiger Mutations- und Kristallisationsstudien dienen.

4.1 Die physiologische Auswirkung der T-DNA-Insertion in das *ENT1*-Gen

Um zu überprüfen, ob ein *Knockout* des *ENT1* zu vergleichbaren physiologischen Konsequenzen führt wie der *Knockdown* in den vorhandenen *ENT1*-RNAi-Pflanzen, wurden zwei unabhängige *ENT1*-T-DNA-Insertionslinien (*ent1-1* und *ent1-2*) auf genomischer Ebene charakterisiert (Abb. 3.1). Die detaillierte Untersuchung auf transkriptioneller Ebene zeigte, dass die T-DNA-Insertion keine Auswirkung auf den Transkriptgehalt des *ENT1* in vier bis sechs Wochen alten Rosettenblättern hat (Abb. 3.2B - D). Die in der Datenbank Aramemnon (Schwacke *et al.*, 2003) hinterlegte Nukleotidsequenz besitzt eine Länge von 1353 bp, wohingegen bei der biochemischen Charakterisierung des *ENT1* im Jahr 2001 ein im Anfangsbereich um 66 bp verkürztes Gen exprimiert wurde. Die Primereffizienz der beiden verwendeten Primerpaare zur Amplifikation beider Versionen lag bei ca. 75 %. Obwohl durch die Verwendung der Primerkombination zur Amplifikation der Kurzversion auch die Langversion als Matrize diente, wird deutlich, dass die verkürzte Version des *ENT1* das vorherrschende Transkript in Wildtyp-Pflanzen ist. In *ent1-1*- und *ent1-2*-Pflanzen konnte kein Produkt mit der Größe des annotierten *ENT1* amplifiziert werden (Abb. 3.2C). Durch quantitative RT-PCR und PCR-Analysen auf die Kurzversion des *ENT1* war allerdings ein unveränderter Transkriptgehalt in den Linien *ent1-1* und *ent1-2* (Abb. 3.2B,D) detektierbar. Somit handelt es sich zwar um T-DNA-Insertionslinien im codierenden Bereich des *ENT1*, auf transkriptioneller Ebene konnte aber nur eine geringe bis keine Veränderung festgestellt werden. In *ent1-1*- und *ent1-2*-Pflanzen konnte keine Auswirkung der T-DNA-Insertion auf die bereits beschriebenen *ENT1*-kritischen Parameter, wie Pollenmorphologie, Adenylatgehalt der Zelle, Adenylatgehalt der Vakuole, Enzymaktivitäten der Adenosinkinase und Adeninphosphoribosyltransferase und weitere, wie Ertragsparameter, Phosphatmangel, Stickstoffmangel, Seneszenz, Autophagie, oder die Expression von Genen, die an Autophagie (*ATG5*, *ATG7*, *ATG8*), Nukleosidtransport (*ENT2* bis *ENT8*), Seneszenz (*SAG12*) oder RNA-Abbau (*RNS1*, *RNS2*) beteiligt sind, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). *ent1-1*- und *ent1-2*-Pflanzen unterscheiden sich demnach klar von den bereits beschriebenen *ENT1*-RNAi-Linien (Bernard *et al.*, 2011). Selbst wenn sich der Transkriptlevel in T-DNA-Insertionslinien nicht ändert, kann auf Proteinebene eine Änderung auftreten (Monte *et al.*, 2003). Da die Insertion in den Linien *ent1-1* und *ent1-2* jedoch keine Auswirkung auf o.g. Parameter gezeigt hat, gibt es keine Hinweise darauf, dass eine Veränderung der *ENT1*-Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp vorlag. Zwar ist nicht genau

bekannt, wie groß die inserierte T-DNA in den beiden Linien ist, sie liegen allerdings laut dem Hersteller dieser Mutanten (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, USA) im ersten Exon, wobei die Insertion der Linie ent1-2 zwischen den zwei putativen Startcodi liegt (vgl. Abb. 3.1C). Es ist bekannt, dass T-DNA, die auf einem Exon liegt, während der Prozessierung der prä-mRNA zumindest teilweise herausgespleißt werden kann. (Lehti-Shiu *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2004). Immerhin zeigen nur 86 Prozent der Linien mit Insertionen im codierenden Bereich eines Gens einen echten *Knockout* desselbigen und 1,1 Prozent von 607 untersuchten exonständigen T-DNA-Insertionslinien, dass die T-DNA überhaupt keinen Einfluss auf den Transkriptlevel hat (Wang, 2008). In mehreren unabhängigen Linien, die alle eine T-DNA-Insertion auf dem gleichen Exon des *PIE1* tragen, konnte auf Transkriptebene ebenfalls kein *Knockout* festgestellt werden (Noh & Amasino, 2003). Eine T-DNA-Insertion kann außerdem Translokation, reziproke Translokation und Genduplikation auslösen. Reziproke Translokation wurde für die T-DNA-Insertion in *ARL2* (Guan *et al.*, 2003) und *RHD3* (Yuen *et al.*, 2005), Translokation in *TOC33* Mutanten nachgewiesen (Gutensohn *et al.*, 2004), wohingegen die Genduplikation durch eine T-DNA-Insertion in *WRKY33* (Zheng *et al.*, 2006) gezeigt werden konnte. Die Insertion im codierenden Bereich des *ENT1* an zwei nahegelegenen Stellen im ersten Exon ohne Verlust des Transkripts ist demnach nicht außergewöhnlich und erklärt das Ausbleiben von phänotypischen Unterschieden im Vergleich zum Wildtyp, wie es für *ENT1*-RNAi-Pflanzen beschrieben wurde.

4.2 Transgene *RNS2*-Pflanzen zeigen eine verringerte vakuoläre RNase-Aktivität

Transgene *RNS2*-Pflanzen wurden erstmals 1999 von Bariola *et al.* (1999) beschrieben. In *RNS2*-*Antisense*-Keimlingen, die entweder unter Standard- oder unter Phosphatmangelbedingungen angezogen wurden, konnten erhöhte Anthocyanengehalte gemessen werden. Außerdem konnte erstmals mit Antikörpern gezeigt werden, dass *RNS2* ein intrazellulär lokalisiertes Enzym ist. Neben dem Vorkommen der *RNS2* in Proteomanalysen der Vakuole (Carter *et al.*, 2004) wurde über *RNS2*-CFP Fusionsproteine gezeigt, dass die RNase in der Vakuole, dem ER und ER-ähnlichen Strukturen (Hillwig *et al.*, 2011) lokalisiert ist. Das pH-Optimum des gereinigten Proteins lag zwar bei pH 7, die höchste *RNS2*-Aktivität wurde jedoch in Vakuolen gefunden. Eine T-DNA-Insertionslinie zeigte zwar eine Akkumulation von

RNA in der Pflanze, konstitutive Autophagie und einen verzögerten Abbau von ribosomaler RNA (Hillwig *et al.*, 2011), dennoch gilt es zu prüfen, ob das Fehlen der RNS2-Aktivität einen Einfluss auf die vakuoläre RNase-Aktivität hat. Um die Bedeutung der RNS2 für den vakuolären RNA-Abbau vertiefend zu analysieren, wurde neben der bereits beschriebenen *RNS2*-T-DNA-Insertionslinie *rns2-2* eine weitere Linie (*rns2-1*) identifiziert, die ebenfalls kein *RNS2*-Transkript mehr aufwies (Abb. 3.3). Beide zeigten in den hier präsentierten Studien, wie bereits zuvor für *rns2-2*- und *RNS2-antisense*-Pflanzen publiziert (Hillwig *et al.*, 2011), konstitutive Autophagie (Abb. 3.4). Die *RNS2*-Expression ist zwar in allen Geweben konstitutiv, zeigte aber, ähnlich wie *ENT1*, eine deutliche Erhöhung im Pollen (Winter *et al.*, 2007). Ein verringerter extrazellulärer Adenosintriphosphat- (eATP-) Gehalt in Pollen von *ENT1*-RNAi-Pflanzen hatte die Bildung von Tetraden und die Verringerung der Keimungseffizienz zur Folge (Bernard *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob *RNS2*-T-DNA-Insertionspflanzen ähnliche Effekte zeigen, wurden Pollen mikroskopisch untersucht. Da der Pollen als Teil der Blüte für die Fortpflanzung eine wichtige Rolle spielt, wurden darüber hinaus verschiedene Ertragsparameter bestimmt. Neben einer unveränderten Pollenmorphologie (Daten nicht gezeigt), konnten auch keine Unterschiede in der Samenproduktion der *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3.5). *RNS2* hat daher mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Pollenvitalität, Pollenkeimung, Befruchtung, Samen- und Schotenbildung.

Die physiologische Rolle von T2-Typ RNasen in Pflanzen ist nicht auf den Bereich Fortpflanzung beschränkt. So ist zum Beispiel die verstärkte Expression von T2-Typ RNasen als Antwort auf Phosphatmangel ein oft beschriebenes Phänomen im Reich der Pflanzen (Abel *et al.*, 2000; Bariola *et al.*, 1994; Bariola *et al.*, 1999; Nürnberger *et al.*, 1990). Zur Nährstoffremobilisierung wird RNA in Nukleotide gespalten, aus denen unter Freisetzung von anorganischem Phosphat Nukleoside entstehen. Da die Lokalisierung der *RNS2* unter anderem als vakuolär beschrieben wurde, sollte überprüft werden, ob der *Knockout* der *RNS2* einen Einfluss auf die vakuolären Gehalte von Nukleotiden, Nukleosiden und Nukleobasen hat. Um eine hohe Sensitivität zu ermöglichen, wurden die adeninhaltigen Bestandteile nach Derivatisierung mit Chloracetaldehyd mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) aufgetrennt und fluoreszenzspektroskopisch detektiert. Messungen an isolierten Vakuolen bestätigten frühere Untersuchungen (Bernard,

2010), die Adenosin und 2',3'-cAMP als einzig vorhandenen Adenylate in *A. thaliana* Vakuolen beschreiben (vgl. dazu Abb. 3.10). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Gehalte beider Adenin-Derivate in *rns2-1* und *rns2-2* im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert waren (Abb. 3.7). Dass dies das Resultat einer verringerten RNS2-Aktivität in der Vakuole ist, konnte durch RNase-Assays bestätigt werden. Die Analyse der Adenin-Derivate nach Inkubation von RNA in Abwesenheit von Enzymen über 16 Stunden zeigte eine hohe Stabilität der RNA im Hinblick auf die Freisetzung von Adenin, Adenosin, 2',3'-cAMP oder anderer Adenin-Nukleotidphosphate (Abb. 3.10). Die gleiche Beobachtung konnte für die Inkubation von denaturierten Vakuoleninhalt mit RNA gemacht werden. Die Quantifizierung der HPLC-Elektropherogramme von RNA, die mit vakuolären Enzymen des WT inkubiert wurden zeigte hingegen die Bildung von Adenosin und 2',3'-cAMP. Die Adenin-Derivat-Produktion in den T-DNA-Insertionslinien *rns2-1* und *rns2-2* (Abb. 3.11) war im Vergleich zum Wildtyp verringert. Die Messung der RNase-Aktivität über die fluoreszenzspektroskopische Quantifikation der RNA (beziehungsweise RNA-EtBr) bestätigte diese Beobachtung (Abb. 3.9). Die verbleibene RNase-Aktivität von circa 30 Prozent in den *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien ist mindestens einem weiteren vakuolären Enzym zuzuschreiben. Kandidaten hierfür sind die zwei noch nicht untersuchten Vertreter der Ribonuklease T2-Typ Familie At1g14210 (*RNS4*) und At1g14220 (*RNS5*). Ob diese Enzyme in der Vakuole lokalisiert sind, darüber hinaus Ribonuklease-Aktivität aufweisen und somit einen Beitrag zur RNase-Restaktivität in Vakuolen aus *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien leisten, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

RNasen der T2-Typ Familie spalten RNA endonukleolytisch und produzieren in einem ersten Schritt, der Transphosphorylierung, 2',3'-zyklische Nukleotide am 3'-Ende des Makromoleküls (Nicholson, 2001). In dem zweiten Schritt, der Hydrolyse, werden RNAs mit einem 3'-Phosphat produziert. Es sind allerdings Beispiele bekannt, bei denen es nicht nur zur Bildung der 2',3'-Phosphate am 3'-Ende der RNA, sondern zur Freisetzung von 2',3'-zyklischen Nukleotidmonophosphaten (2',3'-cNMPs) als erstes Produkt eines enzymatisch katalysierten RNA-Abbaus kommt, die im Folgenden zu den entsprechenden 3'-NMPs hydrolysiert werden (Abel & Glund, 1986; Huang *et al.*, 2014; Jackson, 2011; Mossakowska *et al.*, 1989; Nürnberger *et al.*, 1990).

Messungen mit vakuolären Enzymen aus *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien zeigten nicht nur, dass *RNS2* einen entscheidenden Anteil an der vakuolären RNase-Aktivität hat.

Vielmehr offenbarte die Analyse der Adenin-Derivate in Vakuolen mit und ohne Inkubation von RNA, dass die 2',3'-cAMP Bildung bzw. die Gehalte der *rns2-1*- und *rns2-2*-Vakuolen geringer waren als im Wildtyp (Abb. 3.7 und Abb. 3.11A). *L. esculentum* RNase LE, RNase LX und RNase LV1 bis RNase LV3 und *S. cerevisiae* Rny1 sind extra- und intrazelluläre RNasen, die ebenfalls zyklische Intermediate in Form von 2',3'-cNMPs freisetzen (Abel *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2014). ³¹P-kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen verschiedener RNasen (unter anderem RNase A, BaRNase, RNase T₁) zeigten, dass lediglich 0,1 Prozent der RNA sowohl transphosphoryliert als auch hydrolysiert wurden, bevor das Nukleotidmonophosphat (2'-NMP oder 3'-NMP) freigesetzt wurde (Thompson *et al.*, 1994). Das heißt, dass 99,9 Prozent der Intermediate als 2',3'-cNMPs entlassen wurden. Neben RNA-Abbau sind keine weiteren Reaktionen in der Pflanze bekannt, die zur Bildung von 2',3'-cNMPs führen (Nürnberg *et al.*, 1990). RNS2 repräsentiert demnach eine vakuoläre RNase in *A. thaliana*, die in der Lage ist 2',3'-cNMPs als unmittelbare Produkte des RNA-Abbaus zu generieren (vgl. Abb. 4.1).

Obwohl die vakuolären 2',3'-cAMP-Gehalte in den *RNS2-T*-DNA-Insertionslinien bis zu 70 Prozent geringer waren als in Wildtyp-Vakuolen und der RNA-Abbau die einzige Ursache für das Auftreten dieses Nukleotids darstellt, zeigten sich auf zellulärer Ebene keine Unterschiede mehr (Abb. 3.6). Da ein Teil des Nukleinsäure-Abbaus im Cytosol oder außerhalb der Zelle stattfindet, ist die Bildung der Abbauprodukte nicht auf vakuoläre Prozesse beschränkt. Vertreter der Ribonuklease T2-Typ Familie produzieren bekanntermaßen 2',3'-Nukleotide am 3'-Ende der RNA (Nicholson, 2001). Da für RNS2 gezeigt werden konnte, dass 2',3'-cAMP freigesetzt wird, ist dies auch für andere Vertreter der Familie in *A. thaliana* vorstellbar und konnte in *L. esculentum* bereits gezeigt werden (Abel *et al.*, 1989). Die Produktion dieses Intermediats in Pflanzen stellt demnach kein Alleinstellungsmerkmal der RNS2 dar, sodass das Ausbleiben von Unterschieden in den zellulären 2',3'-cAMP-Gehalten eine Folge der Aktivität anderer RNasen sein kann.

Der zweite Teil der RNase-Aktivität von Vertretern der T2-Typ Familie umfasst die Hydrolyse (oder Phosphodiesterase-Aktivität) und Bildung von 3'-phosphorylierten Verbindungen. Dabei kann die hydrolytische Aktivität am 3'-Ende der RNA oder am freigesetzten 2',3'-cNMP erfolgen. Die Fähigkeit zur hydrolytischen Spaltung der Esterbindung vakuolärer Enzyme aus *RNS2-T*-DNA Insertionslinien konnte durch das Substratanalogon Bis-(*p*-Nitrophenyl)-Phosphat (BNP) ermittelt werden (Kap. 2.4.14).

Es zeigte sich eine stark verringerte Aktivität in *rns2-1*- und *rns2-2*-Vakuolen. Ein direkter Beweis wurde zwar nicht geliefert, aber der Verlust von RNS2-Aktivität, ein Enzym mit Phosphodiesterase-Aktivität, ist vermutlich für den verringerten BNP-Umsatz verantwortlich sein. Der unveränderte Transkriptgehalt der verbleibenden T2-Typ RNasen in *rns2-1* und *rns2-2* (Abb. S1) lässt vermuten, dass diese RNasen ungeachtet ihrer Lokalisierung nicht für die verringerte Hydrolyseaktivität in *rns2-1* und *rns2-2* verantwortlich sind. An RNase A konnte gezeigt werden, dass die Spaltung der zyklischen Esterbindung erst dann abläuft, wenn die Transphosphorylierung der RNA abgeschlossen ist (Cuchillo *et al.*, 1993). Daher wird angenommen, dass zyklische Intermediate als Substrat für RNase A dienen, sobald Poly- und Oligonukleotide abgebaut sind (Cuchillo *et al.*, 1993). RNA-Abbau durch RNasen mit diesen Eigenschaften führt in Folge der Differenz zwischen 2',3'-cNMP-Produktion und Abbau zur Akkumulation der zyklischen Intermediate, sofern keine weiteren Enzyme die Hydrolysegeschwindigkeit begünstigen (Abel *et al.*, 2000). Ebenso wie RNase A ermöglicht RNS2 die Freisetzung sowie die Hydrolyse von 2',3'-cNMPs. Die Akkumulation von 2',3'-cAMP in isolierten Vakuolen ist ein Hinweis darauf, dass zyklische Intermediate für RNS2 ebenfalls erst dann als Substrat dienen, wenn Poly- und Oligonukleotide abgebaut sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisierung zweier putativer zyklischer Phosphodiesterasen (At4g18930 und At4g18940) über Lokalisierungsstudien mittels grün fluoreszierendem Protein (GFP) als cytosolisch ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dass diese beiden Enzyme einen Beitrag zur vakuolären Phosphodiesterase-Aktivität leisten ist somit zwar ausgeschlossen, die Anwesenheit anderer Enzyme (RNasen, Phosphodiesterasen) mit Phosphodiesterase-Aktivität ist jedoch möglich.

