

Analyse der *in organello* RNA-Prozessierung nach Elektroporation von Mitochondrien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel



vorgelegt von
Matthias Staudinger
aus Dortmund
Kiel, 2004

Referent: Prof. Dr. F. Kempken

Korreferentin: Prof. Dr. K. Krupinska

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2004

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 09.11.2004

gez. Prof. Dr. J. Grotemeyer

Der Dekan

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Transkription und RNA-Prozessierung in Organellen	3
1.2.1	Transkription des Plastoms und Chondrioms	3
1.2.2	Prozessierung organellärer Transkripte	6
1.3	Problemstellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Organismen	15
2.1.2	Oligonukleotide	15
2.1.3	Plasmide	17
2.1.4	Membranen und Papiere	18
2.1.5	Chemikalien	19
2.1.6	Radiochemikalien	19
2.1.7	Nährmedium für <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.8	Enzyme	20
2.1.9	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Kultur- und Anzuchtsbedingungen	21
2.2.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.3	Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.2.4	Gelektrophorese	23
2.2.5	Reinigung und Gel-Elution von DNA	24
2.2.6	Hydrolyse von DNA	24
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA	24
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	24

2.2.9	Radioaktive Markierung von DNA	25
2.2.10	Southern-Blot und DNA-DNA-Hybridisierung	25
2.2.11	DNA-Sequenzierung	26
2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.2.13	<i>In vitro</i> RNA-Synthese	28
2.2.14	Mitochondrien-spezifische Methoden	28
2.2.15	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.2.16	Enzym-Aktivitätsmessungen	31
2.2.17	Mikroskopische Untersuchungen	31
2.2.18	Auswertung von Nukleotid- und Protein-Sequenzen	32
2.2.19	Graphische Darstellung von Vektorkarten	33
2.2.20	Digitale Bildbearbeitung	33
2.2.21	Sicherheitsbestimmungen	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Isolierung pflanzlicher Mitochondrien	34
3.1.1	Aktivitätsmessungen mitochondrialer Leitenzyme	34
3.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der isolierten Organellen .	36
3.1.3	Nachweis der Respirationsaktivität der Mitochondrien <i>in organello</i> .	37
3.2	Transkription und Prozessierung endogener mRNA in isolierten Mitochon-	
	drien von <i>Zea mays</i>	39
3.2.1	Mitochondriale Transkription <i>in organello</i>	39
3.2.2	Spleißen von <i>cox2</i> Primärtranskripten in isolierten Mitochondrien	
	von <i>Zea mays</i>	42
3.2.3	<i>In organello</i> RNA-Edierung endogener Transkripte	44
3.2.4	Edierung <i>de novo</i> synthetisierter RNA in isolierten Mitochondrien .	51
3.3	Elektroporation isolierter Mitochondrien	54
3.3.1	Abhängigkeit der <i>in vitro</i> Elektroporation isolierter Mitochondrien	
	von der Feldstärke	54

3.3.2	<i>In vitro</i> Elektroporation von Mais-Mitochondrien in Abhängigkeit von der Größe der Plasmid-DNA	57
3.4	Transkription exogener DNA in isolierten Mitochondrien und <i>in organello</i> Prozessierung fremder Transkripte	60
3.4.1	Expression des <i>Arabidopsis thaliana cox2</i> Gens in Mitochondrien aus <i>Zea mays</i>	60
3.4.2	Transkription des <i>atp6-1</i> Gens aus <i>Sorghum bicolor</i> in isolierten Mitochondrien aus <i>Zea mays</i>	74
3.4.3	Transkription chimärer Konstrukte des <i>atp6</i> Gens in isolierten Mitochondrien von <i>Zea mays</i>	77
3.4.4	Expression des <i>atp9</i> Gens aus <i>Sorghum bicolor</i> in Mitochondrien aus <i>Zea mays</i>	84
4	Diskussion	90
4.1	Transkription endogener Gene und Transkriptprozessierung in isolierten Mitochondrien von <i>mmays</i>	91
4.1.1	Nachweis der Transkription endogener Gene <i>in organello</i>	91
4.1.2	<i>In organello</i> Prozessierung endogener Transkripte am Beispiel der Transkripte des <i>nad9</i> , <i>atp6</i> und <i>cox2</i> Gens	95
4.2	Exogene DNA kann mittels Elektroporation effizient in isolierte Mitochondrien eingebracht werden	97
4.3	Transkription von Fremd-DNA in isolierten Mitochondrien	99
4.4	Spleißen der Transkripte des <i>Arabidopsis thaliana cox2</i> Gens in Mitochondrien von <i>Zea mays</i>	99
4.5	Effiziente RNA-Edierung des <i>Arabidopsis thaliana cox2</i> Transkripts in Mais-Mitochondrien	102
4.5.1	Identische <i>cis</i> -Sequenzen der <i>cox2</i> Transkripte von <i>Zea mays</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> ermöglichen die RNA-Edierung im heterologen System	102

4.5.2	Die RNA-Edierung der <i>Arabidopsis thaliana cox2</i> Transkripte in Mitochondrien von Mais erfolgt unabhängig vom Spleißen der mRNA	108
4.6	RNA-Edierung der <i>in organello</i> synthetisierten <i>Sorghum bicolor atp6-1</i> und <i>atp9</i> sowie chimärer <i>atp6</i> Transkripte	110
4.6.1	Potentieller Einfluss der „ <i>prepiece</i> “ Region des <i>atp6</i> Gens auf die Edierung der <i>atp6</i> Transkripte	111
4.6.2	Das <i>S. bicolor atp9</i> Transkript wird in Mitochondrien von Mais nur partiell ediert	114
4.6.3	Wenig effiziente RNA-Edierung der für die Untereinheiten der ATP-Synthase kodierenden Transkripte	117
4.7	Ausblick	120
5	Zusammenfassung	122
6	Literatur	126
7	Anhang	153

Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
G	Guanin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mt	mitochondrial
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PPFD	Photosynthetisch aktive Photonenflussdichte
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>rounds per minute</i> “)
RT	reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan

U Uracil

UTP Uraciltriphosphat

XGAL X-Galaktose, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactopyranosid

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einführung

1.1 Einleitung

Pflanzliche Zellen weisen neben dem Kern-Genom zwei weitere, in verschiedenen Kompartimenten vorliegende Genome auf. Bei Plastiden wird diese genetische Information als Plastom bezeichnet, bei Mitochondrien spricht man hingegen vom Chondriom. Ursächlich für diese in den Organellen befindlichen Genome ist nach der Endosymbiontentheorie die Aufnahme einst eigenständiger Organismen in die Ureukaryontenzelle. Als Vorläufer der Mitochondrien wird ein α -Purpurbakterium angenommen, der Ursprung der Plastiden hingegen könnte ein phagozytiertes Cyanobakterium gewesen sein (Gray und Doolittle, 1982; Yang *et al.*, 1985; Gray, 1992; Dyll *et al.*, 2004).

Beim Vergleich der Kodierungskapazitäten der Genome der Organellen mit den ursprünglich eigenständigen Organismen ist der Verlust an genetischer Information in den Mitochondrien und Plastiden auffällig. Generell weisen die Plastidengenome heutige Pflanzen eine Größe von 120 bis 160 kb auf (Palmer, 1990; Whitfeld und Bottomley, 1993). Die Kodierungskapazität des Plastoms beschränkt sich auf lediglich 5% der plastidären Proteine (Martin *et al.*, 2002). Zu den vom Plastom kodierten Proteinen zählen einige Proteine der Komplexe der Transkription und Translation sowie der Photosynthese.

Pflanzliche Chondriome sind mit einer Größe von 200-2400 kb wesentlich größer als die der Protisten (5,7-76 kb), Tiere (14-42 kb) oder Pilze (18-176 kb) (Backert *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1998). Die auffällige Differenz der Größe der mitochondrialen Genome der Pflanzen ist auf den hohen Anteil an Intronen und duplizierten Sequenzen in der mitochondrialen DNA sowie die zwischen den kodierenden Regionen gelegenen intergenische Sequenzabschnitte zurückzuführen (Backert *et al.*, 1997; Unseld *et al.*, 1997). Die Kodierungskapazität des mitochondrialen Genoms ist jedoch auch bei Pflanzen beschränkt. So enthält das Chondriom von *Arabidopsis thaliana* mit einer Größe von 366 kb lediglich Gene für einige Untereinheiten der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung, einige ribosomale Proteine, rRNA und tRNA-Sequenzen, jedoch nicht für eine RNA-Polymerase (Unseld *et al.*, 1997).

Viele einst mitochondrial bzw. plastidär kodierte Gene sind inzwischen im Kerngenom lokalisiert. Im Anschluss an die Autonomie des phagozytierten Prokaryonten erfolgte der Transfer des Großteils der Gene des aufgenommenen Bakteriums in den Kern des Wirtes (Martin und Herrmann, 1998). Einige Hinweise deuten auf einen heute noch aktiven Transfer der genetischen Information des Plastoms in den Kern hin (Baldauf und Palmer, 1990). Bei Leguminosen kann der erfolgte Gen-Transports vom Mitochondrion zum Kern mit einigen Zwischenstufen beobachtet werden (Nugent und Palmer, 1991; Adams *et al.*, 1999). Mitunter liegen nach einem erfolgten Transfer der kodierenden Gensequenz des *cox2* Gens in das Kerngenom noch inaktive Gene im Chondriom vor (Adams *et al.*, 1999). In anderen Fällen wird die bereits im Kern lokalisierte Sequenz jedoch nicht exprimiert. Hier erfolgt die Transkription und Translation des mitochondrialen Gens weiterhin in den Mitochondrien selbst (Adams *et al.*, 1999).

Ein solcher Transfer der genetischen Information vom Organell in den Kern ist mit der Notwendigkeit des Erwerbs der grundlegenden Regulationsstrukturen der nukleären Transkription und der cytoplasmatischen Translation verbunden (Brennicke *et al.*, 1993). Die im Cytoplasma translatierten Proteine müssen zudem eine Importsignalsequenz enthalten, um von den für Mitochondrien (Truscott *et al.*, 2003) wie Plastiden (Soll und Schleiff, 2004) bekannten Komplexen in die Organellen transportiert zu werden. Dieses aquirierte Signalpeptid muss zudem in den Organellen wieder entfernt werden. Die Komplexizität dieses Prozesses ist für das bei Soja kernlokalisierte *cox2* Gen untersucht (Daley *et al.*, 2002a). Zudem scheint mitunter eine Veränderung der Eigenschaften des Proteins notwendig zu sein. So weist das vom kernlokalisierten *cox2* Gen exprimierte COX2 Peptid bei Soja, im Gegensatz zu dem mitochondrial kodierten Protein, eine geringere Hydrophobizität auf (Daley *et al.*, 2002b). Erst durch diese Erhöhung der Hydrophilie wird ein Import des im Cytoplasma synthetisierten COX2 Proteins in die Mitochondrien möglich (Daley *et al.*, 2002b). Die komplexe Verteilung der genetischen Information, der Makromolekülsynthese und des Proteinbedarfs in Abhängigkeit von physiologischen Parametern und externen Einflüssen setzt eine koordinierte Interaktion der einzelnen beteiligten genetischen Systeme voraus.

Bei der Biogenese von Enzymkomplexen mit unterschiedlichen Kodierungsorten in der Zelle ist eine Koordination der Expression der einzelnen Komponenten notwendig, um eine ausgewogene Stöchiometrie zu erreichen. Den Einfluss der Entwicklung auf die Mitochondrien verdeutlicht die Reaktion der Organellen auf den erhöhten Energiebedarf während des Pollenwachstums und der Pollenreifung. Hier kommt es zur antherenspezifischen Erhöhung der Transkription mitochondrialer wie auch nukleärer Gene, die für mitochondriale Proteine kodieren (Huang *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1994; Leon *et al.*, 1998). So wurde eine sechs bis zehnfache verstärkte Transkriptionsaktivität einiger für mitochondriale Enzyme kodierender Kerngene in generativen Geweben ermittelt (Huang *et al.*, 1994; Grohmann *et al.*, 1996; Heiser *et al.*, 1996). Voraussetzung für eine solche Modulation der nukleären Transkription sind entwicklungspezifisch regulierbare Promotoren der in den Kern transferierten mitochondrialen Gene (Zabaleta *et al.*, 1998; Lohrmann *et al.*, 2001).

1.2 Transkription und RNA-Prozessierung in Organellen

1.2.1 Transkription des Plastoms und Chondrioms

1.2.1.1 Transkription mitochondrialer Gene

Die Transkription in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt durch eine 145 kDa große RNA-Polymerase. Diese ähnelt den aus nur einer Untereinheit bestehenden T3, T7 und SP6 RNA-Polymerasen der Bakteriophagen und wird durch das im Nukleus lokalisierte *rpo41* Gen kodiert (Greenleaf *et al.*, 1986; Kelly *et al.*, 1986; Masters *et al.*, 1987). Es wurden bereits cDNA Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zum *rpo41* Gen der Hefe für die dicotylen Pflanzen *Chenopodium album* (Weihe *et al.*, 1997) und *A. thaliana* (Hedtke *et al.*, 1997) beschrieben. Die Expression von Reportergenen, bei denen eine Fusion der Importsequenzen der *A. thaliana* und *C. album* RNA-Polymerasen mit der für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierenden Sequenz vorlag, deuten auf einen Import der Proteine in Mitochondrien hin (Hedtke *et al.*, 1997, 1999). Alle bislang bekannten mitochondrialen Genome photosynthetischer Eukaryoten weisen keine Sequenzbereiche mit Ho-

mologien zu Sequenzen der RNA-Polymerasen auf. Demnach ist davon auszugehen, dass die RNA-Polymerasen der Mitochondrien im Kern kodiert vorliegen. Allein bei dem Protisten *Reclinomonas americana* sind Teile einer aus mehreren Untereinheiten bestehenden RNA-Polymerase im Chondriom anzutreffen (Lang *et al.*, 1997).

Die Analyse der mitochondrialen Transkripte von *S. cerevisiae* ermöglichte die Identifizierung eines konservierten Nonanukleotid-Motivs 5' ATATAAGTA(+1) 3' (Osinga *et al.*, 1982), welches ausreichend und essentiell für die Initiation der Transkription ist. Die Promotoren des Chondrioms Höherer Pflanzen hingegen zeigen wenig Sequenzhomologien. Untersuchungen an *in vivo* synthetisierten Transkripten ermöglichten, ebenso wie *in vitro* Transkriptions-Systeme, die Identifizierung einiger Bereiche der Transkriptionsinitiation bei *Zea mays* (Mulligan *et al.*, 1988, 1991; Rapp und Stern, 1992; Rapp *et al.*, 1993; Caoile und Stern, 1997), bei *Glycine max* (Brown *et al.*, 1991), *Pisum sativum* (Binder *et al.*, 1995), *Triticum aestivum* (Covello und Gray, 1991), *Solanum tuberosum* (Binder *et al.*, 1994; Giese *et al.*, 1996; Remacle und Marèchal-Drouard, 1996) *Oenothera berteriana* (Binder und Brennicke, 1993) und *Sorghum bicolor* (Yan und Pring, 1997).

Ähnlich zu dem Nonanukleotid mitochondrialer Promotoren der Hefe konnte für die Initiation der Transkription in der dikotylen Pflanze *Oenothera berteriana* eine konservierte Sequenz 5' CRTAaGaGA (+2) 3' ermittelt werden (Binder und Brennicke, 1993). Dieses Motiv liegt ebenso im 5'-Bereich der Transkriptionsstartpunkte mitochondrialer Gene von *G. max* (Brown *et al.*, 1991) und *P. sativum* (Binder *et al.*, 1995; Giese *et al.*, 1996) vor. Mitochondriale Promotoren monokotyler Pflanzen sind hingegen weitaus weniger konserviert. Neben dem Konsensusmotiv 5' CRTA 3' (Mulligan *et al.*, 1988; Covello und Gray, 1991) wurden noch weitere, degenerierte Motive 5' AATA 3' sowie 5' CTTA 3' als Sequenzen für den Transkriptionsstart ermittelt (Yan und Pring, 1997). Alleiniges konserviertes Merkmal aller mitochondrialer Promotoren scheint daher eine konservierte Sequenz 5' YR-TA 3' zu sein.

1.2.1.2 Transkription in Plastiden

In Plastiden kommen mehrere RNA-Polymerasen vor. So konnten eine lösliche und eine DNA-gebundene, transkriptionsaktives Chromosom (TAC) genannte, RNA-Polymerase-Aktivität in Plastiden nachgewiesen werden (Briat *et al.*, 1979; Gruissem *et al.*, 1983). Innerhalb des TAC-Komplexes konnte bereits eine Untereinheit der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP, „*plastid encoded RNA polymerase*“) detektiert werden (Suck *et al.*, 1996). Diese RNA-Polymerase, die aus mehreren Untereinheiten besteht, weist eine Ähnlichkeit zu der RNA-Polymerase in Bakterien auf. Die von der plastidär kodierten RNA-Polymerase erkannten Promotoren entsprechen dem -10/-35 σ^{70} -Typ (Gruissem und Zurawski, 1985; Tonkyn und Gruissem, 1993).

Es gab schon früh Hinweise auf kernkodierte RNA-Polymerasen. Sowohl in Ribosomenfreien Plastiden der *Hordeum vulgare* Mutante *albostrians* (Hess *et al.*, 1993), als auch in Hitze-gebleichten, Ribosomen-defizienten Keimlingen der Gerste (Falk *et al.*, 1993) konnte eine plastidäre RNA-Synthese nachgewiesen werden. Zudem ist auch eine nukleär kodierte, plastidäre RNA-Polymerase aus Spinat biochemisch charakterisiert (Lerbs-Mache, 1993). Aufgrund der nukleären Kodierung dieser RNA-Polymerase muss ein Import dieses Proteins in die Plastiden erfolgen. Eine solche Translokation der RNA-Polymerase konnte bereits gezeigt werden (Hedtke *et al.*, 1997).

Die Promotoren dieser nukleär kodierten, plastidären RNA-Polymerasen (NEP, „*nuclear encoded RNA polymerase*“) erkennen zur Initiation der Transkription ein konserviertes Motiv 5' YATAGAATAA 3' (Kapoor *et al.*, 1997; Hübschmann und Börner, 1998; Miyagi *et al.*, 1998). Demnach erkennen die nukleär kodierten RNA-Polymerasen der Plastiden wie die der Mitochondrien ein konserviertes Sequenzmotiv 5' YRTA 3'.

Je nach dem Typ des Promotors plastidärer Gene können verschiedene Genklassen unterschieden werden. Die Klasse I Gene, zu denen z.B. die für die Proteine der Photosysteme I und II kodieren Gene gehören, werden bei *N. tabacum* von der plastidärkodierten RNA-Polymerase transkribiert (Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Neben diesen liegt bei den Genen der Klasse II ein Promotor für die Initiation der Transkription sowohl durch die nukleärko-

dierte, wie auch die plastidärkodierte RNA-Polymerase vor. Die dritte Klasse plastidärer Gene hingegen wird allein durch die nukleär kodierte RNA-Polymerase transkribiert. Im Gegensatz zu Mitochondrien, die mono- oder bicistronische Transkripte aufweisen, kommen in Plastiden, ähnlich wie in Bakterien, auch in einem Operon angeordnete Gene und demnach polycistronische mRNAs vor (Whitfeld und Bottomley, 1993).

1.2.2 Prozessierung organellärer Transkripte

Die Transkripte der Plastiden wie Mitochondrien unterliegen vielfältigen Prozessierungsreaktionen. Hierzu zählen endo- und exonukleolytische Veränderungen der 5'- und 3'-Nichtkodierungsbereiche ebenso wie das Spleißen von Intronen aus Mosaikgenen wie auch die RNA-Edierung. Die letzteren Prozesse verändern die kodierende Information der Transkripte selbst, während die Prozessierung der nichttranslatierten Sequenzen die Struktur und Stabilität der RNA betrifft.

Plastidäre und mitochondriale Transkripte weisen an ihrem 3'-Ende häufig palindromartige Sequenzen auf (Schuster *et al.*, 1986), für die eine Stamm-Schleifen-Formation als Sekundärstruktur in Frage kommt. Solche Stamm-Schleifen-Strukturen dienen in Bakterien und tierischen Mitochondrien als Terminatoren der Transkription (Clayton *et al.*, 1984; Cheng *et al.*, 1991; Cohen, 1995; Nudler *et al.*, 1995). In Plastiden und pflanzlichen Mitochondrien hingegen agieren sie als Prozessierungssignale und Transkript-stabilisierende Elemente (Stern und Gruissem, 1987; Kaleikau *et al.*, 1992; Sugita und Sugiura, 1996; Dombrowski *et al.*, 1997). Protein-Komplexe, die an diese Regionen binden, enthalten Exo- sowie Endonukleasen, die Prozessierung katalysieren oder kontrollieren (Hsu-Ching und Stern, 1991; Manley und Proudfoot, 1994; Drager *et al.*, 1996; Sugita und Sugiura, 1996). Die Dissoziation der Proteine von der RNA führt zur Degradation der Transkripte durch Nukleasen. Eingeleitet wird der Abbau der RNA durch die Polyadenylierung der Transkripte. Dieser Degradationsweg ist sowohl in Prokaryoten (Carpousis *et al.*, 1999), Plastiden (Kudla *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999) und Mitochondrien (Kuhn *et al.*, 2001; Gagliardi *et al.*, 2001) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu spielt die Polyadenylierung

rung nukleärer mRNA eine Rolle im Export der RNA aus dem Kern, in der Initiation der Translation und bedingt zudem die Stabilität dieser Transkripte (Wahle und Ruegsegger, 1999).

1.2.2.1 Spleißen der Transkripte in Mitochondrien und Plastiden

Aufgrund der Primärsequenz, der Sekundärstruktur sowie der katalytischen Eigenschaften können organellärer Introne der Gruppe I oder Gruppe II unterschieden werden (Saldanha *et al.*, 1993). So benötigen die Intronen der Gruppe I zur Exzision ein freies, spezifisch an die RNA gebundenes Guanosin als Co-Faktor (Cech und Bass, 1986). Bei den Intronen der Gruppe II hingegen übernimmt ein am 3'-Ende des Introns gelegenes Adenosin die Funktion des Guanosins (Sharp, 1994).

Einige wenige Gene des Plastoms bzw. Chondrioms enthalten Intronen der Gruppe I. So wurden diese im *psbA* Gen der Plastiden von *Chlamydomonas reinhardtii* (Herrin *et al.*, 1991), in der plastidären Leucin-tRNA (Kuhnel *et al.*, 1990) und im mitochondrialen *cox1* Gen einiger Pflanzenarten (Cho *et al.*, 1998) nachgewiesen.

Die Gruppe II Intronen hingegen sind weit verbreitet in Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten und kommen sporadisch in *Archaea* vor (Michel *et al.*, 1989; Ferat und Michel, 1993; Dai und Zimmerly, 2002; Toro, 2003). Es handelt sich um große, katalytische RNAs, die durch kleine Bereiche konservierter Sequenzen sowie eine konservierte strukturelle Organisation von sechs großen helikalen Domänen und charakteristische Interaktionen der Domänen definiert sind (Michel *et al.*, 1989; Michel und Ferat, 1995; Qin und Pyle, 1998; Bonen und Vogel, 2001). Sowohl in mRNA, tRNA wie auch rRNA Genen eukaryontischer Organellen und Eubakterien wurden diese Intronen nachgewiesen (Michel und Ferat, 1995; Martínez-Abarca und Toro, 2000; Bonen und Vogel, 2001). Einige Hinweise deuten auf einen gemeinsamen Vorfahren der Introne der Gruppe II und der nukleären pre-mRNA Introne hin (Sharp, 1991; Michel und Ferat, 1995; Villa *et al.*, 2002). So weisen beide Typen von Intronen eine ähnliche Chemie des Spleißvorgangs und ähnliche RNA-Strukturen in den katalytischen Regionen (Valadkhan und Manley, 2001) auf. Zudem wurde in beiden

Fällen die Katalyse der Reaktionen in Verbindung mit RNA-gebundenen Magnesium-Ionen gebracht (Sontheimer *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 2000).

Die Exzision der Gruppe II Introne aus den Primärtranskripten erfolgt über zwei Transesterreaktionen ähnlich dem Mechanismus des Spleißens nukleärer Transkripte. Die 2'-Hydroxylgruppe eines im Intron gelegenen Adenosins greift die 5'-Spleißstelle an. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe des stromaufwärts gelegenen Exons auf die 3'-Spleißstelle. Das agierende Adenosin liegt 7 bis 8 Nukleotide vor dem 3'-Ende des Introns innerhalb der Domäne VI (Peebles *et al.*, 1986; Schmelzer und Schweyen, 1986). Letztlich liegt ein exzisiertes Intron als Lariat mit einer internen 2'-5'-Verknüpfung und einem kurzen Nukleotidschwanz vor.

Untersuchungen an selbst-spleißenden Intronen der Gruppe II, bei denen einzelne Domänen deletiert wurden, zeigten, dass die Domäne VI von essentieller Bedeutung für die Bildung des Lariats ist (Koch *et al.*, 1992; Holländer und Kück, 1999). Im Gegensatz zu dem in dieser Domäne liegenden Adenosin ist die Domäne VI jedoch innerhalb der Gruppe der Intronen nicht stark konserviert (Michel *et al.*, 1989).

Bei der Analyse der exzisierten Intronen wurden Lariate für 16 verschiedene Transkripte in Plastiden aus Gerste nachgewiesen (Vogel und Börner, 2002). Dem gegenüber liegt das Intron der *trnV* mRNA nach der Exzision als lineares Molekül vor. Lariate wurden für das Intron dieses Transkripts nicht detektiert (Vogel und Börner, 2002). Im Intron der *trnV* Transkripte fehlt das Adenosin für die Ausbildung des Lariats (Learn *et al.*, 1992). Mutationen, welche die Lariatbildung beim Spleißen der mitochondrialen *al5 γ* Transkripte in Hefe verhindern, führen ebenso zur Exzision linearer Intronen (van der Veen *et al.*, 1986; Jarrell *et al.*, 1988; Podar *et al.*, 1998). Folglich scheint eine Co-Existenz beider Varianten bei der Exzision der Intronen in den Organellen vorzuliegen.

Im Gegensatz zum Ribonukleoprotein-katalysierten Spleißen der nukleären Introne wurde ein Selbstspleißen einiger Gruppe II Introne *in vitro* beobachtet (Peebles *et al.*, 1986; van der Veen *et al.*, 1986; Schmelzer und Schweyen, 1986). Aufgrund des nachgewiesenen Einflusses einer Kern-Mutation auf das Ausbleiben des *in vivo* Spleißens eines *in vitro* selbstspleißenden mitochondrialen Introns (Collins und Lambowitz, 1985), ist jedoch da-

von auszugehen, dass *in vivo* eine Protein-Interaktion für die Katalyse notwendig ist. Das Spleißen der Transkripte in Plastiden von Algen und Pflanzen ist ebenso abhängig von Kern-kodierten Faktoren (Choquet *et al.*, 1988; Hess *et al.*, 1994; Jenkins *et al.*, 1997).

1.2.2.2 RNA-Edierung mitochondrialer und plastidärer Transkripte

Der Prozess der Edierung von Transkripten ist ein Vorgang, der in verschiedenen genetischen Systemen für die Reifung der mRNA essentiell ist (Brennicke *et al.*, 1999). Abhängig von der Natur der Veränderung der RNA kann hierbei der Typ der Insertions-/Deletions-Edierung von dem der Konversions-Edierung unterschieden werden.

Für die Transkripte der Kinetoplasten-DNA der Trypanosomen ist die Insertion- bzw. Deletion von Uracil-Nukleotiden in die von der DNA transkribierten RNA beschrieben (Benne *et al.*, 1986). Die Positionsinformation für diesen Prozess wird durch kleine, *in trans* agierende Moleküle, sogenannte „guide“-RNAs geliefert. Bei *Physarum polycephalum* ist hingegen eine Insertion von Cytosinen in die RNA beschrieben (Mahendran *et al.*, 1991). Zusätzliche Guanosine kommen bei Transkripten einiger Paramyxoviren vor (Vidal *et al.*, 1990).

Basenkonversionen liegen nur bei wenigen Transkripten von Säugern (Niswender, 1998) sowie *Drosophila* (Hoppengardener *et al.*, 2003) vor. Dem gegenüber wird eine Vielzahl der Transkripte pflanzlicher Organellen durch eine solche Transition in der RNA ediert. Es handelt sich hierbei um einen posttranskriptionalen Prozess, bei dem meist Sequenzveränderungen von C nach U, seltener von U nach C beobachtet werden (Meier *et al.*, 1996; Brennicke *et al.*, 1999; Bock, 2000). Mitunter ist die RNA-Edierung eine notwendige Voraussetzung für die Reifung der Primärtranskripte (Marchfelder *et al.*, 1996; Marèchal-Dourad *et al.*, 1996). Aufgrund der meist in der kodierenden Sequenz gelegenen Edierungspositionen führt die RNA-Edierung zur Aufrechterhaltung der konservierten Aminosäuresequenz (Bègu *et al.*, 1990; Bock *et al.*, 1994; Zito *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2001). Bei den RNA-Edierungen innerhalb der kodierenden Sequenzen kommt es mitunter erst zur Generierung eines Stopp-Kodons (Kempken *et al.*, 1991; Wintz und Hanson, 1991). Eben-

so erfolgt mitunter die Prozessierung des Triplets ACG, so dass dann erst das Startkodon ATG in der mRNA vorliegt (Chapdelaine und Bonen, 1991).

Bei Landpflanzen wurde die RNA-Edierung von Transkripten zuerst in Mitochondrien (Covello und Gray, 1989; Gualberto *et al.*, 1989; Hiesel *et al.*, 1989), dann in Plastiden (Hoch *et al.*, 1991; Kudla *et al.*, 1992) beschrieben. In pflanzlichen Organellen ist der Vorgang der Edierung der Transkripte unter den Landpflanzen weit verbreitet (Hiesel *et al.*, 1994; Freyer *et al.*, 1997). Die Edierung von Transkripten der Organellen konnte bei Angiospermen, Gymnospermen wie auch Bryophyta nachgewiesen werden (Hiesel *et al.*, 1994; Freyer *et al.*, 1997; Kugita *et al.*, 2003).

Hinsichtlich der Edierungsfrequenz unterscheiden sich Mitochondrien und Plastiden erheblich voneinander. Für mitochondriale Transkripte des Chondrioms von *A. thaliana* sind 441 (Giegè und Brennicke, 1999) RNA-Edierungsstellen beschrieben. 491 C zu U Austausch sind für das Transkriptom von *Oryza sativa* (Notsu *et al.*, 2002) und 427 für das von *Brassica napus* (Handa, 2003) bekannt. Plastidäre RNAs hingegen weisen lediglich 27 Edierungspositionen bei *Z. mays* (Maier *et al.*, 1995), 26 bei *Pinus nigra* (Wakasugi *et al.*, 1996), 31 (Hirose *et al.*, 1999) bzw. 34 (Chateigner-Boutin und Hanson, 2003) bei *Nicotiana tabacum* und 21 bei *O. sativa* (Notsu *et al.*, 2002) auf. Während bei *Marchantia polymorpha* bislang keine RNA-Edierung beschrieben wurde, sind für die Plastiden eines weiteren Moores, *Anthoceros formosae*, 509 C zu U ebenso wie 433 U zu C RNA-Edierungen beschrieben worden (Kugita *et al.*, 2003). Die Häufigkeit der edierten Kodone beträgt bei mitochondrialen Transkripten zwischen drei bis fünfzehn Prozent, bei den RNAs der Plastiden lediglich 0,13 Prozent der Kodone der Transkripte.

Die Translation nicht vollständig edierter Transkripte in Mitochondrien scheint von Gen zu Gen verschieden. Bei *Petunia hybrida* konnten mittels Antikörpern, die gegen die von unedierten und edierten mRNAs abgeleiteten Proteine gerichtet wurden, sowohl „unedierte“ wie „edierte“ RPS12 Proteine in Mitochondrien und Ribosomen nachgewiesen werden (Lu *et al.*, 1996). Dem gegenüber waren keine „unedierten“ RPS13 Proteine in Mitochondrien oder Ribosomen detektierbar (Williams *et al.*, 1998), obwohl der Edierungsgrad der zugrundeliegenden *rps13* Transkripte heterogen und nicht vollständig war. Williams *et al.*

(1998) diskutieren daher die Möglichkeit, dass partiell edierte mRNAs zwar translatiert werden, dann aber eine Degradation der assemblierten Enzymkomplexe mit „unedierten“ Proteinen erfolgt.

Allgemein scheint der Grad der Edierung mitochondrialer Transkripte zwischen verschiedenen mRNAs zu variieren. Für viele Transkripte ist eine vollständige RNA-Edierung beschrieben. So konnten komplett edierte Cytosine bei gespleißten Transkripten der Cytochrom c Oxidase Untereinheit 2 (*cox2*) (Yang und Mulligan, 1991; Grosskopf und Mulligan, 1996), bei der mRNA der ATP Synthase Untereinheit 9 (*atp9*) (Bègu *et al.*, 1990; Schuster und Brennicke, 1990; Grosskopf und Mulligan, 1996) sowie der NADH Dehydrogenase Untereinheit 4 (*nad4*) (Lamattina und Grienberger, 1991) nachgewiesen werden. Dem gegenüber wurden lediglich partiell edierte mRNAs einiger anderer Gene identifiziert (Covello und Gray, 1990; Kempken *et al.*, 1991; Lu und Hanson, 1992; Grosskopf und Mulligan, 1996).

Die Edierungsreaktion scheint durch Enzyme katalysiert, da eine Degradation der Proteine zum Ausbleiben der RNA-Edierung in Lysaten von Mitochondrien führt (Araya *et al.*, 1992). Eine Exzision der Nukleotide oder ein Austausch scheint im Fall der RNA-Edierung bei Höheren Pflanzen nicht vorzuliegen, wie Untersuchungen zur Biochemie des Edierungsprozesses in *in vitro* Edierungssystemen zeigten. Das α -Phosphat des Cytosins bleibt während der Prozessierung erhalten (Rajasekhar und Mulligan, 1993; Yu und Schuster, 1995). Zudem kann eine Transglykosylierung ausgeschlossen werden (Yu und Schuster, 1995). Folglich ist bei der RNA-Edierung von einer oxidativen Deaminierung oder Transaminierung auszugehen (Rajasekhar und Mulligan, 1993; Yu und Schuster, 1995). Bisher konnte jedoch in Pflanzen kein solches, die Deaminierung der organellären Transkripte katalysierendes Enzym isoliert und charakterisiert werden. Aufgrund der auf der Basis eines für Mitochondrien aus *P. sativum* entwickelten *in vitro* RNA-Edierungssystems erhaltenen Daten scheint eine Helikase bei der Prozessierung der *atp9* RNA beteiligt zu sein (Takenaka und Brennicke, 2003). Die Unabhängigkeit des an der RNA-Edierung beteiligten Enzyms von Zink-Ionen deutet hingegen nicht auf eine durch Deaminasen katalysierte Reaktion hin (Takenaka und Brennicke, 2003).

Natürlich vorkommende Fusionen der kodierenden Sequenzen verschiedener mitochondrialer Gene ermöglichten bislang die Analyse der RNA-Edierung der Transkripte dieser verschiedenen chimären Gene im Vergleich zu den der Fusion zugrundeliegenden mRNAs (Gualberto *et al.*, 1991; Kumar und Leving, 1993; Nivison *et al.*, 1994). Aufgrund dieses Ansatzes wurde angenommen, dass 5'-flankierende Sequenzen einen kritischen Einfluss auf die Erkennung der Edierungsstelle haben (Williams *et al.*, 1998; Kubo und Kadowski, 1997; Mulligan *et al.*, 1999).

Mangels der Möglichkeiten, Mitochondrien in Pflanzen gentechnisch zu manipulieren, sind bislang hauptsächlich Daten zu den die Spezifität der RNA-Edierung vermittelnden *cis*-Faktoren für Plastiden bekannt. Untersuchungen der die 31 Edierungsstellen bei *N. tabacum* umgebenden Sequenzen zeigten keine offensichtlichen Konsensussequenzen oder auffälligen Sekundärstrukturen (Hirose *et al.*, 1999). Die Analyse einiger Edierungsstellen plastidärer Transkripte wie *psbL* (Chaudhuri *et al.*, 1995; Chaudhuri und Maliga, 1996), *ndhB* (Bock *et al.*, 1996, 1997; Hermann und Bock, 1999) und *rpoB* (Reed *et al.*, 2001) in transgenen Ansätzen weisen auf die für die Edierung notwendigen, meist, aber nicht ausschließlich im 5'-Bereich der Edierungsstelle gelegenen *cis*-Elemente hin. Dem gegenüber ist für die Edierung der das Apolipoprotein B kodierenden mRNAs (*apoB*) bei Säugetieren bekannt, dass die notwendigen *cis*-Elemente in der 3'-Region der Edierungsstelle lokalisiert sind (Mehta und Driscoll *et al.*, 2002).

Der für die RNA-Edierung in Plastiden notwendige Sequenzabschnitt bei der Edierungsstelle der *psbL* mRNA ist auf einen Bereich von -16 bis +5 (Chaudhuri und Maliga, 1996) und für die *ndhB* mRNA auf einen Abschnitt von -42 und -2 eingegrenzt (Bock *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde jedoch auch eine Abhängigkeit der Edierung von stromauf gelegenen Sequenzen nachgewiesen (Bock *et al.*, 1996, 1997).

Die an der RNA-Edierung beteiligten *trans*-Faktoren könnten die spezifische Erkennung der Edierungsstelle durch kleine RNA-Moleküle erlangen, was der Charakteristik des Vorgangs bei der Edierung mitochondrialer Transkripte in Kinetoplasten entspräche (s.o.). Die Ausbleibende Edierung in einem *in vitro* System für pflanzliche Mitochondrien nach der Hydrolyse der RNA (Araya *et al.*, 1992) könnte auf die Beteiligung von RNA bei der

Erkennung der Edierungsstelle hindeuten. Für Plastiden konnte zumindest eine plastidäre Kodierung dieser RNAs bislang für das *psbL* Transkript ausgeschlossen werden (Bock und Maliga, 1995).

In vitro Untersuchungen unter Verwendung von Plastidenlysaten ermöglichen bereits den direkten Nachweis der Interaktion der *cis*-Elemente verschiedener Edierungsstellen mit den jeweiligen an der RNA-Edierung beteiligten *trans*-Faktoren. Für die Prozessierung der *psbE* bzw. *petB* Transkripte wurde gezeigt, dass Nukleotide im Bereich von -15 bis -1 bzw. -20 bis -1 direkt stromauf der Edierungsstelle für die Bindung des *trans*-Faktors benötigt werden (Miyamoto *et al.*, 2002). Durch UV-Quervernetzungsversuche der an diese *cis*-Elemente der *psbL* respektive *petB* mRNA bindenden *trans*-Faktoren konnte bereits die spezifische Bindung von Proteinen mit einer Größe von 56 kDa (*psbL*) und 70 kDa (*petB*) detektiert werden (Miyamoto *et al.*, 2002).

Obwohl das RNA-Edierungssystem von Plastiden und Mitochondrien einige Eigenschaften teilt, konnte keine RNA-Edierung plastidärer Transkripte in Mitochondrien nachgewiesen werden (Zeltz *et al.*, 1996). Ebenso wurden mitochondriale RNAs in Plastiden nicht ediert (Sutton *et al.*, 1995). Demnach scheinen die Erkennungssequenzen bzw. die *trans*-Faktoren für die RNA-Edierung spezifisch für die Organellen zu sein.

1.3 Problemstellung

Der Prozess der RNA-Edierung ist eine in Mitochondrien häufig vorkommende Modifizierung mitochondrialer Transkripte. Die Veränderung der Nukleotidsequenz ist eine zwingende Voraussetzung für die Expression der organellären Proteine. Durch die Basenkonversion wird die von dem mRNA kodierte Aminosäuresequenz der des homologen Proteins anderer Organismen ähnlicher (z. B. Bock *et al.*, 1994).

Zur stabilen Transformation von Plastiden sind mehrere Methoden etabliert (Svab *et al.*, 1990; Svab und Maliga, 1993). Die Anwendung dieser Techniken führten bereits zur Identifizierung von Sequenzen, die für die RNA-Edierung plastidärer Transkripte notwendig sind (vgl. Kap. 1.2.2.2). Genetische Veränderungen an Mitochondrien *in planta* hingegen sind bislang aufgrund des Mangels an geeigneten Selektionsmarkern nicht möglich.

In vitro Systeme unter Verwendung von Lysaten der Mitochondrien könnten an Stelle der *in planta* Ansätze die Charakterisierung der an der RNA-Edierung beteiligten *cis*- wie *trans*-Faktoren ermöglichen. Der Nachweis der biochemischen Grundlage, der oxidativen Deaminierung der Cytosine im Verlauf der RNA-Edierung, konnte so bereits ermittelt werden (siehe Kap. 1.2.2.2). Bislang ist jedoch die Effizienz der Prozessierung in diesen *in vitro* Versuchen mit einer maximalen Edierungsrate von 6% (Araya *et al.*, 1992) relativ gering. Daher kann mit diesen Systemen keine eingehende Analyse des Einflusses von veränderten *cis*-Sequenzen auf die Edierungsrate vorgenommen werden.

Sowohl die Enzymkomplexe der Transkription, wie auch der Translation, sind in Mitochondrien mit Membranen assoziiert (Fox, 1996). Dies könnte die Ursache für die geringe Effizienz der Prozessierung in Lysaten der Mitochondrien sein. Im Gegensatz zur Edierungsrate in *in vitro* Versuchen (vgl. Kap. 1.2.2.2), sollte in intakten Organellen eine effiziente RNA-Edierung ablaufen, da alle an der Prozessierung beteiligten Faktoren in ihrem natürlichen Kompartiment vorliegen.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in isolierte pflanzliche Mitochondrien mittels Elektroporation auf Grundlage der Daten zu tierischen Mitochondrien (Collombet *et al.*, 1997) etabliert und charakterisiert werden. Zudem sollte ein System zu Aufrechterhaltung der *in organello* Transkription von tierischen Mitochondrien (Enríquez *et al.*, 1996) auf solche aus *Z. mays* übertragen werden. Neben der Synthese von mRNA sollte insbesondere das Spleißen der mitochondrialen Transkripte wie auch die RNA-Edierung in isolierten Mitochondrien untersucht werden.

Die Kombination des Einbringens von fremder oder veränderter DNA in die isolierten Mitochondrien in Verbindung mit der Transkription dieser Fremdgene könnte dann die Identifizierung und Analyse der an der RNA-Prozessierung beteiligten *cis*-Faktoren ermöglichen. Deshalb sollte zunächst die Transkription der in die Mitochondrien eingebrachten Fremdgene untersucht werden. Nachfolgend sollte die Analyse des Spleißens und der Edierung der Transkripte dieser Fremdgene in den isolierten Mitochondrien erfolgen. Durch Veränderungen der die Edierungsstelle umgebenden Sequenzen wäre so die Determinierung von potentiellen *cis*-Sequenzen möglich.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Bakterien:

Escherichia coli (K12) XL1-Blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1
 lac [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]^c
 Bullock *et al.*, 1987; Stratagene, Heidelberg

Pflanzen:

Arabidopsis thaliana Linie Columbia 0
Sorghum bicolor Linie IS1112C
Zea mays Linie Kampala, Nickerson SA

2.1.2 Oligonukleotide

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und für die Sequenzierung von DNA, für die ortsgerichtete Mutagenese sowie zur Amplifizierung von Transkripten wurden die in Tab. 1 aufgeführten Oligonukleotide bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']	Spezifität
FK75	CCA AAT GCA TGG CAA TCC TT	<i>S. bicolor</i> , <i>Z. mays atp6</i>
FK98	CCA GAC CGG TTA ATG CTA G	<i>S. bicolor</i> , <i>Z. mays atp6</i>
FK102	TTT ATC GCG CTC ATC ATA ACC	<i>S. bicolor atp6-1</i>
FK343	CCG CAA AGG ATT GTT CAT GG	<i>Z. mays cox2</i>

Tab. 1 (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']	Spezifität
FK344	ACG TGA TTG ACC CAA TTC TGG	<i>Z. mays cox2</i>
FK351	GGG GGG <u>CGG CCG</u> GCG CCT TAC CAC ACC AAC CAC C	<i>A. thaliana cox2</i>
FK352	GGG GGG <u>CGG CCG</u> CCT GAG GCA AAG GCG AAT CCC	<i>A. thaliana cox2</i>
FK356	GCT GTA CCT GGT CGT TTA AAT CAA	<i>A. thaliana cox2</i>
FK357	GAT TAA TTG ATT GGA TAC CCG AGA AC	<i>A. thaliana cox2</i>
FK433	GGG <u>GGA TCC</u> CCA ACT CTA CCC ACG CTT CGG	<i>Z. mays atp6 5' NCS</i>
FK434	GGG <u>GAT ATC</u> GTA CAG ATC TCT TAG AGG CTG	<i>Z. mays atp6 5' NCS</i>
FK435	GGG <u>AAG CTT</u> TAG CAT TAA CCG GTC TGG AAT TAG	<i>Z. mays atp6 3' NCS</i>
FK436	GGG <u>GGA TCC</u> AAC ACA AGC AAG TTG AAC TTA C	<i>Z. mays atp6 3' NCS</i>
FK441	GGG <u>CTC GAG</u> CCA ACT CTA CCC ACG CTT CG	<i>Z. mays atp6 5' NCS</i>
FK442	GGG <u>GGA TCC</u> CAT CTC ATC GTA CAG ATC TCT TAG	<i>Z. mays atp6 5' NCS</i>
FK443	GGG <u>GGA TCC</u> GAC AGT ATA GCT CAT ATG AG	<i>S. bicolor atp6 „prepiece“</i>
FK444	GGG <u>GGA TCC</u> TTT CTT TCA CGG TAA CTG CC	<i>S. bicolor atp6 3' NCS</i>
FK457	GGG <u>ATA TCA</u> TGG ACA GTA TAG CTC ATA TGA G	<i>S. bicolor atp6 „prepiece“</i>
FK458	GGG <u>AGC TTT</u> TAC TCA TTT TGA TGG AGA TTT G	<i>S. bicolor atp6 „core“</i>
FK498	GGG <u>TCG AGC</u> ATA GAA GTC AGA GAG GGA GGA A	<i>S. bicolor atp6 5' NCS</i>
FK500	GGG <u>ATA TCA</u> GCC CCT TGG ATC AAT TTG GAA	<i>S. bicolor atp6 „core“</i>
FK501	CCG <u>ATA TCT</u> TTC TTT CAC GGT AAC TGC CTA	<i>S. bicolor atp6 3' NCS</i>
FK503	CCG <u>ATA TCT</u> TCT GTT ACT GGT CCG CCG CCT CC	<i>Z. mays atp6 „prepiece“</i>
FK529	GGG <u>ATA TCT</u> ACA GGT TCG TCG CCT CCA G	<i>S. bicolor atp6 „prepiece“</i>
FK530	GGG <u>ATA TCA</u> GCC CAT TGG ATC AAT TTG GAA TTC	<i>Z. mays atp6 „core“</i>
FK531	GGG <u>ATA TCC</u> TAT GAT TGG CTC CTC GTT TTT ATG C	<i>Z. mays atp6 „core“</i>

Tab. 1 (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']	Spezifität
FK532	GGC CCG GGA GTC ATT TTG CAT AAT TGC ATA AAA AC	<i>S. bicolor atp6</i> 3' NCS
FK553	TAA TAC TAC TAG GCC CCA CCA C	<i>S. bicolor atp9</i>
FK554	AGA ACG GAT2 GGT GGT CAG CAT	<i>S. bicolor atp9</i>
FK566	ACC ATC TTT CCT AGT ATC ATC TCG A	<i>A. thaliana cox2</i>
FK573	CCA TAT GTA GTT CTC TTC CAG	<i>S. bicolor atp6</i> 3' NCS
FK576	AAG ATA GAT ACC TAC TTA AGT TTG	<i>S. bicolor atp9</i>
FK683	ACAGCTCCAGCCGCTCACTG	<i>A. thaliana cox2</i>
FK592	GTG CCA AAT GCA TTT CAA TCC TT	<i>Z. mays atp6</i> 3' NCS
FK593	CGA AAC AAT GTC ATG TCG CG	<i>S. bicolor atp9</i>
FK660	GAT ATC ATG GAT AAC CAA TCC ATT TTC	<i>Z. mays nad9</i>
FK661	GAT ATC TTA TCC GTC GCT ACG CTG TTC C	<i>Z. mays nad9</i>
FK683	ACA GCT CCA GCC GCT CAC TG	<i>A. thaliana cox2</i> Intron

2.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.1.3 aufgeführt (Plasmidkarten siehe Anhang, Abb. 27 und 28).

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Charakteristik	Referenz
pAF1	<i>S. bicolor atp6-1</i>	Mullen <i>et al.</i> , 1992
pBluescriptII SK+	Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pMon	Derivat des pBluescript, T-Klonierungsvektor	Borovkov und Rivkin, 1997
pTE231	pMon-Derivat mit 728 bp inseriertem <i>gfp</i> -Fragment	Engmann, pers. Mitteilung
pFW224	Transposon <i>Restless</i>	Windhofer, 2002

Tab. 2 (Fortsetzung)

Plasmid	Charakteristik	Referenz
pTJ246	<i>A. thaliana cox2</i> Fragment in pBluescript	diese Arbeit
pJG257	<i>Z. mays atp6</i> 5'- und 3'-Bereich	diese Arbeit
pMS282	chimäres <i>atp6</i> Gen: 5' NCS <i>atp6</i> aus <i>Z. mays</i> mit „prepiece“, „core“ und 3' NCS des <i>atp6-1</i> aus <i>S. bicolor</i>	diese Arbeit
pIB306	chimäres <i>atp6</i> Gen: 5' und 3' NCS <i>atp6</i> aus <i>Z. mays</i> mit „prepiece“ und „core“ des <i>atp6-1</i> aus <i>S. bicolor</i>	diese Arbeit
pIB323	chimäres <i>atp6</i> Gen: 5' NCS <i>atp6</i> und „prepiece“ aus <i>Z. mays</i> mit „core“ und 3' NCS des <i>atp6-1</i> aus <i>S. bicolor</i>	diese Arbeit
pIB325	chimäres <i>atp6</i> Gen: „prepiece“ des <i>atp6</i> aus <i>Z. mays</i> mit 5' NCS, „core“ und 3' NCS des <i>atp6-1</i> aus <i>S. bicolor</i>	diese Arbeit
pIB334	chimäres <i>atp6</i> Gen: 5' und 3' NCS sowie „core“ des <i>atp6</i> aus <i>Z. mays</i> mit „prepiece“ des <i>atp6-1</i> aus <i>S. bicolor</i>	diese Arbeit
pMS381	<i>S. bicolor atp9</i> Gen	diese Arbeit

2.1.4 Membranen und Papiere

Filterpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Nylonmembran	Perkin Elmer, NEN Liefescience (Rodgau - Jügesheim)
Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell (Dassel)

2.1.5 Chemikalien

Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid 19:1	AppliChem (Darmstadt)
Cordycepin 5'-triphosphat	Sigma (München)
Digitonin	Fluka (Selze)
Hygromycin B	Calbiochem (Bad Soden)
Rinderserumalbumin	Serva (Heidelberg)
Oligomycin	Sigma (München)
MitoTracker Orange CM-H ₂ TMRos	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

Alle sonstigen Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen BioRad (München), Roche (Mannheim), Merck (Bad Soden), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

2.1.6 Radiochemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP spez. Aktivität: 110 Tbq/mmol (=3000 Ci/mmol); [$\alpha^{35}\text{S}$]-dATP spez. Aktivität: >37 Tbq/mmol (>1000 Ci/mmol); [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP spez. Aktivität: 30 Tbq/mmol (800 Ci/mmol) (Amersham Buchler)

2.1.7 Nährmedium für *Escherichia coli*

Zur Anzucht von *E. coli* (siehe 2.1.1) wurde autoklaviertes (121°C, 1 bar Überdruck) Luria-Bertani (LB) Medium (1% w/v Pepton, 0,5% w/v Hefeextrakt, 0,5% w/v NaCl, pH 7,5 mit NaOH) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Festmedium enthielt zudem 1,5% (w/v) Agar-Agar. Zur Selektion des Ausgangsstammes *E. coli* XL1 Blue wurde das Medium mit Tetracyclin (12,5 mg/l) versetzt. Zur Anzucht von Transformanten wurde das Medium in Abhängigkeit der vom Vektor (siehe 2.1.3) vermittelten Resistenz mit einem Antibiotikum (Ampicillin 50 mg/l) supplementiert. Für die „Blau-Weiss-Selektion“ wurde das Medium zusätzlich mit X-Gal (40 mg/l) und IPTG (0,2 mM) versetzt.

2.1.8 Enzyme

In Tab. 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Enzym	Firma
DNaseI	Roche (Mannheim)
DNaseI, RNase-frei	Roche (Mannheim), MBI Fermentas (Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen	Qbiogene (Heidelberg)
<i>DpnI</i> , <i>XcmI</i>	NewEngland Biolabs (Beverly, USA)
Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Mannheim)
Sequenase	United States Biochemical (Cleveland, USA)
T4-DNA-Ligase	Qbiogene (Heidelberg)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche (Mannheim), Qbiogene (Heidelberg)

2.1.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Denhardts (1x)	0,02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 0,02% (w/v) Ficoll, 0,02% (w/v) RSA
SSPE (1x)	180 mM NaCl, 10 mM Na-phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4
Taurin (1x)	28,5 mM Taurin, 0,5 mM EDTA, 89 mM Tris-HCl
TBE (1x)	100 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3
MOPS (1X)	20 mM MOPS, 5mM Na-acetat, 1 mM EDTA, pH 7,0
Aqua dest., DEPC-behandelt	0,1% (v/v) Diethylpyrokarbonat, Inkubation über Nacht bei 37°C, 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur- und Anzuchsbedingungen

Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor

Samen von *A. thaliana* und *S. bicolor* (siehe 2.1.1) wurden in Pflanzschalen auf Erde ausgebracht und in einem Licht-Dunkelzyklus (16 h Licht, PPFD (Photosynthetisch aktive Photonenfluss-Dichte) $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 8 h Dunkel) bei 25°C angezogen.

Escherichia coli

Die Anzucht der *E. coli*-Kulturen erfolgte auf LB-Festmedien (siehe 2.1.7) oder in LB-Schüttelkulturen (250 rpm) bei 37°C über Nacht.

Zea mays

Die Anzucht der etiolierten Sprosse von *Zea mays* (siehe 2.1.1) erfolgte, nach drei-stündigem Quellen des Saatguts, über 9-11 Tage in Hydrokultur in Vermiculit (Baustoffhandel Rieck, Neumünster) oder Isoself (Baustoffhandel BAHN, Kiel) bei 25°C im Dunkeln.

2.2.2 Transformation von *Escherichia coli*

Elektrokompetente *E. coli* Zellen (Stratagene, Heidelberg) wurden durch Elektroporation mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad, München) nach dem Protokoll des Herstellers transformiert. Die Transformation erfolgte hierbei unter Standardbedingungen (Spannung: 1,8 kV, Widerstand: 200Ω , Kapazität: $25 \mu\text{F}$) in einer Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 3 mm) mit 100 ng Plasmid-DNA oder 1/10 Volumen eines zuvor durch Filterblattdialyse oder Reinigung mit Hilfe des „Gelextraktions- und PCR-Reinigungs-Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, siehe Kap. 2.2.5) entsalzten Ligationsansatzes.

2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab erfolgte mit dem „NukleoSpin Plasmid“-Kit (Macherey-Nagel, Düren) ausgehend von 3 ml *E. coli* Übernachtskulturen (siehe 2.2.1) nach Angaben des Herstellers.

Größere Mengen Plasmid-DNA aus 25 ml Übernachtskulturen von *E. coli* wurden mit dem „JETstar Plasmid Midi Kit“ nach dem Protokoll der Firma Genomed (Löhne) isoliert.

2.2.3.2 Extraktion von Gesamt-DNA aus Pflanzen

Gesamt-DNA aus Pflanzen wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Lecellier und Sillar (1994) präpariert. Hierzu wurde Blattmaterial mit flüssigem Stickstoff im Mörser homogenisiert und mit Extraktionspuffer (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% w/v SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) versetzt. Nach einer ersten Phenolysierung durch Ausschütteln des Homogenats mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zum Abtrennen von Proteinen wurde der nach einer Zentrifugation (4°C, 13000 x g, 10 min) erhaltene wässrige Überstand zum Abbau der vorhandenen RNA mit DNase-freier RNaseA versetzt und bei 37°C über eine Stunde inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine weitere Phenolysierung mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch sowie eine nachfolgende Extraktion der Phenol-Anteile aus dem nach der Zentrifugation (4°C, 13000 x g, 10 min) erhaltenen wässrigen Überstand mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Die Fällung der DNA erfolgte mit 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol bei -80°C über mindestens 30 Minuten. Durch eine Zentrifugation (14000 x g, 4°C, 30 min) konnte ein Präzipitat erhalten werden, welches mit 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut durch Zentrifugation sedimentiert wurde. Das so erhaltene DNA-Präzipitat wurde nach dem Trocknen in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst.

2.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Die Isolierung von RNA aus Pflanzen in kleinem Maßstab erfolgte nach Hoge *et al.* (1982). Blattmaterial wurde unter Stickstoffkühlung im Mörser zerrieben und mit kochendem Lysepuffer (0,2 M Na-borat, 30 mM EDTA, 1% w/v SDS, pH 9,0) aufgeschlossen. Proteine wurden durch eine nachfolgende zweimalige Phenolysierung entfernt, die Nukleinsäuren anschließend mit 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat sowie 2,5 Volumen absolutem Ethanol über mindestens 30 Minuten bei -80°C gefällt. Die Präparation der RNA erfolgte dann, ausgehend von dem nach der Fällung der gesamten Nukleinsäuren erhaltenen Präzipitat, selektiv mit 2 M Lithiumchlorid bei 4°C über Nacht. Anschließend konnte die so angereicherte RNA durch eine Zentrifugation (14000 x g, 4°C , 30 min) sedimentiert und mit 70% (v/v) Ethanol von Salzresten gereinigt werden. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die RNA getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.2.4 Gelelektrophorese

2.2.4.1 DNA-Gelelektrophorese

DNA wurde in 0,8 bis 2%(w/v)-igen Agarosegelen in 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (vgl. 2.1.9) nach Sambrook *et al.* (1989) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente *Hind*III-hydrolysierte λ -DNA, ein 100 bp-Marker oder ein erweiterter 100-5000 bp-Marker (MBBL, Bielefeld).

2.2.4.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur Denaturierung wurde die aufzutrennende RNA zunächst mit Ladepuffer (56% v/v Formamid, 11% v/v MOPS (10X), 18% v/v Formaldehyd, 7% v/v Aqua dest., 7% v/v Glycerin, 0,5% w/v Bromphenol Blau, 0,5% w/v Xylencyanol) 5 min bei 60°C inkubiert und nachfolgend bei 4°C gehalten. Die Auftrennung erfolgte dann in 1%(w/v)-igen Formaldehyd-Agarosegele in MOPS-Puffer. Als Größenstandard wurde ein RNA-Marker (MBI Fermentas, Leon-Rot) verwendet.

2.2.4.3 Polyacrylamidgele

Die Sequenzanalyse erfolgte in vertikalen 5%-igen (w/v) Polyacrylamid-Harnstoffgelen mit Dickegradient (BioRad Sequigen Apparatur, BioRad, München) nach Herstellerangaben unter Verwendung von Taurin-Puffer (siehe 2.1.9). Während aller nach der Elektrophorese erfolgten Schritte (Waschen, Trocknen, Exposition) verblieb das Gel auf der mit Bind-Silan behandelten Glasplatte.

2.2.5 Reinigung und Gel-Elution von DNA

Die Reinigung von DNA aus einer PCR-Probe bzw. Ligation erfolgte ebenso wie die Elution von DNA aus einem Agarosegel mit dem „NucleoSpin Extract“-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

Alternativ wurde die Elution kleiner DNA-Fragmente nach der „Zentrifugations“-Methode nach Heery *et al.* (1990) bzw. der „freeze and squeeze“-Methode nach Thuring *et al.* (1975) vorgenommen.

2.2.6 Hydrolyse von DNA

Die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller (Qbiogene, Heidelberg) empfohlenen Puffer nach Sambrook *et al.* (1989).

2.2.7 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Enzyms SAP (Shrimps Alkalische Phosphatase) nach dem Protokoll des Herstellers (Roche, München).

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde unter Verwendung der T4-DNA Ligase nach Angaben des Herstellers (Roche, Qbiogene, Heidelberg) durchgeführt. Zur Klonierung von *Taq*-PCR Fragmenten wurde ein mit der Restriktionsendonuklease *XcmI* hydrolysierter

und damit mit T-Überhängen vorliegender Klonierungsvektor pMon (Borovkov und Rivkin, 1997) benutzt. *Pfu*-PCR-Produkte enthalten keine Adenin-Überhänge und wurden daher in den mit den Restriktionendonukleasen *EcoRV* oder *SmaI* (ergeben glatte Enden) linearisierten pBluescript II SK+ inseriert. PCR-Fragmente, die durch eine Amplifikation von Plasmid-DNA erhalten wurden, wurden zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (vgl. Kap. 2.2.5). Alternativ wurde die ursprüngliche Plasmid-DNA durch Hydrolyse (siehe Kap. 2.2.6) mit der Restriktionendonuklease *DpnI*, deren Aktivität von der Methylierung der DNA abhängig ist, entfernt.

Für weitere Klonierungen wurde linearisierte Vektor-DNA bei Ligationen mit phosphorylierten Enden, wie sie nach Hydrolyse von zwischenklonierten Fragmenten mittels Restriktionendonukleasen erhalten werden, zuvor dephosphoryliert (siehe Kap. 2.2.7), um eine Selbst- bzw. Religation des Klonierungsvektors auszuschließen.

2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA

DNA-Fragmente, die als Sonde zur DNA-DNA-Hybridisierung dienen, wurden mit Hilfe des „DECA prime II“ Kits (Ambion, Auston) unter Einsatz von [α - 32 P]-dCTP (siehe 2.1.6) nach dem entsprechenden Protokoll markiert. Überschüssige, nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt.

2.2.10 Southern-Blot und DNA-DNA-Hybridisierung

Im Anschluss an eine gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (vgl. 2.2.4) erfolgte nach 30-minütiger Denaturierung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, pH 13) und 30-minütiger Neutralisierung (2 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 5,5) der Transfer der DNA nach Southern (1975) mit 20x SSPE (siehe 2.1.9) auf eine Nylonmembran (siehe 2.1.4). Koloniefilter-Hybridisierungen wurden nach einer Methode von Grundstein und Hogness (1975) durchgeführt. Die Fixierung der DNA an der Membran erfolgte durch eine UV-Quervernetzung mit Hilfe des „*UV-Stratalinkers*“ (Stratagene, Heidelberg). Nach einer Vorhybridisierung (5x SSPE, 0,2% w/v SDS, 1x Denhards-Lösung, 50% v/v Formamid)

über etwa 2 Stunden bei 37°C erfolgte die Hybridisierung nach Zugabe der [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten DNA-Sonde (vgl. 2.2.9) über Nacht bei 37°C. Unspezifisch gebundene DNA-Sonde wurde durch Waschen der Membran in 5x SSPE (vgl. 2.1.9) und 0,2% (w/v) SDS bei einer Temperatur von 50 bis 70°C entfernt. Die Exposition der getrockneten Membran mit Fuji-Ray RX Röntgenfilmen erfolgte in Expositionskassetten („Quanta Fast Detail“, Dupont, Wilmington) bei -80°C für ein bis 20 Tage.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode Sanger *et al.* (1977). Hierzu wurde das „*Sequenase Version 2.0 Sequencing Kit*“ (United States Biochemical, Cleveland, USA) nach Vorschrift des Herstellers unter Verwendung von [$\alpha^{35}\text{S}$]-dATP (siehe 2.1.6) eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde die durch asymmetrische PCR (vgl. 2.2.12) erhaltene einzelsträngige DNA keiner Denaturierung unterzogen. Auftragssequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.12.1 Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte verändert nach Saiki *et al.* (1988) und Kawasaki und Wang (1998). Gesamt-DNA (60 ng) oder Plasmid-DNA (0,1 - 1 ng) wurden in einem Gesamt-Volumen von 50 μl in 1x PCR-Puffer (15 mM MgCl_2 , 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, Qbiogene, Heidelberg) mit 10 mM dNTPs (Qbiogene, Heidelberg) und je 5 pmol der Oligonukleotide sowie einer Einheit *Taq*-Polymerase (Qbiogene, Heidelberg) zur Amplifizierung im „*MiniCycler*“ (MJ Research Inc., Hess. Oldendorf), im „*PTC 100*“ (MJ Research Inc., Hess. Oldendorf) oder dem „*Mastercycler gradient*“ (Eppendorf, Hamburg) eingesetzt. Für Klonierungs-PCRs wurde an Stelle der *Taq*- die *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Das PCR-Programm sah eine Anfangsdenaturierung von 2 min bei 94°C vor. Anschließend folgten 43 Zyklen von Denaturierung (1 min, 94°C), Hybridisierung (1 min) und Elongation (72°C). Die Hybridisierungstemperatur wurde den

verwendeten Oligonukleotiden angepasst und betrug zwischen 50 und 58°C. Die Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur erfolgte, wenn nötig, im „Mastercycler gradient“ (Eppendorf, Hamburg). In Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase und dem zu amplifizierenden DNA-Fragment wurde die Elongationszeit gewählt.

2.2.12.2 Asymmetrische PCR

Um einzelsträngige DNA zur Sequenzierung von PCR-Produkten zu erhalten, wurde eine asymmetrische PCR durchgeführt. Hierzu wurde 0,2 bis 5 μ l aus einer vorhergehenden PCR als Matrize für eine nachfolgende PCR eingesetzt, bei der eines der Oligonukleotide im Überschuss vorlag (10 pmol : 0,04 pmol).

2.2.12.3 Inverse Polymerase-Kettenreaktion

Die inverse PCR wurde durchgeführt, um die eine bekannte Sequenz flankierenden DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Die Oligonukleotide wurden für die PCR von den bekannten Sequenzbereichen abgeleitet und sind in die Richtung der unbekannt Sequenz gerichtet. Als Matrize wurde Gesamt-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und anschließend mittels T4-DNA Ligase ligiert. Bei entsprechenden, mit sich selbst ligierten Molekülen erfolgte dann in der nachfolgenden PCR eine Amplifizierung durch die zugesetzte *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) ausgehend von den aus dem bekannten DNA-Bereich heraus gerichteten Oligonukleotiden.

2.2.12.4 Reverse-Transkription-PCR („One Step-RT-PCR“)

Zur Amplifikation von cDNA aus Gesamt-RNA wurde das „One Step RT-PCR Kit“ (Qiagen, Hilden) benutzt. Die Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die als Matrize eingesetzte RNA wurde zuvor mit einer RNase-freien DNaseI (Roche, München; MBI Fermentas, Leon-Rot) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt und nacher mittels PCR auf DNA-Kontaminationen mit spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

2.2.13 *In vitro* RNA-Synthese

Die Synthese von RNA *in vitro* erfolgte mit dem „T7 Transcription Kit“ (MBI Fermentas, Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers.