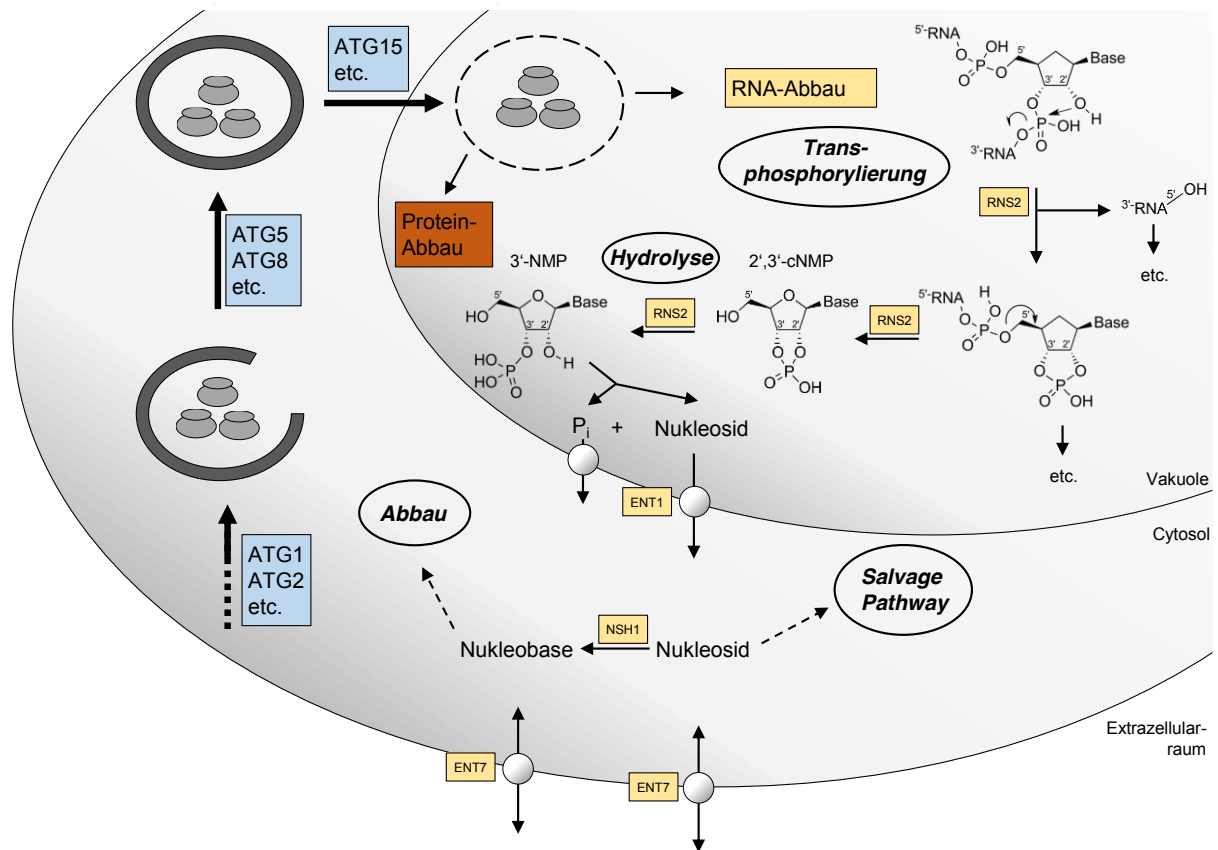


Abbildung 4.1: Autophagie-abhängiger, vakuolärer RNA-Abbau in *A. thaliana* und Integration in den zellulären Nucleotid-Metabolismus unter Berücksichtigung von Nucleosidtransportprozessen. An Autophagie (Ribophagie) beteiligte Proteine sind blau hinterlegt, an RNA-Abbau und -Transport beteiligte Proteine gold, der Protein-Abbauweg rot. In Anlehnung an Welter & Elazar (2014).

Die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen der vakuolären Adenylatgehalte und RNA-Abbauprodukte in *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien zeigten, dass *RNS2*, ähnlich wie die intrazellulären RNasen in *L. esculentum*, 2',3'-cNMPs produzieren und diese zu NMPs hydrolysieren. Die Akkumulation dieses Intermediates des RNA-Abbaus lässt darauf schließen, dass die Transphosphorylierung schneller verläuft als die Hydrolyse (Abel & Glund, 1987; Löffler *et al.*, 1992; Nürnberger *et al.*, 1990). Ob weitere Enzyme an der Hydrolyse beteiligt sind, ist jedoch nicht geklärt.

4.3 Vakuolenisolation und Extraktion vakuolärer RNA: Eine Frage der Qualität?

An *L. esculentum* konnte bereits gezeigt werden, dass die Vakuole ein nukleolytisches Kompartiment darstellt, in dem Nukleinsäuren abgebaut werden können (Abel *et al.*, 1990). Über radioaktive Markierung zellulärer RNA mit [³H]-Uridin und *in vitro* Analyse von Nukleinsäuren aus isolierten Vakuolen konnte darüber hinaus intravakuoläre RNA nachgewiesen werden (Abel *et al.*, 1990). Dabei wiesen die verwendeten Vakuolenisolationen keine bis geringe Kontaminationen anderer Kompartimente auf. Die vorliegende Arbeit befasst sich u.a. mit dem Nachweis vakuolärer RNA aus *A. thaliana* und der Untersuchung dieser in Bezug auf ihre Größe und anderer Eigenschaften. Zum einen erfolgte die Separierung subzellulärer Kompartimente über die nicht-wässrige Fraktionierung. Hierbei bilden sich nach dem Wasserentzug kleine Partikel, die zuvor in enger Nachbarschaft lagen. Diese Partikel stellen im Wesentlichen die zellulären Kompartimente dar und können durch einen kontinuierlichen Dichtegradienten aus Tetrachlorethen und Heptan aufgetrennt werden (Krüger *et al.*, 2011). Dabei konnten im Wesentlichen drei Kompartimente fraktioniert werden: Cytosol (inklusive Mitochondrien), Plastiden und Vakuolen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der sofortigen Unterdrückung biologischer Aktivitäten durch den rapiden Wasserentzug und Einfrieren der Proben (Gerhardt & Heldt, 1984). Nukleinsäureabbau und -zerfall wird durch die Abwesenheit von Wasser effektiv unterbunden, was zum Beispiel die Untersuchung der intrazellulären Verteilung von kleinen RNAs in Zellen aus menschlichen Epithelzellen (HeLa Zellen) ermöglichte (Gurney & Eliceiri, 1980). Die zweite Methode zur Isolation intakter Vakuolen über Dichtegradientenzentrifugation basiert auf einem diskontinuierlichen Ficollgradienten (Kap. 2.4.6.1). Diese Isolationsmöglichkeit hat den Vorteil, dass intakte Vakuolen isoliert werden, die im Folgenden untersucht oder behandelt werden können. Da nur geringe Mengen an RNA in *A. thaliana* Vakuolen erwartet wurden, sollte die Reinheit und Intaktheit der Vakuolenisolationen bestimmt werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigten keine Verunreinigungen mit Protoplasten. Um zu überprüfen, wie hoch der Anteil der cytosolischen und chloroplastidären Kontamination in den unterschiedlichen Vakuolenisolationen ausfällt, wurden die Aktivität des chloroplastidären Markerenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und des cytosolischen Markerenzym Uridindiphosphat-glucosepyrophosphorylase (UGPase) gemessen, auf die Aktivität des vakuolären

Markerenzym α -Mannosidase bezogen und mit den Aktivitäten in Protoplasten in Bezug gesetzt. Die Aktivität der GAP-DH lag bei beiden Isolationsmethoden bei circa 5 Prozent im Vergleich zu Protoplasten (Abb. 3.12A.). Die Aktivität der UGPase lag hingegen in den Vakuolen, die über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten isoliert wurden (DGZ-Vakuolenisolationen) bei 10 Prozent bzw. für Vakuolenisolationen aus nicht-wässriger Fraktionierung (NAF-Vakuolenisolationen) bei 30 Prozent (Abb. 3.12B). Chloroplasten konnten demnach sehr erfolgreich aus der Vakuolenisolation ausgeschlossen werden. Die cytosolische Kontamination war über beide Isolationsmethoden nicht zu vernachlässigen und beschreibt eine potentielle Ursache von Kontamination der Vakuolen mit cytosolischer RNA. Diese Erkenntnis deckt sich mit der Aktivitätsbestimmung verschiedener Markerenzyme in den einzelnen Fraktionen der nicht-wässrigen Fraktionierung, bei denen in der vakuolenreichen Fraktion ein cytosolischer Anteil von 20 Prozent und ein vakuolärer Anteil von 40 Prozent des Gesamtanteils bestimmt wurde (Krüger *et al.*, 2011). Zur Überprüfung der Integrität isolierter, intakter DGZ-Vakuolen wurden diese mit Neutralrot gefärbt. Sie zeigten nahezu ausschließlich unverletzte, rot gefärbte Vakuolen (Abb. 3.13B). Um extravakuoläre RNA-Kontaminationen zu entfernen wurden die Vakuolen mit RNase A und anschließend mit Proteinase K inkubiert. Die Proteinase K Behandlung führte in den DGZ-Vakuolenisolationen zu keiner detektierbaren UGPase Aktivität (Abb. 3.12B) und bestätigte den erfolgreichen Proteinabbau. Die Behandlung intakter DGZ-Vakuolen mit entsprechenden Enzymen ermöglichte die Entfernung der RNA- und Enzym-Kontamination. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Vakuolen RNA besitzen (Abb. 3.13C). Auch nach der Behandlung der Vakuolen mit RNase A konnte RNA fluoreszenzmikroskopisch intravakuolär nachgewiesen werden, wenngleich das Fluoreszenzsignal schwächer ausfiel als in Vakuolen, die nicht behandelt wurden. Die Bildung von Autophagosom-ähnlichen Vesikeln in behandelten Vakuolen zeigte, dass Prozesse, wie zum Beispiel Vesikelfluss, nicht vollständig zum Erliegen kommen. Es ist vorstellbar, dass auch vakuoläre RNA während des Isolationsprozesses weiter abgebaut wird. Dennoch muss man dabei bedenken, dass diese Prozesse lediglich durch vakuoläre RNasen ablaufen können, die *in vivo* solche Reaktionen ebenfalls katalysieren. NAF-Vakuolen liefern andererseits zwar stärker kontaminiertes, aber qualitativ hochwertiges Ausgangsmaterial für die nachfolgende Nukleinsäure-Isolation, da u.a. kein störendes

Percoll bzw. Ficoll enthalten ist. Die Analyse von RNA aus unterschiedlich aufbereiteten Vakuolen erlaubt eine gesicherte Aussage über das Vorkommen vakuolärer Oligonukleotide zu treffen. RNA wurde über Phenol/Chloroform extrahiert, wobei die chaotrope Substanz Guanidinisothiocyanat dabei als RNase-Inhibitor während der Extraktion der Gesamt-RNA fungierte, sodass jegliche RNase-Aktivität während der Isolation unterdrückt wurde (Wenzel & Amann, 2013). Bei der Extraktion der RNA wurde die Trifast-Reagenz (Peqlab, Erlangen) sofort auf die tiefgefrorenen Proben gegeben, um eine mögliche Degradation durch das Auftauen der Proben zu vermeiden (Botling *et al.*, 2009). Der Fokus lag hierbei auf sorgfältigem Arbeiten, um Abbau der RNA durch vorhandene RNasen zu vermeiden. Es wird daher angenommen, dass die extrahierte RNA während des Isolationsprozesses nicht verändert wurde und in Größe, Menge und Art die vakuoläre RNA widerspiegelt. In *L. esculentum* wiesen die isolierten Vakuolen RNA-Fragmente einer Größe von unter 80 nt auf (Abel *et al.*, 1990). Die Qualität der RNA bzw. das Maß der Degradierung wird für gewöhnlich über die Präsenz der 25S und 18S rRNA abgeleitet und kann als *RNA Integrity Number* (RIN) wiedergegeben werden (McIntosh & Cattolico, 1978; Schroeder *et al.*, 2006). Da die Vakuole von *A. thaliana* ein nukleolytisches Kompartiment darstellt (Abb. 3.9; Hillwig *et al.*, 2011), ist ein hoher Degradierungsgrad der vakuolären RNA zu erwarten und die *RNA Integrity Number* für Untersuchungen vakuolärer RNA im Hinblick auf die Qualität nicht sinnvoll. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA aus *A. thaliana* Vakuolen ermöglichte eine exakte Größenauftrennung und offenbarte ähnliche RNA-Fragmentgrößen wie in *L. esculentum*. So konnten in den DGZ-Vakuolen mit geringer cytosolischer Kontamination RNA mit einer Länge von unter 200 nt isoliert werden. In NAF-Vakuolenisolationen, in denen die cytosolische Kontamination bis zu 30 Prozent betrug, lag die maximale Oligonukleotidgröße bei 1000 nt. Dennoch waren die Fragmente mit einer Länge von maximal 200 nt überdurchschnittlich stark vertreten. Um zu überprüfen, ob die größeren RNA-Oligonukleotide extravakuoläre Kontaminationen darstellen, wurden intakte DGZ-Vakuolen zunächst mit RNase A inkubiert, diese durch Proteinase K Inkubation abgebaut, Vakuolen aufgeschlossen und anschließend die verbliebene RNA extrahiert. Durch den RNase A-Verdau erfolgt die Entfernung aller extravakuolär vorhandenen RNAs, sodass durch die nachfolgende Nukleinsäureisolation lediglich Nukleinsäuren isoliert werden, die tatsächlich aus der Vakuole stammten. Die Isolation von intakten Vakuolen aus Jungpflanzen

(Kap. 2.4.6.1) wiesen zwar kaum nachweisbare chloroplastidäre wie cytosolische Verunreinigungen auf (Daten nicht gezeigt), der mikroskopische Nachweis vakuolärer RNA in diesen Vakuolen war jedoch aufgrund der geringen Mengen und hohen Ficoll-Konzentration nicht möglich. RNA-Transport und -Abbau sind entwicklungsabhängige Prozesse, die in adulten Blättern verstärkt ablaufen. Der Nachweis von RNA in diesen Isolationen war zwar über Fluoreszenzfarbstoffe nicht möglich, gelang allerdings durch radioaktive Endmarkierung der Nukleinsäuren. Die Auftrennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichte auch in diesen Vakuolen den Nachweis kleiner RNA-Fragmente – mit einer maximalen Größe von 50 nt (Abb. 3.16A). Die Inkubation der intakten Vakuolen mit RNase A zur Entfernung extravakuolärer RNA führte zu keiner Veränderung in der Größenverteilung der RNA. Mit anderen Worten lässt sich dieser Sachverhalt wie folgt ausdrücken: Diese Methode ermöglicht die Isolation hochreiner Vakuolen mit vakuolärer RNA einer Länge von maximal 50 nt und nicht-nachweisbarer Kontamination mit extravakuolären RNA-Fragmenten. Wurden hingegen DGZ-Vakuolen aus adulten Pflanzen isoliert und anschließend mit RNase A behandelt, so verblieben von den ursprünglich bis zu 150 nt großen RNAs hauptsächlich RNA-Fragmente einer Länge von bis zu 50 nt (Abb. 3.16C). Alle größeren RNAs waren folglich nicht in der Vakuole lokalisiert und repräsentieren Kontaminationen, die allerdings durch den RNase A-Verdau entfernt werden konnten. Anders als bei dem Abbau von vakuolären Speicherproteinen während der Keimung, der in isolierten Organellen verfolgt werden kann (Nishimura & Beevers, 1979), weist die Größe der vakuolären RNA in *A. thaliana* (< 50 nt) auf RNA-Abbau hin, der in anderen zellulären Kompartimenten, etwa dem ER oder Autophagosome, beginnt. Die kurzen RNA-Fragmente sind demnach vielmehr als *steady-state* Intermediate zu sehen, die durch weitere vakuoläre Abbauprozesse unter Mitwirkung der RNS2 zu Nukleosiden degradiert werden können. Möglicherweise ist auch die Dynamik des Abbaus langer und kurzer RNA-Fragmente unterschiedlich. Wenn der Abbau kurzer Fragmente, etwa aufgrund von Edukthemmung, verlangsamt abläuft, würden sich diese anreichern. Da hier jedoch nur ein Zeitpunkt betrachtet wurde, kann über die Dynamik des RNA-Abbauprozesses keine Aussage getroffen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vakuolenisolationen zwar unterschiedliche Grade an Kontaminationen mit anderen Organellen aufwiesen, die Wahl mehrerer Methoden jedoch gesicherte Aussagen über Vorkommen, Größe und Art der vakuolären RNA ermöglicht. Erstmals konnte die Existenz vakuolärer RNA in

A. thaliana durch mikroskopische Untersuchungen und RNase A-Inkubation intakter Vakuolen eindeutig nachgewiesen werden. Die Größe der RNA-Fragmente innerhalb der Vakuole liegt bei maximal 50 nt und weist auf nukleolytische Aktivität vor dem Eintritt in die Vakuole hin. Diese Ergebnisse ebnen letztlich den Weg für detaillierte Analysen vakuolärer RNA durch *Next Generation Sequencing*.

4.4 Next Generation Sequencing

Untersuchungen an *L. esculentum* zeigten erstmals die Längenverteilung vakuolärer RNA (Abel *et al.*, 1990). Hochreine isolierte Vakuolen aus Tomaten-Zellkultur enthielten RNA-Oligonukleotide, die deutlich kürzer als 80 nt waren und als Produkte von vakuolären RNA-Abbau galten (Abel *et al.*, 1990). Es wurde postuliert, dass die vakuoläre RNA durch nicht-selektive Autophagie in die Vakuole gelangt, sodass diese RNA in ihrer Zusammensetzung den zellulären RNA-Pool widerspiegelt (Hillwig *et al.*, 2011). Durch Northern Blot Studien ist zwar bekannt, dass rRNA in der pflanzlichen Vakuole vorhanden ist (Abel *et al.*, 1990), die Untersuchung des vakuolären RNoms war jedoch technisch nicht realisierbar und konnte nun im Rahmen dieser Arbeit durch Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken ermöglicht werden.

4.4.1 Datengenerierung und -verarbeitung

Die Herstellung der cDNA-Bibliotheken erfolgte nach dem „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit (New England Biolabs) mit verlängerter Ligation des 3'-Adapters (Kap. 2.6.1). Dieser Schritt führt zwar zu einer vermehrten Bildung von Adapterdimeren und -concatameren, verbessert aber die Ligationseffizienz von RNA-Molekülen mit methylierten 3'-Enden und ermöglicht so die Erfassung einer größeren RNA-Population des ursprünglichen *Pools* in den cDNA-Bibliotheken. Die *Recovery* von rRNA-, tRNA-Abbauprodukten und anderen RNA-Spezies kann durch Dephosphorylierung vor der 3'-Adapterligation und Rephosphorylierung vor der 5'-Adapterligation weiter verbessert werden (Hafner *et al.*, 2011) und könnte für zukünftige Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Zusätzlich zur ursprünglichen RNA-Sequenz werden insgesamt 134 bp an 3'- und 5'-Ende ligiert. Die dominantesten Größen in der cDNA-Bibliothek von DGZ-Vakuolen (C9) sind circa 150 bp und 280 bp (Abb. 3.17). Dies bedeutet, dass die Adapter-flankierten Sequenzen vornehmlich im Größenbereich von 16 bp beziehungsweise 146 bp liegen. Zum Vergleich: Die Maximallänge der RNA-Fragmente aus DGZ-Vakuolen betrug

nach der Entfernung extravakuolär vorhandener RNA 150 bp (Abb. 3.16C). Die Länge der HiSeq2500-Sequenzen betrug überwiegend 9 - 14 bp. Die Anzahl kleinster Fragmente scheint zwar auf Ebene der cDNA und auf Ebene der erhaltenen Sequenzen überrepräsentiert zu sein, dennoch finden sich auch dort sehr kurze Oligonukleotide mit einer Länge von unter 150 nt. Die cDNA-Herstellung erfolgte nach Herstellerangaben und ist für *small* RNA optimiert. So verringert sich zum Beispiel die Ligationseffizienz für lange *Inserts* oder für solche, die modifizierte Enden aufweisen oder aufgrund ihrer Länge bevorzugt zirkuläre oder andere Sekundärstrukturen ausbilden (Hafner *et al.*, 2011). Hierin liegt die Ursache für den geringeren Anteil an langen cDNAs in einigen Bibliotheken im Vergleich zur für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA.