2.2.14 Mitochondrien-spezifische Methoden

2.2.14.1 Isolierung von Mitochondrien aus *Zea mays*

Die Präparation der Mitochondrien aus neun Tage alte, etiolierte Mais-Sprosse (vgl. 2.2.1) erfolgte nach Newton (1994). Hierzu wurden die Sprosse zunächst durch Besprühen mit Meliseptol (50% v/v Isopropanol, 0,5% v/v Glyoxal) und eine anschließende Inkubation (15 min) in Hypochlorit-Lösung (3% aktives Chlor) desinfiziert. Nach fünfmaligem Waschen des Materials mit kaltem Wasser erfolgte der Aufschluss in Puffer A (0,5 M Saccharose, 5 mM EDTA, 1% w/v BSA, 0,0175% v/v β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) im Mixer (Waring Blender) durch drei kurze Mix-Impulse (3 x 2 sec.). Nachdem grobe Bestandteile durch Filtrieren durch vier Lagen Mull abgetrennt worden waren, erfolgte eine differentielle Zentrifugation der Suspension. Der Überstand nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 x g (4°C) wurde erneut zentrifugiert (20 min, 15900 x g, 4°C). Das so erhaltene Sediment wurde in Puffer A resuspendiert, im Potter homogenisiert und auf diskontinuierliche Saccharosedichtegradienten (52%, 40%, 36% und 20% w/v Saccharose in Puffer A) gegeben. Durch die nachfolgende Ultrazentrifugation in einem Ausschwingrotor (Centricon T-1065, Kontron (Milan, Italien), Rotor TST 28.36, 24.000 rpm, 1 h, 4°C) konnten die Mitochondrien aufgereinigt werden. Nach dem Verdünnen der Mitochondrienfraktion mit Puffer A wurden die Organellen durch eine Zentrifugation sedimentiert (15 min, 9000 x g, 4°C). Die so erhaltenen Mitochondrien wurden mit Puffer A resuspendiert. Nicht sofort verwendete Organellen wurden mit Glycerin add 10% (v/v) versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.14.2 *In vitro* Elektroporation isolierter Mitochondrien

Die Elektroporation isolierter, pflanzlicher Mitochondrien erfolgte in Anlehnung an das Protokoll für tierische Mitochondrien (Collombet *et al.*, 1997). Isolierte Organellen wurden zuvor zweifach mit 0,6 M Saccharose gewaschen, mittels zehn-minütiger Zentrifugation (4°C, 10000 x g) sedimentiert und in 0,6 M Saccharose resuspendiert (Endkonzentration 300 µg Mitochondrienprotein (vgl. 2.2.15) in 25 µl 0,6 M Saccharose). Nach Zugabe von 3 µg Plasmid-DNA erfolgte die Elektroporation mittels „Gene Pulser II“ (BioRad, München) in Elektroporationsküvetten (Spaltbreite 1 mm). Soweit nicht anders angegeben, wurde die Elektroporation unter Standardeinstellungen mit einem Widerstand von 400 Ω, 25 µF Kapazität und einer Feldstärke von 18 kV cm⁻¹ durchgeführt. Die Organellen wurden anschließend in 0,6 M Saccharose aufgenommen und durch Zentrifugation (10 min, 10000 x g, 4°C) sedimentiert.

2.2.14.3 Solubilisierung der äusseren mitochondrialen Membran von Mitochondrien mittels Digitonin

Zur Solubilisierung der äusseren mitochondrialen Membran wurden die Mitochondrien nach der erfolgten Elektroporation mit 0,3 mg Digitonin pro mg Mitochondrienprotein bei 4°C inkubiert. Hieran schloss sich dann die DNaseI-Behandlung an.

2.2.14.4 Hydrolyse nicht DNaseI-geschützter Plasmid-DNA nach erfolgter Elektroporation von Mitochondrien

Mitochondrien wurden im Anschluss an eine Elektroporation mit 10 µg DNaseI in 100 µl DNase-Puffer (0,6 M Saccharose, 1 M Natriumacetat, 50 mM Magnesiumsulfat, pH 5,0) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNaseI durch eine 30-minütige Behandlung mit 25 µg Pronase in 180 µl Pronase-Puffer (1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) bei 37°C für 15 min inaktiviert.

2.2.14.5 *In organello* Inkubation von Mitochondrien

Auf Grundlage der Daten von Enriquez *et al.* (1996) wurde die *in organello* Inkubation isolierter Mais-Mitochondrien vorgenommen. Der verwendete *in organello*-Puffer (25 mM Saccharose, 75 mM Sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4 , 50 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Glutamat, 2,5 mM Malat, 10 mM Tris, pH 7,4) enthielt, so nicht anders angegeben, 1 mM ADP. Die Inkubation der Organellen erfolgte nach einmaligem Äquilibrieren in einem Endvolumen von 500 μ l pro 250 μ g Mitochondrienprotein (vgl. 2.2.15) über ein bis fünf Stunden bei 25°C.

Zum Nachweis der Respirationsaktivität der isolierten Mitochondrien unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen wurde dem *in organello* Puffer der mitochondrienspezifische, erst in der oxidierten Form fluoreszierende Farbstoff MitoTrackerOrange CM-H₂TMRos (Molecular Probes, Leiden) in einer Enkonzentration von 25 nM zugegeben. Nach einer Äquilibrierung der Organellen in dem supplementierten Puffer und einer nachfolgenden Inkubation über 30 min bei 25°C wurden die Mitochondrien mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (vgl. 2.2.17).

Die Untersuchung der Transkriptionsaktivität der isolierten Mitochondrien in dem beschriebenen *in organello* Puffer erfolgte durch Inkubation der Mitochondrien (1 mg Mitochondrienprotein) in 500 μ l des mit 100 μ Ci [α ³²P]-UTP supplementierten Respirationspuffer über einen Zeitraum von bis zu drei Stunden.

2.2.14.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus Mitochondrien

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Mitochondrien wurden die Organellen (250 μ g Mitochondrienprotein, siehe 2.2.15) sedimentiert (10 min, 10000 x g, 4°C) und anschließend in 180 μ l Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 2% w/v) wurde eine Phenolysierung zur Entfernung der Proteine vorgenommen. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte mit Ethanol. Die so erhaltene DNA wurde in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert. Zur Präparation von RNA wurde diese aus der Lösung der Gesamt-Nukleinsäuren selektiv mit 2M Lithiumchlorid gefällt.

2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976) mit Hilfe des Proteinkonzentrations-Testsystems „*BioRad Protein Assay*“ (BioRad, München) in einem kolorimetrischen Gesamtproteinbestimmungstest. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin.

2.2.16 Enzym-Aktivitätsmessungen

2.2.16.1 Cytochrom-Oxidase

Die Aktivität der Cytochrom_c-Oxidase wurde photometrisch anhand der Änderung des Absorptionsverhaltens des Cytochrom_c in reduziertem und oxidiertem Zustand nach Collobet *et al.* (1997) bestimmt. Direkt vor der Messung wurde das Cytochrom_c reduziert. Nach Zugabe von 0,08 mM Cytochrom_c zu 1 ml Reaktionslösung (10 mM Kaliumphosphat, pH 7) konnte die Absorptionsänderung bei 550 nm gemessen werden.

2.2.16.2 Fumarase

Die Aktivitätsmessung der Fumarase, einem Leitenzym für die mitochondriale Matrix, wurde anhand der Absorptionsänderung aufgrund des Umsatzes von L-Malat photometrisch bei einer Wellenlänge von 240 nm bestimmt. Das Reaktionsgemisch enthielt je 20 μ l der Gradientenfraktion in 100 mM Tricin (pH 7,5) und 0,02% (v/v) Triton. Durch Zugabe von 5 mM Malat wurde die enzymatische Reaktion gestartet.

2.2.17 Mikroskopische Untersuchungen

2.2.17.1 Fluoreszenzmikroskopie

Der Nachweis der Respirationsaktivität der Mitochondrien *in vitro* erfolgte nach Inkubation der Organellen in einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (Molecular Probes, Leiden) supplementiertem *in organello* Puffer (vgl. 2.2.14) mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des „Axiophot“ Mikroskops (Zeiss, Je-

na) mit entsprechendem Filtersatz. Zur Aufnahme der mikroskopischen Abbildungen wurde die „ImageAccess“-Software in Verbindung mit einer Sony 3CCD Iriskamera eingesetzt.

2.2.17.2 Elektronenmikroskopie

Zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen erfolgte die Fixierung isolierter Mitochondrien über Nacht bei 4°C nach Elias und Miller (1975). Nach 2-maligem Spülen in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer wurde eine Behandlung mit 1% (w/v) OsO₄ über 1 h vorgenommen. Im Anschluss wurden die Proben 2-malig in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer über 5 min gewaschen, dann wurde das Material durch Inkubation in einer ansteigenden Ethanol-Reihe von 50% (v/v, 2 x 10 min), 70% (v/v, 2 x 10 min), 90% (v/v, 2 x 5 min) und 100% (v/v, 4 x 20 min) entwässert. Anschließend erfolgte das Trocknen in Propylenoxid (2 x 5 min). Nach 2 Stunden Inkubation in Epon/Propylenoxid (1:2) wurde die Probe in Epon/Propylenoxid (2:1) für 2 Stunden überführt (Tandler und Walter, 1977). Über Nacht wurde das Material in reinem Epon belassen. Nach dem Wechsel des Epons erfolgte nach weiteren fünf Stunden Inkubation die Einbettung. Im Anschluss an das Auspolymerisieren über 24 h bei 70°C wurden die Proben geschnitten (Reichert Ultracut S). Nach dem Nachkontrastieren mittels Uranylacetat erfolgten die mikroskopischen Aufnahmen am Philips CM 10 TEM mit „Kodak electron microscope 4489“ Filmen. Die Vorbereitung der Proben wurde, ebenso wie die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, von Fr. Dr. Pambor in der Zentralen Mikroskopie des Botanischen Instituts vorgenommen.

2.2.18 Auswertung von Nukleotid- und Protein-Sequenzen

Vergleiche der Primärstruktur von Proteinen, DNA und RNA erfolgten mit dem Programm CLUSTAL (Version W, Higgins und Sharp, 1988; Higgins *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1994). Das Auffinden homologer Bereiche in Protein-, DNA- sowie cDNA-Sequenzen in entsprechenden Datenbanken ermöglichten die BLAST-Algorithmen (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) sowie das FASTA-Programm (Pearson, 1990). Sämtliche aufgeführten

Programme stehen auf den Internet-Seiten des EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>) und der *SDSC Biology Workbench* (<http://workbench.sdsc.edu/>) zur Verfügung. Zur Berechnung der Sekundärstruktur von Transkripten wurde der mfold-Server (<http://www.bioinfo.rpi.edu/zuckerm/rna>) verwendet (Zucker, 2003).

2.2.19 Graphische Darstellung von Vektorkarten

Zur Darstellung von DNA-Sequenzen und Vektorkarten wurde das Programm CLONE Manager 4.1 (Scientific & Educational Software) verwendet.

2.2.20 Digitale Bildbearbeitung

Alle in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurden elektronisch erfasst und bearbeitet. Sie stimmen inhaltlich vollständig mit den Originaldaten oder Ergebnissen überein.

2.2.21 Sicherheitsbestimmungen

Die gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) erfolgten nach dem Gentechnikgesetz vom 01.07.1990.

3 Ergebnisse

In Anlehnung an die Erkenntnisse aus Arbeiten an tierischen Mitochondrien (Collombet *et al.*, 1996; Enríquez *et al.*, 1997) wurde ein System entwickelt, dass es ermöglicht, Fremd-DNA mittels Elektroporation in isolierte pflanzliche Mitochondrien einzubringen und die *in organello* Transkription sowie die Prozessierung dieser Transkripte zu untersuchen.

Zunächst wurde die Überprüfung der Reinheit der isolierten Mitochondrienpräparation sowie die Integrität der Organellen untersucht. Anschliessend wurde das *in organello* Transkriptions- und *in vitro* Elektroporationssystem charakterisiert, bevor die Transkripte der Transgene hinsichtlich der RNA-Edierung und des Spleißens analysiert wurden.

3.1 Isolierung pflanzlicher Mitochondrien

Aufgrund der Daten zur entwicklungsabhängigen Steigerung der Effizienz der RNA-Edierung in Maiskeimlingen (Grosskopf und Mulligan, 1996) wurde eine neuntägige Kultivierung der Maiskeimlinge vorgenommen. Mitochondrien aus etiolierten Sprossen von *Zea mays* wurden mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation in Anlehnung an Newton (1994) sowie Logan *et al.* (2001) angereichert (vgl. Kap. 2.2.14). Zur Identifizierung der Bereiche des Saccharosegradienten, die Mitochondrien enthalten, wurden Messungen der Aktivität von Enzymen, die in den Mitochondrien in der Matrix oder der Membran lokalisiert sind, vorgenommen. Eine Bestätigung der Identität und Integrität der so isolierten Organellen erfolgte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen. Zudem wurde die Atmungsaktivität der Organellen durch eine Vitalfärbung nachgewiesen.

3.1.1 Aktivitätsmessungen mitochondrialer Leitenzyme

Einige Enzyme sind spezifisch in Mitochondrien lokalisiert und können daher als Leitenzyme für diese Organellen verwendet werden. Hierzu zählen z.B. die Fumarase als charakteristisches Enzym der mitochondrialen Matrix sowie die Cytochrom_c Oxidoreduktase als Leitenzym der inneren mitochondrialen Membran. Die Aktivität des letzteren Enzyms wird durch den photometrisch messbaren Umsatz von reduziertem zu oxidiertem Cytochrom_c

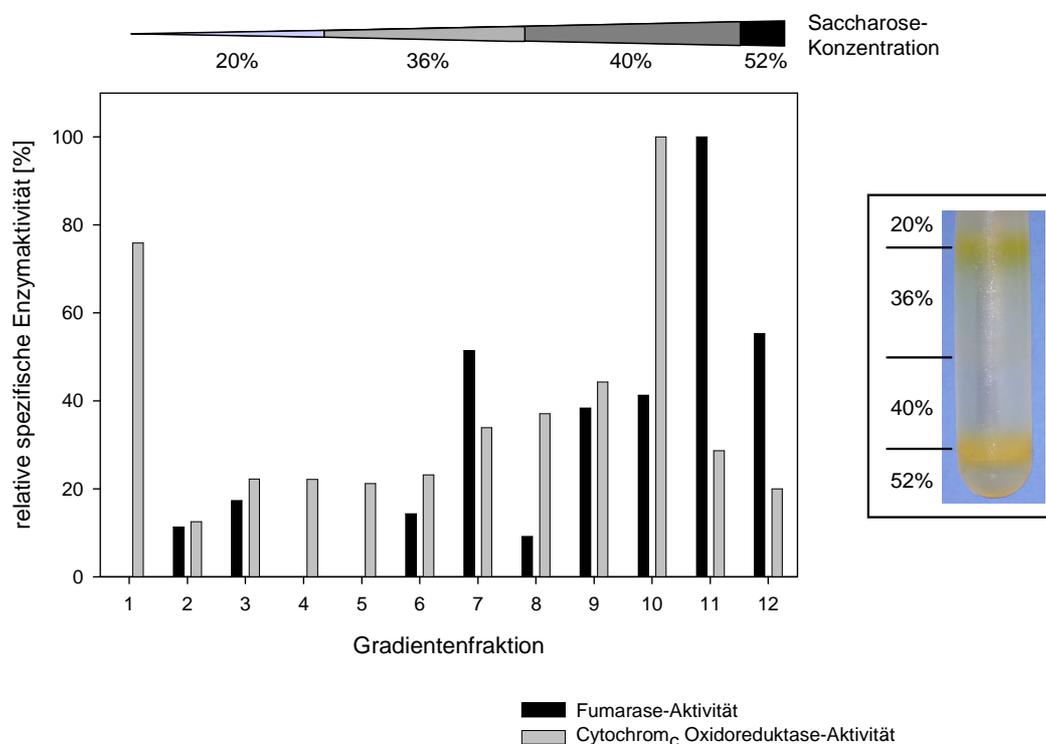


Abbildung 1: Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Mitochondrien-spezifischen Enzyme Fumarase sowie der Cytochrom_c Oxidoreduktase.

Isolierte Mitochondrien von *Z. mays* wurden in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (20%, 36%, 40% und 52% (w/v) Saccharose) aufgetrennt. 12 Fraktionen (je 1 ml) des Gradienten (rechts) wurden zur Ermittlung des Proteingehalts und der Enzymaktivitäten der untersuchten Leitenzyme entnommen. Die spezifischen, also auf den Proteingehalt bezogenen, Aktivitäten der Leitenzyme sind in Relation zur maximal gemessenen Enzymaktivität (= 100%) gesetzt.

Dargestellt sind die gemittelten Werte der Enzymaktivitäten von zwei Datensätzen zweier unabhängiger Präparationen der Organellen.

bestimmt. Da eine intakte äußere Mitochondrienmembran jedoch für das Substrat, das reduzierte Cytochrom_c nicht permeabel ist, kann es zu keiner Oxidation des Cytochrom_c durch die Cytochrom_c Oxidoreduktase kommen, wenn die Organellen intakt sind. Somit bietet dieser Nachweis zudem die Möglichkeit zur Analyse der Integrität der Mitochondrien. Zur Charakterisierung der Fraktionen des Saccharosegradienten wurden die Fraktionen daher verdünnt, so dass die Organellen nicht mehr osmotisch stabilisiert waren. Die matrix-

bzw. membranlokalisierten Enzyme der lysierten Mitochondrien sollten demnach den jeweiligen Substraten zugänglich sein.

Abb. 1 zeigt, dass bei einer Präparation von Organellen im analytischen Maßstab die maximale spezifische Aktivität der Cytochrom_c Oxidoreduktase sowie der Fumarase in den Fraktionen der Interphase von 40% zu 52% Saccharose gemessen wurde. Offensichtlich liegen in dieser Fraktion des Gradienten vermehrt Mitochondrien vor.

3.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der isolierten Organellen

Um einen zusätzlichen Nachweis der Identität der aus *Z. mays* Sprossen isolierten Organellen zu erhalten, wurden die Fraktionen der Interphasen des Saccharosegradienten bei 36%-40% (w/v) und 40%-52% (w/v) Saccharose im Anschluss an die Zentrifugation zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen verwendet (siehe Kap. 2.2.17).

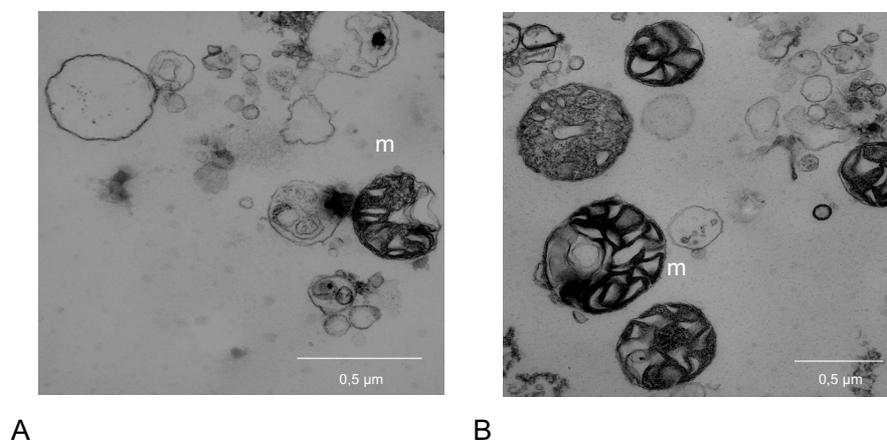


Abbildung 2: Nachweis der Identität der isolierten Organellen mittels Elektronenmikroskopie. Die Aufnahme der Fraktion der Interphase zwischen 36% und 40% (w/v) Saccharose weist lediglich Membranvesikel bzw. nicht mehr intakte Mitochondrien auf (A). Demgegenüber befinden sich in der elektronenmikroskopischen Abbildung der Interphase zwischen 40% und 52% (w/v) isolierte, durch die osmotisch aktive Saccharoselösung plasmolysierte Mitochondrien (B).

Erwartungsgemäß sind in der Fraktion zwischen 36% (w/v) und 40% (w/v) Saccharose (siehe Abb. 2) hauptsächlich Membranbestandteile bzw. nicht intakte Mitochondrien zu erkennen. Dem gegenüber zeigt das elektronenmikroskopische Aufnahme der Fraktion, die bei der Dichtegradientenzentrifugation zwischen 40% (w/v) und 52% (w/v) Saccharose bandiert, Strukturen (vgl. Abb. 2), die den Bildern von den unter ähnlichen Bedingungen isolierten Mitochondrien entsprechen (Logan *et al.*, 2001). Die durch die hohe Saccharosekonzentration „*plasmolysierten*“ Mitochondrien sind deutlich durch die Einfaltung der inneren Mitochondrienmembran zu erkennen.

Plastiden scheinen bei der Präparation aufgrund ihrer von der der Mitochondrien unterschiedlichen Dichte durch die Zentrifugation aus der Organellen-Suspension entfernt zu werden bzw. liegen nur noch als Membranvesikel vor. Auf eine Quantifizierung der Kontamination bzw. auf eine weitere Aufreinigung der Mitochondrien wurde verzichtet. Zum einen weichen die Daten zur erfolgreichen Elektroporation von Plastiden von denen für Mitochondrien ab (To *et al.*, 1996). Zum anderen ist der Editotyp der Plastiden von dem der Mitochondrien verschieden (siehe Kap. 1.2.2). Eine RNA-Edierung der *in organello* synthetisierten Transkripte der eingebrachten mitochondrialen Fremd-DNA sollte in Plastiden nicht erfolgen, wie von Sutton *et al.* (1995) bereits für Transkripte des *cox2* Gens gezeigt wurde.

3.1.3 Nachweis der Respirationsaktivität der Mitochondrien *in organello*

Die isolierten Mitochondrien aus *Z. mays* wurden für eine Vitalfärbung durch den für Mitochondrien spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (Molecular Probes, Leiden) eingesetzt. Der Farbstoff ist nur in seiner oxidierten Variante fluoreszierend, so dass eine Akkumulation in Mitochondrien und die nachfolgende Oxidation auf die Identität der Organellen, die Integrität der mitochondrialen Membran und die Oxidationsfähigkeit der Mitochondrien hinweisen.

Die isolierten Mitochondrien (1 μ g Mitochondrienprotein pro μ l *in organello* Puffer) wurden zum Nachweis der Respirationsaktivität in dem für tierische Mitochondrien entwickelten

in organello Puffer (Enríquez *et al.*, 1996) unter Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (Molecular Probes, Leiden) mit einer Endkonzentration von 25 nM inkubiert (siehe Kap. 2.2.14). Mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Kap.2.2.17) konnte gezeigt werden, dass es sich bei den isolierten Organellen um intakte, atmungsaktive Mitochondrien handelte (siehe Abb. 3). Die Mitochondrien waren unter diesen Inkubationsbedingungen, d.h. in dem verwendeten Puffer, in der Lage, den zugegebenen reduzierten Fluoreszenzfarbstoff innerhalb einer Zeitspanne von 30 Minuten aufzunehmen und zu oxidieren.

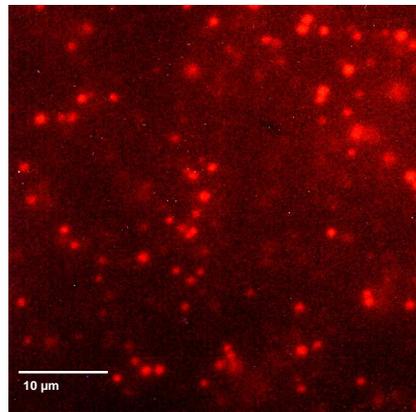


Abbildung 3: Nachweis der Respirationsaktivität isolierter Mitochondrien.

Die isolierten, über eine Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation angereicherten Mitochondrien (500 µg Mitochondrienprotein) wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten in einem *in organello* Puffer in Anwesenheit des in reduziertem Zustand farblosen, für Mitochondrien spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (Molecular Probes, Leiden) bei einer Endkonzentration von 25 nM inkubiert. Die im Fluoreszenzmikroskop beobachtete Orange-Fluoreszenz der Mitochondrien weist auf die erfolgte Aufnahme in die Organellen sowie Oxidation des Farbstoffs in den Mitochondrien hin.

3.2 Transkription und Prozessierung endogener mRNA in isolierten Mitochondrien von *Zea mays*

3.2.1 Mitochondriale Transkription *in organello*

Für die Untersuchung der Transkription fremder oder veränderter Gene ist eine Transkriptionsaktivität der isolierten Mitochondrien zwingend erforderlich. Die Analyse der Transkriptionsfähigkeit der Organellen in dem *in organello* System erfolgte durch den Nachweis der Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP in mitochondriale Transkripte in Abhängigkeit von der Zeit. Nach der Inkubation der Mitochondrien in dem mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP supplementierten *in organello*-Puffer (vgl. Kap. 2.2.14) über einen Zeitraum von 30 bis 180 Minuten wurde Gesamt-RNA isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.4). Wie die Abb. 4 des von dem RNA-Gel angefertigten Autoradiogramms zeigt, konnte eine stetige Zunahme höhermolekularer, radioaktiv markierter Transkripte in einem Zeitraum von drei Stunden beobachtet werden. Da dem Puffer neben UTP keine weiteren Nukleotide zugegeben wurde, ist der in den Organellen vorhandene Anteil an Nukleotiden offensichtlich ausreichend für die Synthese der Transkripte über drei Stunden.

Erwartungsgemäß erfolgt eine Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP nicht, nachdem die Organellen vor der mehrstündigen Inkubation fünf Minuten auf 100°C erhitzt wurden (siehe Abb. 4).

Für tierische Mitochondrien wurde in dem *in organello* System eine Hemmung der mitochondrialen Transkription durch erhöhte Konzentrationen von ADP festgestellt (Enríquez *et al.*, 1996). Wie Abb. 4 zeigt, erfolgte die radioaktive Markierung der Transkripte in isolierten Mitochondrien bei einer Konzentration von 1 mM ADP, wurde aber durch eine höhere ADP-Konzentration (5 mM, siehe Abb. 4) im Respirationspuffer negativ beeinflusst. Oligomycin, ein Hemmstoff der ATP-Synthase, hat einen negativen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität der isolierten Mitochondrien. Die Inkorporationsrate von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP ist bei Zugabe von Oligomycin (10 μg pro mg Mitochondrienprotein) im Vergleich zu der Kontrolle ohne Zugabe des Hemmstoffs (Abb. 4, K) über drei Stunden minimal. Die Inhibierung der ATP-Synthase sollte zu einer Reduzierung der Verfügbarkeit von ATP sowie

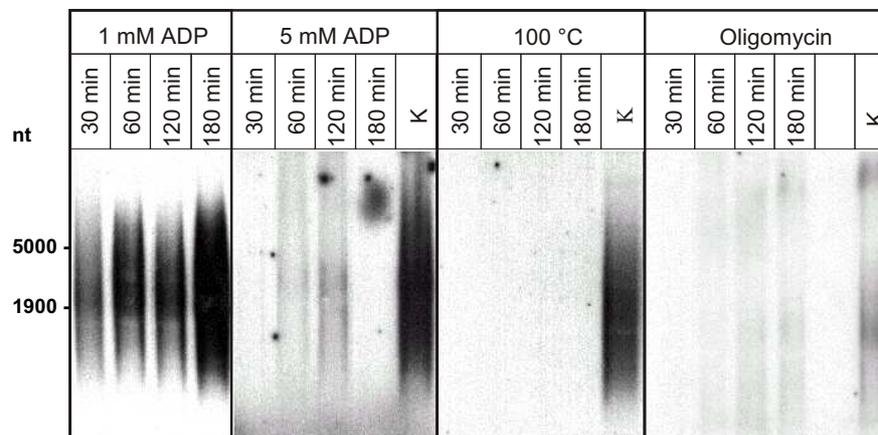


Abbildung 4: Nachweis der Transkriptionsaktivität isolierter Mitochondrien.

Zur Untersuchung des Einflusses der ADP-Konzentration auf die Transkription wurden isolierte Mitochondrien (1 mg Mitochondrienprotein) für einen Zeitraum von 30 bis 180 Minuten in einem mit $[\alpha^{32}\text{P}]$ -UTP versetzten *in organello* Puffer (je 500 μl) inkubiert. Der Puffer enthielt 1 mM respektive 5 mM ADP. Zum jeweiligen Vergleich wurde eine Kontrolle (K) unter Standard-Bedingungen inkubiert (1 mM ADP, 180 Minuten Inkubation). Die anschliessend isolierte Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abgebildet ist das Autoradiogramm des so erhaltenen RNA-Gels. Als Negativkontrolle wurden Mitochondrien verwendet, die vor dem Inkorporationsversuch erhitzt wurden. Der Nachweis der Beeinflussung der mitochondrialen Transkription durch den Redoxzustand der Organellen bzw. die Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthase erfolgte durch Inhibierung der ATP-Synthase mittels Oligomycin (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Mitochondrienprotein). (K: Kontrolle mit 1 mM ADP ohne Oligomycin).

zu einer Veränderung des Redoxzustandes der Organellen führen. Demnach scheint die mitochondriale Transkription von der Aufrechterhaltung der oxidativen Phosphorylierung bzw. des Redoxzustandes der Organellen abhängig zu sein.

Die Anreicherung der Organellen über einen Saccharosedichtegradienten sowie die zuvor vorgenommene differentielle Zentrifugation sollte eine Kontamination der Mitochondrienfraktion durch isolierte Kerne sowie Etioplasten vermindern. Aufgrund der Inhibierung der Transkription in isolierten Organellen durch Oligomycin kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesenen Transkripte nicht auf transkriptionsaktive Kerne oder membran-

assoziierte, transkriptionsaktive Komplexe zurückzuführen sind. In diesem Fall sollte die *in vitro* RNA-Synthese nicht durch die Inhibierung der mitochondrialen ATP-Synthase gehemmt werden. Eine mögliche Kontamination der Mitochondrienfraktion durch transkriptionsaktive Etioplasten oder plastidäre Membranen ist jedoch nicht gänzlich auszuschliessen. Bakterielle Verunreinigungen der Mitochondrienpräparation konnten nicht nachgewiesen werden.

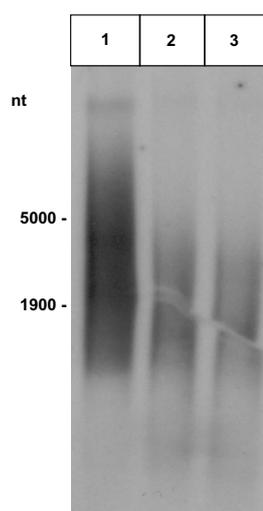


Abbildung 5: Cordycepin-vermittelte Inhibierung der Transkription in isolierten Mitochondrien von *Z. mays*.

Isolierte Mitochondrien (1 mg Mitochondrienprotein) wurden in dem mit $[\alpha^{32}\text{P}]$ -UTP supplementierten *in organello* Puffer (500 μl) über einen Zeitraum von 90 Minuten inkubiert. Zur Untersuchung des Einflusses von 3'-Deoxyadenosin 5'-triphosphat (Cordycepin) auf die Termination der Transkription in den Mitochondrien wurden 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2) sowie 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3) Cordycepin zugegeben. Isolierte Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt das von dem getrockneten RNA-Gel angefertigte Autoradiogramm.

Zur weiteren Charakterisierung der mitochondrialen Transkription *in vitro* wurde der verwendete *in organello* Puffer mit unterschiedlichen Mengen an 3'-Deoxyadenosin 5'-triphosphat (Cordycepin 5'-triphosphat) versetzt. Cordycepin wird durch die RNA-Polymerase in die in der Synthese befindlichen Transkripte eingebaut. Aufgrund des Fehlens der 3'-OH Gruppe verhindert Cordycepin die weitere Elongation der Transkripte. Zum Nachweis

der Transkription in den isolierten Mitochondrien wurde der Puffer zudem mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP supplementiert (s.o.). Nach einer Inkubation der isolierten Organellen (1 mg Mitochondrienprotein) in dem mit 10 μg , 50 μg oder 100 μg Cordycepin pro ml versetzten *in organello* Puffer über einen Zeitraum von 90 Minuten wurde Gesamt-RNA extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wie das Autoradiogramm des so erhaltenen RNA-Gels (siehe Abb. 5) zeigt, konnte bei Zugabe von 50 μg pro ml Corycepin (Abb. 5, 2) eine deutliche Reduktion der Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP im Vergleich zur Probe mit 10 μg pro ml Cordycepin (siehe Abb. 5, 1) beobachtet werden. Eine weitere Reduktion der UTP-Inkorporation ist in dem Ansatz mit der doppelten Konzentration (Abb. 5, 3) zu verzeichnen. Demnach wird die mitochondriale Transkription auch durch diesen Hemmstoff beeinflusst.

3.2.2 Spleißen von *cox2* Primärtranskripten in isolierten Mitochondrien von *Zea mays*

Neben einigen anderen Prozessierungsreaktionen, die z.B. die Veränderung der 5'- und 3'-Enden mitochondrialer Transkripte durch endo- oder exonukleolytisch wirksame Nukleasen betreffen, ist das RNA-Spleißen in *cis* oder *trans* eine häufig vorkommende posttranskriptionelle Modifizierung von Primärtranskripten nukleärer, plastidärer wie auch mitochondrialer Mosaikgene.

Zum Nachweis des Spleißens endogener Transkripte in isolierten Mitochondrien wurde beispielhaft die Prozessierung der Transkripte des *cox2* Gens über einen Zeitraum von fünf Stunden untersucht. Das *cox2* Gen kodiert für die Untereinheit 2 der Cytochrom_c Oxidase. Es weist innerhalb der kodierenden Sequenz ein Intron der Gruppe II auf (Fox und Leaver, 1981). Durch Amplifikation der cDNA mit Oligonukleotiden, die jeweils innerhalb der Sequenzen der beiden Exonen positioniert sind und das Intron flankieren, ist eine Differenzierung der gespleißten von ungespleißten Transkripten anhand der Größe der Amplifikate möglich.

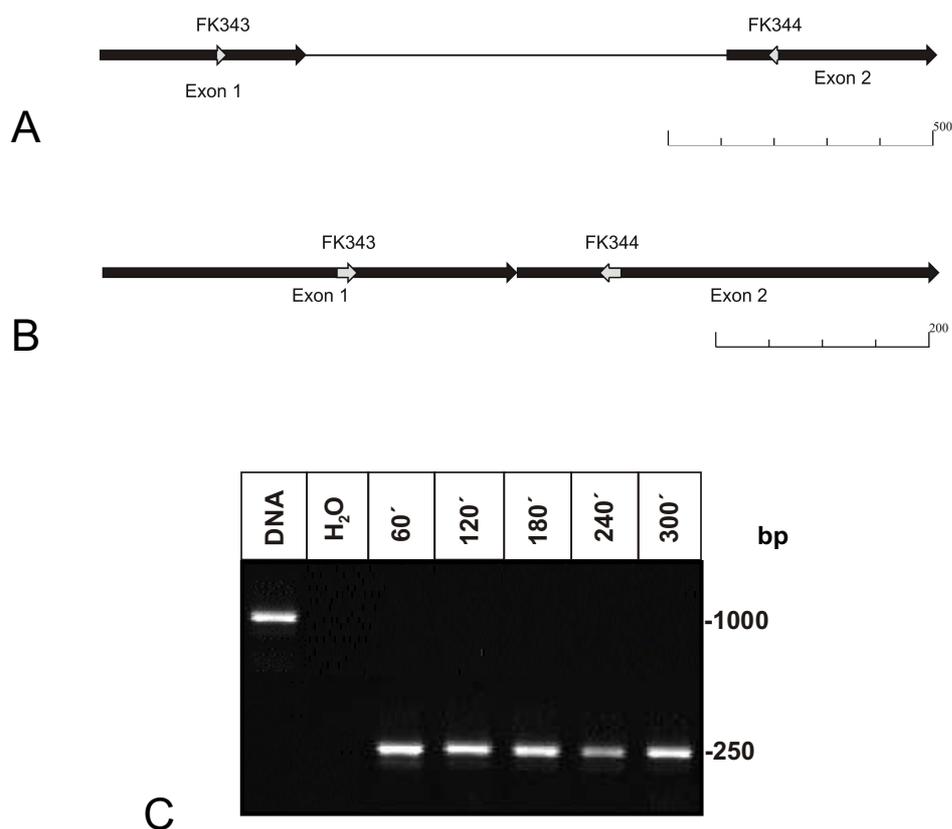


Abbildung 6: RNA-Spleißen von Transkripten des *cox2* Gens in isolierten Mitochondrien von *Z. mays*. Die schematische Darstellung des *cox2* Gens bzw. der ungespleißten (**A**) und der gespleißten *cox2* mRNA (**B**) von *Z. mays* verdeutlicht den Größenunterschied der zu erwartenden cDNA-Amplifikate. Die für die RT-PCR zur Amplifikation der cDNA verwendeten *cox2* spezifischen Oligonukleotide FK334/344 sind als Pfeile eingezeichnet. **C** Isolierte Mitochondrien wurden über einen Zeitraum von 60 bis 300 Minuten in *in organello* Puffer inkubiert. Die aus den Organellen isolierte RNA wurde, im Anschluss an eine DNase-Behandlung, als Matrize für die RT-PCR mit den *cox2* spezifischen, Intron-flankierenden Oligonukleotiden FK343/FK344 eingesetzt. Zudem wurde zum Vergleich eine PCR mit mtDNA als Matrize mit den Oligonukleotiden durchgeführt. Als Kontaminationskontrolle wurde eine RT-PCR ohne Zugabe von DNA oder RNA vorgenommen (H₂O).

Aus den über einen Zeitraum von einer bis zu fünf Stunden in dem *in organello* Puffer (vgl. Kap. 2.2.14) inkubierten Mitochondrien wurde Gesamt-RNA isoliert. Mit Hilfe der Intron-flankierenden Oligonukleotide FK343/FK344 konnte hiervon mittels RT-PCR (siehe Kap. 2.2.12) ein Fragment mit der Größe von 250 bp amplifiziert werden (siehe Abb. 6). Im Vergleich hierzu ergab die PCR mit DNA als Matrize ein Fragment von 1 kb. Die Größe dieses PCR-Produkts entspricht der zu erwartenden Größe eines RT-PCR Fragments, das von ungespleißter *cox2* mRNA amplifiziert wurde. Ein RT-PCR Produkt dieser Länge konnte jedoch in den RT-PCR Proben nicht nachgewiesen werden, obwohl die *in organello* RNA-Synthese durch Inkorporation von radioativ markiertem UTP in die mtRNA über die Zeit beobachtet wurde (vgl. Kap. 3.2.1). Demnach erfolgte das Spleißen der *cox2* Primärtranskripte in den Organellen sehr effizient. Es ist jedoch nicht gänzlich auszuschliessen, dass lediglich die Analyse der zum Zeitpunkt der Isolierung der Organellen gespleißt und über den Zeitraum stabil vorliegende *cox2* mRNA erfolgte.

3.2.3 *In organello* RNA-Edierung endogener Transkripte

3.2.3.1 RNA-Edierung der *nad9* Transkripte

Neben dem Spleißen von Primärtranskripten wurde zudem die RNA-Edierung endogener Transkripte untersucht. Für das *nad9* Transkript aus *Z. mays* sind bislang keine Edierungsstellen bekannt. Mögliche Positionen für eine C zu U Transition wurden daher durch Vergleiche publizierter *nad9* mRNA und DNA Sequenzen ermittelt.

Das bei *Z. mays* im Chondriom lokalisierte *nad9* Gen (NCBI „*Accession No.*“: AY506529) kodiert für die Untereinheit 9 der NADH-Dehydrogenase. Die kodierende Sequenz weist eine Größe von 573 Nukleotiden auf. Das davon abgeleitete Polypeptid besteht demnach aus 191 Aminosäuren. Die DNA-Sequenz des Gens ist zwischen verschiedenen Arten relativ hoch konserviert, wie der Vergleich der in den Datenbanken publizierten Sequenzen des *nad9* Gens von *Lupinus luteus* cv. Topaz (NCBI „*Accession No.*“: AF279446), *Lupinus angustifolius* cv. Mirela (NCBI „*Accession No.*“: AF279448), *Solanum tuberosum* (NCBI „*Accession No.*“: X79774), *Oryza sativa* (NCBI „*Accession No.*“: AB076666) und *Z. mays* zeigt (ohne Abb.).

```

Os ATGGATAACCAATTCATTTTCCAATATAGTTGGGAGATTTTACCCAAGAAATGGGTACAT 60
Zm ATGGATAACCAATCCATTTTCAAATATAGTTGGGAGATTTTACCCAAGAAATGGGTACAT 60
*****

Os AAAATGAAAAGATCGGAACATGGGAATAGATTTTATACCAATACTGACTACCTATTTCCTCA 120
Zm AAAATGAAAAGATCGGAACATGGGAATAGATCTTATACCAATACTGACTACCTATTTCCTCA 120
*****

Os TTGTTGTGCTTTCATAAATGGCATACTATACAAGGGTTCAAGTTTGATCGATATTTCG 180
Zm TTGTTGTGCTTTCATAAATGGCATACTATACAAGGGTTCAAGTTTCGATCGATATTTCG 180
*****

Os GGAGTGGATATATCCCTCTCGAAAACGAAGATTTGAAGTTGTCATAAATTTACTGAGTACT 240
Zm GGAGTGGATCATCCCTCTCGAAAACGCAGATTTGAAGTTGTCATAAATTTACTGAGTACT 240
*****

Os CGGTATAACTCAGCATTCTGTGTACAAACAAGTGCAGACGAAGTAAACGGAATATCTCCG 300
Zm CGGTATAACTCAGCATTCTGTGTACAAACAAGTGCAGACGAAGTAAACGGAATATCTCCG 300
*****

Os GTAGTCAGTCTATTTCATCAGCCGGCTGGTGGGAGCGAGAAGTATGGGATATGTTGGT 360
Zm GTAGTCAGTCCATTTCCATCAGCCGGCTGGTGGGAGCGAGAAGTATGGGATATGTTGGT 360
*****

Os GTTTCCTTCATCAATCATCCGGATTTACGCCGTATATCAACAGATTATGGTTTCGAGGGT 420
Zm GTTTCCTTCATCAATCATCCGGATTTACGCCGTATATCAACTGATTATGGTTTCGAGGGT 420
*****

Os CATCCATTACGAAAAGACTTTCCTCTGAGTGGATATGTGGAAGTACGCTATGATGATCCA 480
Zm CATCCATTACGAAAAGACTTTCCTCTGAGTGGATATGTGGAAGTACGCTATGATGATCCA 480
*****

Os GAGAAACGTGTGGTTTCTGAACCCATTGAGATGACCCAAGAATTTTCGCTATTTGATTTT 540
Zm GAGAAACGTGTGGTTTCTGAACCCATTGAGATGACCCAAGAATTTTCGCTATTTGATTTT 540
*****

Os GCTAGTCCTTGGGAACAGCGTAGCGACGGATAA 573
Zm GCTAGTCCTTGGGAACAGCGTAGCGACGGATAA 573
*****

```

Abbildung 7: Sequenzvergleich der kodierenden Bereiche des *nad9* Gens und der *nad9* cDNA von *Oryza sativa* und *Z. mays*.

Zur Ermittlung potentieller Edierungsstellen in den Transkripten des *nad9* Gens aus *Z. mays* wurde ein Vergleich der kodierenden *nad9* Sequenzen der DNA (NCBI „Accession No.“: AB076666) und abgeleiteten cDNA von *O. sativa* (Nishiwaki *et al.*, 1995) sowie der Sequenz des Gens aus *Z. mays* („Accession No.“: AY506529) vorgenommen. Die bekannten Edierungsstellen des *nad9* aus *O. sativa* sind, ebenso wie die durch die Sequenzierung der *nad9* cDNA von *Zea mays* ermittelten Positionen der Sequenz aus *Z. mays*, rot markiert.

Bislang sind die Edierungsstellen der *nad9* mRNA von *S. tuberosum* (Grohmann *et al.*, 1994; Lu und Hanson, 1996), *O. sativa* (Nishiwaki *et al.*, 1995) sowie einiger Arten der Gattung *Lupinus* (Rurek *et al.*, 2003) charakterisiert. In Abb. 7 ist ein Sequenzvergleich der *nad9* DNA Sequenz von *Z. mays* („Accession No.“: AY506529) mit der cDNA Sequenz des Transkripts von *O. sativa* (Nishiwaki *et al.*, 1995) gezeigt. Die Unterschiede von C zu T geben einen Hinweis auf die mögliche Präsenz von Edierungsstellen im *nad9* Transkript von *Z. mays*.

Zur Analyse der *nad9* Transkripte hinsichtlich potentieller Edierungsstellen wurden isolierte Mitochondrien einer Inkubation in dem Respirationspuffer (vgl. Kap. 2.2.14) über einen Zeitraum von drei Stunden unterzogen. Ausgehend von der aus den Organellen isolierten Gesamt-RNA wurde mit den *nad9*-spezifischen Oligonukleotiden FK660 und FK661 eine 570 bp große cDNA amplifiziert (ohne Abb.).

Dieses RT-PCR Produkt wurde, ebenso wie das ausgehend von mtDNA aus *Z. mays* amplifizierte PCR-Fragment, mit dem spezifischen Oligonukleotid FK660 sequenziert (siehe Kap. 2.2.11). Die so erhaltenen Sequenzdaten zeigen erstmals, dass das *nad9* Primärtranskript in Mitochondrien aus *Z. mays* einer RNA-Edierung unterliegt. An den Positionen 190 sowie 356 dominiert der Anteil von Cytosin gegenüber Thymin in der cDNA-Probe (vgl. Abb. 8), doch weisen die Ausschnitte der Chromatogramme der Sequenzierung deutlich auf vorhandenes Thymin hin. Insgesamt sind somit elf Edierungsstellen im Transkript des *nad9* Gens ermittelt worden. Jede dieser Stellen liegt nicht vollständig ediert vor, wie die Ausschnitte aus dem Chromatogramm der Sequenzierung (siehe Abb. 8) belegen.

Die Edierungsstellen der *nad9* mRNA von *Z. mays* sind in der Tabelle 4 vergleichend mit den bekannten acht Edierungspositionen des Transkripts von *Oryza sativa* (Nishiwaki *et al.*, 1995) zusammengefasst. Zudem verifiziert der Vergleich der so erhaltenen *nad9* cDNA Sequenz die aus den bekannten Sequenzdaten von *O. sativa* (Nishiwaki *et al.*, 1995) abgeleiteten Annahmen zur RNA-Edierung des Transkripts aus *Z. mays*.

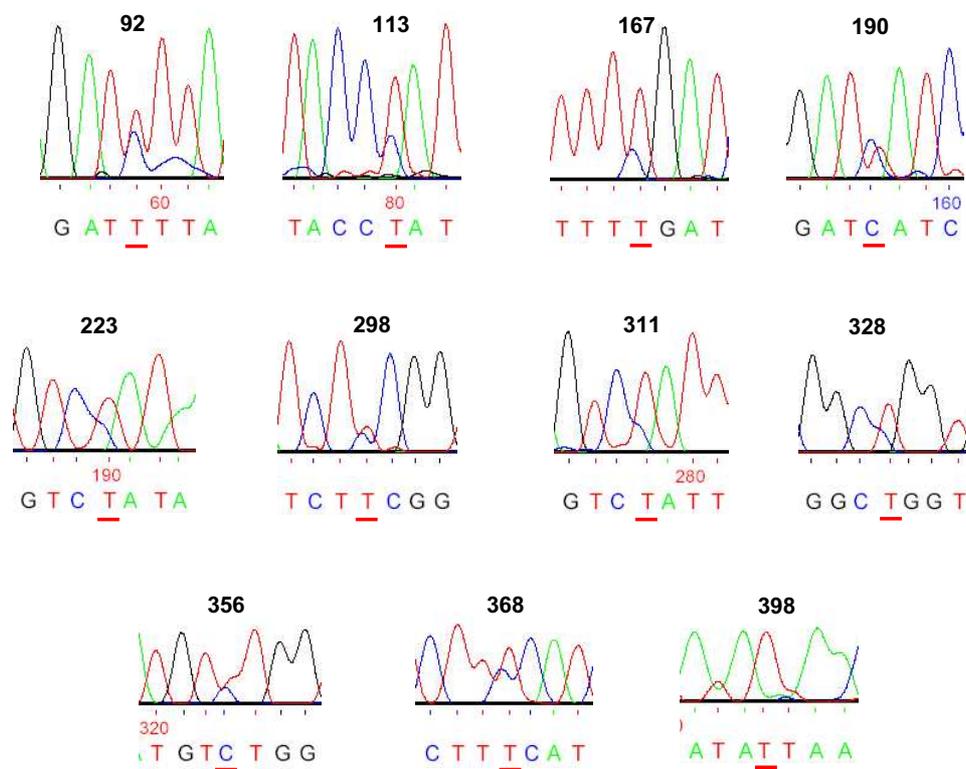


Abbildung 8: Nachweis der partiellen Edierung der *nad9* Transkripte in *Z. mays*.
Abgebildet sind Ausschnitte aus dem Chromatogramm der Sequenzierung des 570 bp großen *nad9* RT-PCR Produkts. Die Nummerierung der Edierungsstellen (unterstrichen) erfolgte relativ zum Startkodon der *nad9* mRNA.

Tabelle 4: Übersicht über die für *O. sativa* (Nishiwaki *et al.*, 1995) publizierten und die für *Z. mays* ermittelten Edierungsstellen des *nad9* Transkripts

(RNA-Edierungsstellen sind unterstrichen; Abk.: nb. = nicht bestimmt;

+ = ediert, T \gg C; (+) = ediert, C \gg T)

Position	Sequenz [5' - 3']	Edierung bei	
		<i>O. sativa</i>	<i>Z. mays</i>
14	AACCAAT <u>CC</u> CAT	+	nb.
92	AATAGAT <u>CTG</u> /TA	+	+
113	GACTAC <u>CC</u> CATT	+	+
167	CAAGTTT <u>C</u> GAT	+	+
190	AGTGGAT <u>C</u> ATC	+	(+)
223	AGTG/TGT <u>CC</u> CATA	+	+
298	AATATCT <u>CC</u> GG	+	+
311	GTCAGT <u>CC</u> ATT	+	+
328	AGCCG <u>GC</u> CGGT	+	+
356	GATATGT <u>CT</u> GG	+	(+)
368	CTTTCTT <u>CC</u> CAT	+	+
398	CGTATAT <u>CA</u> AC	+	+

3.2.3.2 Effiziente *in organello* RNA-Edierung der *atp6* mRNA

Über die nachweislich nur partiell erfolgte Edierung der *nad9* mRNA hinaus wurde zusätzlich die Transkriptprozessierung am Beispiel der mRNA des *atp6* Gens untersucht. Das *atp6* Gen kodiert für die Untereinheit 6 der mitochondrialen ATP-Synthase. Bisher sind lediglich die RNA-Edierungsstellen des *Z. mays atp6* Transkripts einer cytoplasmatisch sterilen Linie von *Z. mays* (Kumar und Lewings, 1993) bekannt.

Innerhalb der kodierenden Sequenz dieser *atp6* mRNA von 1245 bp befinden sich 18 Edierungsstellen (Kumar und Lewings, 1993). Ein Vergleich der DNA-Sequenz des *atp6* Gens von *Z. mays* (Linie BN, NCBI „Accession No.“: AY506529) und der cDNA (Linie B73,

cms-C; NCBI „*Accession No.*“: Z11843; Kumar und Lewings, 1993) weist auf deutliche Unterschiede der *atp6* Sequenzen dieser beiden Linien im 5'-Bereich der kodierenden Sequenzen hin. Diese Unterschiede in dem als „*prepiece*“ bezeichneten Abschnitt innerhalb des offenen Leserahmens ist typisch für die *atp6* Gene von Pflanzen (Mullen *et al.*, 1992). Diese Sequenz kodiert für eine N-terminale Extension des ATP6 Proteins mit unbekannter Funktion. Innerhalb des zwischen verschiedenen Arten konservierten Bereichs der kodierenden *atp6* Sequenz, „*core*“-Region genannt, sind beide Sequenzen einander ähnlicher. Auffällig sind Unterschiede von C zu T, die bei einem Vergleich von mRNA und DNA Sequenz auf eine potentielle Edierungsstelle hindeuten. Das *atp6* Transkript aus *Z. mays* (Linie NB) weist aufgrund des Sequenzvergleichs 18 potentielle Edierungsstellen auf. Auffällig ist die mögliche Edierung des Cytosins der *Z. mays* (Linie NB) *atp6* RNA an Position 1185, da sie zur Einführung eines Stopp-Kodons (CAA → TAA) führt, so dass das von dieser prozessierten mRNA abgeleitete Peptid um 15 Aminosäuren gegenüber dem von der Sequenz des Primärtranskripts abgeleiteten Proteins verkürzt ist.

Eine Edierung der *atp6* mRNA an Position 953 (bezogen auf das Startkodon) führt zum Austausch des Cytosins in der Sequenz 5' AAGCUC 3' durch ein Uracil, so dass die Basenfolge 5' AAGCUU 3' in der edierten mRNA zu einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HindIII* in der cDNA führt. Somit ist über die Hydrolysierbarkeit der *atp6* cDNAs ein erster Einblick in den Status der Edierung der zugrunde liegenden *atp6* Transkripte möglich.

Gesamt-RNA wurde aus den über einen Zeitraum von einer bis zu drei Stunden in dem *in organello* Puffer inkubierten Mitochondrien (siehe Kap. 2.2.14) isoliert. Mit den beiden innerhalb der kodierenden Sequenz gelegenen, *atp6* spezifischen Oligonukleotide FK75 und FK98 (vgl. Kap. 2.1.2, Position siehe Abb. 9, A) konnten 521 bp große RT-PCR Produkte amplifiziert werden (siehe Abb. 9, B). Anschliessend wurde die Hydrolyse (vgl. Kap. 2.2.6) der cDNA durch die Restriktionsendonuklease *HindIII* vorgenommen. Da annähernd alle *atp6* RT-PCR Produkte durch *HindIII* hydrolysiert wurden (vgl. Abb.9, B), ist auf eine fast vollständige Edierung der *atp6* mRNA an der hier betrachteten Edierungsstelle zu schliessen.

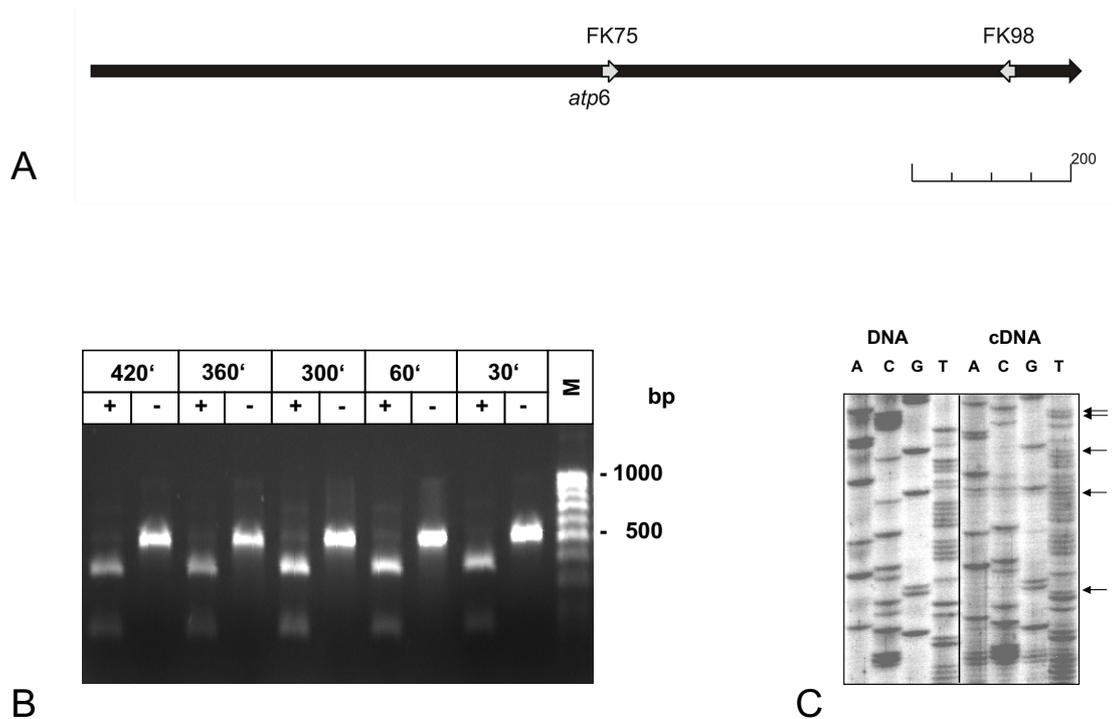


Abbildung 9: RNA-Edierung von Transkripten des *atp6* Gens in isolierten Mitochondrien von *Z. mays*. **A** Schema der kodierenden Sequenz (schwarzer Pfeil) des *atp6* Gens aus *Z. mays*. Die für die Amplifizierung der *atp6* cDNA verwendeten Oligonukleotide FK75 und FK98 sind als graue Pfeile dargestellt. **B** Gelelektrophoretische Auftrennung der *atp6* RT-PCR Produkte vor (-) und nach (+) einer Hydrolyse der Amplifikate durch die Restriktionsendonuklease *Hind*III. Die für die RT-PCR verwendete RNA wurde aus Mitochondrien isoliert, die über einen Zeitraum von 30 bis 420 min einer *in organello* Inkubation unterzogen worden waren. **C** Autoradiogramm des Sequenzgels nach einer Sequenzierung des *atp6* DNA sowie cDNA Amplikons. Die in der Sequenz der *atp6* cDNA verifizierten Edierungsstellen sind durch Pfeile hervorgehoben.

Dieser erste Einblick in den Edierungsstatus der *atp6* Transkripte wurde durch die Sequenzierung der cDNAs bestätigt. Das in Abb. 9 (C) dargestellte Autoradiogramm zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzreaktion. Sowohl das von RNA erhaltene RT-PCR Fragment, als auch das von DNA amplifiziertes *atp6* PCR-Produkt wurden sequenziert. Das Autoradiogramm dokumentiert die Sequenzunterschiede

Tabelle 5: Übersicht über die Edierungsstellen des *atp6* Transkripts aus *Z. mays* (CMS-C, Kumar und Levings, 1993) sowie die im *in organello* System beobachtete RNA-Edierung der *atp6* Transkripte.

(RNA-Edierungsstellen sind unterstrichen; Abk.: nb = nicht bestimmt, + = ediert)

Position	Sequenz [5' - 3']	Edierung <i>in organello</i>
480	ATATTGG <u>C</u> AAG	nb
515	TCCTTGT <u>C</u> TAT	nb
530	TCACTCT <u>C</u> GGT	nb
584	GGAAAGT <u>C</u> AGT	nb
635	TTCGTGCC <u>G</u> AA	nb
704	TGCATCT <u>C</u> GGT	+
722	ACTTTTT <u>C</u> GTT	+
730	GTTATTT <u>C</u> GTA	+
737	CGTAATCC <u>C</u> CA	+
738	GTAATCC <u>C</u> CAG	+
931	AATCTCT <u>C</u> ATT	nb
953	TTAAGCT <u>C</u> AGG	+
995	CATAGTT <u>C</u> AGT	nb
1124	GCTATAT <u>C</u> ACA	nb
1132	ACAAGCT <u>C</u> ATG	nb
1139	CATGTTT <u>C</u> TAC	nb
1148	ACGATCT <u>C</u> AAT	nb
1175	GATGCTA <u>C</u> AAA	nb.
1185	TCTCCAT <u>C</u> AAA	nb.

zwischen DNA und RNA an fünf Positionen, bei denen Cytosine in der DNA Sequenz durch Thymine in der cDNA Sequenz substituiert sind.

3.2.4 Edierung *de novo* synthetisierter RNA in isolierten Mitochondrien

Sowohl bei der Untersuchung des RNA-Spleißens der *cox2* mRNA (siehe Kap. 3.2.2), wie auch der RNA-Edierung der *atp6* Transkripte (vgl. Kap. 3.2.3) konnte eine effiziente Pro-

zessierung der Primärtranskripte in isolierten Mitochondrien in dem betrachteten Zeitraum von bis zu sieben Stunden nachgewiesen werden. In Hinblick auf den Nachweis der erfolgten Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP in synthetisierte Transkripte (vgl. Kap. 3.2.1) deutet dies darauf hin, dass auch die in isolierten Mitochondrien neu synthetisierte mRNA prozessiert wird. Nicht auszuschliessen ist jedoch, dass der Anteil stabiler Transkripte weit über dem der neu transkribierten mRNA liegt, so dass die Analyse der RNA-Edierung bzw. des RNA-Spleißens hauptsächlich auf bereits zum Zeitpunkt der Isolierung vorhandener prozessierter RNA beruht.

Zur Analyse der RNA-Edierung von Transkripten, die nachweislich während der *in organello* Inkubation (siehe Kap. 2.2.14) synthetisiert werden, erfolgte die *in organello* Markierung der sich im Zustand der Synthese befindlichen mtRNA mittels Biotin. Isolierte Mitochondrien aus Mais wurden hierzu in dem mit Biotin-16-UTP versetzten *in organello* Puffer inkubiert. Nach einer Inkorporation des Nukleotid in die neu synthetisierten Transkripte kann diese markierte RNA anschliessend aus dem Isolat der gesamten Nukleinsäuren selektiv über eine Interaktion mit Streptavidin angereichert werden. Hiermit kann ausgeschlossen werden, dass die Analyse der Prozessierung der Transkripte lediglich auf dem Nachweis der Stabilität bereits vor der Inkubation vorliegender edierter Transkripte erfolgt.

Durch Kontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass bei der Isolierung von markierter RNA auch nicht mit Biotin markierte RNA isoliert und untersucht wurde. Zum einen wurde RNA aus Mitochondrien, die in Abwesenheit von Biotin-16-UTP inkubiert worden waren, isoliert und mit paramagnetischen Partikeln versetzt. Darüber hinaus wurden Nukleinsäuren aus den mit Biotin-haltigem Puffer inkubierten Mitochondrien isoliert. Beide RNA-Fraktionen wurden, wie auch die Biotin-markierten und mit Magnetpartikeln versetzten RNA-Isolate, mehrfachen Aufreinigungen unterzogen. In beiden Kontroll-Ansätzen konnte während der anschließenden RT-PCR mit den *atp6* spezifischen Oligonukleotiden FK75 und FK98 keine *atp6* cDNA amplifiziert werden. Eine Kontamination der mit Biotin-markierten und an die paramagnetischen Partikel gebundenen RNA durch unmarkierte Transkripte konnte damit ausgeschlossen werden.

Nach der Inkubation der Organellen in dem mit Biotin-16-UTP supplementierten *in or-*

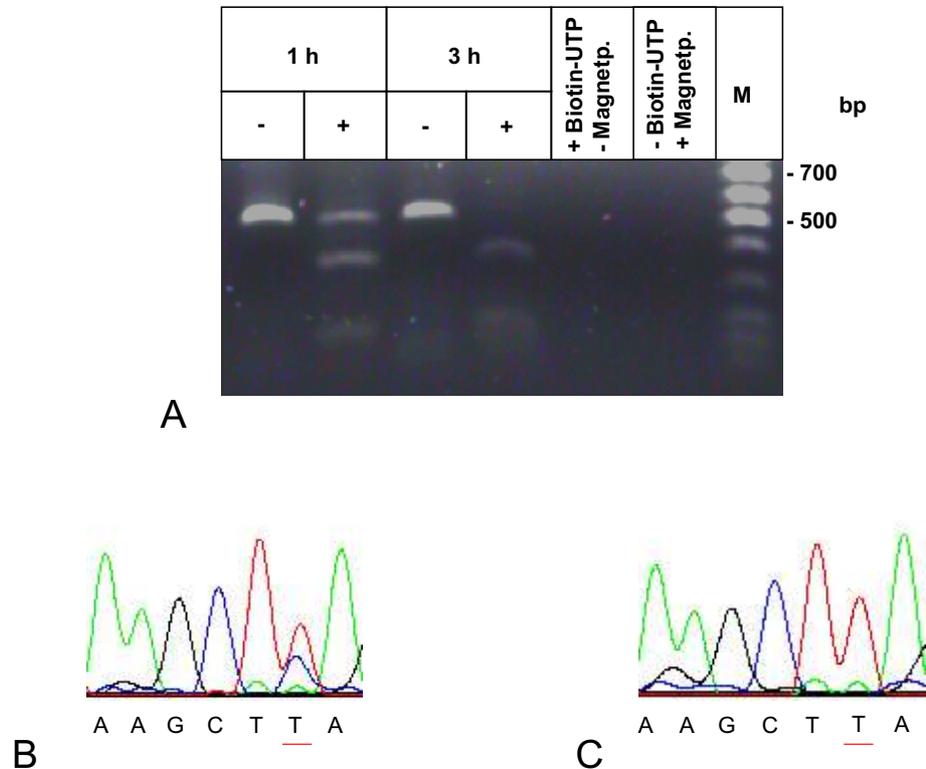


Abbildung 10: *In organello* RNA-Edierung von *de novo* synthetisierten Transkripten des *atp6* Gens in isolierten Mitochondrien von *Z. mays*.

A Auftrennung der RT-PCR Produkte nach Amplifikation der *atp6* cDNA ausgehend von isolierter, mit Biotin-UMP markierter Gesamt-RNA aus einer Inkubationsreihe der Mitochondrien über ein bzw. drei Stunden. Das 521 bp große RT-PCR Fragment wurde unbehandelt (-) und nach einer erfolgten Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease *Hind*III als Test auf die erfolgte RNA-Edierung aufgetragen. **B** Der Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung der cDNA-Produkte bestätigte die partielle Edierung der *atp6* Transkripte an Position 953 nach einer Stunde *in organello* Inkubation der Mitochondrien (**B**, Edierungsstelle ist unterstrichen). Dem gegenüber weist das Chromatogramm der Sequenzierung des RT-PCR Produkts nach einer drei stündigen Inkubationszeit der Organellen hingegen auf eine vollständig edierte *atp6* mRNA hin (**C**, Unterstriche: Edierungsstelle).

ganello Puffer über einen Zeitraum von einer und drei Stunden wurde die Gesamt-RNA aus den Organellen isoliert. Über die Interaktion von Streptavidin und Biotin konnten die Biotin-markierten mRNAs isoliert werden. Diese wurden dann für eine RT-PCR (siehe Kap. 2.2.12) mit den *atp6*-spezifischen Oligonukletiden FK75 und FK98 (vgl. Kap. 2.1.2)

eingesetzt. Nachfolgend erfolgte die Hydrolyse (siehe Kap. 2.2.6) der so erhaltenen 521 bp großen cDNA mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III. Die nach einstündiger Inkubation der Organellen extrahierte, Biotin-markierte RNA lieferte ein RT-PCR Produkt, das nicht vollständig durch *Hind*III hydrolysiert werden konnte. Die nur partiell erfolgte Edierung der *atp6* Transkripte wurde durch eine Sequenzierung des Amplifikationsprodukts bestätigt. Eine annähernd vollständige Hydrolyse konnte hingegen bei der RT-PCR Probe ermittelt werden, die von RNA aus den über drei Stunden inkubierten Mitochondrien erhalten wurde. Demnach lagen fast alle Transkripte des *atp6* Gens an der untersuchten Edierungsstelle prozessiert vor. Durch eine Sequenzierung der cDNA konnte dieser erste Eindruck über den Edierungsstatus bestätigt werden (siehe Abb. 10, B, C). Demnach nimmt der Grad der Edierung der *atp6* Transkripte über die Zeit zu.