Während der Illumina-Sequenzierung dieser cDNA erfolgt zunächst eine Brückenamplifikation an einer zweidimensionalen Trägerplatte (*Flow Cell*). Diese mehrfach wiederholte Amplifikation führt zur Bildung von *Clustern* gleicher DNA-Stränge. Die Replikation des Strangs mit reversiblen Farbstoff-Terminatoren ermöglicht letztlich die Ermittlung der Sequenz (Quail *et al.*, 2012). Die *Insert*-Größe zur Generierung der cDNA-Bibliothek beeinflusst dabei die *Cluster*-Generierung auf der *Flow Cell* während der Sequenzierung. Während kurze Produkte wesentlich effizienter amplifiziert werden, produzieren lange DNA-Stücke größere, diffusere *Cluster* (Head *et al.*, 2014). Somit ist die Größenverteilung der Sequenzen aufgrund von Effekten während der cDNA-Herstellung und der Sequenzierung nur bedingt zur Beschreibung der ursprünglichen RNA-Population nutzbar.

Die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken C1 - C15 führte zu einer quantitativen Ausbeute von vier bis acht Millionen Sequenzen je Bibliothek (Tab. 3.1) und gewährleistete eine hohe Abdeckung trotz geringer Abundanz einiger RNAs. Die geringere Abdeckung durch die MiSeq-Daten hat dabei ein größeres Fehlerpotential zur Folge, da teilweise Sequenzen nur durch wenige *Counts* abgedeckt wurden (Gesamtzahl der *Counts* <100.000). Die kurze Lesereichweite ist für Kartierungen herausfordernd. Da allerdings im Fall der vakuolären RNA Fragmente einer maximalen Größe von 50 bp erwarten werden, ist die Illumina-Sequenzierung im *Rapid-run*-Modus für die Fragestellungen eine geeignete Technologie. Für die Datenverarbeitung stehen zwar *Tools* zur Verfügung, die Parameter müssen jedoch individuell angepasst werden. Zur Entfernung von Adaptersequenzen wurde die entsprechende Nukleotidabfolge in Cutadapt hochgeladen und aus den Datensätzen entfernt

(Kap. 2.6.3). TopHat verarbeitet lediglich Sequenzen mit einer Mindestlänge von 12 bp und erlaubt die Suche von maximal 20 multiplen Positionen der Sequenz auf dem Genom. Das Tool teilt Sequenzen zur Berücksichtigung von Exon-Intron-Übergängen der mRNA und kann so bei bestimmten Fragestellungen zur Aufspürung von Spleißvarianten nützlich sein (Trapnell *et al.*, 2012). Die Berechnung der Abundanz der verschiedenen RNA-Loci erfolgte mit multicov aus der BEDTools-Suite. Für die Assemblierung stand zwar eine regelmäßig aktualisierte Referenz zur Verfügung (Lamesch *et al.*, 2012), als vollständig ist diese jedoch nicht zu bezeichnen. Je nachdem, welche Gene beziehungsweise RNA-Sorten im Fokus stehen, muss die Referenz entsprechend überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden. Zur Vervollständigung der Annotierungen wurden zur aktuellen Referenz (TAIR10) in der Literatur beschriebene rRNA-Loci der 45S rRNA und 5S rRNA der Kernchromosome ergänzt (Layat *et al.*, 2012). Auf Chromosom 2 und Chromosom 3 wurde die Annotierung der 25S rRNA hinzugefügt. Auf Chromosom 4 und Chromosom 5 befinden sich insgesamt 19 Loci der 5S rRNA. Die in der Literatur beschriebenen Loci der 45S rRNA auf Chromosom 4 und 5S rRNA auf Chromosom 3 sind in der Genomdatei nicht vorhanden. Ferner sind die vorhandenen Loci in der Genom-Sequenz nicht wie *in vivo* mit bis zu 1000 Kopien vertreten (Layat *et al.*, 2012), sondern einzeln (45S rRNA) beziehungsweise in bis zu 20 Kopien (5S rRNA) (vgl. Tab. 2.9).

4.4.2 Analyse des vakuolären RNoms

Die pflanzliche Vakuole akkumuliert RNasen während Bedingungen, wie Seneszenz oder Phosphatmangel (Löffler *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1993). Doch auch für den „normalen“ rRNA-*turnover* ist konstitutive RNase-Aktivität in der Vakuole notwendig (Hillwig *et al.*, 2011; MacIntosh & Bassham, 2011). Es konnte zwar RNA als Abbauprodukt von RNasen in *L. esculentum* Vakuolen nachgewiesen und die Größe dieser Oligonukleotide bestimmt werden (Abel *et al.*, 1990), die Zusammensetzung und das Vorkommen verschiedener RNA-Typen wurde jedoch nie genauer untersucht. Die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken, die aus vakuolärer RNA hergestellt wurden, ermöglichte erstmals die Gesamtheit der RNAs zu erfassen und bekannten RNA-Typen zuzuordnen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Vergleich von verschiedenen Loci innerhalb eines Datensatzes verzichtet und lediglich gleiche Loci in verschiedenen cDNA-Bibliotheken miteinander verglichen, sodass eine Normalisierung auf die Locusgröße nicht notwendig war. Man kann ungeachtet der

realen Länge dieser RNA davon ausgehen, dass der Anteil der *Counts* pro Locus im Wesentlichen den Anteil der vorhandenen RNA-Fragmente pro Locus in der Vakuole widerspiegelt. Es ist klar zwischen normalisierten *Counts* und Anteil an *Counts* für die verschiedenen RNA-Typen zu unterscheiden. Während erstes die *Counts* pro Locus erfasst, werden im zweiten Fall alle *Counts*, die den Loci eines RNA-Types zugeordnet wurden, zusammengefasst. An dieser Stelle sei angemerkt, dass intakte tRNA mit der hier angewandten Vorgehensweise der cDNA-Herstellung durchaus in cDNA umzuschreiben ist. Intakte mRNA hingegen dient aufgrund ihrer 5'-Cap-Struktur nicht als Substrat für die Adapterligation während der cDNA-Synthese (Head *et al.*, 2014), sodass die erhaltenen *Counts* aus Abbauprodukten der mRNA entstehen.

In vielen Streudiagrammen konnten klare „Linien“ an Loci beobachtet werden, die in der Beschreibung nicht weiter erwähnt wurden. Sie sind als Artefakte, die die Software produzieren, identifiziert worden. In C14 beispielsweise splittet TopHat *Reads* auf Chromosom 1 im Bereich von AT1G73650.1 bis AT1G73890.1 nicht korrekt, sodass diese über einen sehr großen Bereich gezogen werden. Diese werden fälschlicherweise in multicov für mehrere Loci erfasst, was zusammen mit der logarithmischen Darstellung zu eben diesen diskreten „Linien“ führt. Da diese vermeidlichen Änderungen in der Anzahl der zugeordneten *Counts* auf fehlerhafte Paramtereinstellungen zurückzuführen sind, werden diese Artefakte nicht mit in die weitere Diskussion einbezogen.

Die Isolation der Vakuolen durch unterschiedliche Methoden führte zu einer starken Varianz in der Verteilung der *Counts* auf die RNA-Loci (Abb. 3.24). Über die nicht-wässrige Fraktionierung aufbereitete Vakuolen (C14) wiesen im hoch-abundanten Bereich ($10^2 - 10^5$) eine verstärkte Änderung einzelner Loci im Vergleich zu DGZ-vakuolärer RNA (C1, C9) auf (Abb. 3.24). So konnte ermittelt werden, dass in NAF-Vakuolen (C14) der Anteil an mRNA um circa 4 Prozent (C1) bzw. circa 6 Prozent (C9) niedriger und gleichzeitig der tRNA-Anteil um 7 Prozent (C1) bzw. 5 Prozent (C9) höher war (Tab. 3.2). Da während der wässrigen Isolation der DGZ-Vakuolen (C1, C9) RNA-abbauende Prozesse nicht unmittelbar gestoppt werden, können diese und weitere Effekte natürlich aus dem Abbau spezifischer vakuolärer RNA während der Isolation der Vakuolen resultieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die Mehrheit der vakuolären RNA-Oligonukleotide (circa 70 Prozent) in mRNA ihren Ursprung hat (Abb. 3.28 und Tab. 3.2). Mit Northern Blot Analysen und elektronen- oder

fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war es *bis dato* nicht möglich, diese gering abundanten mRNA-Abbauprodukte in der Vakuole zu detektieren und zu analysieren (Abel *et al.*, 1990; Hillwig *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014); erst mit *Next Generation Sequencing* konnte die Vielzahl der mRNAs erfasst und zugeordnet werden (Abb. 3.22). Da allerdings über 1000-mal mehr mRNA-Loci als rRNA-Loci existieren, ist die Anzahl an Loci zu berücksichtigen. Eine Aussage über die Abundanz der einzelnen Transkripte als Ursprung für vakuolären RNA-Abbau ist nur bedingt möglich, da keine Normalisierung der Transkriptlänge erfolgte. Es sollte aber zum einen bedacht werden, dass die Sequenzlänge in C1 - C13 sehr diskret und kurz war. Zum anderen ist der Unterschied der Transkriptgröße von mRNA- und rRNA-Transkripten nicht so gravierend, wie zum Beispiel im Vergleich zu snoRNAs, snRNAs und miRNAs. Die Zuteilung des großen Anteils an rRNA-Counts zu den wenigen Loci (Abb. 3.27 und Abb. 3.28) ist demnach ein deutlicher Hinweis darauf, dass im Bezug auf das einzelne Transkript die rRNAs die bedeutendste Quelle für vakuolären RNA-Abbau darstellen. Der Anteil der mRNA-Fragmente in der Vakuole ist zwar bedeutend größer; hier kommt aber die große Anzahl der Transkripte zum Tragen, sodass einer einzelnen oder mehrerer mRNAs keine besondere Bedeutung zugeschrieben werden kann. In *S. cerevisiae* wurde der RNA-Abbau in Vakuolen unter Stickstoffmangel detailliert untersucht (Huang *et al.*, 2014). Hefen unter Stickstoffmangel zeigten überwiegend nicht-selektiven RNA-Abbau, wobei die RNA-Verteilung in der Vakuole die der Zelle widerspiegeln müsste. Da 80 bis 85 Prozent der zellulären RNA rRNA und nur ein geringer Anteil mRNA darstellt, wurde angenommen, dass überwiegend Abbauprodukte der rRNA in der Vakuole vorzufinden sind (Huang *et al.*, 2014). Auch in *A. thaliana* wird der nicht-selektive, vakuoläre RNA-Abbau vermutet (Hillwig *et al.*, 2011). Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass in der pflanzlichen Vakuole rRNA-Transkripte eine wichtige Quelle für vakuolären RNA-Abbau darstellen. Dennoch bleibt festzuhalten, dass der Anteil an mRNA-Fragmenten in der Vakuole wesentlich höher ist als die Gesamtheit der rRNA-Fragmente. In *S. cerevisiae* konnten 125 Gene identifiziert werden, die mRNA-enthaltene *P-bodies* und/oder Stress-Granula über Autophagie in die Vakuole dirigieren (Buchan *et al.*, 2013). Es ist also nicht ausgeschlossen, dass die Vakuole eine zusätzliche Rolle in der Regulation und Abbau von mRNA spielt, was einen erhöhten Anteil an mRNA-Fragmenten in der Vakuole im Vergleich zur zellulären Ebene erklären könnte. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass es keine Informationen über die

Abbaugeschwindigkeit der unterschiedlichen RNAs in der Vakuole gibt. Gelangt die RNA über nicht-selektiven Transport in die Vakuole, so kann ein erhöhter Anteil an RNA-Fragmenten der mRNA durch eine verlangsamte Abbaugeschwindigkeit im Vergleich zur Abbaugeschwindigkeit der rRNA erklärt werden. Die 5'-Cap-Struktur und der 3'-Poly-Adenosin-Bereich verhindert bekanntermaßen den Abbau von mRNA durch Exonukleasen (Abler & Green, 1996).

Unterschiede in der Zusammensetzung der vakuolären RNA in verschiedenen Mutanten (*atg5*, *rns2*, *ent1*, *ENT1OE5*) konnten nicht festgestellt werden (Abb. S6). Ebenso zeigte die RNase A-Behandlung von Vakuolen keine Änderung des vakuolären RNAs auf Ebene der Sequenzierung (Abb. 3.23).

Der *Knockout* der *RNS2* führte zur Akkumulation von RNA in der Vakuole (Hillwig *et al.*, 2011) und zur Verringerung der vakuolären RNase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Kap. 3.3.2). Die Sequenzierungsergebnisse lassen darüber hinaus schließen, dass die Zusammensetzung der vakuolären RNA in dieser Mutante ungeachtet der RNA-Akkumulation unverändert bleibt (Abb. 3.26). Aufgrund der fehlenden Normalisierungsmöglichkeit und mehrfachen Vervielfältigungsschritte ist eine Aussage über absolute Mengen der RNA in Vakuolen von *rns2-2*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp auf Basis der erhaltenen Sequenzen kaum möglich. Der *Knockout* des Autophagie assoziierten Gens *ATG5* führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Zusammensetzung vakuolärer RNA. Nicht-selektive Makroautophagie von RNA und der Transport dieser in die Vakuole scheint demnach nicht exklusiv über den *ATG-Pathway* zu laufen. In Säugetieren wurde Autophagie intensiv untersucht und neben dem *ATG5/ATG7*-abhängigen *Pathway* bereits ein *ATG5/ATG7*-unabhängiger *Pathway* entdeckt, der unter anderem im Embryonalstadium nachgewiesen wurde (Nishida *et al.*, 2009). Auch in *A. thaliana* ist ein solcher alternativer Weg zum nicht-selektiven Abbau von zellulären Bestandteilen vorstellbar und liefert eine Erklärung für das Ausbleiben von drastischen Veränderungen in der vakuolären RNA-Zusammensetzung zwischen Wildtyp und der *ATG5* T-DNA Insertionslinie. Jedoch zeigte sich ein verringerter Anteil der chloroplastidären RNA in Vakuolen von jungen Pflanzen (2 Prozent) im Vergleich zu adulten Pflanzen (7 Prozent; Tab. 3.2). Da ein Teil des Abbaus chloroplastidärer Bestandteile in der Vakuole abläuft, sind RNA-Abbauprodukte der chloroplastidären RNA in der Vakuole vorzufinden. In Studien aus den frühen 80er Jahren wurde postuliert, dass der Abbau von Chloroplasten in der Vakuole der Hauptabbauweg von chloroplastidären Proteinen, vor allem in

seneszierendem Gewebe ist (Lin & Wittenbach, 1981; Wittenbach *et al.*, 1982). Der Transport des ganzen Organells oder selektiver Transport von Stroma in die Vakuole erfolgt dabei über Autophagie (Ishida *et al.*, 2014). Die zur Vakuolenisolation verwendeten 4 - 6 Wochen alten Pflanzen wiesen zwar keine Seneszenz auf, dennoch kann davon ausgegangen werden, dass diese Abbauprozesse im adulten Blatt im Vergleich zum juvenilen Blatt verstärkt ablaufen.

4.5 Biochemische Analyse von rekombinant synthetisiertem ENT7-eGFP

Equilibrative Nukleosidtransporter spielen für die Verteilung von Nukleosiden in Pflanzen sowie unter anderem Säugetieren eine wichtige Rolle und liefern die Substrate der *Salvage Pathway* Reaktionen zur Synthese von Nukleotiden. Neben ihrer Beteiligung an Stoffwechselprozessen besitzen die menschlichen Vertreter eine pharmakologische Bedeutung, da Inhibierung und Transport von Nukleosiden, Nukleosid-Analoga und anderen Permeanten kardiovaskuläre, anticancerogene und antivirale Effekte haben (Young *et al.*, 2013). Trotz dieser Signifikanz wurde die Kristallstruktur eines ENTs bisher nicht veröffentlicht, da stabiles und funktionelles Protein nie erfolgreich aufgereinigt werden konnte (Hammond, 1997; Hammond & Zarenda, 1996; Young *et al.*, 2013). Durch Antipeptid-Antikörper-Analysen in Kombination mit Glykosylierungs-*Scanning*-Mutagenese konnte jedoch gezeigt werden, dass *Homo sapiens* (*H. sapiens*) ENT1 elf transmembrane Domänen mit einem cytosolischen *Loop* zwischen der Transmembrandomäne sechs und sieben, einen cytosolischen N-Terminus sowie extrazellulärem C-Terminus besitzt (Young *et al.*, 2013). Eine ähnliche Struktur wird auch für die pflanzlichen Vertreter vermutet (Abb. 3.29). Mit FUN26 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wurde der erste Nukleosidtransporter erst kürzlich erfolgreich aufgereinigt (Boswell-Casteel *et al.*, 2014), dennoch konnte die heterologe Expression erstmals mit *A. thaliana* ENT7 realisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ENT7 mit C-terminalem eGFP synthetisiert und stabiles, sowie funktionelles Protein aufgereinigt, das in der Lage war, bekannte Substrate zu binden. Homogenität und Stabilität sind Voraussetzungen für strukturelle Analysen und Funktionsstudien. Die Synthese eines fluoreszierenden Fusionsproteins hatte mehrere Vorteile. Zum einen ermöglichte sie die zügige Identifizierung von Hefekolonien mit hohem Expressionslevel (Abb. 3.30). Zum anderen ist die Fluoreszenz von eGFP ein Indikator für die korrekte Proteinfaltung. Wird bei C-terminaler Fusionierung des eGFP Fluoreszenz detektiert, so bedeutet dies, dass die am N-Terminus beginnende Faltung des synthetisierten Proteins bis zum C-terminalen Fluorophor erfolgt sein muss. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zur Expression von Membranproteinen nutze diesen Sachverhalt und führte die ENT7-Homologe ENT1 und ENT3 aus *A. thaliana* als Modellproteine zur Demonstration korrekter Faltung auf (Müller-Lucks *et al.*, 2012). Die starke Fluoreszenz der Hefekolonien, sowie die In-Gel-Fluoreszenz von ENT7-eGFP (Abb. 3.33), geben demnach einen Hinweis auf die korrekte Faltung des Proteins.

4.5.1 Oligomerer Zustand des ENT7

Fluoreszenz-Gel-Permeations-Chromatographie ist ein nützliches *Tool*, um Monodispersität zu überprüfen. Ein gefaltetes Protein eluiert typischerweise in einem einzigen, symmetrischen Peak (Ricker & Sandoval, 1996). Während die Standardaufreinigung in oligomerisiertem, polydispersen Protein resultierte (Abb. 3.32), konnte durch die Optimierung der Solubilisierungs- und immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie-Bedingungen die Solubilisierung von monodispersen ENT7-eGFP Fusionsprotein erzielt werden (Abb.3.34A). Die Kalibrierung des Systems mit Standardproteinen (Kap.2.4.4) ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichtes beziehungsweise oligomeren Zustandes des untersuchten Proteins durch den Vergleich der Partitionskoeffizienten K_{av} . Im vorliegenden Fall war das Molekulargewicht des Fusionspartners und des Detergens zu berücksichtigen. Das Micellengewicht leerer DDM-Micellen wurde über *Dynamic Light Scattering* (DLS) auf 40 kDa bestimmt und für eGFP bzw. ENT7 auf Basis der Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 25 kDa bzw. 46 kDa angenommen (Tab. S2). Das Peak-Maximum von gereinigtem ENT7-eGFP liegt bei einem Elutionsvolumen von $V_E = 12,6$ ml, was mit einem Molekulargewicht von 192 kDa korreliert und dem in DDM solubilierten ENT7-eGFP im dimeren Zustand entspricht. Das Elutionsprofil von eGFP zeigte lediglich monomeres Protein, sodass ein Dimerisierungseffekt von eGFP ausgeschlossen werden kann. Andere Gruppen berichteten ebenfalls, dass eGFP in Lösung als Monomer vorliegt (Drew *et al.*, 2008; Parker & Newstead, 2014a). Die Neigung, Dimere auszubilden, muss demnach eine charakteristische Eigenschaft des Transporters sein (Abb. 3.34B). Auch nach der Entfernung des eGFP zeigte ENT7 mit 142 kDa ein Molekulargewicht, das dem dimeren Zustand entspricht (Abb. 3.35B). Die Entfernung dieses *Tags* ist bekanntermaßen ein kritischer Schritt für künftige Stukturanalysen und war im vorliegenden Fall ohne Verlust der Monodispersität möglich.

4.5.2 Binfähigkeit des solubilierten ENT7-eGFP

Microscale Thermophorese (MST) ermöglicht die Messung molekularer Interaktionen von Proteinen oder Rezeptor-Liganden-Interaktionen, sowie die Ausbildung großer Komplexe (Oligomerisierung, Ribosomen etc.). Das Messprinzip beruht auf der gerichteten Molekülbewegung entlang eines Temperaturgradienten: Thermophorese. Diese Bewegung hängt von der Größe, Ladung und Hydrathülle des Moleküls ab, die

wiederrum von der Bindung eines Liganden abhängen (Duhr & Braun, 2006). Für die Messung ist die Fluoreszenz-Markierung essentiell, da das Thermophorese-Verhalten über die Fluoreszenz determiniert wird. Nach lokaler Erhitzung durch einen Infrarot-Laser wird die Molekülbewegung als Fluoreszenzänderung optisch erfasst. Veränderungen im thermophoretischen Verhalten bei Titration mit einem unmarkierten Interaktionspartner ermöglichen die quantitative Bestimmung von Bindungsparametern (Wienken *et al.*, 2010). Neben der Möglichkeit, Bindeeigenschaften von solubilisierten Proteinen zu untersuchen, ermöglichte diese Methode ebenfalls die Detektion von Proteinaggregation. Das konstante Fluoreszenzsignal während der Anregung durch Aktivierung des IR-Lasers und die unveränderte Rückdiffusion nach Beendigung dieses Pulses sind ein Hinweis darauf, dass die Probe frei von Aggregaten ist (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011; Seidel *et al.*, 2013). Selbst wenn MST keine Untersuchung des Transportes ermöglicht, können Protein-Ligand-Interaktionen gemessen und Affinitäten bestimmt werden. Diese Technik wurde unter anderem verwendet, um die Bindeeigenschaften des pflanzlichen Nitrattransporters NRT1.1 zu untersuchen und ermöglichte die Berechnung der Dissoziationskonstante K_d für das Substrat Nitrat unabhängig des pH mit 1 mM (Parker & Newstead, 2014b). Frühere Untersuchungen an diesem Protein in *Xenopus laevis* (*X. laevis*) Oozyten zeigten eine Transportkinetik nach Michaelis-Menten mit der Michaeliskonstanten K_M von 4 mM. Die Arbeit an NRT1.1 zeigte erstmals die Vergleichbarkeit von Transport- und Bindungsstudien und untermauerte in erster Linie die Gültigkeit der Nutzung von MST für die Bestimmung der Funktionalität von Transportproteinen. Die Bindungsaffinitäten von ENT7-eGFP mit den Nukleosiden liegen in dem gleichen Konzentrationsbereich wie die von Wormit *et al.* (2004) berichteten Transportaffinitäten (Abb. 3.36; Tab. S3) mit leicht verringerten K_d -Werten für Adenosin (1,12 μM) im Vergleich zu der berechneten Substratffinität ($K_M = 9,8 \mu\text{M}$; Tab. S3). Darüber hinaus konnte das erste Mal für einen pflanzlichen Nukleosidtransporter gezeigt werden, dass Nukleobasen mit Affinitäten von 10 bis 20 μM gebunden werden (Abb. 3.37). Um auszuschließen, dass die reine Anwesenheit der Base zur Bindung des Liganden an das Protein führt, wurde die thermophoretische Messung mit ATP durchgeführt (Girke *et al.*, 2015). Es zeigte sich jedoch keine konzentrationsabhängige Änderung der Fluoreszenz. In *S. cerevisiae* wurden zwar keine direkten Aufnahmestudien mit Nukleobasen durchgeführt, Wettbewerbsstudien demonstrierten jedoch, dass der Adenosintransport durch die Anwesenheit von

Nukleobasen nicht gehemmt wird (Wormit *et al.*, 2004). Dies lässt vermuten, dass die Bindung von Nukleobasen an einer unabhängigen Bindungstasche abläuft. Für rekonstituierten *S. cerevisiae* FUN26 konnte eine starke Transportaffinität zu Nukleobasen (0,19 - 0,32 μ M) nachgewiesen werden (Boswell-Casteel *et al.*, 2014). Untersuchungen des Nukleobasen-Transports von *H. sapiens* ENT1 und ENT2 wurden in *X. laevis* Oozyten durchgeführt, und zeigten mit K_M -Werten im mM-Bereich wesentlich geringere Affinitäten als *S. cerevisiae* FUN26 und die Bindungsaffinität von ENT7 aus *A. thaliana* (Yao *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2002). Anders als die ENTs aus Säugetieren transportieren pflanzliche ENTs ihre Substrate im Symport mit Protonen (Girke *et al.*, 2014; Traub *et al.*, 2007). Studien mit dem Protonenentkoppler CCCP in *S. cerevisiae* gaben erste Hinweise darauf, dass *A. thaliana* ENT7 Nukleoside elektroneutral transportieren kann, was an *X. laevis* Oozyten mittlerweile bestätigt wurde (Girke *et al.*, 2015). Somit beschreibt ENT7 den ersten Transporter, der in der Lage ist, RNA-Abbauprodukte in Form von Nukleosiden und wahrscheinlich auch Nukleobasen aus der Zelle heraus und damit entgegen des anliegenden pH-Gradienten zu transportieren. Er kann damit einen wichtigen Beitrag zur Verteilung von stickstoffhaltigen Nährstoffen von *sink* nach *source* in der Pflanze leisten. *A. thaliana* ENT7 war der erste Nukleosidtransporter, der nach heterologer Expression funktionell aufgereinigt werden konnte. Mittlerweile konnte auch die heterologe Synthese von *H. sapiens* ENT1 gezeigt werden, sowie die Bindung des gereinigten Proteins an einen bekannten Inhibitor (Rehan & Jaakola, 2015). Neben ENT1 aus *H. sapiens* eignet sich auch ENT7 aus *A. thaliana* aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit zu den „klassischen“ ENTs als Modellproteine zur Untersuchung von Struktur und Funktionsweise auf Basis von Mutations- und Kristallisationsstudien.

4.6 Ausblick

Durch die hier vorliegende Arbeit gelang es, detaillierte Einblicke in RNA-Abbauprozesse der Pflanze, sowie in die Zusammensetzung vakuolärer RNA, zu gewinnen. RNS2 ist zwar die einzig bekannte vakuolär lokalisierte RNase in *A. thaliana*, die präsentierten Analysen weisen jedoch auf die Anwesenheit mindestens einer weiteren RNase hin. Die Ausbildung des schwachen Phänotyps in transgenen *RNS2*-Pflanzen kann in der funktionellen Komplementation begründet sein. Phylogenetische Analysen lassen die Anwesenheit zweier weiterer T2-Typ RNasen, RNS4 und RNS5, in *A. thaliana* vermuten (Igic & Kohn, 2001). RNS5 weist nicht nur eine hohe Verwandtschaft mit RNase LX auf – die intrazellulär lokalisierte RNase aus *L. esculentum* – es konnte auch in Proteomanalysen als vakuoläres Protein nachgewiesen werden (Carter *et al.*, 2004) und ist somit ein interessanter Kandidat für eine vakuoläre Lokalisierung. Auch die Anwesenheit eines weiteren Enzyms neben RNS2, das in der Lage ist, 2',3'-cNMPs zu spalten, ist nicht ausgeschlossen.

Es wurde von der Abteilung „Systemanalyse, Prognose und Regelung“ des Fraunhofer-Instituts für Techno- und Wirtschaftsmathematik ITWM ein *Workflow* erarbeitet, mit dem RNA-Sequenzierungen mit dem Fokus auf die Analyse der Gesamt-RNA ausgewertet werden können. Die Änderung bestimmter Parameter im *Workflow* ermöglicht es in Zukunft, eine statistisch abgesicherte Aussage über die Validität verschiedener Auswertungen treffen zu können. Der *Workflow* bietet weiterhin die Chance, die RNA von genetischen Mutanten, von Pflanzen aus unterschiedlichen Entwicklungsphasen oder von Pflanzen, die in Anwesenheit von Stressoren beziehungsweise Effektoren (Starklicht, Nährstoffmangel, etc.) kultiviert wurden, zu analysieren und zu vergleichen. Darüber hinaus können durch chemische und enzymatische Behandlung der RNA bestimmte RNA-Spezies oder der gesamte RNA-Pool für *downstream*-Anwendungen optimiert werden. Neben dem Fokus auf die Gesamt-RNA ermöglicht der *Workflow* durch die Änderung weniger Parameter die Analyse von RNA-Sequenzierungsdaten für zukünftige Transkriptomanalysen.

Die erfolgreiche Expression von *ENT7* ermöglicht zukünftige Kristallisations- und Mutationsstudien. Neben der Möglichkeit, mit dem optimierten Expressions- und Aufreinigungssystem auch andere ENT-Proteine aufzureinigen, können im ENT7 Aminosäuren, die in *H. sapiens* ENT1 als wichtig für die Inhibitor-Erkennung identifiziert wurden (Visser *et al.*, 2007; Visser *et al.*, 2002), eingeführt und analysiert

werden. Die Möglichkeit, Bindungsstudien im solubilierten Zustand durchführen zu können, erspart die Rekonstitution in Liposomen. Dennoch stellt die Rekonstitution eine Methode dar, um Transporteigenschaften zu untersuchen und mit den Daten der Thermophorese-Messung zu vergleichen.

5 Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Arbeit konzentrierte sich auf den vakuolären Ribonukleinsäure- (RNA) Abbau in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) und die Integration in den Nukleotid-Metabolismus unter Berücksichtigung von Nukleosidtransportprozessen. Insbesondere die physiologische Bedeutung des Verlustes der RNS2-Aktivität auf die vakuolären RNA-Abbauprozesse sollte untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass RNS2 den größten Anteil an der vakuolären Ribonuklease- (RNase-) Aktivität ausmacht, wobei die Restaktivität von circa 30 Prozent ein Hinweis auf mindestens eine weitere vakuoläre RNase ist. Die vakuolären Adenylatgehalte, Abbauprodukte der RNA, in *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien zeigten, dass RNS2, ähnlich wie die intrazellulären RNasen in *L. esculentum*, 2',3'-zyklische Nukleotidmonophosphate (2',3'-cNMPs) produzieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass in diesen Linien die vakuolären Enzyme sowohl RNA, als auch 2',3'-cNMPs langsamer abbauen als vakuoläre Enzyme aus Wildtyp-Pflanzen. Die Akkumulation dieses zyklischen Intermediates des RNA-Abbaus lässt darauf schließen, dass die Transphosphorylierung schneller verläuft als die Hydrolyse (Abel & Glund, 1987; Löffler *et al.*, 1992; Nürnberger *et al.*, 1990). Es kann angenommen werden, dass ein weiteres Enzym, wie etwa eine zyklische Phosphodiesterase oder eine weitere Ribonuklease, an der Hydrolyse beteiligt ist. Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der wichtigen Frage der Qualität von Vakuolenisolationen. Protoplastenkontaminationen konnten mikroskopisch ausgeschlossen werden. Die chloroplastidäre Verunreinigung war mit circa 5 Prozent gering, die cytosolische Kontamination lag jedoch je nach Isolationsmethode bei bis zu 30 Prozent im Vergleich zu Protoplasten. Es konnte darüber hinaus erstmals durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass Vakuolen RNA besitzen. Diese Oligonukleotide sind vornehmlich kleine Fragmente im Größenbereich bis 50 nt.

Next Generation Sequencing ermöglichte eine detaillierte Analyse von cDNA-Bibliotheken, gewonnen aus vakuolärer RNA. Diese Technik wurde unter anderem angewandt, um die Reliabilität des Experimentes zu untersuchen. Es zeigte sich eine große Varianz in der Verteilung der *Counts* auf die verschiedenen RNA-Loci innerhalb biologischer Replikate und unterschiedlicher Vakuolenisolationen. Erstmals konnte jedoch gezeigt werden, dass circa 70 Prozent der RNA-Fragmente in der

Vakuole von mRNA stammen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass der Abbau der wenigen rRNA-Transkripte in diesem Organell verstärkt abläuft.

In *A. thaliana* existiert mit ENT7 lediglich ein Vertreter, der einen Export von RNA-Abbauprodukten aus der Zelle ermöglicht. Da er den namensgebenden Vertretern aus dem Reich der Säugetiere strukturell und funktionell ähnelt, ist ENT7 ein geeignetes ENT-Protein für zukünftige Kristallisations- und Strukturanalysen. In dieser Arbeit konnte ENT7-eGFP in *Pichia pastoris* mit großer Ausbeute (2 mg Protein pro Liter Hefekultur) synthetisiert und in stabiler Form gereinigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass ENT7 ohne eGFP ebenfalls stabil und als Dimer vorliegt. Durch Bindungsstudien erfolgte der Nachweis der erfolgreichen Bindung an bekannte Substrate. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass neben Nukleosiden auch Nukleobasen, aber nicht ATP gebunden werden.

6 Literatur

Abbasi, N., Park, Y.-I. & Choi, S.-B. (2013) RNA deadenylation and decay in plants. *Journal of Plant Biology* 56(4): 198-207.

Abel, S., Blume, B. & Glund, K. (1990) Evidence for RNA-Oligonucleotides in Plant Vacuoles Isolated from Cultured Tomato Cells. *Plant Physiol* 94(3): 1163-1171.

Abel, S. & Glund, K. (1986) Localization of RNA-degrading enzyme activity within vacuoles of cultured tomato cells. *Physiologia Plantarum* 66(1): 79-86.

Abel, S. & Glund, K. (1987) Ribonuclease in plant vacuoles: purification and molecular properties of the enzyme from cultured tomato cells. *Planta* 172(1): 71-78.

Abel, S., Krauss, G.-J. & Glund, K. (1989) Ribonuclease in tomato vacuoles: high-performance liquid chromatographic analysis of ribonucleolytic activities and base specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 998(2): 145-150.

Abel, S., Nürnberger, T., Ahnert, V., Krauss, G. J. & Glund, K. (2000) Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. *Plant Physiol* 122(2): 543-552.

Abler, M. L. & Green, P. J. (1996) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol Biol* 32(1-2): 63-78.

Anderson, M., Cornish, E., Mau, S., Williams, E., Hoggart, R., Atkinson, A. & Niall, H. (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein. *Nature* 321: 1.

Ansorge, W. J. (2009) Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 25(4): 195-203.

Baldwin, S. A., Yao, S. Y., Hyde, R. J., Ng, A. M., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M. W., Cass, C. E. & Young, J. D. (2005) Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem* 280(16): 15880-15887.

Bariola, P. A., Howard, C. J., Taylor, C. B., Verburg, M. T., Jaglan, V. D. & Green, P. J. (1994) The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *The Plant Journal* 6(5): 673-685.

Bariola, P. A., MacIntosh, G. C. & Green, P. J. (1999) Regulation of S-like ribonuclease levels in Arabidopsis. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* 119(1): 331-342.

Bernard, C. (2010) Untersuchungen zur physiologischen Funktion des ENT1 (Equilibrativer Nukleosid Transporter 1) im pflanzlichen Adenylathaushalt. Dissertation. Kaiserslautern, Deutschland.

Bernard, C., Traub, M., Kunz, H. H., Hach, S., Trentmann, O. & Möhlmann, T. (2011) Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in Arabidopsis. *J Exp Bot* 62(13): 4627-4637.

Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4(6): 1633-1649.

Boller, T. & Kende, H. (1979) Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol* 63(6): 1123-1132.

Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N. & Satiat-Jeunemaitre, B. (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc* 214(2): 159-173.

Boswell-Casteel, R. C., Johnson, J. M., Duggan, K. D., Roe-Zurz, Z., Schmitz, H., Burleson, C. & Hays, F. A. (2014) Function Unknown Now 26 (FUN26) Protein from *Saccharomyces cerevisiae* is a Broad Selectivity, High-Affinity, Nucleoside and Nucleobase Transporter. *J Biol Chem*.

Botling, J., Edlund, K., Segersten, U., Tahmasebpoor, S., Engström, M., Sundström, M., Malmström, P.-U. & Micke, P. (2009) Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue. *Diagnostic Molecular Pathology* 18(1): 44-52.

Brooks, C. L., Morrison, M. & Lemieux, M. J. (2013) Rapid expression screening of eukaryotic membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Protein Sci* 22(4): 425-433.

Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R. & Sagi, M. (2008) A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* Arabidopsis mutant. *Plant J* 54(3): 496-509.

Buchan, J. R., Kolaitis, R.-M., Taylor, J. P. & Parker, R. (2013) Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell* 153(7): 1461-1474.

Bullock, W. (1987) XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-379.

Bürkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C. & Frommer, W. B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *Plant J* 34(1): 13-26.