3.3 Elektroporation isolierter Mitochondrien

Notwendige Voraussetzung für die Analyse der an der Transkriptprozessierung in intakten Mitochondrien beteiligten *cis*-Faktoren ist es, fremde oder veränderte DNA in die Organellen einzubringen. In Anlehnung an die vorliegenden Daten zur Elektroporation tierischer Mitochondrien von Collombet *et al.* (1997) wurde ein System für pflanzliche Mitochondrien etabliert und charakterisiert.

3.3.1 Abhängigkeit der *in vitro* Elektroporation isolierter Mitochondrien von der Feldstärke

Um die für eine Elektroporation pflanzlicher Mitochondrien optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurde die Feldstärke bei sonst konstanten Bedingungen variiert. Hierfür wurde die Standardeinstellung für die Elektroporation (400 Ω Widerstand und 25 μ F Kapazität) von den für tierische Mitochondrien (Collombet *et al.*, 1997) ermittelten Ergebnissen übernommen. Bei gleichbleibendem Plattenabstand des Kondensators (Spaltbreite der Küvette: 1 mm) wurde so eine Versuchsreihe mit steigender elektrischer Spannung vorgenommen. Um eine spezifische Detektion der in die Organellen eingebrachten DNA zu ermöglichen,

wurde das 3,7 kb große Plasmid pTE231 (siehe Kap. 2.1.3) verwendet. In diesem Plasmid liegt die für das GFP (grün fluoreszierende Protein) kodierende Sequenz im Klonierungsvektor pBluescript II SK+ (Stratagene, Leiden) vor (Engmann, pers. Mitteilung). Aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen der Plasmid-DNA und der mtDNA ist ein selektiver Nachweis der in die Organellen eingebrachten Fremd-DNA möglich.

Im Anschluss an die Elektroporation der Mitochondrien (jeweils 250 μg Mitochondrienprotein) mit gleichen Mengen Plasmid-DNA (je 3 μg) wurde nicht geschützte, freie Plasmid-DNA durch Inkubation des Ansatzes mit DNaseI hydrolysiert. Eine Inaktivierung der DNaseI (siehe Kap. 2.2.14) durch eine Behandlung mit Pronase (vgl. Kap. 2.2.14) ermöglicht

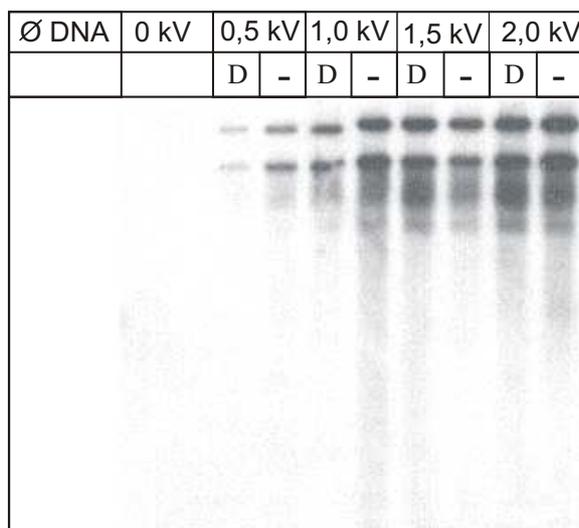


Abbildung 11: Untersuchung zur Lokalisation der durch Elektroporation in die Mitochondrien eingebrachten Plasmid-DNA in Abhängigkeit von der Feldstärke.

Isolierte Mitochondrien (250 μg Mitochondrienprotein) wurden in Anwesenheit von 3 μg Plasmid-DNA (pTE231) einer Elektroporation bei steigender Feldstärke (Spannung von 0 bis 2 kV) unterzogen. Im Anschluss an eine selektive Solubilisierung der äusseren mitochondrialen Membran mittels des Detergenzes Digitonin erfolgte die Hydrolyse der DNA mit DNaseI. Die dann vorliegende DNase-geschützte Gesamt-DNA wurde extrahiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und für einen Southern-Blot zur Hybridisierung mit einer radioaktiv Sonde gegen das verwendete Plasmid eingesetzt. Zum Vergleich wurden DNA-Proben aus den Digitonin-behandelten (D) wie unbehandelten (-) Mitochondrien aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden Mitochondrien ohne Zusatz von DNA einer Elektroporation ausgesetzt (Ø DNA).

nachfolgend die Isolierung der Gesamt-DNA. Der von der gelelektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-DNA angefertigte Southern-Blot (vgl. Kap. 2.2.10) wurde mit einer [$\alpha^{32}\text{P}$] radioaktiv markierten Sonde (siehe Kap. 2.2.9) gegen das Plasmid pTE231 hybridisiert. So konnte die nach der Elektroporation vorliegende, vor der Hydrolyse durch die DNaseI geschützte Plasmid-DNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 11).

Prämisse für die beabsichtigte Expression der in die Organellen eingebrachte Fremd-DNA ist die Lokalisation der rekombinanten DNA in der mitochondrialen Matrix. Nur so sollte eine Transkription der DNA des Fremdgens möglich sein. Die Untersuchung zur Lokalisation der Plasmid-DNA in den Mitochondrien im Anschluss an eine Elektroporation erfolgte nach Rasmusson *et al.* (1999). Das Detergenz Digitonin permeabilisiert unter den gewählten Bedingungen spezifisch die äußere Membran der Mitochondrien. Somit wird auch die nach einer erfolgten Elektroporation im Intermembranraum der Mitochondrien vorliegende Plasmid-DNA zugänglich für die zugesetzte DNaseI. Die im Anschluss an die Behandlung der Organellen mit Digitonin (siehe Kap. 2.2.14) extrahierte DNaseI-geschützte Gesamt-DNA wurde für die Anfertigung des Southern-Blots eingesetzt. Der Nachweis der zur Elektroporation verwendeten Plasmid-DNA (pTE231, s.o.) erfolgte durch eine Hybridisierung des Blots mit der [$\alpha^{32}\text{P}$] radioaktiv markierten Sonde gegen das Plasmid.

Eine Hybridisierung der Plasmid-Sonde mit hochmolekularer mtDNA erfolgte nicht (siehe Abb. 11, \emptyset DNA). Ohne vorhergehende Elektroporation wurde offensichtlich die gesamte eingesetzte Plasmid-DNA während der nachfolgenden DNaseI-Inkubation hydrolysiert. Ein Hybridisierungssignal ist in diesem Fall nicht zu beobachten (vgl. Abb. 11, 0 kV). Mit steigender Feldstärke lag eine zunehmende Menge Plasmid-DNA vor, die insensitiv gegenüber der Hydrolyse war. Dies ist aus der zunehmende Stärke der Hybridisierungssignale in Abhängigkeit von der Spannung zu schließen. Das Maximum an DNaseI-geschützter Fremd-DNA wurde im Anschluss an die Elektroporation der Organellen bei einer Spannung von 1,5 bis 2 kV, demnach bei einer Feldstärke von 18 bis 20 kV cm⁻¹ nachgewiesen.

Wie im Autoradiogramm in Abb. 11 dargestellt, konnten auch in der isolierten DNA der mit Digitonin behandelten Organellen Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Bei identischen Elektroporationsbedingungen lag in diesen Mitochondrien im Vergleich zu den unbehan-

delten Organellen weniger Plasmid-DNA vor. Mit steigender Feldstärke nimmt jedoch auch der Anteil an Plasmid-DNA in den so behandelten Proben zu. Folglich könnte die erhöhte Feldstärke mit einem Optimum von 18 bis 20 kV cm⁻¹ dazu führen, dass ein erhöhter Anteil der in die Mitochondrien eingebrachte Plasmid-DNA in der Matrix vorliegt.

3.3.2 *In vitro* Elektroporation von Mais-Mitochondrien in Abhängigkeit von der Größe der Plasmid-DNA

Das Einbringen von Fremd-DNA in isolierte Mitochondrien könnte von der Größe und der Konformation der verwendeten Plasmid-DNA abhängig sein. Dies würde für die nachfolgend geplanten Experimente zur heterologen Expression von Fremd-DNA in isolierten Mitochondrien eine Reglementierung in Bezug auf die Größe der in die Organellen einzubringenden DNA bedeuten.

Um zunächst den Einfluss der Konformation der zur Elektroporation isolierter Mitochondrien verwendeten DNA zu testen, wurde bei gleichbleibenden Elektroporationsbedingungen (Standardbedingung: 25 μ F Kapazität, 400 Ω Widerstand, 20 kV cm⁻¹ Feldstärke) Fremd-DNA in Form des Klonierungsvektors pBluescript II SK+ (vgl. Kap. 2.1.3) in linearisiertem sowie superspiralisiertem Zustand eingesetzt. Das Plasmid weist eine Größe von 3 kb auf. Die mit der Plasmid-DNA (je 3 μ g) vermischten Mitochondrien (jeweils 250 μ g Mitochondrienprotein) wurden nach der erfolgten Elektroporation (siehe Kap. 2.2.14) mit DNaseI inkubiert, um die nicht von einer Membran geschützte DNA zu hydrolysieren. Nach Inaktivierung der DNase durch Pronase wurde die gesamte DNA isoliert und gelelektrophoretisch (siehe Kap. 2.2.4) aufgetrennt. Der hiervon angefertigte Southern-Blot (vgl. Kap. 2.2.10) wurde mit einer [α ³²]P-markierten Sonde (vgl. Kap. 2.2.9) gegen das verwendete Plasmid hybridisiert.

In Abb. 12 ist das so erhaltene Autoradiogramm gezeigt. Sowohl bei Verwendung linearer wie auch kovalent geschlossener, zirkulärer pBluescript II SK+ Plasmid-DNA zur Elektroporation konnte in der isolierten Gesamt-DNA das Plasmid nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12, A). Obwohl der Vektor vor der Elektroporation zu 99% in der kovalent geschlossenen zirkulären Form vorlag, konnte offenzirkuläre sowie lineare Plasmid-DNA in der aus

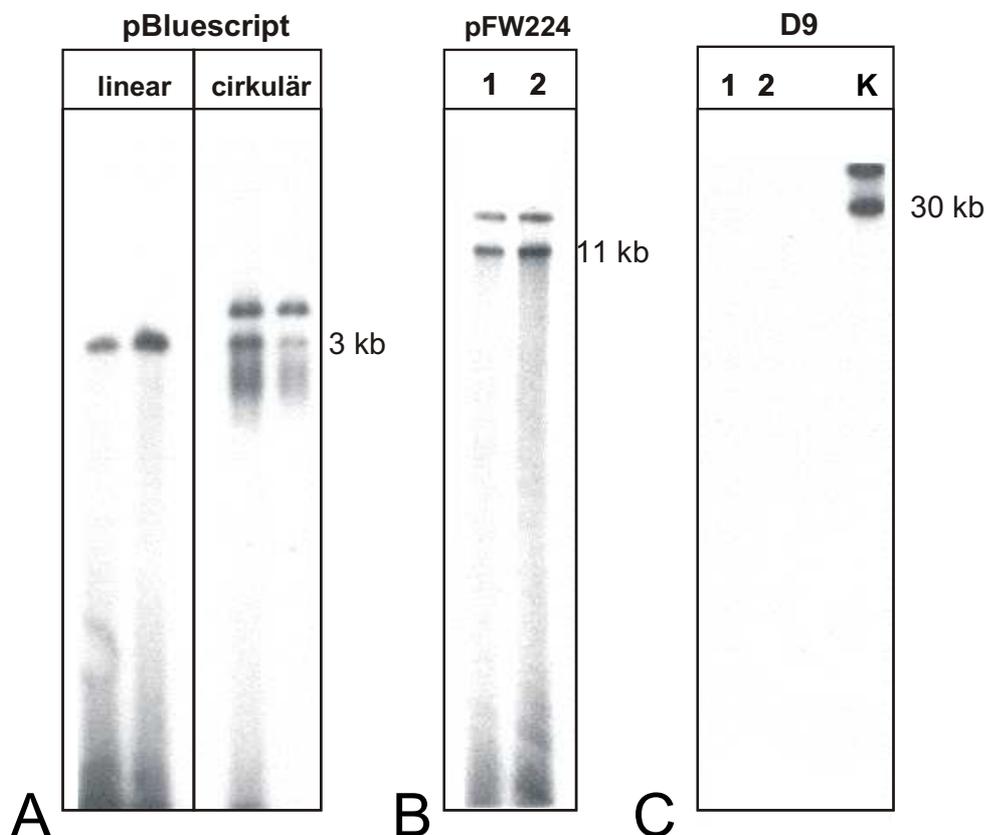


Abbildung 12: Effizienz der *in vitro* Elektroporation isolierter Mitochondrien in Abhängigkeit von der Konformation und Größe der verwendeten Plasmid-DNA.

Isolierte Mitochondrien ($250 \mu\text{g}$ Protein) wurden mit $3 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA für eine Elektroporation eingesetzt. Verwendet wurde lineare wie zirkulär geschlossene DNA des Klonierungsvektors pBluescript SK+ (3kb, Abb. A), das Plasmid pFK224 mit einer Größe von 11 kb (Abb. B) sowie das Cosmid D9 (30 kb, Abb. C). Die nicht DNaseI-geschützten Nukleinsäuren wurden nach Inaktivierung der DNase mittels Pronase im Anschluss an eine gelelektrophoretische Auftrennung für einen Southern-Blot eingesetzt. Nach einer Hybridisierung mit $[\alpha^{32}\text{P}]$ -markierten Sonden gegen die verwendeten Plasmide konnte das abgebildete Autoradiogramm erhalten werden. Es handelt sich jeweils um zwei unabhängige Elektroporationsversuche, bei C ist zum Nachweis der erfolgreichen Hybridisierung zusätzlich eine Positivkontrolle dargestellt (K).

den Organellen im Anschluss an die Elektroporation isolierten Gesamt-DNA nachgewiesen werden.

Der 11 kb große Vektor pFW224 und das 30 kb große Cosmid P9 (siehe Kap. 2.1.3) wurden ebenfalls zur Elektroporation der Organellen (vgl. Kap. 2.2.14) verwendet, um die

mögliche Limitierung der Elektroporation von Organellen durch die Größe der verwendeten Fremd-DNA zu untersuchen. Das Plasmid pFW224 sowie das Cosmid D9 enthalten Fremd-DNA aus Pilzen, so dass ein Nachweis der in die Organellen eingebrachten DNA ohne Kreuzreaktionen mit der mtDNA ermöglicht ist.

Das Plasmid pFW224 wurde unter den gleichen Bedingungen in der kovalent geschlossenen, zirkulären Form (ccc Form, „*covalently closed circular*“) zur Elektroporation von isolierten Mitochondrien eingesetzt. DNase-geschützte Plasmid-DNA wurde dann im angefertigten Southern-Blot (vgl. Kap. 2.2.10) durch eine [α^{32}]P-markierte Sonde (vgl. Kap. 2.2.9) gegen die Plasmid-DNA nachgewiesen. Auch hier konnte ein Hybridisierungssignal nachgewiesen werden, wie das Autoradiogramm in Abb. 12 (B) zeigt. Die Größe von 11 kb entspricht der linearisierten Form des Plasmids. Darüber hinaus sind Hybridisierungssignale im höhermolekularen Bereich erkennbar, was für das Vorhandensein von offenzirkulärer Plasmid-DNA nach der Elektroporation spricht. Demnach lag ein Teil des zur Elektroporation eingesetzten Plasmids in der linearen und offenzirkulären Form, wenig jedoch in der kovalent geschlossenen Konformation vor.

Im Gegensatz zu den 3 bzw. 11 kb großen Plasmiden konnte das Cosmid P9 (30 kb) nach einer Elektroporation in der isolierten Gesamt-DNA der Mitochondrien nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12, C).

Eine Hybridisierung der eingesetzten Sonden mit hochmolekularer DNA (mtDNA) wurde in keinem der durchgeführten Versuche beobachtet. Der Nachweis der eingesetzten Vektoren war demnach spezifisch. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Effizienz des Einbringens von Fremd-DNA in isolierte Mitochondrien mittels Elektroporation von der Größe der verwendeten Plasmid-DNA, nicht jedoch von deren Konformation abhängig ist. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die verwendete geschlossen-zirkuläre Plasmid-DNA im Anschluss an eine Elektroporation zum Großteil in der offen-zirkulären bzw. linearen Form vorkommt. Dies könnte einen Einfluss auf die geplante Transkription der eingebrachten Fremd-DNA haben.

3.4 Transkription exogener DNA in isolierten Mitochondrien und *in organello* Prozessierung fremder Transkripte

Wie in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt, ermöglicht das *in organello* System die Aufrechterhaltung der Transkription und der Prozessierung der mRNA in isolierten Mitochondrien über einen Zeitraum von bis zu sieben Stunden. Darüber hinaus konnte Plasmid-DNA *in vitro* mittels Elektroporation in isolierte Mitochondrien, vermutlich in die mitochondriale Matrix, eingebracht werden. Durch die Verbindung der *in vitro* Elektroporation mit der nachfolgenden transienten Transkription der so in die Organellen transferierten Fremd-DNA steht demnach ein System zur Verfügung, welches die Analyse der Transkription fremder oder veränderter Gene und der Prozessierung dieser Transkripte ermöglichen sollte.

3.4.1 Expression des *Arabidopsis thaliana cox2* Gens in Mitochondrien aus *Zea mays*

3.4.1.1 Klonierung des *cox2* Gens von *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund des beobachteten effizienten Spleißens endogener *cox2* mRNA in isolierten Mitochondrien von *Z. mays* erfolgte die Analyse der Transkription und Prozessierung von Transkripten eines in die Organellen eingebrachten Fremdgens am Beispiel der *cox2* Sequenz von *A. thaliana*.

Die mitochondrialen *cox2* Gene monokotyler wie dikotyler Pflanzen weisen meist ein Gruppe II Intron auf, welches die kodierenden Exone trennt. Bei den Angiospermen ist die Insertionsposition des Introns konserviert. Lediglich in zwei Linien der Dikotylen kommt das Gruppe II Intron nicht mehr im *cox2* Gen vor (De Benedetto *et al.*, 1992). Einige Angiospermen hingegen weisen ein weiteres, im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz gelegenes Gruppe II Intron auf (Lippok *et al.*, 1992; Unseld *et al.*, 1997; Qui *et al.*, 1998). Weder sind die Sequenzen beider Introns homolog, noch ist das Vorkommen des einen Introns abhängig von dem des anderen. Das *cox2* Gen von *Daucus carota* beispielsweise enthält

beide Introne (Lippok *et al.*, 1992). Bei *Z. mays* hingegen liegt nur das im 5'-Bereich der *cox2* Sequenz gelegene Intron vor (Fox und Leaver, 1981). Diese Insertionsposition ist für die *cox2* Sequenz der Monokotylen charakteristisch (Kudla *et al.*, 2002). Dem gegenüber befindet sich in der *cox2* Sequenz von *A. thaliana* das mit dem Mais *cox2* Intron nicht homologe Gruppe II Intron in dem 3'-Anteil der kodierenden Sequenz (Unselde *et al.*, 1997). Diese Divergenz der Introne zwischen *A. thaliana* und *Z. mays* sowie einige, wenn auch geringe Sequenzunterschiede innerhalb der kodierenden Sequenzen ermöglichen eine Analyse der Transkripte des heterolog in *Z. mays* exprimierten Gens aus *A. thaliana*.

Die zur Klonierung des *cox2* Gens von *A. thaliana* verwendeten Oligonukleotide FK351 und FK352 (siehe Kap. 2.1.2, Position der Oligonukleotide siehe Abb. 13) wurden aus der publizierten *A. thaliana* mtDNA Sequenz (NCBI „Accession No.“: NC 001284) abgeleitet. Im Hinblick auf mögliche weitere Verwendungen wurden am 5'-Ende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *NotI* eingefügt (vgl. Kap. 2.1.2). Mit diesen Oligonukleotiden wurde aus Gesamt-DNA (vgl. Kap. 2.2.3) von *A. thaliana* mittels PCR ein 3,2 kb großes Fragment amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pBluescript II SK+ kloniert. Das so erhaltene Plasmid pTJ246 (Plasmidkarte siehe Anhang, Abb. 27) enthält neben der 783 bp großen kodierenden Sequenz des *cox2* Gens das inserierte Gruppe II Intron (1344 bp) und zudem einen 579 bp großen Anteil des 5'- und einen 526 bp großen Sequenzabschnitt des 3'-Nichtkodierungsbereichs des Gens (vgl. Abb. 13).

Innerhalb des 5'-Bereichs findet sich an Position -210 relativ zum Startkodon die Sequenz 5' CGTA 3' (Staudinger und Kempken, 2003), die der Konsensussequenz mitochondrialer Promotoren (5' YRTA 3') entspricht. Zudem weist dieser Sequenzabschnitt im 3'-Anteil eine hohe Ähnlichkeit zum Promotor des *atp6* sowie *cox2* Gens (Lupold *et al.*, 1999) aus *Z. mays* auf (siehe Abb. 13, B). Weniger ähnlich ist diese mögliche Promotorsequenz des *cox2* Gens aus *A. thaliana* dagegen der Promotorsequenz des *cox2* Gens aus *P. sativum* (Kuhn und Binder, 2002) oder anderer bekannter Nonanukleotidsequenzen mitochondrialer Promotoren dikotyler Pflanzen (z.B. *atp9* aus *G. max* oder *P. sativum* (Hoffmann und Binder, 2002)).

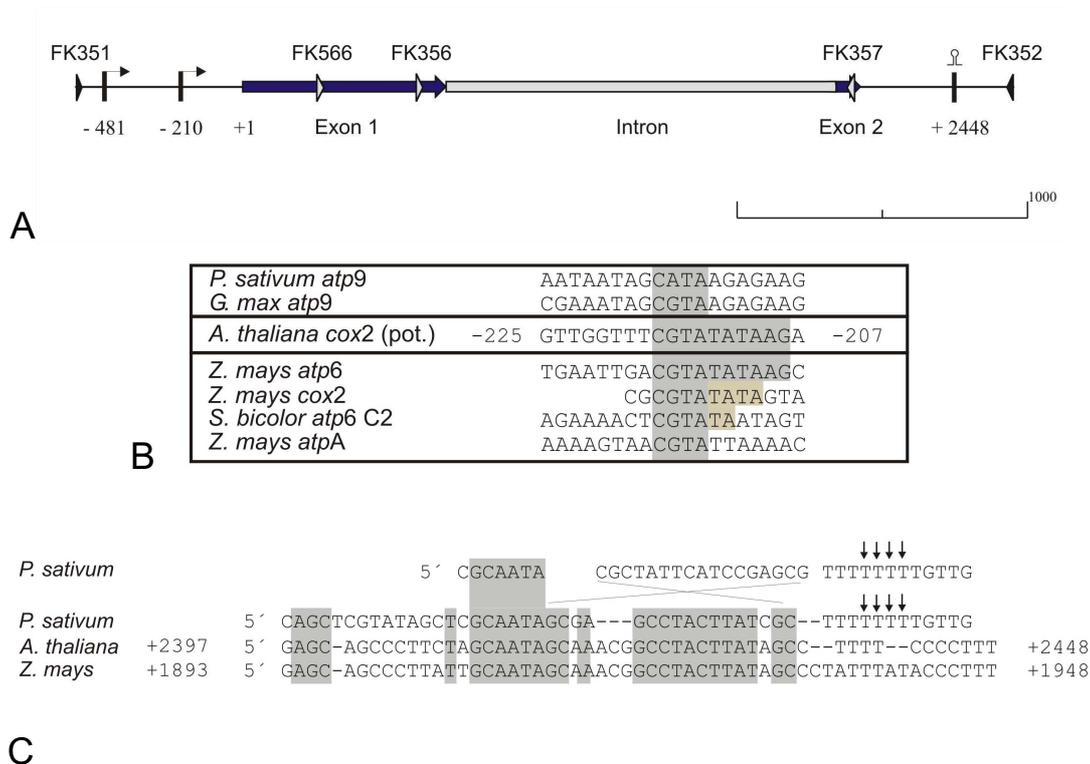


Abbildung 13: Übersicht über die Charakteristika des *cox2* Gens aus *A. thaliana*.

Die schematische Darstellung (A) des *cox2* Gens aus *A. thaliana* zeigt die Position des Introns (hellgrau) sowie die Lage und Größe der beiden Exonen (dunkle Pfeile). Die zur Klonierung des *cox2* Gens aus mtDNA von *A. thaliana* verwendeten Oligonukleotide FK351 und FK352 wurden von der in der Datenbank publizierte Sequenz des Chondrioms (NCBI „Accession No.“: NC 001284) abgeleitet und sind in die schematische Darstellung des klonierten *cox2* Fragments (A) eingefügt. Innerhalb der Exone sind die für die Analyse der Transkripte dieses klonierten Gens verwendeten Oligonukleotide FK566, FK356 und FK357 (helle Dreiecke) positioniert. Das klonierte Gen enthält 579 bp des 5'- und 526 bp des 3'-Nichtkodierungsbereichs. Innerhalb des Sequenzabschnittes im 5'-Bereich kommt an Position -210 relativ zum *cox2* Startkodon eine Sequenz mit Ähnlichkeit zur Konsensussequenz mitochondrialer Promotoren vor (Staudinger und Kempken, 2003). Der Vergleich dieser putativen Promotorsequenz mit charakterisierten Promotoren mitochondrialer Gene von *G. max atp9* (Dombrowski *et al.*, 1999), *P. sativum cox2* (Binder *et al.*, 1995), *S. bicolor atp6-C2* (Yan und Pring, 1997), *Z. mays atpA* (Rapp und Stern, 1992), *atp6* (Rapp *et al.*, 1993), *cox2* (Lupold *et al.*, 1999) ist in B dargestellt. Von den inzwischen charakterisierten Transkriptionsinitiations- und Prozessierungsstellen an den Positionen -210, -481 (Börner, pers. Mitteilung) liegen lediglich die Initiationsstellen an den Position -210 und -481 innerhalb des klonierten DNA-Abschnittes. Die Ähnlichkeit der charakterisierten Sequenzen am 3'-Ende der Transkripte des *cox2* Gens von *P. sativum* (Kuhn und Binder, 2002) und dem 3'-Nichtkodierungsbereich des klonierten *cox2* Gens aus *A. thaliana* sind in C abgebildet. Pfeile markieren die Prozessierungsstellen im 3'-Bereich.

Im 5'-Bereich des *A. thaliana cox2* Gens liegen mehrfache Initiations- und Prozessierungsstellen (Börner, pers. Mitteilung). Neben der bereits erwähnten potentiellen Promotorsequenz an Position -210 liegt eine weitere der insgesamt vier ermittelten Initiations- und Prozessierungsstelle an der Position -481 relativ zum Startkodon innerhalb des hier klonierten *cox2* Gens aus *A. thaliana* vor (vgl. Abb. 13, A). Eine Transkriptionsinitiation könnte in Anlehnung an die ermittelten Ähnlichkeiten der potentiellen Promotorsequenzen zwischen *A. thaliana* und *Z. mays* möglich sein.

Im 3'-Nichtkodierungsbereich des *A. thaliana cox2* Gens befindet sich ein Abschnitt, der eine Ähnlichkeit zum Ende des *cox2* Transkripts aus *P. sativum* (Kuhn und Binder, 2002) aufweist (siehe Abb. 13, C). Beim Vergleich der entsprechend homologen Sequenz aus *Z. mays* mit denen aus *P. sativum* (Kuhn und Binder, 2002) und *A. thaliana* (NCBI „Accession No.“: NC 001284) fallen einige konservierte Bereiche auf. Ausgehend von dem zwischen den drei betrachteten Sequenzen von *A. thaliana*, *P. sativum* und *Z. mays* konservierten Sequenzbereich kann eine Stamm-Schleifenstruktur ableiten werden. Möglicherweise führt der hier aufgezeigte Sequenzbereich zur Prozessierung des endogenen *cox2* Transkripts bei *Z. mays* ähnlich der des *cox2* Transkripts bei *P. sativum*. So könnte aufgrund des Vorkommens dieses Sequenzabschnitts in der 3'-Region des klonierten *cox2* Gens aus *A. thaliana* auch die *cox2* mRNA aus *A. thaliana* über diese Sequenz einer Prozessierung und Stabilisierung unterliegen, die folglich dann auch im heterologen System, in Mitochondrien von *Z. mays*, ablaufen könnte.

3.4.1.2 Transkription des *cox2* Gens aus *Arabidopsis thaliana* und Prozessierung der Transkripte des Fremdgens in Mitochondrien aus *Zea mays*

Obschon die kodierende Sequenzen der *cox2* Gene von *Z. mays* und *A. thaliana* eine hohe Homologie zeigen, finden sich ausreichend divergente Abschnitte, die eine spezifische Amplifikation der Transkripte des Transgens auch vor dem Hintergrund der endogenen *cox2* mRNA von *Z. mays* ermöglichen sollten. Das für die RT-PCR (vgl. Kap. 2.2.12) verwendete Oligonukleotid FK357 (siehe 2.1.2) liegt innerhalb eines solchen Abschnitts (siehe

Abb. 14) im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz des Exon 2, so dass die cDNA Synthese ausschliesslich aufgrund der RNA des Fremdgens erfolgen sollte.

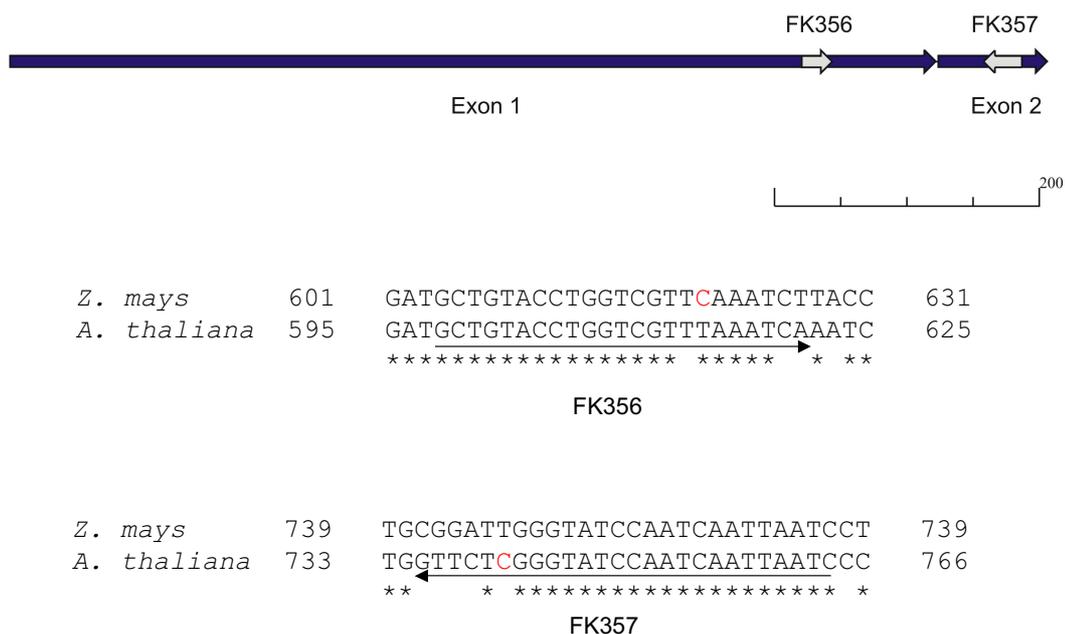


Abbildung 14: Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des *cox2*-Transkripts aus *A. thaliana*.

Zur Verdeutlichung der Spezifität der für die spezifische Amplifizierung der cDNA der *cox2*-Transkripte von *A. thaliana* mittels RT-PCR verwendeten Oligonukleotide FK356 und FK357 (Pfeile) sind die den Oligonukleotiden homologen Sequenzen in der *cox2*-DNA-Sequenz von *A. thaliana* und *Z. mays* vergleichend dargestellt. Zudem ist die Lage der Oligonukleotide im Exon 1 respektive Exon 2 innerhalb der kodierenden Sequenz des *cox2*-Transkripts von *A. thaliana* abgebildet (oben).

Um eine selektive Amplifikation der an der Position 740 edierten Transkripte auszuschliessen, wurde die Oligonukleotidsequenz von der DNA-Sequenz abgeleitet (vgl. Abb. 14). Zur Analyse des Spleißens des *cox2* Transkripts wurde das zweite Oligonukleotid im Exon 1 positioniert. Auch hier liegen Fehlpaarungen im 3'-Bereich des Oligonukleotids im Vergleich zur entsprechenden *cox2* Sequenz aus *Z. mays* vor.

Zum Nachweis der Spezifität dieser Intron-flankierenden Oligonukleotide wurde zunächst eine RT-PCR mit RNA aus Mais-Mitochondrien als Matrize durchgeführt. Wie Abb. 15 zeigt, kommt es hierbei nicht zur Amplifizierung eines 164 bp oder 1,5 kb großen cDNA-Fragments. Während das 164 bp Fragment zu erwarten wäre, wenn gespleißte *A. thaliana cox2* mRNA vorläge, entspräche die Länge von 1,5 kb dem RT-PCR Fragment bei der Amplifikation ungespleißter Primärtranskripte. Erwartungsgemäß liefert eine RT-PCR mit den beiden Oligonukleotiden und Gesamt-RNA aus *A. thaliana* als Matrize ein 164 bp großes Produkt (ohne Abb.).