Burla, B., Pfrunder, S., Nagy, R., Francisco, R. M., Lee, Y. & Martinoia, E. (2013) Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in Arabidopsis. *Plant Physiol* 163(3): 1446-1458.

Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T. & Raikhel, N. V. (2004) The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16(12): 3285-3303.

Chen, K. L., Xu, M. X., Li, G. Y., Liang, H., Xia, Z. L., Liu, X., Zhang, J. S., Zhang, A. M. & Wang, D. W. (2006) Identification of AtENT3 as the main transporter for uridine uptake in Arabidopsis roots. *Cell Res* 16(4): 377-388.

Chiba, Y. & Green, P. J. (2009) mRNA degradation machinery in plants. *Journal of Plant Biology* 52(2): 114-124.

Collier, R. & Tegeder, M. (2012) Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *Plant J* 72(3): 355-367.

Cornelius, S., Witz, S., Rolletschek, H. & Möhlmann, T. (2011) Pyrimidine degradation influences germination seedling growth and production of Arabidopsis seeds. *J Exp Bot* 62(15): 5623-5632.

Cuchillo, C. M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F. & Nogués, M. V. (1993) The role of 2', 3'-cyclic phosphodiester in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett* 333(3): 207-210.

Curie, C., Liboz, T., Bardet, C., Gander, E., Claire, M., Axelos, M. & Lescure, B. (1991) Cis and trans-acting elements involved in the activation of Arabidopsis thaliana Al gene encoding the translation elongation factor EF-1 α . *Nucleic Acids Res* 19(6): 1305-1310.

Diaz, C., Lemaître, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., Morot-Gaudry, J.-F., Le Dily, F. & Masclaux-Daubresse, C. (2008) Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. *Plant Physiol* 147(3): 1437-1449.

Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (2003) Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection

and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(15): 8817-8822.

Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., von Heijne, G. & Iwata, S. (2008) GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc* 3(5): 784-798.

Duhr, S. & Braun, D. (2006) Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(52): 19678-19682.

Ewing, B. & Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* 8(3): 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* 8(3): 175-185.

Farkas, G. (1982) Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. *Nucleic Acids and Proteins in Plants II*, Springer: 224-262.

Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R. E. & Flügge, U.-I. (1997) A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 9(3): 453-462.

Galiana, E., Bonnet, P., Conrod, S., Keller, H., Panabières, F., Ponchet, M., Poupet, A. & Ricci, P. (1997) RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiol* 115(4): 1557-1567.

Genschik, P., Hall, J. & Filipowicz, W. (1997) Cloning and Characterization of the Arabidopsis Cyclic Phosphodiesterase Which Hydrolyzes ADP-ribose 1", 2"-Cyclic Phosphate and Nucleoside 2', 3'-Cyclic Phosphates. *Journal of Biological Chemistry* 272(20): 13211-13219.

Gerhardt, R. & Heldt, H. W. (1984) Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiol* 75(3): 542-547.

Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B. & Frommer, W. B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *Plant Cell* 12(2): 291-300.

Girke, C., Arutyunova, E., Syed, M., Traub, M., Möhlmann, T. & Lemieux, M. J. (2015) High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7

(ENT7) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850(9): 1921-1929.

Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S. & Möhlmann, T. (2014) Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* 5.

Green, P. J. (1994) The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 45(1): 421-445.

Groß, N., Wasternack, C. & Köck, M. (2004) Wound-induced RNaseLE expression is jasmonate and systemin independent and occurs only locally in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Phytochemistry* 65(10): 1343-1350.

Guan, C., Rosen, E. S., Boonsirichai, K., Poff, K. L. & Masson, P. H. (2003) The ARG1-LIKE2 gene of *Arabidopsis* functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the PGM pathway. *Plant Physiol* 133(1): 100-112.

Guo, B., Irigoyen, S., Fowler, T. B. & Versaw, W. K. (2008) Differential expression and phylogenetic analysis suggest specialization of plastid-localized members of the PHT4 phosphate transporter family for photosynthetic and heterotrophic tissues. *Plant Signal Behav* 3(10): 784-790.

Gurney, T. & Eliceiri, G. L. (1980) Intracellular distribution of low molecular weight RNA species in HeLa cells. *J Cell Biol* 87(2): 398-403.

Gutensohn, M., Pahnke, S., Kolukisaoglu, Ü., Schulz, B., Schierhorn, A., Voigt, A., Hust, B., Rollwitz, I., Stöckel, J. & Geimer, S. (2004) Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts. *Molecular Genetics and Genomics* 272(4): 379-396.

Hafner, M., Renwick, N., Brown, M., Mihailović, A., Holoch, D., Lin, C., Pena, J. T., Nusbaum, J. D., Morozov, P. & Ludwig, J. (2011) RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA* 17(9): 1697-1712.

Hammond, J. R. (1997) Enhancement of the functional stability of solubilized nucleoside transporters by substrates and inhibitors. *Biochem Pharmacol* 53(5): 623-629.

Hammond, J. R. & Zarenda, M. (1996) Effect of detergents on ligand binding and translocation activities of solubilized/reconstituted nucleoside transporters. *Arch Biochem Biophys* 332(2): 313-322.

- Hammond, K. R., Steinkampf, M. P., Boots, L. R. & Blackwell, R. E. (1996)** The effect of routine breast examination on serum prolactin levels. *Fertil Steril* 65(4): 869-870.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hassler, S., Lemke, L., Jung, B., Möhlmann, T., Krüger, F., Schumacher, K., Espen, L., Martinoia, E. & Neuhaus, H. E. (2012)** Lack of the Golgi phosphate transporter PHT4; 6 causes strong developmental defects, constitutively activated disease resistance mechanisms and altered intracellular phosphate compartmentation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 72(5): 732-744.
- Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R. & Ordoukhanian, P. (2014)** Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *BioTechniques* 56(2): 61.
- Hesketh, A. R., Chandra, G., Shaw, A. D., Rowland, J. J., Kell, D. B., Bibb, M. J. & Chater, K. F. (2002)** Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 46(4): 917-932.
- Hillwig, M. S., Contento, A. L., Meyer, A., Ebany, D., Bassham, D. C. & Macintosh, G. C. (2011)** RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(3): 1093-1098.
- Holletz, T., Güler, S., Linnemann, M. & Köhl, M. (2013)** *Biochemie für Mediziner: Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug*, Springer Berlin Heidelberg.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. & Zimmermann, P. (2008)** Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* 2008.
- Huang, H., Kawamata, T., Horie, T., Tsugawa, H., Nakayama, Y., Ohsumi, Y. & Fukusaki, E. (2014)** Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *EMBO J*: e201489083.
- Hyde, R. J., Cass, C. E., Young, J. D. & Baldwin, S. A. (2001)** The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* 18(1): 53-63.
- Igic, B. & Kohn, J. R. (2001)** Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13167-13171.

Initiative, A. G. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796.

Ishida, H., Izumi, M., Wada, S. & Makino, A. (2014) Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837(4): 512-521.

Jackson, E. K. (2011) The 2', 3'-cAMP-adenosine pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 301(6): F1160-F1167.

Janning, W. & Knust, E. (2008) *Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*, Thieme.

Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. & Duhr, S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* 9(4): 342-353.

Johnson, Z. L., Cheong, C.-G. & Lee, S.-Y. (2012) Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature* 483(7390): 489-493.

Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. & Flügge, U.-I. (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10(1): 105-117.

Köck, M., Löffler, A., Abel, S. & Glund, K. (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol Biol* 27(3): 477-485.

Köck, M., Stenzel, I. & Zimmer, A. (2006) Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. *J Exp Bot* 57(14): 3717-3726.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M. & Peter, M. (2008) Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature cell biology* 10(5): 602-610.

Krüger, S., Giavalisco, P., Krall, L., Steinhauser, M. C., Bussis, D., Usadel, B., Flugge, U. I., Fernie, A. R., Willmitzer, L. & Steinhauser, D. (2011) A topological map of the compartmentalized *Arabidopsis thaliana* leaf metabolome. *PLoS One* 6(3): e17806.

Krüger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M. C., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., Romero, L. C., Hoefgen, R., Gotor, C. & Hesse, H. (2009) Analysis

of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in Arabidopsis. *Plant, cell & environment* 32(4): 349-367.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L. & Garcia-Hernandez, M. (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res* 40(D1): D1202-D1210.

Layat, E., Sáez-Vásquez, J. & Tourmente, S. (2012) Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in Arabidopsis. *Plant and cell physiology* 53(2): 267-276.

Lehmann, K., Hause, B., Altmann, D. & Köck, M. (2001) Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiol* 127(2): 436-449.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16(21): 4743-4751.

Lehti-Shiu, M. D., Adamczyk, B. J. & Fernandez, D. E. (2005) Expression of MADS-box genes during the embryonic phase in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 58(1): 89-107.

Leroch, M., Neuhaus, H. E., Kirchberger, S., Zimmermann, S., Melzer, M., Gerhold, J. & Tjaden, J. (2008) Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Plant Cell* 20(2): 438-451.

Li, G., Liu, K., Baldwin, S. A. & Wang, D. (2003) Equilibrative nucleoside transporters of Arabidopsis thaliana. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *J Biol Chem* 278(37): 35732-35742.

Li, P., Ponnala, L., Gandotra, N., Wang, L., Si, Y., Tausta, S. L., Kebrom, T. H., Provart, N., Patel, R. & Myers, C. R. (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature genetics* 42(12): 1060-1067.

Lin, W. & Wittenbach, V. A. (1981) Subcellular localization of proteases in wheat and corn mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 67(5): 969-972.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. & Law, M. (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International* 2012.

Löffler, A., Abel, S., Jost, W., Beintema, J. J. & Glund, K. (1992) Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol* 98(4): 1472-1478.

Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.

MacIntosh, G. C. (2011) RNase T2 family: enzymatic properties, functional diversity, and evolution of ancient ribonucleases. *Ribonucleases*, Springer: 89-114.

MacIntosh, G. C., Bariola, P. A., Newbigin, E. & Green, P. J. (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1018-1023.

MacIntosh, G. C. & Bassham, D. C. (2011) The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal RNA decay. *Autophagy* 7(6): 662-663.

MacIntosh, G. C., Hillwig, M. S., Meyer, A. & Flagel, L. (2010) RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. *Molecular Genetics and Genomics* 283(4): 381-396.

Mansfield, T. A., Schultes, N. P. & Mourad, G. S. (2009) AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 583(2): 481-486.

Maurino, V. G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K. & Flügge, U.-I. (2006) Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology* 47(10): 1381-1393.

McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F. & Clarke, A. E. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342(6252): 955-957.

McIntosh, L. & Cattolico, R. A. (1978) Preservation of algal and higher plant ribosomal RNA integrity during extraction and electrophoretic quantitation. *Analytical Biochemistry* 91(2): 600-612.

Moffatt, B. A. & Ashihara, H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* 1: e0018.

Mohelnikova-Duchonova, B. & Melichar, B. (2013) Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): do we really have a new predictive biomarker of chemotherapy outcome in pancreatic cancer patients? *Pancreatology* 13(6): 558-563.

Möhlmann, T., Mezher, Z., Schwerdtfeger, G. & Neuhaus, H. E. (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). *FEBS Lett* 509(3): 370-374.

Monte, E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Phillips, S. & Quail, P. H. (2003) Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* 15(9): 1962-1980.

Mossakowska, D. E., Nyberg, K. & Fersht, A. R. (1989) Kinetic characterization of the recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and investigation of key residues in catalysis by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 28(9): 3843-3850.

Müller-Lucks, A., Bock, S., Wu, B. & Beitz, E. (2012) Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS One* 7(7): e42186.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.

Nicholson, A. W. (2001) Ribonucleases, Part A: Functional Roles and Mechanisms of Action: Functional Roles and Mechanisms of Action, Elsevier Science.

Niemann, A., Takatsuki, A. & Elsässer, H.-P. (2000) The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48(2): 251-258.

Niopek-Witz, S., Deppe, J., Lemieux, M. J. & Möhlmann, T. (2014) Biochemical characterization and structure–function relationship of two plant NCS2 proteins, the nucleobase transporters NAT3 and NAT12 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1838(12): 3025-3035.

Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461(7264): 654-658.

Nishimura, M. & Beevers, H. (1979) Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissue.

Noh, Y.-S. & Amasino, R. M. (2003) PIE1, an ISWI family gene, is required for FLC activation and floral repression in Arabidopsis. *Plant Cell* 15(7): 1671-1682.

Nolte-'t Hoen, E. N., Buermans, H. P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. & t Hoen, P. A. (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 40(18): 9272-9285.

Nürnberg, T., Abel, S., Jost, W. & Glund, K. (1990) Induction of an Extracellular Ribonuclease in Cultured Tomato Cells upon Phosphate Starvation. *Plant Physiol* 92(4): 970-976.

Parker, J. L. & Newstead, S. (2014a) Method to increase the yield of eukaryotic membrane protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* for structural and functional studies. *Protein Sci* 23(9): 1309-1314.

Parker, J. L. & Newstead, S. (2014b) Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507(7490): 68-72.

Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P. & Gu, Y. (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13(1): 341.

Rausch, C. & Bucher, M. (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216(1): 23-37.

Rehan, S. & Jaakola, V.-P. (2015) Expression, purification and functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter subtype-1 (hENT1) protein from Sf9 insect cells. *Protein Expr Purif* 114(0): 99-107.

Ricker, R. D. & Sandoval, L. A. (1996) Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. *J Chromatogr A* 743(1): 43-50.

Rieder, B. & Neuhaus, H. E. (2011) Identification of an Arabidopsis Plasma Membrane–Located ATP Transporter Important for Anther Development. *The Plant Cell Online* 23(5): 1932-1944.

Riens, B., Lohaus, G., Heineke, D. & Heldt, H. W. (1991) Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* 97(1): 227-233.

Robert, S., Zouhar, J., Carter, C. & Raikhel, N. (2007) Isolation of intact vacuoles from Arabidopsis rosette leaf-derived protoplasts. *Nat Protoc* 2(2): 259-262.

Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29(1): 24-26.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5467.

Sanmiguel, P. & Bennetzen, J. L. (1998) Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany* 82(suppl 1): 37-44.

Sato, K. & Egami, F. (1957) Studies on ribonucleases in takadiastase. I. *The Journal of Biochemistry* 44(11): 753-767.

Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K. & Hörtensteiner, S. (2009) Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* 21(3): 767-785.

Schmidt, A., Su, Y.-H., Kunze, R., Warner, S., Hewitt, M., Slocum, R. D., Ludewig, U., Frommer, W. B. & Desimone, M. (2004) UPS1 and UPS2 from Arabidopsis mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *Journal of Biological Chemistry* 279(43): 44817-44824.

Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7): 671-675.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. & Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7(1): 3.

Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I. & Kunze, R. (2003) ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol* 131(1): 16-26.

Seidel, S. A., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J. S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F. A., Ladbury, J. E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D. & Duhr, S. (2013) Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* 59(3): 301-315.

Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P. & Jiang, L. (2013) Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol Plant* 6(5): 1419-1437.

Shi, C.-Y., Yang, H., Wei, C.-L., Yu, O., Zhang, Z.-Z., Jiang, C.-J., Sun, J., Li, Y.-Y., Chen, Q. & Xia, T. (2011) Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. *BMC Genomics* 12(1): 131.

Shin, H., Shin, H. S., Dewbre, G. R. & Harrison, M. J. (2004) Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1; 1 and Pht1; 4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *The Plant Journal* 39(4): 629-642.

Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A. & Ashihara, H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 160(11): 1271-1295.

Stitt, M., Wirtz, W. & Heldt, H. W. (1983) Regulation of sucrose synthesis by cytoplasmic fructosebisphosphatase and sucrose phosphate synthase during photosynthesis in varying light and carbon dioxide. *Plant Physiol* 72(3): 767-774.

Taylor, C. B., Bariola, P. A., Raines, R. & Green, P. (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(11): 5118-5122.

Thomas, H., Ougham, H. J., Wagstaff, C. & Stead, A. D. (2003) Defining senescence and death. *J Exp Bot* 54(385): 1127-1132.

Thompson, A. R. & Vierstra, R. D. (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current opinion in plant biology* 8(2): 165-173.

Thompson, J. E., Venegas, F. D. & Raines, R. T. (1994) Energetics of catalysis by ribonucleases: fate of the 2', 3'-cyclic phosphodiester intermediate. *Biochemistry* 33(23): 7408-7414.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L. & Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7(3): 562-578.

Traub, M., Flörchinger, M., Piecuch, J., Kunz, H. H., Weise-Steinmetz, A., Deitmer, J. W., Ekkehard Neuhaus, H. & Möhlmann, T. (2007) The fluorouridine insensitive 1 (*fur1*) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 49(5): 855-864.

Tripathy, D. R., Dinda, A. K. & Dasgupta, S. (2013) A simple assay for the ribonuclease activity of ribonucleases in the presence of ethidium bromide. *Anal Biochem* 437(2): 126-129.

Valdes, R., Elferich, J., Shinde, U. & Landfear, S. M. (2014) Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *J Biol Chem* 289(13): 8799-8809.

van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flügge, U.-I. & Kunze, R. (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* 141(2): 776-792.

Vickers, M. F., Yao, S. Y., Baldwin, S. A., Young, J. D. & Cass, C. E. (2000) Nucleoside transporter proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Demonstration of a transporter (FUI1) with high uridine selectivity in plasma membranes and a transporter (FUN26) with broad nucleoside selectivity in intracellular membranes. *J Biol Chem* 275(34): 25931-25938.

Visser, F., Sun, L., Damaraju, V., Tackaberry, T., Peng, Y., Robins, M. J., Baldwin, S. A., Young, J. D. & Cass, C. E. (2007) Residues 334 and 338 in transmembrane segment 8 of human equilibrative nucleoside transporter 1 are important determinants of inhibitor sensitivity, protein folding, and catalytic turnover. *J Biol Chem* 282(19): 14148-14157.

Visser, F., Vickers, M. F., Ng, A. M., Baldwin, S. A., Young, J. D. & Cass, C. E. (2002) Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *J Biol Chem* 277(1): 395-401.

Wang, Y. H. (2008) How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *Journal of Biochemical Technology* 1(1): 11-20.

Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10(1): 57-63.

Weber, A. P., Schwacke, R. & Flügge, U.-I. (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu. Rev. Plant Bio.* 56: 133-164.

Welter, E. & Elazar, Z. (2014) Autophagy mediates nonselective RNA degradation in starving yeast. *EMBO J*: e201490621.

Wenzel, W. & Amann, M. J. (2013) *Lexikon der Gentechnologie*, Springer Berlin Heidelberg.

Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. (2010) Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature communications* 1: 100.

Wilson, C. M. (1982) Plant nucleases: biochemistry and development of multiple molecular forms. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 6: 33-54.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. & Provart, N. J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2(8): e718-e718.

Wittenbach, V. A., Lin, W. & Hebert, R. R. (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol* 69(1): 98-102.

Witz, S., Jung, B., Fürst, S. & Möhlmann, T. (2012) De novo pyrimidine nucleotide synthesis mainly occurs outside of plastids, but a previously undiscovered nucleobase importer provides substrates for the essential salvage pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 24(4): 1549-1559.

Wormit, A., Traub, M., Flörchinger, M., Neuhaus, H. E. & Möhlmann, T. (2004) Characterization of three novel members of the Arabidopsis thaliana equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochem J* 383(Pt 1): 19-26.

Xu, J. & Chua, N.-H. (2009) Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell* 21(10): 3270-3279.

Yao, S. Y., Ng, A. M., Cass, C. E., Baldwin, S. A. & Young, J. D. (2011) Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem* 286(37): 32552-32562.

Yao, S. Y., Ng, A. M., Vickers, M. F., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A. & Young, J. D. (2002) Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J Biol Chem* 277(28): 24938-24948.

Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y. & Shirasu, K. (2009) Autophagy Negatively Regulates Cell Death by Controlling NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling during Senescence and the Innate Immune Response in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 21(9): 2914-2927.

Young, J. D., Yao, S. Y., Baldwin, J. M., Cass, C. E. & Baldwin, S. A. (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* 34(2-3): 529-547.

Young, J. D., Yao, S. Y., Sun, L., Cass, C. E. & Baldwin, S. A. (2008) Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 38(7-8): 995-1021.

Yuen, C. Y., Sedbrook, J. C., Perrin, R. M., Carroll, K. L. & Masson, P. H. (2005) Loss-of-function mutations of ROOT HAIR DEFECTIVE3 suppress root waving, skewing, and epidermal cell file rotation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 138(2): 701-714.

Zheng, Z., Qamar, S. A., Chen, Z. & Mengiste, T. (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* 48(4): 592-605.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. & Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 805-836.

Zrenner, R., Willmitzer, L. & Sonnewald, U. (1993) Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* 190(2): 247-252.

7 Anhang

Tabellen

Tabelle S1: Repräsentative Messungen der Menge, Reinheit und Qualität verschiedener RNA-Isolationen vor der Erstellung der cDNA Bibliotheken. Die Vakuolen aus 4-6 Wochen alten Pflanzen wurden über die F-Typ, P-Typ oder N-Typ Methode isoliert (Kap. 2.4.6). Die Konzentrations- und RIN-Bestimmung erfolgte über Agilent 2100 Bioanalyzer Analysen (Kap. 2.3.17), die Bestimmung der A260/280 und A280/230 Werte über NanoDrop™ Analysen (Kap. 2.3.16). +/+ : Inkubation der Vakuolen für 1 h mit 10 µg/ml RNase A und im Anschluss für 1h 400 µg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur. +: Inkubation der Vakuolen für 5 min mit 10 µg/ml RNase.

| Name | RNA-Gehalt [pg µl ⁻¹] | A _{260/280} | A _{260/230} | RIN | α-Mannosidase Aktivität [U] | RNA-Gehalt- [ng U ⁻¹ α-Mannosidase) | RNA-Gehalt [%] |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|-----|-----------------------------|--|----------------|
| Protoplasten | 379.994 | 2,02 | 2,19 | 2,8 | 0,0184 | 1.184.520 | 100 |
| WT (N-Typ) | 287.570 | 2,11 | 2,02 | 2,0 | 0,006425 | 894.533 | 75,52 |
| WT (F-Typ) | - | - | - | - | 0,027 | - | - |
| ent1-1 (F-Typ) | - | - | - | - | 0,030 | - | - |
| ent1-2 (F-Typ) | - | - | - | - | 0,030 | - | - |
| WT (P-Typ) | 6.000 | 1,67 | 0,57 | 2,5 | 0,01311 | 9.156 | 0,77 |
| WT (P-Typ) +/+ | 51 | 1,67 | 0,59 | 2,6 | 0,01311 | 778 | 0,01 |
| ent1-2 (P-Typ) | 419 | 1,63 | 0,56 | 2,6 | 0,00867 | 967 | 0,08 |
| ent1-2 (P-Typ)+ | 2.941 | 1,56 | 0,56 | 2,6 | 0,00867 | 6784 | 0,57 |
| ent1-2 (P-Typ) +/+ | 77 | 1,57 | 0,56 | 2,3 | 0,00867 | 178 | 0,01 |

Tabelle S2: Indices und Konzentration der cDNA Bibliotheken. Vakuolen wurden mit unterschiedlichen Methoden (NAF: nicht-wässrige Fraktionierung, DGZ: wässrige Dichtegradientenzentrifugation) isoliert. RNA aus Vakuolen und Protoplasten wurde isoliert und nach Herstellerangaben eine cDNA Bibliothek angelegt. Die Konzentration der cDNA Bibliotheken wurde mittels Qubit®-Messung bestimmt (Kap. 2.3.16). +/-: Inkubation intakter Vakuolen für 1h mit 10 µg ml⁻¹ RNase A, gefolgt von Inkubation für 1 h mit 400 µg ml⁻¹ Proteinase K. +: Inkubation intakter Vakuolen für 1 h mit 10 µg ml⁻¹ RNase A. grün: Fluoreszenzfarbe der Basen G/T. rot: Fluoreszenzfarbe der Basen A/C. °: Sequenzierung mit HiSeq. *: Sequenzierung mit MiSeq.

| Dateiname | Probenname | Konzentration [ng µl ⁻¹] | Index | Pos. 1 | Pos. 2 | Pos. 3 | Pos. 4 | Pos. 5 | Pos. 6 |
|-----------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| C1° | WT (DGZ, Jungpflanzen) | 6,2 | 5 | A | C | A | G | T | G |
| C2° | ent1-1 (DGZ, Jungpflanzen) | 3,8 | 6 | G | C | C | A | A | T |
| C3° | ent1-2 (DGZ, Jungpflanzen) | 5,5 | 7 | C | A | G | A | T | C |
| C4° | WT (DGZ, adulte Pflanzen) | 3,14 | 14 | A | G | T | T | C | C |
| C5° | ent1-2 (DGZ, adulte Pflanzen) | 3,11 | 15 | A | T | G | T | C | A |
| C6° | ENT1OE5 (DGZ, adulte Pflanzen) | 2,61 | 16 | C | C | G | T | C | C |
| C7° | atg5 (DGZ, adulte Pflanzen) | 17,1 | 17 | G | T | A | G | A | G |
| C8° | rns2-1 (DGZ, adulte Pflanzen) | 4,46 | 18 | G | T | C | C | G | C |
| C9° | WT (DGZ, adulte Pflanzen) | 18,0 | 13 | A | G | T | C | A | A |
| C10° | WT (DGZ, adulte Pflanzen) +/- | 23,9 | 24 | G | G | T | A | G | C |
| C11° | ent1-2 (DGZ, adulte Pflanzen) | 9,7 | 21 | G | T | T | T | C | G |
| C12° | ent1-2 (DGZ, adulte Pflanzen) + | 18,8 | 22 | C | G | T | A | C | G |
| C13° | ent1-2 (DGZ, adulte Pflanzen) +/- | 17,6 | 23 | G | A | G | T | G | G |
| C14° | WT (NAF, adulte Pflanzen) | 17,0 | 20 | G | T | G | G | C | C |
| C15° | Protoplasten | 17,3 | 19 | G | T | G | A | A | A |
| C1* | WT (DGZ, Jungpflanzen) | 6,2 | 5 | A | C | A | G | T | G |
| C2* | ent1-1 (DGZ, Jungpflanzen) | 3,8 | 6 | G | C | C | A | A | T |
| C3* | ent1-2 (DGZ, Jungpflanzen) | 5,5 | 7 | C | A | G | A | T | C |

Tabelle S3: Die Berechnung des Elutionsvolumens V_E für die Gel-Permeations-Chromatographie. Unterschiedliche oligomere Zustände des ENT7-eGFP, „freien“ eGFP, sowie ENT7 für die Gel-Permeations-Chromatographie mit Superdex 200 10/30 Säule wurden auf Basis der Molekulargewichte $M_{ENT7} = 46$ kDa; $M_{eGFP} = 25$ kDa; $M_{DDM} = 40$ kDa und Standards (Kap. 2.4.4) berechnet.

| Name | Oligomerer Zustand | Detergenz | Molekulargewicht M [kDa] | Partitionskoeffizient K_{av} | Elutionsvolumen V_E [ml] |
|---------------|--------------------|-----------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| ENT7-eGFP | Monomer | DDM | 121 | 0,316 | 13,4 |
| | Dimer | DDM | 192 | 0,263 | 12,6 |
| | Trimer | DDM | 263 | 0,227 | 11,9 |
| | Tetramer | DDM | 334 | 0,199 | 11,5 |
| ENT7 | Monomer | DDM | 96 | 0,343 | 13,8 |
| | Dimer | DDM | 142 | 0,298 | 13,1 |
| | Trimer | DDM | 188 | 0,265 | 12,6 |
| | Tetramer | DDM | 234 | 0,240 | 12,2 |
| „freies“ eGFP | Monomer | - | 25 | 0,498 | 16,2 |
| | Dimer | - | 50 | 0,418 | 15,0 |

Tabelle S4: Vergleich von Transport- und Bindungsstudien. Dissoziationskonstanten (K_d) des ENT7-eGFP, gereinigt aus *P. pastoris* und Michaeliskonstanten (K_M) für ENT7 exprimiert in *S. cerevisiae* (Wormit *et al.*, 2004) für Nukleoside.

| | K_d [μ M] | K_M [μ M] |
|----------|-------------------|------------------|
| Adenosin | 1,12 \pm 0,19 | 9,8 |
| Guanosin | 8,11 \pm 1,74 | 9,4 |
| Cytidin | 87,60 \pm 15,50 | 40 |
| Uridin | 16,60 \pm 2,20 | 13,4 |

Tabelle S5: Die Top 10 Loci. Die *Counts* wurden gegen das *A. thaliana*-Genom assembliert und die Loci mit den zehn häufigsten *Counts* aufgelistet.

| Accession Nummer | Beschreibung | Counts [%] |
|-------------------------|---------------------|-------------------|
| C1 | | |
| AT2X25S00 | 25S rRNA | 7,29 |
| AT3X25S00 | 25S rRNA | 7,18 |
| AT3G41768.1 | 18S rRNA | 2,16 |
| AT2G01010.1 | 18S rRNA | 2,14 |
| AT3G41979.1 | 5.8S rRNA | 1,25 |
| AT2G01020.1 | 5.8S rRNA | 1,24 |
| ATCG00950.1 | 23S rRNA | 0,65 |
| ATCG01180.1 | 23S rRNA | 0,65 |
| AT2G01021.1 | Teil der 25S rRNA | 0,54 |
| AT4G06477.1 | Retrotransposon | 0,4 |
| C9 | | |
| AT2X25S00 | 25S rRNA | 3,61 |
| AT3X25S00 | 25S rRNA | 3,56 |
| AT3G41768.1 | 18S rRNA | 2,07 |
| AT2G01010.1 | 18S rRNA | 2,06 |
| ATCG00960.1 | 4.5S rRNA | 1,24 |
| ATCG01170.1 | 4.5S rRNA | 1,22 |
| ATCG01180.1 | 23S rRNA | 1,1 |
| ATCG00950.1 | 23S rRNA | 1,1 |
| AT2G01020.1 | 5.8S rRNA | 0,98 |
| AT3G41979.1 | 5.8S rRNA | 0,98 |
| C14 | | |
| AT2X25S00 | 25S rRNA | 4,79 |
| AT3X25S00 | 25S rRNA | 4,78 |
| AT3G41768.1 | 18S rRNA | 3,85 |
| AT2G01010.1 | 18S rRNA | 3,82 |
| AT3G41979.1 | 5.8S rRNA | 0,78 |
| AT2G01020.1 | 5.8S rRNA | 0,77 |
| ATCG00950.1 | 23S rRNA | 0,6 |
| ATCG01180.1 | 23S rRNA | 0,6 |
| ATCG00920.1 | 16S rRNA | 0,36 |

| | | |
|-------------|-----------|------|
| ATCG01210.1 | 16S rRNA | 0,35 |
| C15 | | |
| ATCG00950.1 | 23S rRNA | 4,27 |
| ATCG01180.1 | 23S rRNA | 4,23 |
| AT3X25S00 | 25S rRNA | 4,14 |
| AT2X25S00 | 25S rRNA | 4,14 |
| AT3G41768.1 | 18S rRNA | 3,18 |
| AT2G01010.1 | 18S rRNA | 3,17 |
| ATCG00920.1 | 16S rRNA | 2,45 |
| ATCG01210.1 | 16S rRNA | 2,41 |
| ATCG00960.1 | 4.5S rRNA | 1,34 |
| ATCG01170.1 | 4.5S rRNA | 1,34 |

Tabelle S6: Die Top 10 rRNA-Loci. Die *Reads* wurden gegen das *A. thaliana*-Genom assembliert und die Loci mit den zehn häufigsten *Counts* innerhalb der RNA-Population aufgelistet.

| Accession Nummer | Reads [%] |
|-------------------------|------------------|
| C1 | |
| AT2X25S00 | 30,5 |
| AT3X25S00 | 30,01 |
| AT3G41768.1 | 9,01 |
| AT2G01010.1 | 8,97 |
| AT3G41979.1 | 5,22 |
| AT2G01020.1 | 5,19 |
| ATCG00950.1 | 2,72 |
| ATCG01180.1 | 2,72 |
| AT4X05S12 | 1,66 |
| ATCG00920.1 | 1,29 |
| C9 | |
| AT2X25S00 | 17,83 |
| AT3X25S00 | 17,58 |
| AT3G41768.1 | 10,22 |
| AT2G01010.1 | 10,2 |
| ATCG00960.1 | 6,13 |
| ATCG01170.1 | 6,02 |
| ATCG01180.1 | 5,44 |

| | |
|-------------|-------|
| ATCG00950.1 | 5,43 |
| AT2G01020.1 | 4,87 |
| AT3G41979.1 | 4,86 |
| C14 | |
| AT2X25S00 | 22,26 |
| AT3X25S00 | 22,26 |
| AT3G41768.1 | 17,92 |
| AT2G01010.1 | 17,78 |
| AT3G41979.1 | 3,61 |
| AT2G01020.1 | 3,58 |
| ATCG00950.1 | 2,8 |
| ATCG01180.1 | 2,77 |
| ATCG00920.1 | 1,7 |
| ATCG01210.1 | 1,65 |
| C15 | |
| ATCG00950.1 | 12,49 |
| ATCG01180.1 | 12,39 |
| AT3X25S00 | 12,11 |
| AT2X25S00 | 12,11 |
| AT3G41768.1 | 9,31 |
| AT2G01010.1 | 9,29 |
| ATCG00920.1 | 7,17 |
| ATCG01210.1 | 7,05 |
| ATCG00960.1 | 3,94 |
| ATCG01170.1 | 3,93 |

Tabelle S7: Die Top 10 mRNA-Loci. Die *Reads* wurden gegen das *A. thaliana*-Genom assembliert und die Loci mit den zehn häufigsten *Counts* innerhalb der RNA-Population aufgelistet.

| Accession Nummer | <i>Reads</i> [%] |
|-------------------------|-------------------------|
| C1 | |
| AT2G01021.1 | 0,74 |
| AT4G06477.1 | 0,55 |
| AT2G15100.1 | 0,2 |
| AT1G37180.1 | 0,2 |
| AT5G59010.1 | 0,19 |

| | |
|-------------|------|
| AT5G59010.2 | 0,19 |
| AT4G07915.1 | 0,17 |
| AT3G17205.1 | 0,17 |
| AT3G17205.2 | 0,17 |
| AT3G17205.3 | 0,17 |

C9

| | |
|-------------|------|
| AT2G01021.1 | 0,36 |
| ATCG00020.1 | 0,21 |
| AT5G25370.1 | 0,14 |
| AT4G06477.1 | 0,14 |
| AT3G06440.1 | 0,12 |
| AT3G06440.2 | 0,12 |
| AT2G02370.1 | 0,1 |
| AT2G02370.2 | 0,1 |
| AT1G55560.1 | 0,08 |
| AT4G29270.1 | 0,08 |

C14

| | |
|-------------|------|
| AT1G73650.3 | 0,38 |
| AT2G01021.1 | 0,29 |
| AT5G59340.1 | 0,24 |
| AT5G59120.1 | 0,24 |
| AT5G59260.1 | 0,24 |
| AT5G59090.1 | 0,24 |
| AT5G59090.2 | 0,24 |
| AT5G59090.3 | 0,24 |
| AT5G59220.1 | 0,24 |
| AT5G59200.1 | 0,24 |

C15

| | |
|-------------|------|
| ATCG00020.1 | 1,11 |
| AT4G06477.1 | 0,38 |
| ATCG00490.1 | 0,24 |
| AT2G02370.1 | 0,16 |
| AT2G02370.2 | 0,16 |
| AT2G01021.1 | 0,16 |
| ATCG00280.1 | 0,15 |

| | |
|-------------|------|
| AT5G25370.1 | 0,15 |
| AT4G29270.1 | 0,13 |
| AT2G20050.2 | 0,12 |

Tabelle S8: Die Top 10 tRNA-Loci. Die *Reads* wurden gegen das *A. thaliana*-Genom assembliert und die Loci mit den zehn häufigsten *Counts* innerhalb der RNA-Population aufgelistet.

| Accession Nummer | <i>Reads</i> [%] |
|-------------------------|-------------------------|
| C1 | |
| AT1G08240.1 | 2,27 |
| AT5G59385.1 | 2,27 |
| AT1G12590.1 | 2,27 |
| AT3G46585.1 | 2,27 |
| AT5G11225.1 | 2,27 |
| AT5G59395.1 | 2,27 |
| AT5G45745.1 | 2,27 |
| AT3G44955.1 | 2,27 |
| AT4G18815.1 | 2,27 |
| AT2G27850.1 | 2,27 |
| C9 | |
| AT1G08240.1 | 1,68 |
| AT1G12590.1 | 1,68 |
| AT4G18815.1 | 1,68 |
| AT5G11225.1 | 1,68 |
| AT5G59395.1 | 1,68 |
| AT5G59385.1 | 1,68 |
| AT2G27850.1 | 1,68 |
| AT5G11325.1 | 1,68 |
| AT3G46585.1 | 1,67 |
| AT5G45745.1 | 1,67 |
| C14 | |
| AT5G59385.1 | 3,47 |
| AT5G59055.1 | 1,89 |
| AT5G59395.1 | 1,75 |
| AT5G45715.1 | 1,5 |
| AT5G27715.1 | 1,5 |

| | |
|-------------|------|
| AT5G66755.1 | 1,5 |
| AT4G37175.1 | 1,5 |
| AT1G09110.1 | 1,5 |
| AT1G20170.1 | 1,5 |
| AT3G05525.1 | 1,49 |

C15

| | |
|-------------|------|
| ATCG00310.1 | 1,7 |
| ATCG00230.1 | 1,66 |
| AT3G46585.1 | 1,59 |
| AT4G18815.1 | 1,59 |
| AT1G08240.1 | 1,59 |
| AT2G29030.1 | 1,59 |
| AT5G59395.1 | 1,59 |
| AT5G11325.1 | 1,59 |
| AT3G44955.1 | 1,59 |
| AT5G59385.1 | 1,59 |

Abbildungen

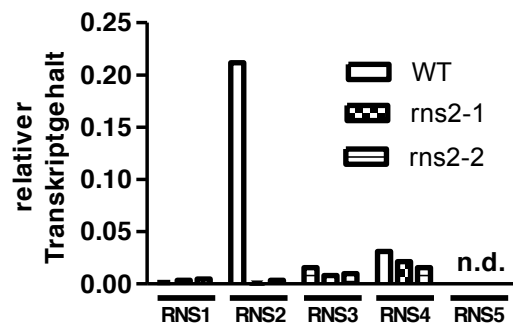


Abbildung S1: Transkript der T2 Ribonukleasen in RNS2-T-DNA-Insertionslinien. 4 Wochen alte Rosettenblätter transgener Pflanzenlinien wurden durch qRT-PCR auf den Transkriptgehalt der RNS1 bis RNS5 untersucht. Als Referenz diente das *Housekeeping*-Gen *EF1 α* (At1g07930). n.d.: nicht detektierbar.