Zur Analyse der Transkriptprozessierung des im Plasmid pTJ246 vorliegenden klonierten *cox2* Gens aus *A. thaliana* in isolierten Mitochondrien aus *Z. mays* wurde eine Elektroporation der Organellen unter Verwendung der pTJ246 Plasmid-DNA vorgenommen. Die Elektroporationsbedingungen orientierten sich an den bei Charakterisierung des Elektroporationssystems gewonnenen Daten (vgl. Kap. 3.3). Isolierte Mitochondrien (250 μg Mitochondrienprotein) wurden mit 3 μg pTJ246 DNA versetzt und einer Feldstärke von 20 kV cm^{-1} ausgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Mitochondrien in dem *in organello* Puffer (vgl. Kap. 2.2.14). Nach 30 respektive 60 Minuten Inkubationszeit wurde Gesamt-RNA aus den Organellen isoliert (siehe Kap. 2.2.14). Die zuvor mit DNase behandelte RNA wurde als Matrize für eine RT-PCR mit den für *A. thaliana cox2* spezifischen Oligonukleotiden FK356/FK357 eingesetzt. Wie die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte in Abb. 15 (A) zeigt, konnte ausschliesslich ein 164 bp großes Fragment amplifiziert werden. Zum Größenvergleich wurde das Plasmid pTJ246 für eine PCR mit den gleichen Oligonukleotiden eingesetzt. Aufgrund des in dem *cox2* Gen vorliegenden Introns entspricht die Größe dieses PCR-Produkts (1,5 kb) der des erwarteten RT-PCR-Amplikons von ungespleißtem Primärtranskript.

Zur näheren Charakterisierung der cDNAs hinsichtlich des erfolgten RNA-Spleißens und der RNA-Edierung wurde die *cox2* cDNA sequenziert (siehe Kap. 2.2.11). Wie das Autoradiogramm des Sequenzgels (siehe Abb. 15, B) zeigt, konnten die Sequenzbereiche des Exons 1 sowie des Exons 2 nachgewiesen werden. Demnach bestätigt die Sequenzierung die erwartete Prozessierung des *cox2* Transkripts. Zudem ermöglicht das Autoradiogramm

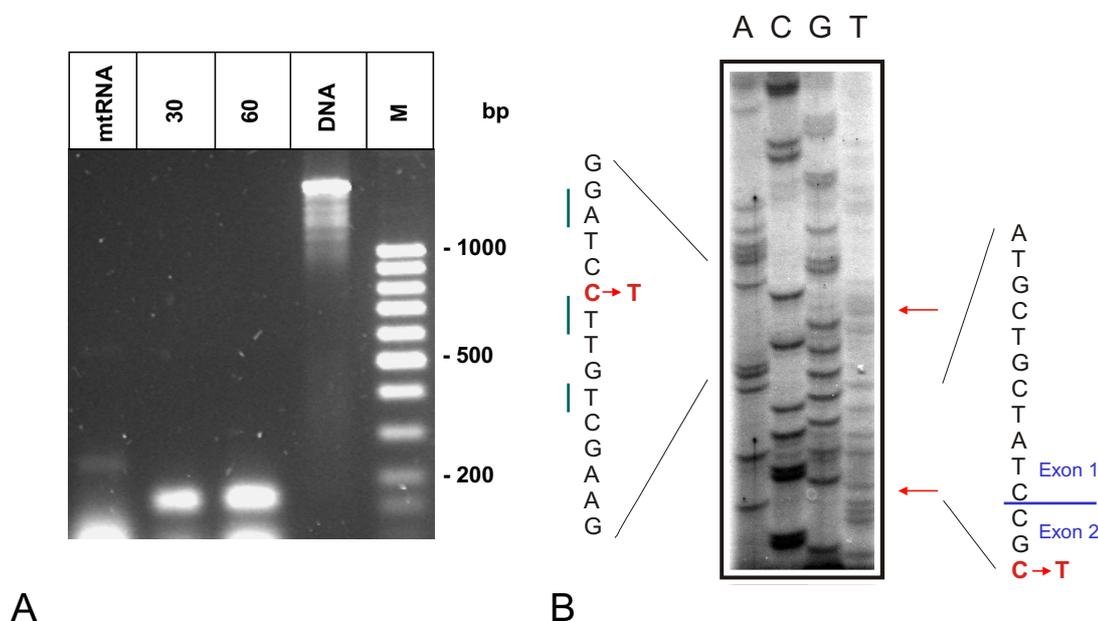


Abbildung 15: Transkription und Prozessierung der Transkripte des *A. thaliana cox2* Gens in isolierten Mitochondrien aus *Z. mays*.

Nach einer Elektroporation isolierter Mitochondrien aus *Z. mays* mit der das *cox2*-Gen aus *A. thaliana* enthaltenden Plasmid-DNA pTJ246 wurde eine Inkubation der Organellen über einen Zeitraum von 30 und 60 Minuten in Respirationspuffer vorgenommen. Aus den so behandelten Mitochondrien wurde Gesamt-RNA isoliert und, nach dem Ausschluss von DNA-Kontaminationen, für eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK356 und FK357 eingesetzt. Wie die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte (**A**) zeigt, konnte ein 164 bp großes cDNA Fragment amplifiziert werden. Ausgehend von der zur Kontrolle verwendeten, aus unbehandelten Mitochondrien von *Z. mays* isolierten RNA konnte unter gleichen Bedingungen mittels RT-PCR kein Produkt gleicher Größe erhalten werden (**A**, mtRNA). Zum Vergleich wurde eine PCR mit der *A. thaliana cox2* DNA vorgenommen (**A**, DNA). Das amplifizierte Fragment mit einer Größe von 1,5 kb entspräche der erwarteten Fragmentlänge bei Amplifikation ungespleißter *cox2* RNA. Zur näheren Charakterisierung der Amplifikate wurde das RT-PCR Produkt (60 min Inkubation der elektroporierten Mitochondrien) einer Sequenzierung unterzogen. Wie das Autoradiogramm des Sequenzgels (**B**) zeigt, konnten an zwei Stellen Nachweise für die erfolgte Edierung (C→U) erbracht werden. Sequenzbelege für die Divergenz des cDNA-Bereichs von der *cox2* Sequenz aus *Z. mays* sind durch senkrechte Striche markiert. Die Position der Exonfusion ist hervorgehoben. (Abk.: M = Marker)

den Nachweis des transgenen Ursprungs der amplifizierten cDNA. An zwei Positionen, in denen sich die Sequenz des *cox2* Gens von *A. thaliana* und Mais unterscheidet, liegt eindeutig die Nukleotidfolge der *A. thaliana cox2* Sequenz vor (siehe Abb. 15, B).

Auffällig ist eine Abweichung der ermittelten *cox2* cDNA Sequenz im Bereich der Fusion der beiden Exonen (5' TGCCT 3') von der publizierten mRNA-Sequenz des reifen *cox2* Transkripts an dieser Stelle (5' TGTCT 3'). Um auszuschliessen, dass dieser Unterschied der *cox2* Sequenzen durch die Analyse der im heterologen System erhaltenen *cox2* Transkripte bedingt ist, wurde eine Amplifizierung der *cox2* cDNA aus Gesamt-RNA von *A. thaliana* vorgenommen. Die Sequenzierung des mit den Oligonukleotiden FK356/357 erhaltenen RT-PCR Produkts bestätigte den Unterschied der ermittelten von der publizierten Sequenz (Daten nicht gezeigt). Demnach kann ein Artefakt durch die Transkription des *cox2* Gens in Mitochondrien von Mais ausgeschlossen werden.

Neben der Untersuchung des RNA-Spleißens ermöglicht das *cox2* Gen aus *A. thaliana* aufgrund der 15 Edierungsstellen (Giegé und Brennicke, 1999) im *cox2* Transkript zudem die Analyse der *cox2* RNA-Edierung in dem verwendeten transienten Expressionssystem. Wie das Autoradiogramm in Abb. 15 zeigt, sind die zwei innerhalb des amplifizierten Bereichs gelegenen Edierungsstellen vollständig ediert.

3.4.1.3 Nachweis der Identität der *in organello* erhaltenen *cox2* Transkripte

Um PCR-Artefakte bei der Amplifikation der cDNA des Fremdgens aufgrund des mitunter beobachtbaren Wechsels der RNA Matrize bei reversen Transkriptionen auszuschliessen, wurden Kontroll-Versuche durchgeführt. Hierzu wurde zunächst *in vitro* ein Transkript des *A. thaliana cox2* Gens synthetisiert (vgl. 2.2.13). Das Gen liegt im Klonierungsvektor pBluescript II SK+ (vgl. 2.1.3) vor, der eine *in vitro* Transkription der inserierten Fremd-DNA durch T3- und T7-Polymerasen ermöglicht. Zur Erzeugung gleichförmiger linearer Transkripte wurde das Plasmid pTJ246 mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert (siehe Abb. 16). Hiervon ausgehend konnten RNAs erhalten werden, die den gesamten Bereich des klonierten *cox2* Gens aus *A. thaliana* repräsentieren. Diese *cox2* RNA enthielt

demnach neben der kodierenden Sequenz das zwischen den Exonen gelegene Intron sowie den gesamten 5'- und 3'-Nichtkodierungsbereich.

Die *in vitro* Transkripte wurden anschliessend für eine RT-PCR mit den beiden Oligonukleotiden FK356 und FK357 eingesetzt. Sollte während der cDNA Synthese ein Überlesen der Intronsequenz an den Intron-Exon-Grenzen durch die reverse Transkriptase erfolgen, würde das erhaltene PCR-Produkt die Größe des gespleißten *cox2* Transkripts aufweisen. Wie Abb. 16 zeigt, ist die amplifizierte cDNA jedoch 1,5 kb groß und entspricht demnach der erwarteten Größe des RT-PCR Produkts des *cox2* Primärtranskripts. Demnach liegt kein RT-PCR-Artefakt vor, welches ein Spleißen des *cox2* Transkripts durch einen Wechsel der Matritze oder ein fehlerhaftes Binden des Oligonukleotids vortäuschen würde.

Da in der RNA Population aus den transienten Expressionsversuchen die RNA des endogenen *cox2* Gens neben der des Fremdgens aus *A. thaliana* vorliegt, wäre zudem der Wechsel der Matritze zwischen den beiden *cox2* Transkripten unterschiedlichen Ursprungs während der reversen Transkription möglich. Dieses sollte ausgeschlossen werden, indem die ausgehend von dem Plasmid pTJ246 *in vitro* transkribierte *cox2* RNA mit einem Überschuss an mitochondrialer RNA aus isolierten Organellen von *Z. mays* versetzt wurde. Diese Population an RNAs sollte dem Verhältnis in der Probe nach transienter Expression des sonst in die Organellen eingebrachten *cox2* Fremdgens entsprechen. Bei der anschliessend durchgeführten RT-PCR konnten lediglich Produkte mit einer Größe von 1,5 kb amplifiziert werden, wie in Abb. 16 deutlich wird. Dieses Produkt entspricht der erwarteten Größe des Amplifikats, wenn *cox2* Primärtranskripte vorlägen. Demnach ist davon auszugehen, dass ein RT-PCR Artefakt durch einen Wechsel der RNA-Matritze in einer heterogenen Population von *A. thaliana* *cox2* Transkript und RNA aus Mitochondrien von *Z. mays* ausgeschlossen werden kann.

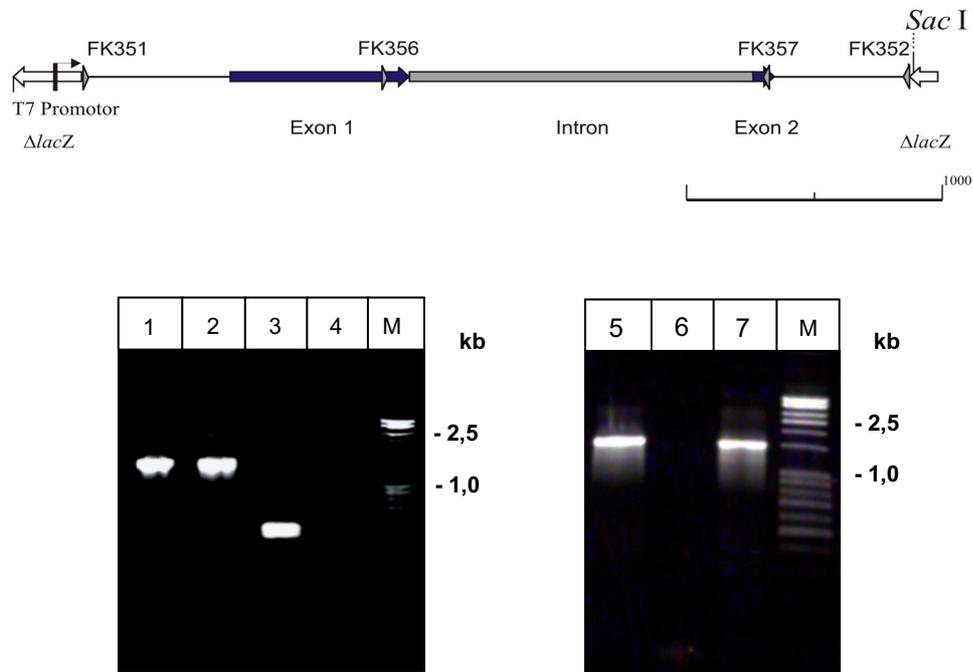


Abbildung 16: Ausschluss artefiziell generierter *cox2* RT-PCR Produkte.

Die *in vitro* Transkription erfolgte mittels T7-RNA-Polymerase ausgehend von der mit der Restriktionsendonuklease *Sac*I linearisierten Plasmid-DNA pTJ246, die das *A. thaliana cox2* Gen enthält. Die schematische Darstellung (oben) zeigt das *cox2* Gen mit Lage der *Sac*I-Erkennungssequenz, des T7-Promotors sowie der Position der Oligonukleotide FK356 im Exon 1 und FK357 im Exon 2. Zur Untersuchung eines möglichen Wechsels der Matrizen-RNA zwischen dem *cox2* aus *A. thaliana* und *Z. mays* während der RT-PCR wurde zunächst das erhaltene *cox2* Transkript zum einen allein (1), zum anderen mit einem Überschuss an mtRNA aus *Z. mays* gemischt (2) für eine RT-PCR mit den Intron-flankierenden, *A. thaliana cox2* spezifischen Oligonukleotiden FK356 und FK357 eingesetzt. Zum Nachweis der in 2 eingesetzten *Z. mays* mtRNA wurde eine Amplifikation des Fragments der Mais *cox2* cDNA mit dem Oligonukleotidpaar FK343/344 mittels RT-PCR vorgenommen (3). Als Kontaminationskontrolle wurde eine RT-PCR ohne Zusatz von RNA durchgeführt (4). Um ein mögliches artefizielles RT-PCR Produkt aufgrund eines während der RT-PCR vorkommenden Überlesens der *cox2* Intronstruktur auszuschließen, wurde das *in vitro* synthetisierte *cox2* Transkript für eine RT-PCR eingesetzt. Die Produkte einer PCR von DNA (7), sowie einer RT-PCR von *cox2 in vitro* Transkript (5) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und weisen eine Größe von 1,5 kb auf. Als DNA-Kontaminationskontrolle wurde eine PCR mit dem *in vitro* Transkript vorgenommen (6). (Abk.: M = Marker)

3.4.1.4 Analyse der RNA-Edierung der *cox2* Transkripte des Fremdgens im heterologen Expressionssystem

Zur weiteren Untersuchung der Edierung der *cox2* Transkripte von *A. thaliana* in Mitochondrien von *Z. mays* wurde zur Amplifikation eines größeren cDNA-Fragments ein weiteres, innerhalb der kodierenden Sequenz des Fremdgens und stromaufwärts von FK356 gelegenes Oligonukleotid FK566 (vgl. Kap. 2.1.2) für die RT-PCR verwendet. Auch dieses Oligonukleotid sollte aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen *A. thaliana* und *Z. mays* im Bereich der homologen Sequenz zur spezifischen Amplifikation eines 506 bp großen *A. thaliana cox2* cDNA-Fragments führen.

Nach der erfolgten Elektroporation der Mitochondrien aus *Z. mays* mit dem Plasmid pTJ246 (vgl. Kap. 2.1.3) wurde die Inkubation der so behandelten Organellen in dem Respirationspuffer (siehe Kap. 2.2.14) über einen Zeitraum von drei Stunden vorgenommen. Anschließend wurde die gesamte RNA aus den Mitochondrien isoliert. Die nachweislich DNA-freie RNA wurde dann für eine RT-PCR mit dem *A. thaliana cox2* spezifischen Oligonukleotidpaar FK357 und FK566 eingesetzt. Die Amplifikation des 500 bp großen *cox2* cDNA Fragments weist auf das erfolgte Spleißen der *cox2* Primärtranskripte des Transgens in den Mitochondrien von *Z. mays* hin (ohne Abb.).

Eine nachfolgende Sequenzierung (vgl. Kap. 2.2.11) der RT-PCR-Produkte zeigte, dass der amplifizierte cDNA tatsächlich Transkripte des in die Organellen eingebrachten Fremdgens zugrunde liegen (siehe Abb. 17, A). Das Chromatogramm der Sequenzierung belegt eindeutig den Sequenzunterschied zum endogenen *cox2* Gen an drei Positionen. Im Gegensatz zum Adenin 326 (relative Position bezogen auf das Start-Kodon der *A. thaliana cox2* cDNA-Sequenz) befindet sich bei *Z. mays* an dieser Stelle ein Guanin. Statt des Guanin 331 und Thymin 396 bei *A. thaliana* weist *Z. mays* ein Thymin bzw. ein Guanin an den entsprechend vergleichbaren Positionen auf.

Darüber hinaus belegen die Sequenzdaten die Edierung der *A. thaliana cox2* mRNA in Mitochondrien aus *Z. mays*. Wie in Abb. 17(A) gezeigt, liegt das Cytosin 379 ediert vor. Eine weitere Sequenzierung der *cox2* cDNA belegte zudem die Edierung dreier weiterer

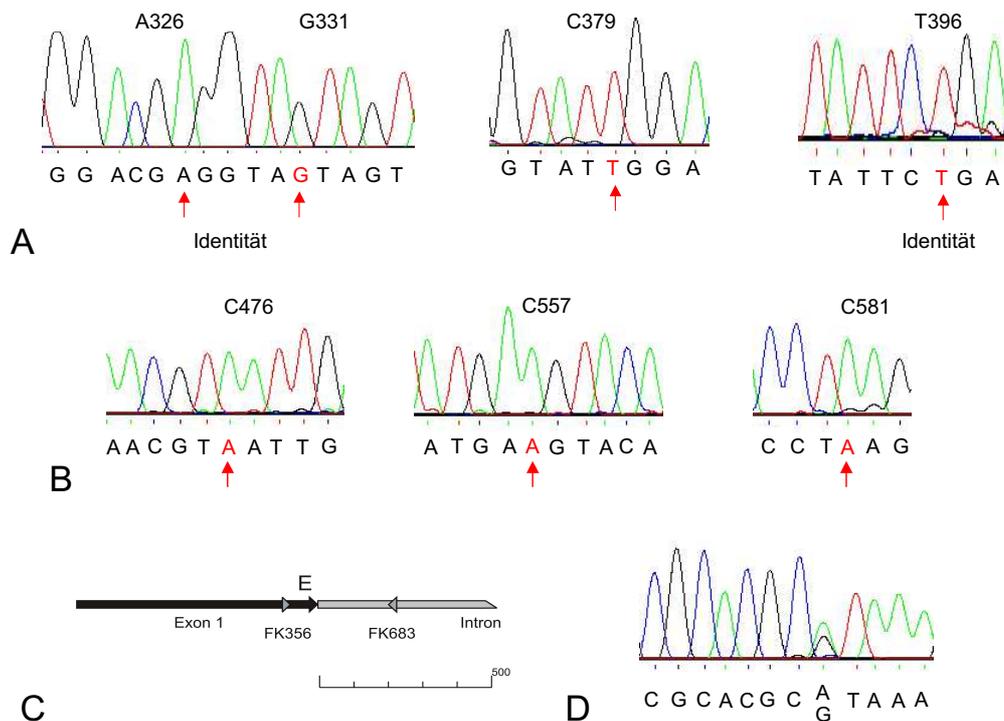


Abbildung 17: Ausschnitte aus den Chromatogrammen der Sequenzierung der *cox2* cDNA. Nach einer Elektroporation der Mitochondrien von *Z. mays* mit dem Plasmid pTJ246 konnten mit den Oligonukleotiden FK357/FK566 RT-PCR Produkte amplifiziert und sequenziert werden. **A** Abgebildet sind drei Ausschnitte aus dem Chromatogramm einer Sequenzreaktion. An drei Positionen liegt ein Beleg für den Sequenzunterschied der cDNA von der *cox2* Sequenz aus *Z. mays* vor. Zwischen diesen Stellen konnte die Edierung des Cytosins C379 nachgewiesen werden. **B** Die Sequenzausschnitte einer weiteren Sequenzierung verifizieren die Edierung an drei weiteren Positionen (abgebildet ist die revers komplementäre Sequenz). **C** Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus der kodierenden Sequenz (Exon 1) und dem Intron des *cox2* Gens von *A. thaliana*. Die Position der Oligonukleotide FK356 im Exon 1 und FK386 im Intron der *cox2* Sequenz wird durch Pfeile (grau) angezeigt. **D** Mit dem Oligonukleotidpaar FK356/FK683 (vgl. C) wurde ein RT-PCR-Produkt ungespleißter *A. thaliana* *cox2* Transkripte erhalten. Der Ausschnitt des Chromatogramms zeigt die partielle Edierung des zwei Nukleotide vom Intron entfernt gelegenen Cytosins.

Cytosine (C476, C557 und C581). Die Ausschnitte der Chromatogramme sind in Abb. 17 (B) dargestellt. Für jede dieser analysierten Edierungsstellen ist charakteristisch, dass die Sequenz der Transkripte im Bereich der Edierungsstelle zwischen *Arabidopsis* und Mais vollkommen identisch ist. Zusammenfassend sind die im heterologen System nachgewiesenen Edierungsstellen in Tabelle 6 vergleichend mit den publizierten Edierungsstellen der *cox2* Transkripte von *Z. mays* (Yang und Mulligan, 1991) und *A. thaliana* (Giegé und Brennicke, 1999) dargestellt. Während nur eine Edierungsstellen des *cox2* Transkripts von *A. thaliana* in der *cox2* Sequenz von *Z. mays* als Thymin bereits in der DNA Sequenz vorliegt, weist die mRNA von *A. thaliana* für sieben Edierungsstellen des *Z. mays* Transkripts solche präedierten Positionen auf (vgl. Tab. 6, ped.).

Durch die Kombination des für das *A. thaliana cox2* Transkript spezifischen Oligonukleotids FK356 mit einem im Intron der *cox2* Primärtranskripte gelegenen Oligonukleotids FK683 (vgl. 17, C) konnte ein RT-PCR Produkt mit einer Größe von 300 Nukleotiden amplifiziert werden (ohne Abb.). Die Sequenzierung dieses Fragments belegte die partielle Edierung der zwei Nukleotide im 5'-Bereich der Exon-Intron Grenze gelegenen Edierungsstelle C696 (siehe Abb. 17, D) in ungespleißten Primärtranskripten des *A. thaliana cox2* Gens.

Tabelle 6: Vergleich der Edierungsstellen von *Z. mays* (Yang und Mulligan, 1991) und *A. thaliana* (Giegé und Brennicke, 1999) sowie der Edierung der *A. thaliana cox2* RNA in isolierten Mais Mitochondrien

(RNA-Edierungsstellen sind unterstrichen; Abk.: + = ediert, - = nicht ediert, ped. = prädiert, nb. = nicht bestimmt, (N) = identische Position, aber divergierende Nukleotide bei *Z. mays cox2*)

Position bei <i>A. thaliana</i>	Sequenz [5' - 3']	Position bei <i>Z. mays</i>	Edierung <i>in organello</i>
-	CTTCGTT <u>C</u> ATT	14	nb.
24	GGTTATT <u>C</u> CTC	-	nb.
25	GT(C)T(G)ATTC <u>C</u> TCA	31	nb.
27	TATTCCT <u>C</u> ACA	-	nb.
71	TTAGGAT <u>C</u> TCA	77	nb.
138	TCTTCCT <u>C</u> ATT	-	nb.
ped.	TTCGTAT <u>C</u> ACG	167	
ped.	CGTATCAC <u>G</u> GA	169	
253	G(A)ATTC(A)TTC <u>G</u> GA	259	nb.
261	GGACCAT <u>C</u> TTT	-	nb.
278	ATCATCT <u>C</u> GAT	-	nb.
-	GTCATT <u>C</u> ATT	284	
379	ATGGTAT <u>C</u> GGA	385	+
ped.	AGTTATA <u>C</u> GAT	449	
-	AGATGAT <u>C</u> CAG	466	-
ped.	GATGAT <u>C</u> CAGA	467	
476	GGTCAAT <u>C</u> ACG	482	+
ped.	TGTAACAC <u>C</u> CCG	550	
557	GATGTAC <u>C</u> TCA	563	+
581	CCTTCCT <u>C</u> AGG	587	+
ped.	GGTCGTT <u>C</u> AAA	620	
ped.	TCCATCT <u>C</u> GGT	638	
698	GCCTTTA <u>C</u> GCC	704	+
721	AGCTGTT <u>C</u> CCTA	-	nb.
742	TGGTTCT <u>C</u> GGG	ped.	

3.4.2 Transkription des *atp6-1* Gens aus *Sorghum bicolor* in isolierten Mitochondrien aus *Zea mays*

Wie in Kap. 3.2.3 bereits gezeigt werden konnte, werden Transkripte des endogenen *atp6* Gens in den Organellen bis zu sieben Stunden vollständig ediert. Zudem erwies sich das Testsystem der Hydrolyse der *atp6* cDNA mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III als gut geeignet, einen ersten Hinweis über den Edierungsgrad der der RT-PCR zugrundeliegenden *atp6* Transkripte zu erhalten. Deshalb wurde zur weiteren Untersuchung der *atp6* Edierung die Transkription eines in die Mitochondrien eingebrachten *atp6* Gens untersucht.

Aufgrund einer Duplikation im Chondriom von *A. thaliana* kommen zwei Kopien des *atp6* Gens vor (Marienfeld *et al.*, 1996). Für lediglich eine Kopie ist eine Edierungsstelle annotiert (Unseld *et al.*, 1997), weshalb eine Klonierung des *atp6* Gens aus *A. thaliana* für die Analyse der RNA-Edierung in Mitochondrien aus Mais nicht in Betracht kam. Ähnlich der Situation bei *A. thaliana* liegen bei *Sorghum bicolor* (Linie IS1112C) zwei Kopien des *atp6* Gens (*atp6-1*, *atp6-2*) in der mitochondrialen DNA vor (Mullen *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu der geringen Edierungsrate der *A. thaliana atp6* Transkripte weisen die Transkripten der beiden Kopien *atp6-1* und *atp6-2* der Hirse 19 Edierungsstellen auf (Kempken *et al.*, 1991). Das Plasmid pAF1 trägt ein 5 kb großes *Bam*HI Fragment des *atp6-1* Gens aus *S. bicolor* (Mullen *et al.*, 1992). Im 5'- und 3'-Bereich der kodierenden Region befinden sich nichttranslatierte Sequenzen (Mullen *et al.*, 1992), die eine Initiation der Transkription, die 5'- und 3'-Prozessierung sowie die Stabilisierung der Transkripte ermöglichen sollten. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Pring für die Transkriptanalyse der *atp6-1* mRNA Prozessierung in Maismitochondrien zur Verfügung gestellt.

Auch wenn eine Transkriptinitiation in dem beschriebenen *in organello* Ansatz auch aufgrund der im verwendeten Klonierungsvektor vorhandenen Sequenzen (z.B. der T3- und T7-Promotoren) erfolgen könnte, sollte die Möglichkeit für eine korrekte Initiation der Transkription des *S. bicolor atp6-1* Gens in Mitochondrien aus Mais bestehen. Die beschriebene Promotorsequenz des *atp6* aus *Z. mays* (5' CGTATATA 3') zeigt eine größere Ähnlichkeit zu dem ermittelten Promotor der Kopie 2 des *S. bicolor atp6* Gens (5' CG-

TATAAT 3'; Yang und Pring, 1997) als zu der Promotorsequenz des *atp6-1* (5' CT-TACAATG 3'; Yan und Pring, 1997). Demnach weicht der *atp6-1* Promotor aus *S. bicolor* am stärksten von der Konsensus-Sequenz (5' YRTA 3') ab, wird aber dennoch in Mitochondrien der Hirse erkannt. Demnach könnte auch eine korrekte Transkriptionsinitiation im heterologen System, d.h. in Mitochondrien aus *Z. mays* möglich sein.

Während das 3'-Ende des *S. bicolor atp6-1* Transkripts bereits durch Nuklease S1-Kartierung charakterisiert ist (Kempken, 1996), ist die im 3' nichttranslatierten Bereich für die Stabilisierung des *atp6* Transkripts bei *Z. mays* vorliegende Sequenz bislang nicht analysiert. Vergleichende Untersuchungen der in dieser Arbeit ermittelten Sequenz des 3'-Nichtkodierungsbereiches des *atp6* Gens von *Z. mays* (vgl. Kapitel 3.4.3) und der *atp6-1* Sequenz aus *S. bicolor* zeigen Gemeinsamkeiten in einem potentiell für die Transkriptstabilisierung verantwortlichen Bereich. Innerhalb der im *atp6* Transkript zwischen *S. bicolor* und *Z. mays* konservierten Bereichs der untranslatierten Sequenz könnte es zur Ausbildung einer doppelten Stamm-Schleife-Struktur kommen. Folglich könnte die in den Mitochondrien von *Z. mays* vorliegende mRNA des *atp6-1* Gens aus *S. bicolor* über diese Doppel-Stamm-Schleifen Struktur stabilisiert werden.

Das Plasmid pAF1 wurde in die aus *Z. mays* isolierten Mitochondrien durch Elektroporation (vgl. Kap. 2.2.14) eingebracht. Nach einer Inkubation in dem *in organello* Puffer über zwei respektive drei Stunden wurde Gesamt-RNA aus den Organellen isoliert. Hier von konnte mittels RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar FK102/FK98 (siehe 2.1.2) ein 850 bp großes Fragment amplifiziert werden (vgl. Abb. 18). Das Oligonukleotid FK98 hybridisiert in einem zwischen den Arten relativ hoch konservierten Bereich der kodierenden Sequenz des *atp6* Gens. Dem gegenüber wird die spezifische Amplifikation der cDNA des Transgens durch das Oligonukleotid FK102 erzielt. Die zu FK102 homologe Sequenz liegt innerhalb des 5'-Bereichs der kodierenden Region („*prepiece*“ genannt), die für die zwischen den Arten wenig konservierte aminoternale Extension kodiert (Mullen *et al.*, 1992). Der spezifische Nachweis der Transkripte des Fremdgens mittels RT-PCR zeigt, dass die Transkription des *S. bicolor atp6-1* Gens in den Organellen aus *Z. mays* über einen Zeitraum von 120 bis 180 Minuten erfolgt.

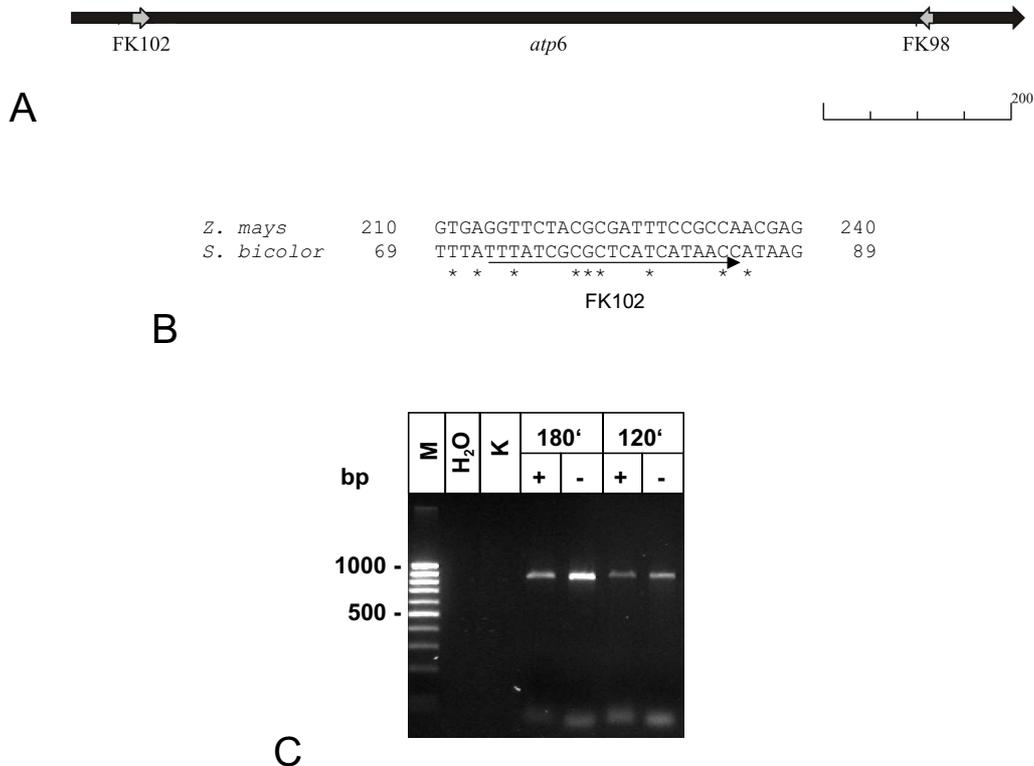


Abbildung 18: Transkription des *Sorghum bicolor atp6-1* Gens in Mitochondrien von *Z. mays*.