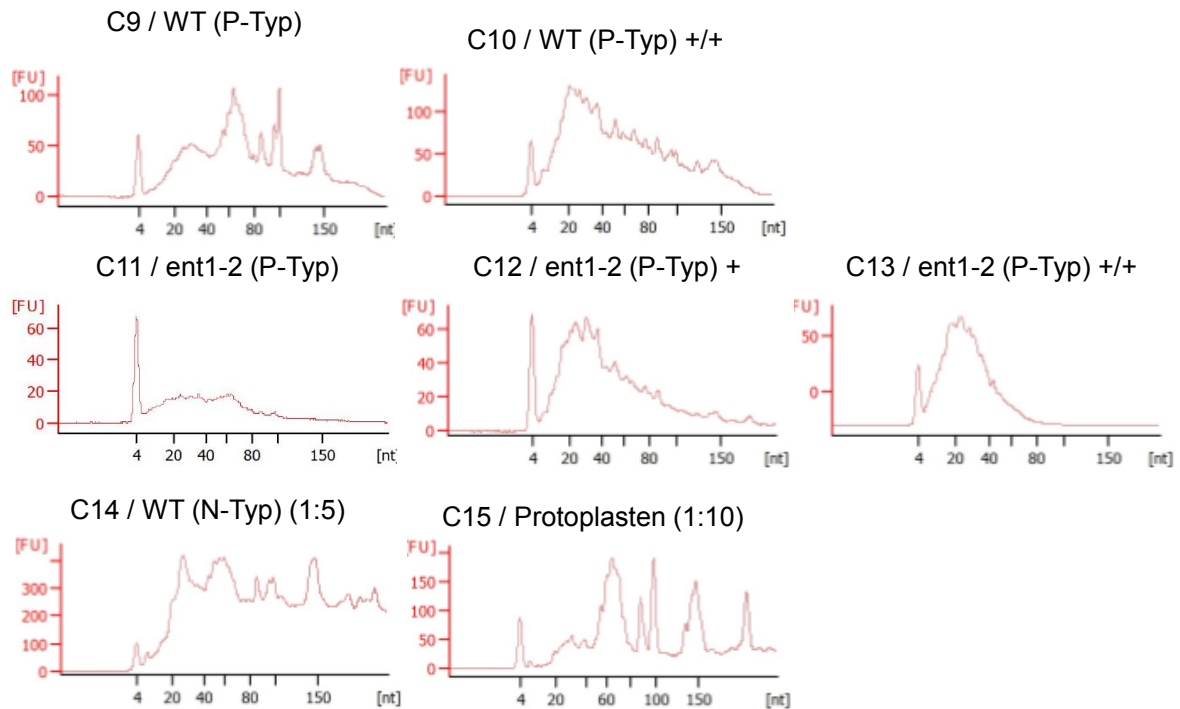


Abbildung S2: Agilent 2100 Bioanalyzer Elektropherogramme der zur cDNA Bibliothek Herstellung eingesetzten RNAs. Die RNAs wurden über das *Small* RNA Kit elektrophoretisch aufgetrennt, über Fluoreszenz detektiert und die Daten mit Agilent 2100 Expert Software ausgewertet. Der erste und der letzte Peak eines jeden Elektropherogramms repräsentieren die Marker Peaks. Nicht abgebildete RNAs, die zur Herstellung von cDNA Bibliotheken verwendet wurden (C1-C8), konnten mit dieser Methode nicht erfolgreich detektiert werden.

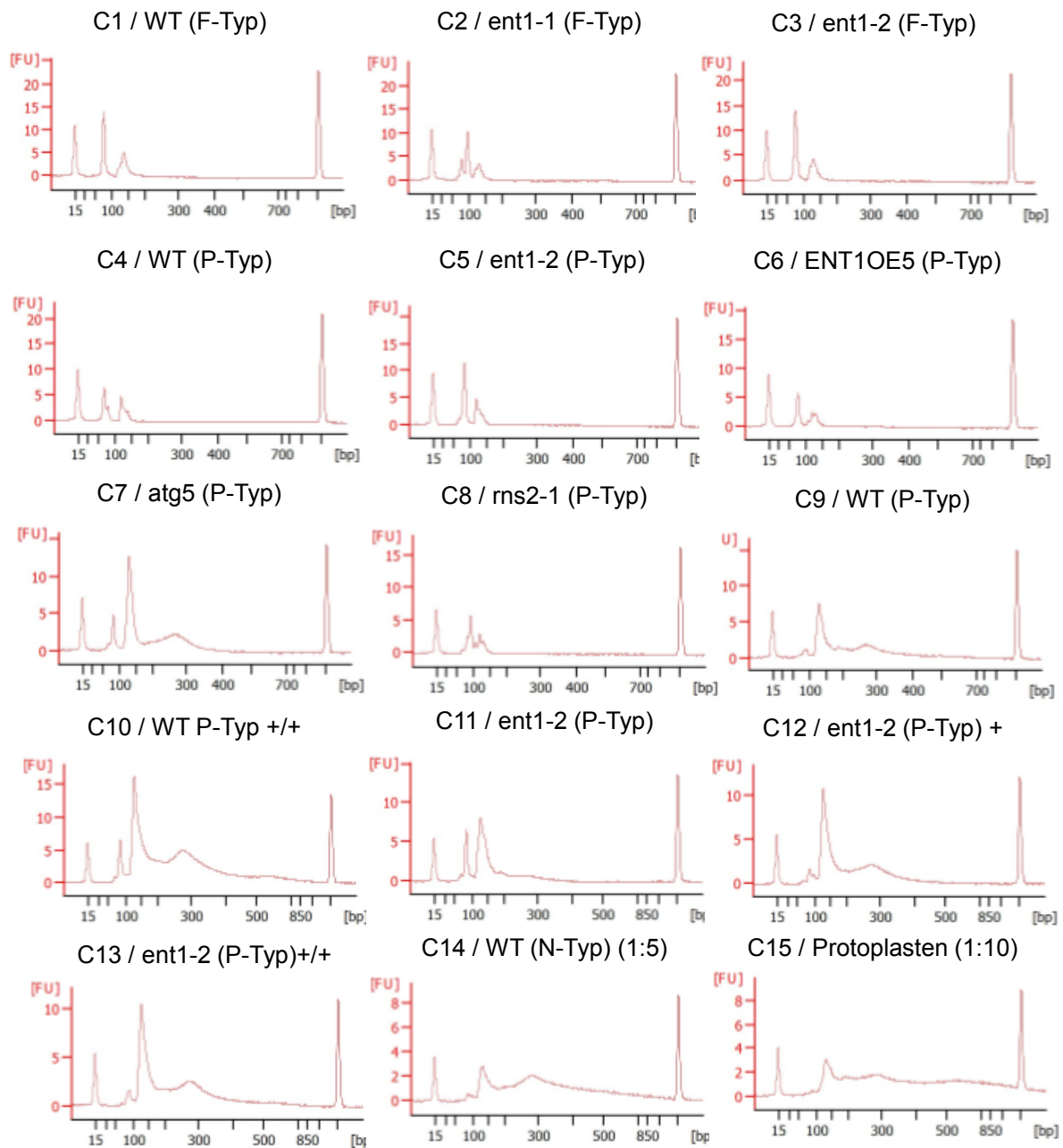


Abbildung S3: Agilent 2100 Bioanalyzer Elektropherogramme der cDNA Bibliothek. Die cDNAs wurden über das „DNA 1000 RNA“-Kit elektrophoretisch aufgetrennt, über Fluoreszenz detektiert und die Daten mit Agilent 2100 Expert Software ausgewertet. Der erste und der letzte Peak eines jeden Elektropherogramms repräsentieren die Marker Peaks.

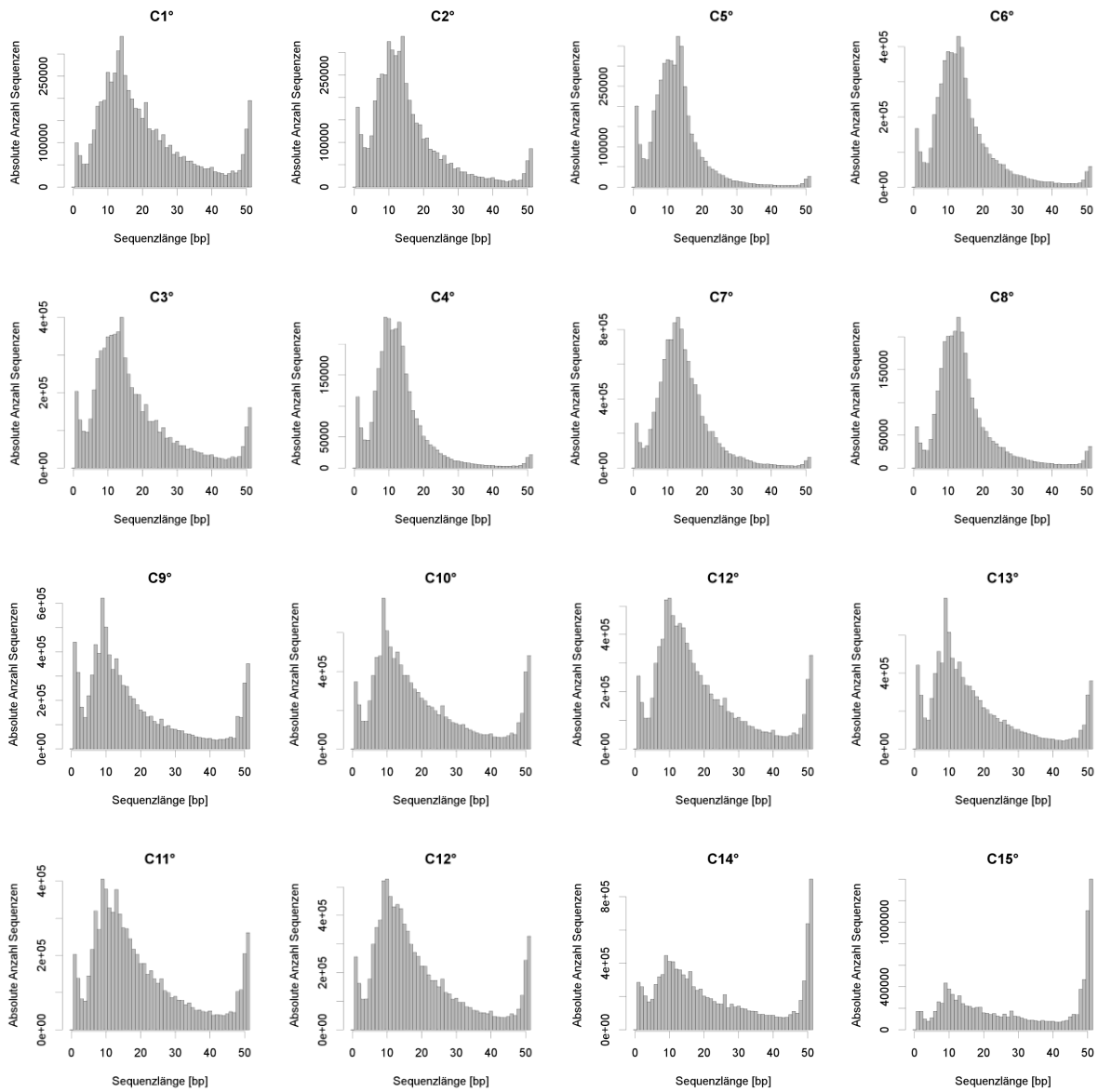
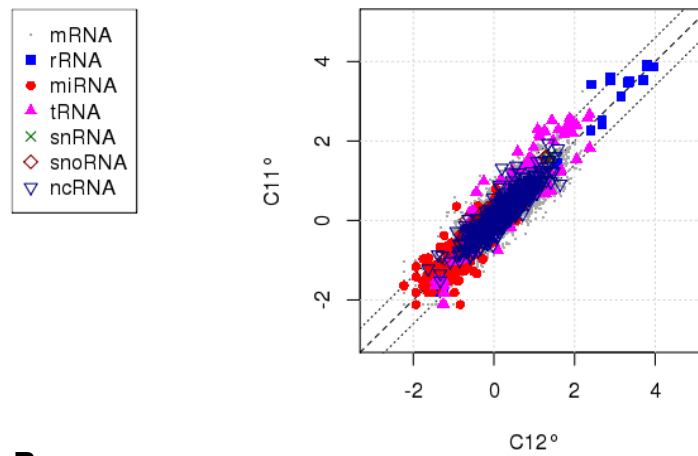


Abbildung S4: Leseweitenverteilung der produzierten Datensätze. Die nach der Adapterentfernung erhaltenen Sequenzen für C1 bis C15 wurden gegen die jeweilige Leselänge aufgetragen. °:HiSeq2500-Sequenzierung

A

**C11° vs. C12°
Log10 Counts (normalisiert)**

B

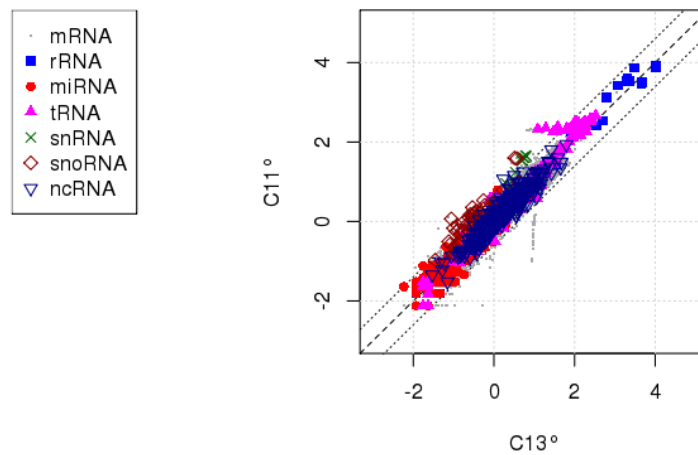
**C11° vs. C13°
Log10 Counts (normalisiert)**

Abbildung S5: Streudiagramme normalisierter Daten von C11, C12 und C13. Verglichen wurden die normalisierten *Counts* von C11 und C12 (A) bzw. C11 und C13 (B). Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Diagonale (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktirt) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

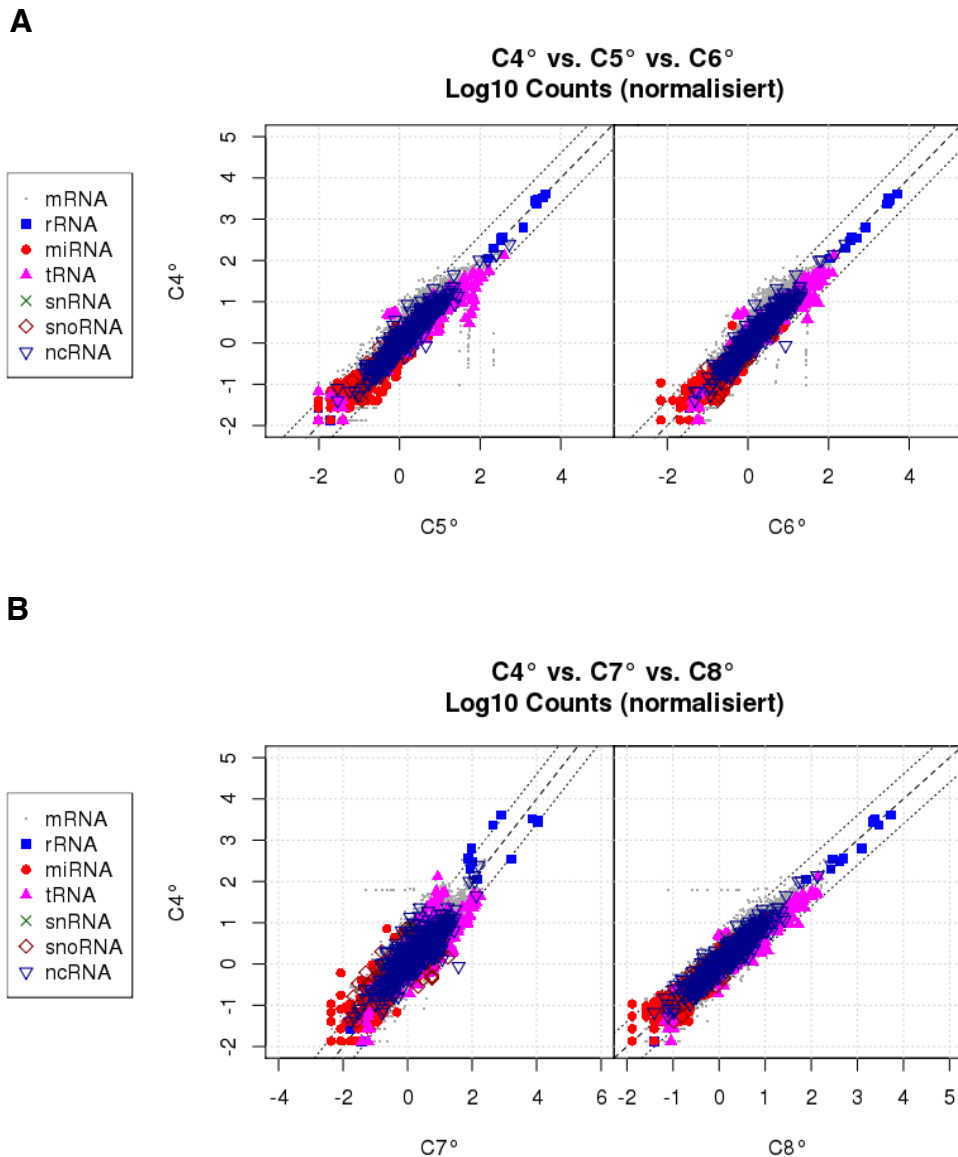


Abbildung S6: Streudiagramme normalisierter Daten von C4 bis C8. Verglichen wurden die normalisierten *Counts* von C4 mit C5 und C6 (A) bzw. mit C7 und C8 (B). Als Referenz diente das *A. thaliana*-Genom (Arapidopsis Genome Initiative, 2000) mit modifizierten TAIR10-Annotierungen (Kap. 2.6.3.3). Zusätzlich zur Nulllinie (gestrichelt) ist die vierfach differentielle Änderung (punktiert) dargestellt. °: HiSeq2500-Sequenzierung. Die Normalisierung erfolgte auf das 75 %-Quantil.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| Δ | Differenz |
| ρ | Roh |
| Ω | Ohm |
| 2',3'-cAMP | 2',3'-Adenosinmonophosphat |
| 2',3'-cNMP | zyklisches Nukleotidmonophosphat |
| 3'-NMP | 3'-Nukleotidmonophosphat |
| a | Aktivität |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| Abb. | Abbildung |
| Adenylat | Synonym für Adenin-Derivat |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AIDS | <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> |
| AK | Adenosinkinase |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| Amp | Ampizillin |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| APRT | Adeninphosphoribosyltransferase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATG | Autophagosom |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| b | Basen |
| BNP | Bis-(<i>p</i> -Nitrophenyl)-Phosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserum-Albumin |
| °C | Grad Celsius |
| c | Konzentration |
| c | Zenti (Präfix) |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CCCP | Carbonylcyanid <i>m</i> -chlorphenyl hydrazon |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CFP | Cyan fluoreszierendes Protein |
| Ci | Curie |
| CNT | konzentrierte Nucleosidtransporter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CYMAL-1 | Cyclohexyl-Methyl-β-D-Maltosid |
| Da | Dalton |
| DDM | N-Dodecyl β-D-maltosid |
| DEPC | Diethyldicarbonat |
| DGZ | Dichtegradientenzentrifugation |
| Dilazep | 3-(4-(3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)carbonyloxy]propyl)-1,4-diazepan-1-yl)propyl-3,4,5-trimethoxybenzoat |
| DIN | Deutsches Institut für Normung |
| DLS | <i>Dynamic Light Scattering</i> |
| DM | N-decyl-β-D-maltopyranosid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxyribonucleosidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Extinktion |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| eATP | extrazelluläres Adenosintriphosphat |

| | |
|---------------------------------|---|
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eGFP | <i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein |
| ENT | equilibrative Nucleosidtransporter |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| EtBr | Ethidiumbromid (nicht Ethylbromid) |
| F | Farad |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FG | Frischgewicht |
| FGPC | Fluoreszenz-Gel-Permeations-Chromatographie |
| FM4-64 | <i>N</i> -(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamin)phenyl)hexatrienyl)pyridiniumdibromid |
| F_{norm} | normalisierte Fluoreszenz |
| FPKM | Fragmente pro Kilobase Locus pro Millionen gemappte <i>Counts</i> |
| FU | relative Fluoreszenz |
| g | Gramm |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| <i>G. max</i> | <i>Glycine max</i> |
| GAP-DH | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| gDNA | genomische DNA |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| h | Stunde(n) |
| H | Wasserstoff |
| H ⁺ | Proton |
| <i>H. sapiens</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| H ₂ O | Wasser |
| HCl | Salzsäure |
| His ₈ | Polyhistidin aus 8 Histidinen |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| Hz | Hertz |
| IMAC | immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie |
| ITWM | Fraunhofer-Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik |
| k | Kilo (Präfix) |
| K | Abbaerate |
| Kan | Kanamycin |
| Kap. | Kapitel |
| K_{av} | Partitionskoeffizient |
| KCl | Kaliumchlorid |
| K_{d} | Dissoziationskonstante |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| K_{M} | Michaeliskonstante |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| λ (Lambda) | Wellenlänge |
| l | Liter |
| <i>L. esculentum</i> | <i>Lycopersicon esculentum</i> |
| LDAO | Lauryldimethylamin-oxid |
| μ | Mikro (Präfix) |
| m | Meter |
| m | Mili (Präfix) |
| M | Molar |
| <i>M. musculus</i> | <i>Mus musculus</i> |
| MDC | Monodansylcadaverin |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |

| | |
|----------------------------------|--|
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min | Minute(n) |
| Mio. | Millionen |
| miRNA | <i>micro</i> RNA |
| MST | Microscale Thermophorese |
| mol | Einheit der Stoffmenge |
| mRNA | <i>messenger</i> RNA |
| MS | Murashige-Skoog |
| MW | Molekulargewicht |
| n | Nano (Präfix) |
| Na ₂ EDTA | Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADP ⁺ | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form) |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form) |
| NAF | <i>non-aqueous fractionation</i> |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCS | Nukleobasen:Kation Sympoter |
| NGS | <i>Next Generation Sequencing</i> |
| NH ₃ | Ammonium |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| NRD | <i>non-functional RNA decay</i> |
| nt | Nukleotide |
| o.g. | oben genannt |
| OD | optische Dichte |
| OG | n-Octyl-β-D-Glucosid |
| P | Phosphor |
| p | Piko (Präfix) |
| P _i | anorganisches Phosphat (PO ₄ ³⁻) |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PEMT | Phosphatidylethanolamin N-methyltransferase |
| PGK | Phosphoglyceratkinase |
| PGM | Phosphoglucomutase |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung |
| PLUTO | <i>plastidic nucleobase transporter</i> |
| PMT | Photomultiplier |
| PNK | Polynukleotidkinase |
| psi | <i>pound-force per square inch</i> |
| PUP | Purin (<i>uptake</i>) Permease |
| rDNA | ribosomale DNA |
| RFU | relative Fluoreszenz |
| RIN | <i>RNA Integrity Number</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | interferenz-RNA |
| RNase | Ribonuklease |
| rRNA | ribosomale RNA |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | (quantitative) <i>Real Time</i> PCR |
| PRPP | Phosphoribosylpyrophosphat |
| s | Sekunde(n) |

| | |
|----------------------|---|
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SAM | S-Adenosylmethionin |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| siRNA | <i>small interfering</i> RNA |
| snRNA | <i>small nuclear</i> RNA |
| snoRNA | <i>small nucleolar</i> RNA |
| SOLiD | <i>Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection</i> |
| Spec | Spectinomycin |
| t | Zeit |
| T-DNA | Transfer DNA |
| Tab. | Tabelle |
| TAIR | <i>The Arabidopsis Information Resource</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| TEV | <i>Tobacco Etch Virus</i> |
| Tris | Tris-Hydroxymethylaminomethan |
| tRNA | <i>transfer</i> RNA |
| TX-100 | O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]polyethoxyethanol |
| U | Unit |
| u.a. | unter anderem |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UGPase | Uridinphosphat-glucosepyrophosphorylase |
| UK | Uridinkinase |
| UMP | Uridinmonophosphat |
| UPRT | Uracilphosphoribosyltransferase |
| UPS | Ureid Permease |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumenprozent |
| V | Volt |
| V | Volumen |
| Vol | Volumen |
| w/v | Gewichtsprozent |
| WT | Wildtyp |
| <i>X. laevis</i> | <i>Xenopus laevis</i> |
| YNB | <i>Yeast Nitrogen Base</i> |
| <i>Z. mays</i> | <i>Zea mays</i> |
| Zeo | Zeocin |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|----|
| Abbildung 1.1: | Transkription und nachfolgende Prozessierung (Reifung) der rRNA. | 6 |
| Abbildung 3.1: | Genetische Charakterisierung der <i>ENT1</i> -T-DNA-Insertionsmutanten auf Ebene der genomischen DANN. | 61 |
| Abbildung 3.2: | Genetische Charakterisierung der <i>ENT1</i> -T-DNA-Insertionsmutanten auf transkriptioneller Ebene. | 63 |
| Abbildung 3.3: | Genetische Charakterisierung der <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionsmutanten. | 65 |
| Abbildung 3.4: | Autophagosomenbildung in Wurzeln von <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionspflanzen. | 67 |
| Abbildung 3.5: | Ertragsparameter von <i>A. thaliana</i> Wildtyp- und <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionspflanzen. | 68 |
| Abbildung 3.6: | Gehalte von Adenylaten in Blättern von Wildtyp sowie <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionspflanzen. | 69 |
| Abbildung 3.7: | Adenylatgehalte in <i>A. thaliana</i> Wildtyp-, <i>rns2-1</i> - und <i>rns2-2</i> -Vakuolen. | 72 |
| Abbildung 3.8: | Enzymatischer Abbau von RNA durch RNase A. | 73 |
| Abbildung 3.9: | Enzymatischer Abbau von RNA durch vakuoläre Enzyme von <i>A. thaliana</i> Wildtyp- und <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionspflanzen. | 75 |
| Abbildung 3.10: | HPLC-Chromatogramme von adeninhaltigen RNA-Abbauprodukten. | 77 |
| Abbildung 3.11: | Quantifizierung der RNA-Abbauprodukte und des BNP-Umsatzes durch vakuoläre Enzyme von <i>A. thaliana</i> Wildtyp- und <i>RNS2</i> -T-DNA-Insertionspflanzen. | 78 |
| Abbildung 3.12: | Abbildung 3.12: Aktivität chloroplastidärer und cytosolischer Markerenzyme in unterschiedlichen Vakuolenisolationen | 80 |
| Abbildung 3.13: | Reinheit, Intaktheit und RNA-Vorkommen in isolierten DGZ-Vakuolen. | 81 |
| Abbildung 3.14: | <i>Workflow</i> der Probenaufarbeitung und Datengenerierung. | 83 |
| Abbildung 3.15: | Elektrophoretische Auftrennung vakuolärer RNA aus <i>A. thaliana</i> . | 84 |
| Abbildung 3.16: | Elektrophoretische Auftrennung vakuolärer RNA nach RNase A-Behandlung intakter Vakuolen. | 85 |
| Abbildung 3.17: | Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken vor der Sequenzierung. | 87 |
| Abbildung 3.18: | Sequenzlängenverteilung MiSeq vs. HiSeq2500, exemplarisch für C1 und C2. | 90 |
| Abbildung 3.19: | Sequenzlängenverteilung ausgewählter Datensätze. | 91 |
| Abbildung 3.20: | <i>Workflow</i> der Datenverarbeitung und –auswertung. | 92 |
| Abbildung 3.21: | Streudiagramm normalisierter <i>Counts</i> von C1. | 93 |
| Abbildung 3.22: | Streudiagramm normalisierter <i>Counts</i> von zwei biologischen Replikaten (C4, C9). | 94 |
| Abbildung 3.23: | Streudiagramm normalisierter <i>Counts</i> einer RNase A behandelten Probe (C10) im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (C9). | 95 |
| Abbildung 3.24: | Streudiagramme normalisierter <i>Counts</i> von Proben aus unterschiedlichen Vakuolenisolation (C1, C9 und C14). | 96 |
| Abbildung 3.25: | Streudiagramme normalisierter <i>Counts</i> von vakuolären (C1, C9, C14) und protoplastidären (C15) Proben. | 97 |

| | | |
|-----------------|---|-------|
| Abbildung 3.26: | Histogramme der normalisierten <i>Counts</i> der biologischen Replikaten (C4, C9). | 99 |
| Abbildung 3.27: | Abdeckung repräsentativer, kerncodierter rRNA-Loci auf Chromosom 2 in C4 und C9. | 102 |
| Abbildung 3.28: | Abdeckung repräsentativer, kerncodierter rRNA-Loci auf und Chromosom 4 in C4 und C9. | 102 |
| Abbildung 3.29: | Topograpisches Modell des ENT7 aus <i>A. thaliana</i> . | 105 |
| Abbildung 3.30: | Plattenbasierter Expressionscreen von ENT7-eGFP Kolonien. | 106 |
| Abbildung 3.31: | <i>P. pastoris</i> Organellfraktionierung über Dichtegradientenzentrifugation. | 107 |
| Abbildung 3.32: | Optimierung der Solubilisierung von ENT7-eGFP. | 109 |
| Abbildung 3.33: | Aufreinigung des ENT7-eGFP durch Nickel-Affinitätschromatographie. | 110 |
| Abbildung 3.34: | Aufreinigung und Überprüfung der Dispersität des ENT7-eGFP mittels Fluoreszenz-Gel-Permeations-Chromatographie. | 111 |
| Abbildung 3.35: | SDS-PAGE Gel und Elutionsprofil des ENT7 nach Entfernung des eGFP. | 112 |
| Abbildung 3.36: | Thermophorese-Messung zur Bestimmung der Bindungsaffinität von ENT7-eGFP zu Nukleosiden. | 114 |
| Abbildung 3.37: | Thermophorese-Messung zur Bestimmung der Bindungsaffinität von ENT7-eGFP zu Nukleobasen. | 115 |
| Abbildung 4.1: | Autophagie-abhängiger vakuolärer RNA-Abbau in <i>A. thaliana</i> und Integration in den zellulären Nukleotid-Metabolismus unter Berücksichtigung von Nukleosidtransportprozessen. | 124 |
| Abbildung S1: | Transkript der T2 Ribonukleasen in RNS2-T-DNA-Insertionslinien. | XIII |
| Abbildung S2: | Agilent 2100 Bioanalyser Elektropherogramme der zur cDNA Bibliothek Herstellung eingesetzten RNAs. | XIV |
| Abbildung S3: | Agilent 2100 Bioanalyser Elektropherogramme der cDNA Bibliothek. | XV |
| Abbildung S4: | Leseweitenverteilung der produzierten Datensätze. | XVI |
| Abbildung S5: | Streudiagramme normalisierter Daten von C11, C12 und C13. | XVII |
| Abbildung S6: | Streudiagramme normalisierter Daten von C4 bis C8. | XVIII |

Symbole für Aminosäuren

| | | |
|---|-----|----------------|
| A | Ala | Alanin |
| C | Cys | Cystein |
| D | Asp | Asparaginsäure |
| E | Glu | Glutaminsäure |
| F | Phe | Phenylalanin |
| G | Gly | Glycin |
| H | His | Histidin |
| I | Ile | Isoleucin |
| K | Lys | Lysin |
| L | Leu | Leucin |
| M | Met | Methionin |
| N | Asn | Asparagin |
| P | Pro | Prolin |
| Q | Gln | Glutamin |
| R | Arg | Arginin |
| S | Ser | Serin |
| T | Thr | Threonin |
| V | Val | Valin |
| W | Trp | Tryptophan |
| Y | Tyr | Tyrosin |

Publikationsliste

- Girke, C., Arutyunova, E., Syed, M., Traub, M., Möhlmann, T., & Lemieux, M. J.** (2015). High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7 (ENT7) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(9), 1921-1929. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.003>
- Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S., & Möhlmann, T.** (2014). Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00443

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas danken, wodurch mir diese Doktorarbeit erst ermöglicht wurde.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön an Torsten für seine Unterstützung und Betreuung. Darüber hinaus zeigte Torsten immer Anteilnahme und volle Unterstützung auch in privat schwierigen Zeiten. Ohne diese Unterstützung hätte ich diese Arbeit niemals beenden können. Außerdem danke ich vor allem den Studenten der Abteilung (Hauke, Justus, David, Chilli) für ein angenehmes Arbeitsklima. Natürlich auch den Mitarbeitern der Abteilung, vor allem Manuel danke ich für die tolle Zusammenarbeit im Labor und Hilfe bei fachlichen Fragen, Korrekturen, Gespräche und sportlichen Aktivitäten.

Durch das Graduiertenprogramm des IRTG1830 konnte ich viele berufliche wie private Erfahrungen innerhalb kürzester Zeit sammeln. Ich danke Dr. Gabriele Amoroso für die unerbittliche Aufopferung der guten Sache und allen Beteiligten, die dieses Programm realisierten und aufrechterhalten. Man ermöglichte mir nicht nur die persönliche Weiterentwicklung meiner Kompetenzen durch Weiterbildungen, sondern auch Aufenthalte in anderen Ländern, Laboraufenthalte in anderen Abteilungen der TU Kaiserslautern, Universität des Saarlandes und University of Alberta. Danke an die Mitarbeiter der Abteilungen für eine tolle und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Die Geburt meiner Tochter war ein ganz besonderes Ereignis während meiner Zeit als Doktorand. Danke an Chrissi für dieses tolle Geschenk und an die TU Kaiserslautern für die Arbeit zur Vereinbarkeit von Familie und Beruf.

Ein ganz fettes Dankeschön geht an meine Familie und Freunde. Vor allem Chrissi hat mir wahnsinnig viel Arbeit abgenommen. Ohne die Unterstützung von Tessina, Manu, Carmen, Jenny, Madeleine, meinen Eltern, Bettina, Phia, Nisi und natürlich Chrissi hätte ich diese Zeit nicht so ohne weiteres überstanden. Wir haben viel durchgemacht und wir sind uns dennoch näher gekommen. „In guten Zeiten reichen uns viele Menschen die Hand. Aber es gibt nur sehr wenige, die sie in schlechten nicht loslassen.“ *Diana Denk*.

Dafür danke ich euch von tiefstem Herzen.

Lebenslauf

Name Christopher Girke

Schullaufbahn

1993 – 1995 Grundschule Teisnach
1995 – 1997 Grundschule Pleißa
1997 – 2001 Albert Schweitzer Gymnasium Limbach Oberfrohna
2001 – 2006 Gymnasium Birkenfeld
Abschluß: Abitur (2,9)

Studium

2006 – 2012 Studium der Biologie und Chemie auf Lehramt für Gymnasien an der Technischen Universität Kaiserslautern
Abschluß mit Auszeichnung (1,3)
Thema der Staatsexamensarbeit: „Weiterführende Untersuchungen zur Funktion und subzellulären Lokalisierung des Equilibrativen Nukleosidtransporters 1 (ENT1) aus *Arabidopsis thaliana*“

Promotion

2012 – 2015 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern
Thema: „Vakuolärer RNA-Abbau in *A. thaliana* und Integration in den Nukleotid-Metabolismus unter Berücksichtigung von Nukleosidtransportprozessen“

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

An dieser Arbeit beteiligte Personen und experimentelle Beiträge:

- Hauke Kattwinkel, Masterstudent, Abt. Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
(Identifizierung homozygoter *ENT1*-T-DNA-Insertionslinien und BNP-Umsatz)
- Justus Niedermeyer, Bachelorstudent, Abt. Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
(Identifizierung homozygoter *ENT1*-T-DNA-Insertionslinien)
- David Zimmer, Bachelorstudent, Abt. Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
(Nicht-wässrige Fraktionierung)
- Tessina Thomas, Masterstudentin, Abt. Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
(Bestimmung der Ertragsparameter von *RNS2*-T-DNA-Insertionslinien)
- Dr. Benedikt Frei, Abt. Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
(Nicht-wässrige Fraktionierung)
- Dr. Elena Arutyunova, Dept. of Biochemistry, University of Alberta, Canada
(Detergenztest und MST Messung der eGFP-Kontrollen)
- Dr. Karl Norström, wiss. Mitarbeiter, Abt. Genetik/Epigenetik, Universität des Saarlandes
(Sequenzierung der cDNA Bibliotheken)
- Dr. Jan Hauth, wiss. Mitarbeiter, Abt. Systemanalyse, Prognose und Regelung, ITWM Kaiserslautern
(Auswertung der Sequenzierdaten)

Ich versichere, dass ich weder an der Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, im September 2015

Christopher Girke