A Schematische Darstellung des *atp6-1* Gens aus *S. bicolor*. Abgebildet ist die kodierende Sequenz (schwarz gefüllter Pfeil) sowie die für die Amplifikation der cDNA verwendeten Oligonukleotide FK102 und FK98 (graue Pfeile). **B** Ausschnitt aus der *S. bicolor atp6-1* Sequenz im Vergleich zum homologen Bereich des *atp6* Gens aus *Z. mays* zur Veranschaulichung der Spezifität des Oligonukleotids FK102. **C** Das Plasmid pAF1 (trägt das *atp6-1* Gen aus *S. bicolor*) wurde mittels Elektroporation in isolierte Mitochondrien eingebracht. Nach einer Inkubation über 120 bzw 180 Minuten wurde Gesamt-RNA isoliert und für eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK102 und FK98 zur spezifischen Amplifikation der *atp6-1* cDNA eingesetzt. Die Edierung der *S. bicolor atp6-1* mRNA generiert eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HindIII* in der cDNA. Zur Analyse des Edierungsgrades der Transkripte sind RT-PCR-Proben mit (+) und ohne (-) eine vorherige Hydrolyse der cDNA mit *HindIII* gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Ebenso wie die Edierung des Transkripts des endogenen *atp6* an Position 953 kommt es bei erfolgter Edierung des Transkript des Transgens zu einem C→U Austausch an der äquivalenten Stelle. Auch diese Edierung sorgt für die Generierung einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HindIII* in der cDNA, so dass mittels Hydrolyse der cDNAs

ein erster Eindruck über die erfolgte RNA-Edierung an dieser Position gewonnen werden kann. Wie Abb. 18 zeigt, sind sämtliche RT-PCR-Produkte nicht durch die Endonuklease *Hind*III hydrolysierbar. Folglich scheinen die Transkripte des Fremdgens an dieser Position nicht ediert zu sein. Eine Sequenzierung der cDNAs aus der RNA-Probe der einstündigen Inkubation der Organellen bestätigte die offensichtlich nicht erfolgte RNA-Edierung der *atp6-1* Transkripte (ohne Abb.).

3.4.3 Transkription chimärer Konstrukte des *atp6* Gens in isolierten Mitochondrien von *Zea mays*

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Gene der beiden Gattungen hauptsächlich in den Sequenzen des 5'- und 3'-Nichtkodierungsbereichs. Darüber hinaus liegt ein Unterschied im 5'-Bereich der kodierenden Sequenz (als „*prepiece*“ bezeichnet) vor, der zu einer bei allen Arten verschiedenen N-terminalen Extension des ATP6 Proteins führt (Mullen *et al.*, 1992). Der relativ konservierte Bereich der kodierenden Sequenz weist zwischen *S. bicolor* und *Z. mays* jedoch auch einige Unterschiede in der Basensequenz auf (Sequenzvergleich siehe Anhang, Abb. 29). Zur Analyse des Einflusses der stark verschiedenen 5'- und 3'-Nichtkodierungssequenzen auf die Edierung der *S. bicolor atp6* Transkripte wurden diese Abschnitte der Gene zwischen *S. bicolor atp6-1* und *atp6* von *Z. mays* ausgetauscht.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Sequenz des 5'- und 3'-Nichtkodierungsbereichs des *atp6* Gens aus *Z. mays* nicht charakterisiert (die Sequenz des *Z. mays* Chondrioms (NCBI „*Accession No.*“: AY506529) stand erst Ende 2003 in der Datenbank zur Verfügung). Daher erfolgte zunächst die Klonierung des *atp6* Gens aus *Z. mays* mit den bis dahin unbekanntem 5'- und 3'-Nichtkodierungsbereichen. Nach den Ergebnissen von Haouazine-Takvorian *et al.* (1997) sollte ein *Bam*HI-Fragment der mtDNA aus *Z. mays* einen ca. 1,7 kb großen 5'-Bereich sowie einen etwa 300 bp langen Anteil der 3'-Nichtkodierungsregion nebst der kodierenden *atp6* Sequenz umfassen. Zunächst wurden diese Daten durch eine Hybridisierung eines von der mit *Bam*HI hydrolysierten mtDNA der für diese Arbeit verwendeten Maislinie angefertigten Southern-Blots überprüft (ohne Abb.).

Zur Amplifikation des unbekanntes Bereichs in der 5'- und 3'-Region des *atp6* Gens wurde eine inverse PCR vorgenommen. Hierzu wurde die aus Mitochondrien von Mais isolierte mtDNA mittels *Bam*HI hydrolysiert. Eine nachfolgende Ligation der linearen mtDNA mittels T4-Ligase sollte teilweise selbstligierte, zirkuläre Fragmente ergeben. Durch eine PCR mit den im konservierten kodierenden Bereich des *atp6* Gens (NCBI „*Accession No.*“: M16223) lokalisierten, nach außen gerichteten Oligonukleotiden FK373 und FK374 konnte so ein 2,1 kb großes PCR-Fragment amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pBluescript II SK+ (siehe Kap. 2.1.3) eingebracht und liegt als Plasmid pJG257 (Plasmidkarte siehe Anhang, Abb. 27) vor. Durch die Sequenzierung des so erhaltenen Plasmids wurde die Nukleotidsequenz des *atp6* Gens im 5' wie 3'-Bereich jenseits der kodierenden Sequenz erhalten.

Ausgehend von der nun bekannten Sequenz konnten Oligonukleotide für die Amplifikation des *atp6* Gens abgeleitet werden. Von der aus *Z. mays* Mitochondrien isolierten mtDNA (siehe Kap. 2.2.14) wurde unter Verwendung des Oligonukleotidpaars FK433/FK436 der 5'- und 3'-Anteil sowie die kodierende Sequenz des *atp6* Gens mittels PCR amplifiziert. Das so erhaltene 2044 bp große PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pBluescript II SK+ eingebracht und liegt als Plasmid pBM313 (Plasmidkarte siehe Abb. 28 im Anhang) vor. pBM313 enthält einen 590 bp großen Anteil des 5'-Bereichs des *atp6* Gens aus der hier untersuchten *Z. mays* Linie, die kodierende Sequenz des *atp6* Gens sowie 220 Nukleotide des 3' nichttranslatierten Bereichs. Die Sequenz des erhaltenen *atp6* Gens wurde mit den für die Linie W182BN (CMS-SC, NCBI „*Accession No.*“: M16223) sowie für die Linie B73 (CMS-C, NCBI „*Accession No.*“: Z11843) publizierten Sequenzen verglichen. Der Vergleich weist auf eine höhere Homologie des zwischen den Arten weniger konservierten „*prepiece*“ Bereichs der hier ermittelten *atp6* Sequenz mit der publizierten Sequenz der Linie W182BN hin. Eine vollständige Homologie zeigt die erhaltene Sequenz hingegen im Vergleich mit der 2003 publizierten *atp6* Sequenz der *Z. mays* Linie NB (NCBI „*Accession No.*“: AY506529; vgl. Anhang, Abb. 30).

Um den 5'-Nichtkodierungsbereich des *S. bicolor atp6-1* Gens zu verändern, wurden 590 bp der 5' nichttranslatierten Sequenz aus *Z. mays* mit den Oligonukleotiden FK441 und

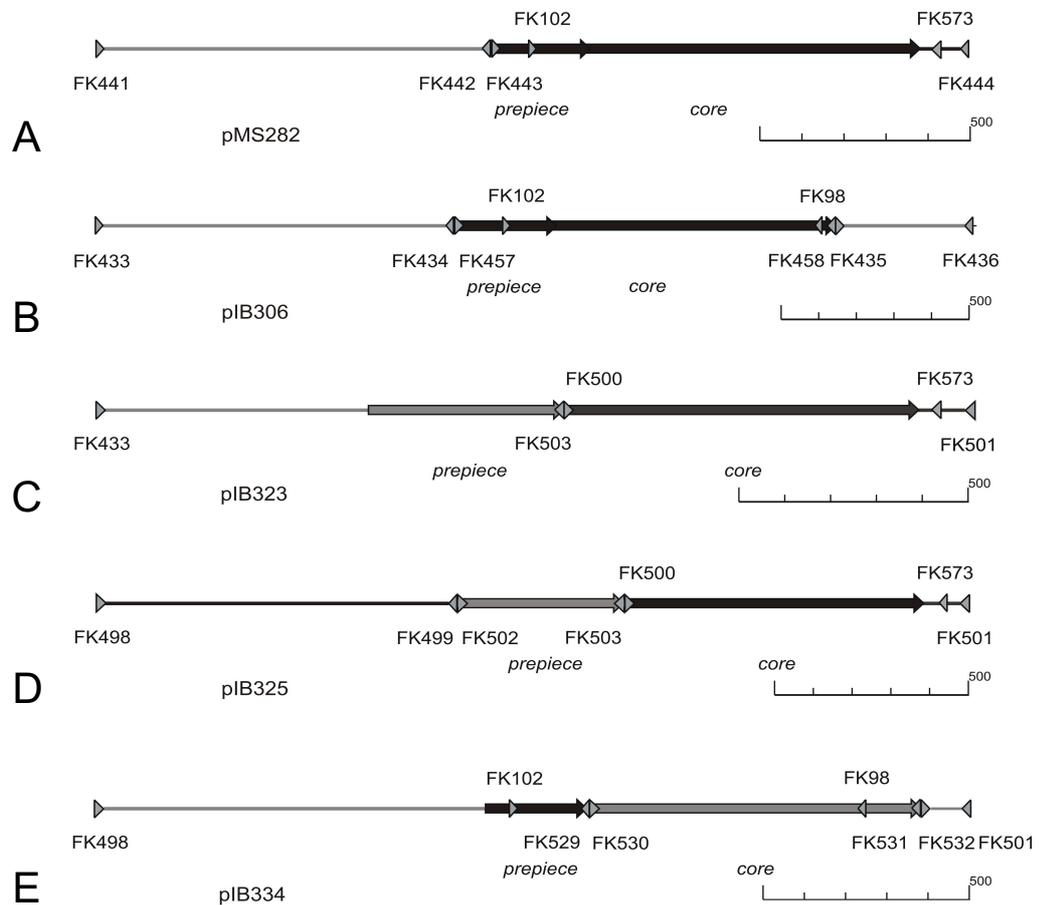


Abbildung 19: Chimäre Konstrukte des *atp6* Gens.

Zur Analyse des potentiellen Einflusses der zwischen den *atp6* Sequenzen von *S. bicolor* (schwarze Pfeile/Linien) und *Z. mays* (graue Pfeile/Linien) divergierenden Bereiche des *atp6* Gens auf die Edierung der Transkripte wurden die in der Sequenz unterschiedlichen 5'-Bereiche allein (**A**: pMS282) oder in Verbindung mit dem 3'-Nichtkodierungsbereich (**B**: pIB306) von *Z. mays* mit der kodierenden Sequenz des *atp6* Gens aus *S. bicolor* neu kombiniert. Im Plasmid pIB323 (**C**) liegt eine Substitution des 5'-Nichtkodierungsbereichs und des für die aminoterminalen Extension kodierenden Bereichs („prepiece“) des *S. bicolor atp6-1* durch den von *Z. mays* vor. Lediglich der „prepiece“-Anteil von *S. bicolor* wurde im Plasmid pIB325 (**D**) gegen den entsprechenden Teil aus *Z. mays* ausgetauscht. Der zwischen *S. bicolor* und *Z. mays* relativ hoch konservierte Bereich der kodierenden Sequenz („core“) von *Z. mays* wurde im Plasmid pIB334 (**E**) mit der übrigen Gensequenz von *S. bicolor* kombiniert. Die zur Amplifikation der jeweiligen Fragmente verwendeten Oligonukleotide sind annotiert (graue Dreiecke).

FK442 unter Verwendung des Plasmids pJG257 mittels PCR amplifiziert. Zudem wurde ein 1492 bp Fragment der kodierende Bereich und die 3' nichttranslatierte Sequenz des *atp6-1* Gens aus *S. bicolor* mittels PCR mit dem Oligonukleotidpaar FK443/FK444 und dem Plasmid pAF1 als PCR-Matrize erhalten. Aufgrund der durch die Oligonukleotide eingebrachten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen konnten die beiden Fragmente zu einem chimären *atp6* Gen neu kombiniert werden. Das so erhaltene Plasmid pMS282 (Plasmidkarte siehe Abb. 27), trägt demnach ein chimäres *atp6* Gen mit der 5'-Nichtkodierungssequenz aus Mais sowie der kodierenden und 3' nichtkodierenden Sequenz aus *S. bicolor* (Übersicht über die vorgenommenen Klonierungen der chimären *atp6* Gene siehe Abb. 19).

Für die Konstruktion des Plasmids pIB306 (Karte des Plasmids siehe Anhang, Abb. 28) wurde ein 962 bp großer Bereich der 5' nichttranslatierten Sequenz (FK433/FK434) sowie ein 364 bp großes Fragment des 3'-Nichtkodierungsbereichs des *atp6* Gens aus *Z. mays* amplifiziert. Die vollständige kodierende Sequenz des *atp6-1* Gens der Hirse wurde mit mittels PCR mit den Oligonukleotiden FK457/FK458 erhalten und mit dem 5'- und 3'-Bereich des Gens aus *Z. mays* kombiniert.

Da neben der Nichtkodierungssequenz auch der zwischen *S. bicolor* und *Z. mays* verschiedene 5'-Bereich der kodierenden Sequenz, der „*prepiece*“-Anteil, einen Einfluss auf die RNA-Edierung der *atp6* Transkripte des *S. bicolor* Gens in Maismitochondrien haben könnte, wurde dieser im Konstrukt pIB323 (Plasmidkarte siehe Anhang Abb. 28) gegen die entsprechende Sequenz aus *Z. mays* ausgetauscht. Hierzu wurde mittels PCR ein 1012 bp Fragment des 5'-Nichtkodierungsbereichs sowie der „*prepiece*“-Region des *Z. mays atp6* Gens mit den Oligonukleotiden FK433/FK503 amplifiziert. Das 885 bp große Fragment des „*core*“-Sequenz sowie 114 Nukleotide der 3'-Nichtkodierungsregion des *S. bicolor atp6-1* Gens wurden mit den Oligonukleotiden FK500 und FK501 amplifiziert und mit dem *atp6* Fragment von *Z. mays* ligiert.

Das Konstrukt pIB325 (vgl. Plasmidkarte Abb. 28 im Anhang) hingegen besteht aus dem 944 bp großen Fragment des 5' nichtkodierenden Bereichs (FK498/FK499) des *atp6-1* Gens aus *S. bicolor*. Der „*prepiece*“-Anteil (432 bp) des *Z. mays atp6* wurde mit den Oligonu-

kleotiden FK502 und FK503 amplifiziert. Die beiden Fragmente wurden nachfolgend mit dem im Plasmid pIB323 vorliegenden „core“-Anteil des *S. bicolor atp6-1* Gens sowie dem 3' nichttranslatierten Bereich fusioniert.

1178 bp der *S. bicolor atp6-1* Sequenz mit dem 5'-Nichtkodierungsbereich sowie dem „pre-piece“-Anteil wurden mit den Oligonukleotiden FK498 und FK529 mittels PCR synthetisiert. Die Amplifikation der „core“-Region des *Z. mays atp6* Gens erfolgte mit den Oligonukleotiden FK530 und FK531. Beide Fragmente liegen fusioniert mit dem 114 bp PCR-Produkt des *S. bicolor atp6-1* 3'-Nichtkodierungsbereichs im Konstrukt pIB334 (Karte des Plasmids vgl. Anhang, Abb. 28) vor.

Die so konstruierten Plasmide der chimären *atp6* Gene wurden in isolierte Mitochondrien eingebracht (vgl. Kap. 2.2.14). Nach einer dreistündigen Inkubation der Organellen in dem Respirationspuffer wurde die Gesamt-RNA isoliert. Für die nachfolgende RT-PCR (siehe Kap. 2.2.12) wurde jeweils ein Oligonukleotid verwendet, welches innerhalb des *S. bicolor atp6-1* Sequenzanteils der Konstrukte hybridisiert. So wurde eine spezifische Amplifikation der cDNA des Fremdgens erzielt. Von allen chimären *atp6* Konstrukten konnten cDNA-Fragmente amplifiziert werden (ohne Abb.). Der Nachweis der RNA-Edierung der Transkripte erfolgte wiederum durch die Untersuchung der Hydrolysierbarkeit der cDNA durch die Restriktionsendonuklease *HindIII*. Die gelelektrophoretische Auftrennung der hydrolysierten wie nicht-hydrolysierten RT-PCR-Proben (siehe Abb. 20) zeigte, dass nur unter Verwendung des Plasmids pIB323 ein cDNA-Fragment des Fremdgens amplifiziert wurde, die mit *HindIII* hydrolysierbar war. Demnach lagen in dieser RNA-Population Transkripte vor, die an der betrachteten Position ediert waren. Eine nachfolgende Sequenzierung des 803 Nukleotide großen PCR-Produkts bestätigte im Chromatogramm die nur mit geringer Effizienz erfolgte RNA-Edierung, wie in der Abbildung 20 (B) deutlich wird. Vergleichend ist der entsprechende Ausschnitt des Chromatogramms aus der Sequenzierung der vom Plasmid pIB325 erhaltenen cDNA dargestellt. Die Sequenzierung des mit *HindIII* hydrolysierten, aus dem Gel eluierten Fragments zeigt hingegen einen höheren Anteil an prozessierten Edierungsstellen (vgl. Abb. 20, C).

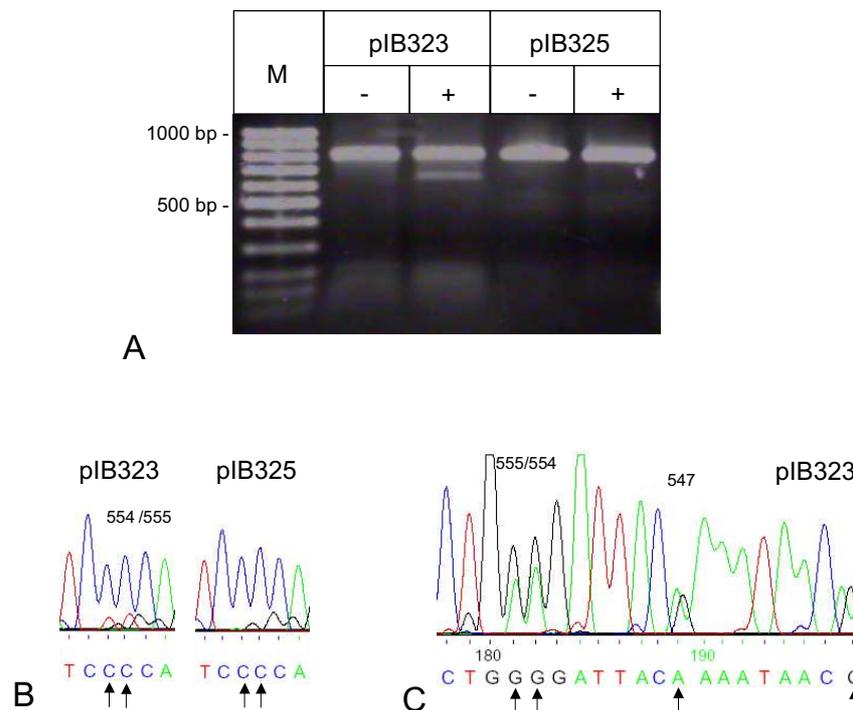


Abbildung 20: RNA-Edierung der Transkripte chimäre Konstrukte des *atp6* Gens.

A Isolierte Mitochondrien aus *Z. mays* wurden für eine Elektroporation mit dem Plasmid pIB323 und pIB325 eingesetzt. Mit der nach einer *in organello* Inkubation extrahierten Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK500 und FK573 durchgeführt. So konnten Transkripte des in die Organellen eingebrachten chimären *atp6* Gens erhalten werden. Gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden die RT-PCR Produkte vor („-“) und nach („+“) einer Hydrolyse mit der Restriktionendonuklease *Hind*III. **B** Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung der nach *in organello* Transkription von pIB323 und pIB325 erhaltenen RT-PCR Produkte. **C** Die *Hind*III hydrolysierten Fragmente der pIB323 cDNA wurden aus dem Gel eluiert und ebenfalls sequenziert. Abgebildet ist ein Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung.

Die Chromatogramme der Sequenzierung beider cDNAs weisen an sämtlichen, im amplifizierten Bereich des Transkripts gelegenen Edierungsstellen auf eine lediglich partielle Edierung der chimären *atp6* Transkripte bei Verwendung des Plasmids pIB323 hin. Vergleichend mit den Ausschnitten des Chromatogramms der Sequenzierung der vom Plasmid pIB325 erhaltenen cDNA sind die RNA-Edierungsstellen in Abb. 21 abgebildet.

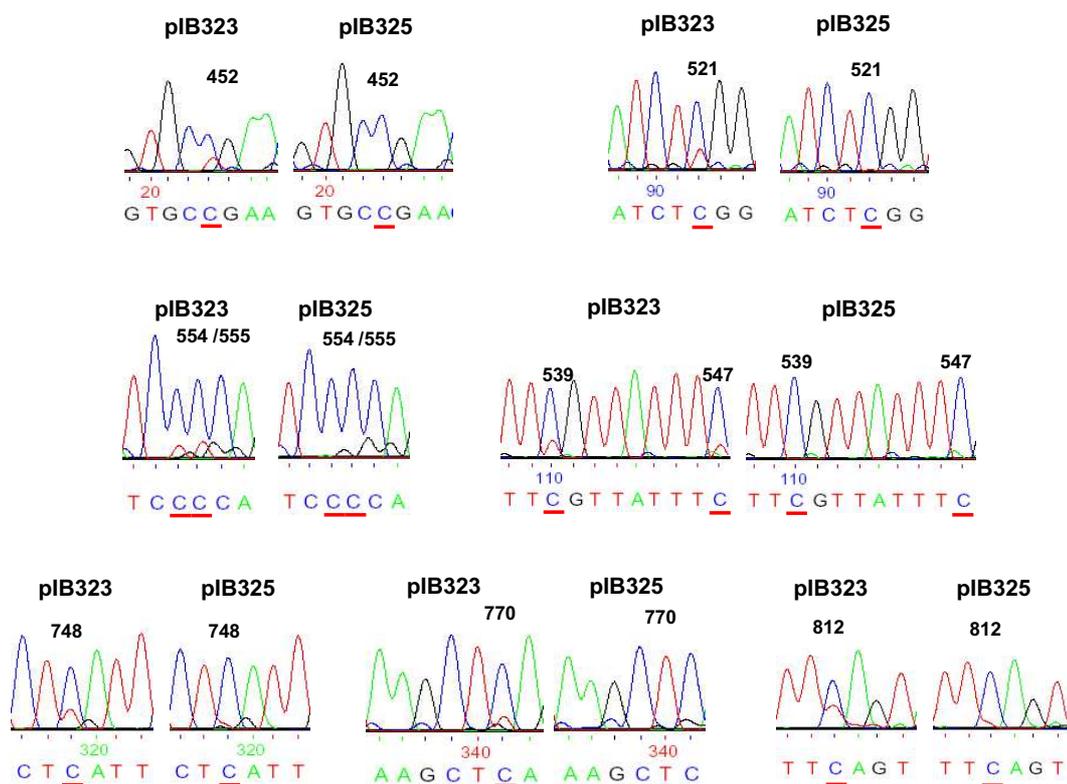


Abbildung 21: RNA-Edierung der Transkripte chimäre Konstrukte des *atp6* Gens.

Vergleichend sind die Ausschnitte aus den Chromatogrammen der Sequenzierung der von den Plasmiden pIB323 bzw. pIB325 erhaltenen RT-PCR Produkte (siehe Abb. 20) gezeigt. Die Edierungsstellen wurden hervorgehoben (unterstrichenes C) und in Bezug auf das Startkodon (1) der *atp6* Transkripte des endogenen Gens nummeriert.

3.4.4 Expression des *atp9* Gens aus *Sorghum bicolor* in Mitochondrien aus *Zea mays*

3.4.4.1 Klonierung des *atp9* Gens aus *Sorghum bicolor*

Die kodierende Sequenz des für die Untereinheit 9 der mitochondrialen ATP-Synthase kodierenden Gens beträgt bei *S. bicolor* (NCBI „Accession No.“: U61165) 240 bp, bei *Z. mays* lediglich 225 bp (NCBI „Accession No.“: AY506529). Ursächlich hierfür ist ein zweites Startkodon des *atp9* Gens, das bei *S. bicolor* im 5'-Bereich des sonst in der DNA-Sequenz des *atp9* Gens verschiedener Gattungen konservierten ATGs liegt. Demnach weist das ATP9 Protein aufgrund der zusätzlichen 15 Nukleotide evtl. bei *S. bicolor* eine aminoterminaler Extension von fünf Aminosäuren im Vergleich zum Protein (75 Aminosäuren) aus *Z. mays* auf.

Im Bereich der kodierenden Sequenz des *atp9* Transkripts befinden sich bei *Z. mays* sieben Edierungsstellen (Grosskopf und Mulligan, 1996). Die *atp9* mRNA von *S. bicolor* hingegen weist acht zu edierende Cytosine auf (Salazar *et al.*, 1991). Bei *S. bicolor* ist die Position 238 (Nummerierung bezogen auf das Start-Kodon) auffällig, hier entsteht das Stopp-Kodon TGA erst durch die Edierung der RNA. Im *atp9* Transkript von *Z. mays* liegt das Stopp-Kodon (TAA) bereits in der DNA Sequenz kodiert vor. Neben diesem abweichenden Stopp-Kodon befindet sich zudem an Position 182 der *atp9* RNA aus *Z. mays* eine Abweichung des Edierungsmusters zwischen *Z. mays* und *S. bicolor*. An dieser Stelle liegt bei *S. bicolor* präediert ein Thymin, bei *Z. mays* jedoch ein zu edierendes Cytosin vor. Die RNA-Edierung an Position 220 bei *S. bicolor* ist für die *atp9* RNA aus *Z. mays* nicht beschrieben. Demnach haben *Z. mays* und *S. bicolor*, wie Tab. 7 zusammenfasst, sechs Edierungsstellen gemeinsam.

Bei *S. bicolor* liegt das *atp9* Gen 323 bp stromab der für die Methionin-tRNA kodierenden Sequenz *trnfM* (Yan *et al.*, 1997). Die *atp9* Transkripte weisen unterschiedliche 5'-Enden auf, die ein bis 28 Nukleotide an das 3'-Ende der *trnfM* Sequenz heran reichen. Aufgrund der vorgefundenen primären wie prozessierten Transkripte wird eine Transkriptpopulation aus prozessierten *trnfM* und *atp9* Co-Transkripten sowie eine Initiation der Transkription in der *trnfM* Sequenz bzw. in deren 3'-Bereich angenommen (Yan *et al.*, 1997).

Der 5'-Bereich zeigt im Vergleich von *S. bicolor* und *Z. mays* eine hoch konservierte Sequenz bis Position -154 bei *S. bicolor*. *Z. mays* weist in diesen 154 Nukleotiden jedoch eine Insertion von insgesamt 30 Nukleotiden auf. Stromaufwärts von Position -154 findet sich keine signifikante Homologie zwischen den beiden mtDNA Sequenzen in der Nähe zum *atp9* Gen. Ähnlich der Situation bei *S. bicolor* ist auch für *Z. mays* eine heterogene Population an *atp9* Transkripte aufgrund multipler Transkriptionsinitiationen beschrieben (Mulligan *et al.*, 1988).

Im 3'-Bereich des *atp9* Transkripts von *P. sativum* liegt ein Sequenzabschnitt vor, der die mRNA Stabilität bedingen könnte (Dombrowski *et al.*, 1997). Als potentielle Sekundärstruktur kann eine doppelte Stamm-Schleifen-Struktur angenommen werden (Dombrowski *et al.*, 1997). Der Vergleich dieser Sequenz aus *P. sativum* mit der publizierten *atp9* Sequenz aus Hirse zeigt deutliche Ähnlichkeiten (vgl. Abb. 22, B). Demnach könnte auch die *atp9* RNA der Hirse durch diese Doppel-Stamm-Schleifenstruktur stabilisiert werden.

Aufgrund dieser evtl. zur Transkriptstabilisierung notwendigen Bereiche der 3' nichttranslatierten Sequenz sowie der im 5'-Bereich vorgefundenen großen Divergenzen wurden zur Klonierung des *atp9* Gens aus der Hirse daher die Oligonukleotide FK553 und FK554 aus der publizierten Sequenz des *atp9* Gens von *S. bicolor* (NCBI „Accession No.“: U61165) abgeleitet. Der so mittels PCR amplifizierte, 810 bp große und in den Klonierungsvektor pBluescript II SK+ (Stratagene, Heidelberg) eingebrachte Abschnitt des *atp9* Gens umfasst einen 5'-Bereich von 390 bp und einen 3'-Nichtkodierungsbereich von 130 Nukleotiden (siehe Abb. 22). Dieses Fragment des *S. bicolor atp9* Gens liegt im Plasmid pMS381 vor (Plasmidkarte siehe Anhang, Abb. 28). Somit befindet sich zwar der 3'-Sequenzabschnitt der das Transkript des *atp9* Gens stabilisierenden Stamm-Schleifen-Struktur innerhalb der klonierten DNA, nicht jedoch der Promotorbereich vor der bei *S. bicolor* vorkommenden Methionin-tRNA. Aufgrund der von Yan *et al.* (1997) in *S. bicolor* vorgefundenen 5'-Enden der *atp9* Primärtranskripte, deren 5'-Sequenz homolog war zum Sequenzbereich direkt im 3'-Bereich der *trnfM*, sollte eine Initiation der Transkription jedoch auch innerhalb des hier klonierten Fragments mit einem Anteil der *trnfM*-Sequenz (vgl. Abb.22) erfolgen können. Die Sequenzierung des klonierten *atp9* Gens zeigte innerhalb der 5'-Nichtkodierungssequenz

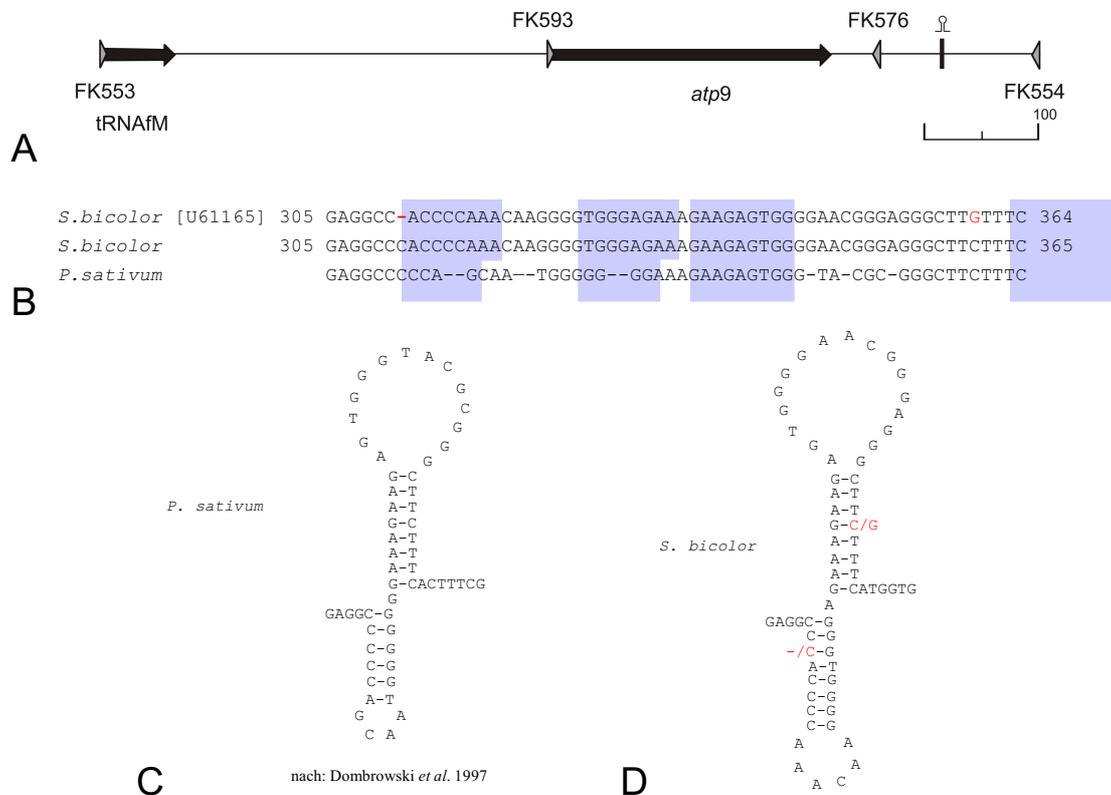


Abbildung 22: Schematische Darstellung des *atp9*-Gens aus *Sorghum bicolor*.

Die zur Amplifikation des 810 bp großen *atp9* PCR-Produkts aus Gesamt-DNA von *S. bicolor* (Linie IS1112C) verwendeten Oligonukleotide FK553/FK554 sind in der schematischen Darstellung (A) des in den Plasmiden pMS343 und pMS381 vorliegenden Fragments des *atp9* Gens (NCBI „Accession No.“: U61165) ebenso wie das für die RT-PCR verwendete Oligonukleotidpaar FK593/FK576 als Dreiecke eingezeichnet. Ein Vergleich der publizierten 3'-Sequenz des *atp9* Gens aus *S. bicolor* sowie des im Plasmid pMS343 bzw. pMS381 vorliegenden klonierten *atp9* Genabschnitts mit Sequenz von *P. sativum* zeigt deutliche Ähnlichkeiten in einem Sequenzbereich (B), der für die Transkriptstabilität in *P. sativum* beschrieben wurde (Dombrowski *et al.*, 1997). In Anlehnung an die von Dombrowski *et al.* (1997) aus der Sequenz abgeleitete Sekundärstruktur am Ende der *atp9* Transkripte von *P. sativum* (C) kann eine Ähnliche 2D-Struktur für die *atp9* Transkripte von *S. bicolor* dargestellt werden (D).

sowie der kodierenden Sequenz des *atp9* Gens eine völlige Übereinstimmung mit der publizierten DNA-Sequenz. Im 3'-Nichtkodierungsbereich fielen Unterschiede auf. Ein Vergleich dieser in der Sequenz abweichenden Positionen mit der veröffentlichten Sequenz des 3'-Bereichs von *P. sativum* zeigt, dass die Basenabfolge innerhalb der für *P. sativum* ange-

nommenen Doppel-Stamm-Schleifen Struktur zwischen *P. sativum* und *S. bicolor* relativ konserviert sind. Aus der ermittelten Sequenz lässt sich in Anlehnung an die für *P. sativum* dargestellte Sekundärstruktur ebenfalls eine zweifache Stamm-Schleifen-Struktur aufzeigen (siehe Abb. 22).

3.4.4.2 Transkription des *atp9* Gens aus *Sorghum bicolor* und Transkriptprozessierung in Mitochondrien aus *Zea mays*

Für die Untersuchung der mRNA des Transgens wurden aufgrund der Sequenzunterschiede von Transkripten des *S. bicolor* und *Z. mays atp9* Gens die Oligonukleotide FK593 und FK576 zur spezifischen Amplifikation aus der Sequenz des *S. bicolor atp9* abgeleitet (vgl. Abb. 22). Zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten Oligonukleotide wurde eine RT-PCR mit RNA aus *Z. mays* vorgenommen. Weder in der Kontaminationskontrolle, noch in der RT-PCR Kontrolle mit mtRNA aus *Z. mays* (vgl. Abb. 23, A) ist ein Produkt nachweisbar.

Zur Transkriptanalyse im heterologen System wurde das Plasmid pMS381 mit dem klonierten *atp9* Gen aus *S. bicolor* mittels Elektroporation in isolierte Mitochondrien aus Mais eingebracht. Die aus den Organellen nach ein bis drei Stunden Inkubation in Respirationpuffer (siehe Kap. 2.2.14) isolierte Gesamt-RNA wurde für eine RT-PCR mit den für das *atp9* Transkript aus *S. bicolor* spezifischen Oligonukleotiden FK593 und FK576 eingesetzt. Wie Abb. 23 (A) zeigt, konnte so ein 300 bp großes Fragment erhalten werden. Demnach wird offensichtlich die Transkription auch in Abwesenheit des im 5'-Bereich der Methionin-tRNA von *S. bicolor* gelegenen, in dem klonierten *atp9* Fragment jedoch nicht vorhandenen Promotors des *trnfM-atp9* Co-Transkripts aus *S. bicolor* initiiert.

Um einen Aufschluss über den Status der RNA-Edierung der Transkripte des Fremdgens zu erhalten, wurde das *atp9* RT-PCR Produkt der drei Stunden Inkubations-Probe sequenziert. Wie die in Abb. 23 (B) gezeigten Ausschnitte der Chromatogramme der Sequenzierung belegen, befindet sich in der cDNA an Position 35, 97 und 107 ein Thymin an Stelle des in der DNA vorliegenden Cytosins (abgebildet ist die revers-komplementäre Sequenz

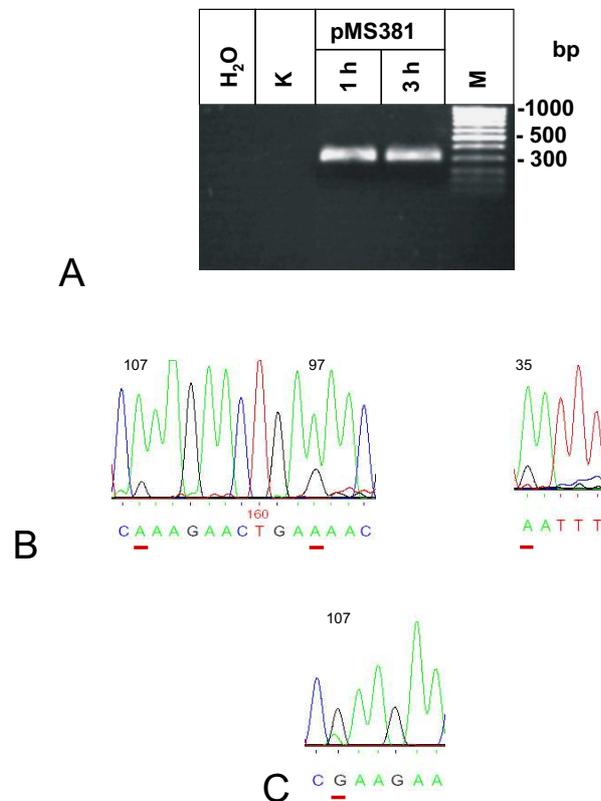


Abbildung 23: Transkription des *atp9* Gens aus *S. bicolor* und Prozessierung der Transkripte in isolierten Mitochondrien von *Z. mays*.

Die Plasmid-DNA wurde in isolierte Mitochondrien aus *Z. mays* mittels Elektroporation eingebracht. Nach ein bis dreistündiger Inkubation der so behandelten Organellen isolierte Gesamt-RNA wurde für eine RT-PCR mit den für *S. bicolor atp9* spezifischen Oligonukleotiden FK593 und FK576 eingesetzt. Die erhaltenen 300 bp großen RT-PCR Produkte (**A**) der Probe (drei Stunden Inkubation) wurden sequenziert. Ausschnitte der Chromatogramme dieser Sequenzierung zeigen, dass unter Verwendung des Plasmids pMS381 Transkripte des *atp9* Gens aus *S. bicolor* erhalten wurden, die an drei der acht Edierungsstellen (Position 35, 97 und 107) partiell ediert waren (**B**). Die Sequenzierung der von einer weiteren *in organello* Expression des Plasmids erhaltenen cDNA Fragmente weist auf eine erfolgte partielle Edierung an Position 107 hin (**C**), während alle übrigen Edierungsstellen nicht ediert waren (ohne Abb.).

der cDNA). Demnach ist hier von einer erfolgten RNA-Edierung des Primärtranskripts des Fremdgens an diesen Positionen auszugehen. Offensichtlich liegt aber nur ein Teil der zur cDNA Synthese eingesetzten RNA des Fremdgens in edierter Form vor, da in dem Chromatogramm Reste von Cytosin auffallen. Alle weiteren, im 3'-Bereich der *atp9* RNA gelegenen

Tabelle 7: RNA-Edierungsstellen in *atp9* Transkripten aus *S. bicolor* und *Z. mays*:RNA-Edierung bei heterologer Expression des *S. bicolor atp9* Gens in Mitochondrien aus *Z. mays*

(RNA-Edierungsstellen sind unterstrichen; Abk.: + = ediert, - = nicht ediert)

Position bei <i>S. bicolor</i>	Sequenz [5' - 3']	Position bei <i>Z. mays</i>	Edierung <i>in organello</i>
35	GCTAAAT <u>CAAT</u>	20	+/-
97	AAACGTT <u>CTCA</u>	82	+/-
107	AGTTCTT <u>CGAT</u>	92	+/+
149	AAACAAT <u>CATT</u>	134	-
206	TTTGCC <u>CAAT</u>	182	-
ped.	ATTGCAT <u>CGTT</u>	191	
220	GGCCTTT <u>CTGA</u>	-	-
227	CTGATCT <u>CATT</u>	212	-
238	CGTTTT <u>CCGAT</u>	-	-

Edierungsstellen lagen nicht ediert vor. Wiederholte Sequenzanalysen der cDNAs, die von RNA aus der Expression des *S. bicolor atp9* Konstrukts in isolierten Mitochondrien aus *Z. mays* amplifiziert wurden, weisen jeweils auf ein Ausbleiben der Edierung der Transkripte hin. Lediglich in einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass an Position 107 der mRNA des *S. bicolor atp9* Gens an Stelle des Cytosins auch Thymin in der cDNA vorkommt, was für eine zumindest partiell erfolgte Edierung an dieser Position spricht (vgl. Abb. 23, C). Parallel vorgenommene Untersuchungen zur Edierung der endogenen *atp6* Transkripte ließen darauf schließen, dass die Organellen in dem betrachteten Zeitraum endogene Transkripte prozessierten.

4 Diskussion

Die Transkripte pflanzlicher Organellen, der Plastiden sowie der Mitochondrien, unterliegen vielfältigen Prozessierungsreaktionen. Hierzu zählen neben den exo- und endonukleolytischen Verkürzung der 5'- und 3'-Enden der Primärtranskripte vornehmlich das Spleißen der mRNA in *cis* oder *trans* wie auch die RNA-Edierung der Transkripte. Die beiden letzteren Vorgänge führen durch das Zusammenführen der Exone sowie die Umwandlung von C nach U, seltener von U nach C, zu einer Veränderung der Sequenz der mRNA und folglich der von ihr abgeleiteten Proteinsequenz.

Während durch Untersuchungen der *in vivo* erstellten Transkripte lediglich das Resultat der Prozessierung analysiert werden kann, ermöglichen genetische Ansätze die Aufklärung der biochemischen wie molekularen Grundlagen dieser Prozessierungsreaktionen. Eine Analyse der RNA-Edierung *in vivo* sowohl in Plastiden wie Mitochondrien weist auf einen von der Entwicklung bzw. vom Gewebetyp abhängige Prozessierung der RNA hin (Bock *et al.*, 1993; Peeters und Hanson, 2002), weshalb in dieser Arbeit lediglich Mitochondrien aus gleichaltrigen Sprossen etiolierter angezogener Maispflanzen eingesetzt wurden.

Plastiden bieten, im Gegensatz zu Mitochondrien, die Möglichkeit der Analyse der RNA-Prozessierung anhand von transplastomischen Linien. So konnten bereits in einigen transgenen Ansätzen eine Charakterisierung von *cis*-Faktoren erfolgen (siehe Kap. 1.2.2). Bislang ist jedoch kein Verfahren zur stabilen Transformation bzw. zur Etablierung von Linien mit genetisch veränderten Mitochondrien bekannt.

Als alternative Methode zur Analyse der für die RNA-Edierung verantwortlichen *cis*-Sequenzen ist die Untersuchung der Transkriptprozessierung *in vitro* oder in isolierten, intakten Organellen möglich. So konnte durch eine Analyse der *in organello* RNA-Edierung in Mitochondrien von *Solanum tuberosum* (Yu *et al.*, 1995) und durch *in vitro* Analysen des Vorgangs in Lysaten von Weizenmitochondrien (Blanc *et al.* 1995) bereits eine oxidative Deaminierung bzw. Transaminierung als Ursache für die Umwandlung von Cytosin zu Uracil nachgewiesen werden. Die bislang entwickelten *in vitro* Systeme für *Triticum aestivum* (Araya *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1995) und *Pisum sativum* (Yu *et al.*, 1998; Takenaka und

Brennicke, 2003) scheinen jedoch aufgrund der schlechten Effizienz der RNA-Edierung zur Analyse der an der Prozessierung beteiligten, in *cis* wie *trans* aktiven, Faktoren nur wenig geeignet zu sein.

Im Gegensatz zu intakten Organellen weisen *in vitro* Systeme vermutlich die zur Prozessierung notwendigen Faktoren nicht in ausreichender Menge bzw. Konzentration auf. So wurde aus Mitochondrien von Weizen bereits ein membranassoziierter hochmolekularer Komplex isoliert, der *in vitro* Replikations- wie Transkriptionsaktivität zeigt (Echeverria *et al.*, 1991). Eine Edierung der von dem aus *S. tuberosum* isolierten mitochondrialen transkriptionsaktiven Chromosom *in vitro* synthetisierten Transkripte wurde jedoch nicht beobachtet (Fey *et al.*, 1999). Demnach könnten die für die RNA-Edierung wichtigen *trans*-aktiven Faktoren nicht an diesem Komplex gebunden vorliegen bzw. sind unter den untersuchten Bedingungen nicht aktiv. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz zur Analyse der Transkription und Transkriptprozessierung in isolierten, intakten pflanzlichen Mitochondrien gewählt. Die Kombination dieses *in organello* Systems mit der Möglichkeit, Fremd-DNA *in vitro* mittels Elektroporation in die Mitochondrien einzubringen, erlaubt zudem die Analyse der *in organello* synthetisierten mRNAs der Transgene.

4.1 Transkription endogener Gene und Transkriptprozessierung in isolierten Mitochondrien von *mmays*

4.1.1 Nachweis der Transkription endogener Gene *in organello*

Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der transienten Transkription in isolierten Mitochondrien ist die Präparation intakter Organellen aus dem verwendeten Blattmaterial. Deshalb wurde zunächst durch elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie Messungen der enzymatischen Aktivität von Leitenzymen der Mitochondrien nachgewiesen, dass es sich bei den aus etiolierten Blättern von *Zea mays* isolierten Organellen um intakte Mitochondrien handelt (vgl. Kap. 3.1.1 und 3.1.2).

Das für pflanzliche Mitochondrien adaptierte transiente Expressionssystem basiert auf den Bedingungen des für tierische Mitochondrien etablierten *in organello* Ansatzes von

Enrriquez *et al.* (1991, 1996). Der verwendete *in organello* Puffer enthält ein Osmotikum sowie anorganisches Phosphat, ADP und oxidierbare Substrate, um die oxidative Phosphorylierung in den Organellen in dem transienten Expressionssystem zu ermöglichen. Die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Respiration isolierter Mitochondrien in dem verwendeten *in organello* Puffer wurde durch den Nachweis der Aufnahme und Oxidation des für Mitochondrien spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker Orange CM-H₂TMRos gezeigt (siehe Kap. 3.1.3).

Die isolierten Organellen aus *Z. mays* sind in dem verwendeten *in organello* System in der Lage, endogene Gene über einen Zeitraum von drei Stunden zu transkribieren (vgl. Kap. 3.2.1). Dies konnte durch die Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP in die *in organello* synthetisierte mitochondriale Transkripte gezeigt werden (vgl. Kap. 3.2.1). Aufgrund der Zunahme der Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP in mitochondriale Transkripte über die Zeit liegt vermutlich, im Gegensatz zu den „run on“ Analysen von Muise und Hauswirt (1992), eine *de novo* Synthese von Transkripten *in organello* vor. Vergleichbare Systeme sind für die *in organello* Transkription in Mitochondrien aus Hefe (Groot *et al.*, 1981; Poyton *et al.*, 1996), aus HeLa-Zellen (Gaines, 1996) und aus Säugern (Inaba und Oda, 1977) beschrieben. Die Anwendung eines solchen transienten *in organello* Transkriptions-Ansatzes ermöglichte den Nachweis der gewebeabhängige Transkription in Mitochondrien aus dem Gehirn von Schafen (Enrriquez *et al.*, 1993).

Das *in organello* System ist jedoch nicht auf die Transkription mitochondrialer Gene beschränkt. Auch die Translation konnte in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae* aufrecht erhalten werden (Poyton *et al.*, 1996). Zudem wurde die Replikation mitochondrialer DNA in isolierten Mitochondrien nachgewiesen (Enrriquez *et al.*, 1994).

Oligomycin vermag den F₀ Teil der F₀F₁ ATP-Synthase der Mitochondrien zu hemmen (Kagawa und Racker, 1966). Eine solche Inaktivierung ist sowohl für Mitochondrien aus der Leber von Ratten (Slater und Ter Welle, 1969), als auch aus Pflanzen beschrieben (Krömer *et al.*, 1988; Valerio *et al.*, 1994). Die Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin hatte einen negativen Einfluss auf die *in organello* RNA-Synthese (siehe Kap. 3.2.1) in isolierten Mitochondrien von *Z. mays*. Bei einer Konzentration von 0,2 μg Oligomycin pro mg Prote-

in wurde eine 50%-ige Inaktivierung der ATP-Synthase bei Mitochondrien der Rattenleber (Slater und Ter Welle, 1969) und aus *P. sativum* (Krömer *et al.*, 1988) erzielt. Die verwendete Konzentration an Oligomycin (10 μg Oligomycin pro mg Mitochondrienprotein) sollte die ATP-Synthase der Mitochondrien aus Mais nahezu vollständig inhibieren. Da die durch Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP nachgewiesene *in organello* RNA-Synthese sensitiv gegen geringe Konzentrationen des Hemmstoffs ist, kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen markierten Transkripte mitochondrialen Ursprungs sind. Bakterielle Kontaminationen wurden durch die Desinfektion des Ausgangsmaterials und nachfolgende Kontrolle der Keimbelastung ausgeschlossen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die RNA-Synthese in pflanzlichen Mitochondrien durch den Redox-Zustand der Organellen reguliert wird (Wilson und Pearson, 1996). Für Mitochondrien aus *S. tuberosum* ist zudem bekannt, dass eine Verminderung der mitochondrialen Transkriptionsaktivität durch eine vollständige Reduktion des Rieske Eisen-Schwefel Proteins des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette hervorgerufen wird (Wilson *et al.*, 1996). Die Inhibierung der ATP-Synthase und die damit einhergehende Reduktion des Ubichinons sollte in den Mitochondrien von *Z. mays* zu einer erhöhten Reduktion des Komplexes III führen. Demnach könnte bei den isolierten Mitochondrien aus *Z. mays* eine Redox-Abhängigkeit der RNA-Synthese *in organello* Ursache für die beobachtete Reduktion der Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP in die synthetisierten Transkripte vorliegen. Eine Inhibierung der ATP-Synthase durch Oligomycin würde darüber hinaus die Konzentration an ATP reduzieren, was ebenfalls die Transkriptionsaktivität negativ beeinflussen sollte.

Nachweislich erfolgte die Transkription bei einer Konzentration von 1 mM ADP, war aber sensitiv gegenüber einer erhöhten Konzentration an ADP von 5 mM (vgl. Kap. 3.2.1). Für die *in organello* Transkription in tierischen Mitochondrien ist der die Transkription inhibierende Einfluss einer auf 2 mM erhöhten Konzentration an ADP ebenfalls bekannt (Enríquez *et al.*, 1996). In Lysaten von Mitochondrien aus HeLa Zellen führte eine erhöhte Konzentrationen an ATP zur Hemmung der Transkription (Fernandez-Silva *et al.*, 1996). Die Aufrechterhaltung des Elektronenflusses der mitochondrialen Atmungskette

durch die Supplementierung des Puffers mit oxidierbaren Substraten könnte zu einer fortlaufenden Phosphorylierung des in die Organellen aufgenommenen ADPs führen. Hierdurch würde die Konzentration an ATP in den Mitochondrien stetig erhöht, zumal die Organellen von ATP-verbrauchende cytoplasmatische Prozessen isoliert sind. Ein vergrößerter ADP-Konzentrationsgradient könnte ebenso zu einem quantitativen Export des ATP durch den mitochondrialen ADP/ATP-Antiporter führen, was ebenfalls die Transkription negativ beeinflussen könnte.

Die Oxidation der im *in organello* Puffer enthaltenen Substrate Glutamat oder Malat führt zu einer Reduktion des Ubichinonpools. Durch die nachfolgenden Enzyme der Atmungskette kann der Elektronenfluss bei gleichzeitiger Translokation von Protonen über die mitochondriale Membran erfolgen. Das so erhaltene Membranpotential wird durch die ATP-Synthase zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischen Phosphat genutzt. Möglicherweise führt die ausserhalb der Organellen erhöhte Konzentrationen von ADP zu einem vermehrten Abbau des Membranpotentials. Dies hätte eine Oxidation des Komplexes III der Atmungskette sowie des Ubichinons zur Folge. Da die RNA-Synthese der Mitochondrien aus *Z. mays* sowohl durch eine Inhibierung der ATP-Synthase (s.o.), wie auch durch erhöhte Konzentrationen an ADP inhibiert wird, könnte in beiden Fällen eine Regulation der mitochondrialen Transkription in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Organellen vorliegen.

Die Transkription isolierter Mitochondrien aus *Z. mays* ist zudem sensitiv gegenüber dem Nukleotidanalogue Cordycepin (3'-Deoxyadenosin 5'-triphosphat). So konnte eine Reduktion der Transkriptionsrate durch die Supplementierung des *in organello* Puffers mit diesem Hemmstoff festgestellt werden. Eine Beeinflussung der mitochondrialen Transkription durch Cordycepin wurde bereits für HeLa Zellkulturen beschrieben (Zylber *et al.*, 1971) und scheint auch für Mitochondrien aus pflanzlichen Zellen vorzuliegen.

4.1.2 *In organello* Prozessierung endogener Transkripte am Beispiel der Transkripte des *nad9*, *atp6* und *cox2* Gens

Neben der Transkription erfolgte auch die Prozessierung der in dem transienten System gebildeten mitochondrialen Transkripte. Über einen Zeitraum von bis zu fünf Stunden konnten gespleißte Transkripte des *cox2* Gens nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.2.2). Im Gegensatz zu ungespleißten *cox2* Transkripten sind die gespleißten mRNAs des *cox2* Gens bei *Z. mays in planta* nahezu vollständig ediert (Yang und Mulligan, 1991). Demnach ist wahrscheinlich, dass auch die in isolierten Mitochondrien aus Mais *in organello* gespleißten *cox2* Transkripte ediert vorliegen.

Zum Nachweis der Edierungsfähigkeit der isolierten Organellen wurden die in isolierten Mitochondrien synthetisierten Transkripte des *nad9* sowie des *atp6* Gens untersucht. So konnten erstmals elf Edierungsstellen der *nad9* mRNA aus *Z. mays* ermittelt werden (siehe Kap. 3.2.3). Die relative Lage der elf Edierungsstellen im *nad9* Transkript von *Z. mays* stimmt mit den für *O. sativa* bekannten Edierungsmuster (Nishiwaki *et al.*, 1995) überein. Die Edierung einer im 5'-Bereich der kodierenden Sequenz von *Z. mays* liegenden potentielle Edierungsposition konnte nicht verifiziert werden. Bei allen untersuchten Edierungsstellen der *nad9* mRNA wurde lediglich eine partielle Edierung der *nad9* Transkripte beobachtet. Für *S. tuberosum* wurde bereits eine Population von edierten wie partiell edierten *nad9* beschrieben (Grohmann *et al.*, 1994; Lu und Hanson, 1996). Der Grad der Prozessierung einzelner Edierungsstellen innerhalb des *S. tuberosum nad9* Transkripts variierte (Grohmann *et al.*, 1994), ein Muster dieser Varianz konnte nicht ermittelt werden. Auch die hier untersuchte Edierung der *nad9* mRNA Population aus Mitochondrien von *Z. mays* zeigt eine graduell verschiedene partielle Edierung, auch wenn eine statistische Untersuchung des Edierungszustandes einzelner Transkripte nicht vorgenommen wurde.

Zudem wurden die *atp6* Transkripte in einer Zeitreihe der Inkubation der Organellen über sieben Stunden vollständig ediert vorgefunden (vgl. Kap. 3.2.2). Während der Edierungsgrad der *atp6* Transkripte in *Petunia hybrida in vivo* offensichtlich niedriger ist (Lu und Hanson, 1994), wurde für *Triticum aestivum* ebenfalls eine annähernd 100%-ige Edierung der *atp6* mRNA beschrieben (Kempken *et al.*, 1991).

Da anhand von UTP-Inkorporationsversuchen eine Synthese von RNA in den isolierten Organellen nachgewiesen wurde (siehe Kap. 3.2.1), nach sieben Stunden aber lediglich vollständig prozessierte Transkripte vorlagen, ist von einer erfolgten Edierung bzw. dem erfolgten Spleißen auch der neu synthetisierten Transkripte auszugehen. Zudem ist für die *atp6* Transkripte eine erhöhte Transkriptionsrate bei gleichzeitig niedrigem Transkriptspiegel, also eine erhöhte Instabilität der *atp6* mRNA in Mitochondrien von Mais (Muise und Hauswirth, 1992) und *A. thaliana* (Giegè *et al.*, 2000) ermittelt worden. Offensichtlich sind die für das Spleißen respektive die RNA-Edierung der endogenen Transkripte verantwortlichen *trans*-Faktoren nicht nur in ausreichendem Maß in den isolierten Organellen vorhanden, sondern bleiben über den betrachteten Zeitraum auch funktionell katalytisch aktiv.

Durch eine *in organello* Inkorporation von Biotin-UTP in mitochondriale Transkripte von *Z. mays* konnte zudem eine Isolierung der markierten, also während der Inkubationsdauer in den Mitochondrien in der Synthese befindlichen Transkripte erfolgen (vgl. Kap. 3.2.4). Auch in dieser Population an mRNA wurde eine RNA-Edierung der *atp6* Transkripte detektiert. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit nahm der Anteil an edierter *atp6* mRNA zu. Demnach wird auch die neu synthetisierte *atp6* mRNA ediert. Folglich reflektieren die Daten zur Edierung endogener *atp6* Transkripte über die Zeit (s.o.) nicht nur den Edierungsstatus der zum Zeitpunkt der Isolierung der Organellen vorhandenen RNA-Population. Der wachsende Anteil der mit Biotin markierten und edierten *atp6* Transkripte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit deutet auf eine posttranskriptional erfolgende Edierung hin.

Die vorliegenden Daten zur Charakterisierung des *in organello* Systems isolierter Mitochondrien von *Z. mays* zeigen, dass eine transiente Transkription sowie die Analyse der Prozessierung endogener Transkripte in isolierten, gereinigten Mitochondrien möglich ist. Im Gegensatz zu der nur partiell edierten mRNA des *nad9* Gens wurden vollständig prozessierte Transkripte des *atp6* sowie des *cox2* Gens erhalten, weshalb sich die Verwendung dieser beiden Gene im Hinblick auf die Transkription sowie die Prozessierung in einem heterologen System anbietet.

Es konnte jedoch mitunter beobachtet werden, dass die Effizienz der RNA-Edierung von der Qualität der präparierten Mitochondrien abhängig war. In unabhängigen Versuchen wurde sowohl eine Zunahme der RNA-Edierung der *atp6* Transkripte, wie auch bisweilen eine Abnahme der Edierungsfrequenz beobachtet. Im Hinblick auf die Aussagen zur RNA-Edierung der von den in die Organellen eingebrachten Fremdgenen erhaltenen Transkripte ist daher eine zusätzliche Analyse des Edierungsgrades endogenen Transkripte von Bedeutung.

4.2 Exogene DNA kann mittels Elektroporation effizient in isolierte Mitochondrien eingebracht werden

Die Etablierung des Elektroporationsverfahrens für isolierte pflanzliche Mitochondrien erfolgte in Anlehnung an die für tierische Mitochondrien publizierte Methode (Collombet *et al.*, 1997). Den Daten von Collombet *et al.* (1997) entsprechend konnte mittels Elektroporation Plasmid-DNA *in vitro* in die isolierten und aufgereinigten Mitochondrien von *Z. mays* eingebracht werden (vgl. Kap. 3.3.1). Die Effizienz der Translokation war abhängig von der Feldstärke (siehe Kap. 3.3.1). So wurde ein nachweislich größerer Anteil an Plasmid-DNA nach einer Elektroporation von Mitochondrien bei einer optimalen Spannung von 1,8 bis 2 kV detektiert, der gegenüber einer DNase-Behandlung insensitive war. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten differieren von den für tierische Mitochondrien (Collombet *et al.*, 1997) sowie in einem für Mitochondrien aus Weizen (Farrè und Araya, 2001) beschriebenen Elektroporationssystem. Für tierische Mitochondrien wurde eine optimale Effizienz für die Translokation der Plasmid-DNA in die Organellen bei einer angelegten Spannung von 1,4 kV ermittelt (Collombet *et al.*, 1997), was annähernd dem Wert für die optimale Effizienz der Elektroporation von Weizenmitochondrien von 13 kV pro cm entspricht (Farrè und Araya, 2001). Für Mitochondrien aus Mais und Reis wurde hingegen eine optimale Feldstärke von 8,8 kV pro cm beschrieben (Mulligan *et al.*, 1989). Möglicherweise differieren die für die einzelnen Systeme ermittelten Spannungen für eine optimale Effizienz der Elektroporation aufgrund der unterschiedlichen Mengen eingesetzter Mitochondrien oder Plasmid-DNA.

Das Einbringen der Fremd-DNA in die Mitochondrien von Mais war von der Größe der Plasmid-DNA (vgl. Kap. 3.3.2) abhängig. Während lineare und superspiralisierte pBluescript II SK+ DNA (3 kb) sowie ein 11 kb großes Plasmid im Anschluss an eine Elektroporation in den Organellen nachgewiesen werden konnten, erfolgte keine Detektion eines 30 kb großen Cosmids. Die in die Mitochondrien von Mais eingebrachte, in der superspiralisierten Form zur Elektroporation der Organellen eingesetzte Plasmid-DNA lag nach der Isolierung aus den Mitochondrien in der linearen wie offen zirkulären Form vor. Auch nach der Elektroporation tierischer Mitochondrien wurden alle drei Zustandsformen der superspiralisiert eingesetzten Plasmid-DNA im Anschluss an die Translokation in den Organellen nachgewiesen (Collombet *et al.*, 1997).

Die Effizienz der Elektroporation war hingegen nicht abhängig von der Konformation der verwendeten DNA (vgl. Kap. 3.3.2). Die in die Organellen eingebrachte superspiralisierte DNA war ebenso wirksam wie die linear eingesetzte DNA des Plasmids pBluescript SK+ gegen die nachfolgende Hydrolase durch eine DNase-Behandlung geschützt. Dem gegenüber wurde eine effiziente, aktive Aufnahme vornehmlich linearer DNA in isolierte Mitochondrien aus *Solanum tuberosum* beobachtet (Koulintchenko *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Präferenz von linearer DNA des aktiven Transports der Mitochondrien aus Kartoffeln ist davon auszugehen, dass das Einbringen der DNA mittels Elektroporation in Mais-Mitochondrien nicht über einen Permeabilität-Komplex erfolgt. Vielmehr ist bei dem spannungsabhängigen Einbringen der Fremd-DNA in Mitochondrien aus *Z. mays* ein der Elektroporation von Bakterien (Miller *et al.*, 1988; Calvin und Hanawalt, 1988) ähnlicher Prozess der Translokation der DNA anzunehmen.

Vermutlich liegt die in die Mitochondrien eingebrachte Fremd-DNA in der mitochondrialen Matrix vor, da trotz einer Solubilisierung der äußeren mitochondrialen Membran mittels Digitonin ein Anteil an Plasmid-DNA vor einer zugegebenen DNase geschützt vorlag (siehe Kap. 3.3.1). Collombet *et al.* (1997) konnten etwa 43% der zur Elektroporation eingesetzten Plasmid-DNA nach Solubilisierung der äußeren mitochondrialen Membran in den Organellen detektieren. Die in die Mitochondrien eingebrachte, zuvor mittels Digoxigenin markierte DNA wurde zudem durch eine nachfolgende Detektion mittels Antikörpertechniken

innerhalb der Matrix lokalisieren (Collombet *et al.*, 1997). Aufgrund der nachgewiesenen Matrix-Lokalisation der Plasmid-DNA könnte eine Transkription von klonierten Fremd-Genen durch den organellären Transkriptionsapparat erfolgen.

4.3 Transkription von Fremd-DNA in isolierten Mitochondrien

Die Kombination des Einbringens von Fremd-DNA in isolierte Mitochondrien mit dem transienten Expressionssystem ermöglicht die Analyse der Transkription der Fremd-DNA in isolierten Mitochondrien. So konnten Transkripte des klonierten *cox2* Gens von *A. thaliana* in isolierten Mitochondrien im Anschluss an eine Elektroporation mittels RT-PCR amplifiziert werden (siehe Kap. 3.4.1). Damit konnte erstmals ein Transkript einer Dikotylen in Mitochondrien einer monokotylen Pflanze nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte mRNA der in die Organellen eingebrachten *atp6* sowie *atp9* Gene aus *S. bicolor* detektiert werden (vgl. Kap. 3.4.2 und 3.4.5).

Alle klonierten Gene enthielten Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich, die eine Transkriptinitiation bzw. Prozessierung der 3'-Enden der RNA ermöglichen sollten. Nicht auszuschliessen ist hingegen, dass die Transkription unabhängig von diesen Strukturen, d.h. unspezifisch oder innerhalb der Sequenz des Vektor, z.B. an den im pBluescript II SK+ vorliegenden T3- oder T7-Promotoren, erfolgt. Eine Untersuchung der 5'- und 3'-Bereiche der erhaltenen Transkripte wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Demnach kann keine Aussage über die Funktionalität der in dem klonierten *cox2* Gen der Dikotylen *A. thaliana* vorliegenden potentiellen Promotorsequenz in isolierten Mitochondrien der monokotylen Pflanze *Z. mays* getroffen werden.

4.4 Spleißen der Transkripte des *Arabidopsis thaliana cox2* Gens in Mitochondrien von *Zea mays*

Aufgrund des im *cox2* Gen von *A. thaliana* vorliegenden Introns der Gruppe II (Unselde *et al.*, 1997) konnte das Spleißen der Primärtranskripte des in die Mitochondrien von *Z. mays* eingebrachten Fremdgens gezeigt werden (siehe Kap. 3.4.1). Im Gegensatz zu den

Daten von Farrè und Araya (2001) erfolgte das Spleißen der *cox2* Transkripte sehr effizient. Wenn gleich die RT-PCR Bedingungen eine Amplifikation von cDNA ungespleißter Primärtranskripte ermöglichen sollten, konnten weder Intronhaltige mRNAs des endogenen *cox2* Gens (vgl. Kap. 3.2.2), noch des Transgens (siehe Kap. 3.4.1) nachgewiesen werden. Bereits nach einer einstündigen transienten Expression des in die Mitochondrien von *Z. mays* eingebrachten *A. thaliana cox2* Konstrukts lagen vollständig gespleißte Transkripte des Fremdgens vor (siehe Kap. 3.4.1). Farrè und Araya (2001) hingegen zeigten für ein in Weizen-Mitochondrien eingebrachtes *cox2* Gen eine hiervon abweichende Prozessierungseffizienz. Während drei Stunden nach der Elektroporation von Mitochondrien aus Weizen prozessierte und nicht prozessierte *cox2* mRNA vorlag, erreichte der Anteil an gespleißten Transkripten erst nach 21 Stunden Inkubationszeit ein Maximum. Möglicherweise führen die abweichenden Zusammensetzungen des für die Weizen wie Mais Mitochondrien verwendeten *in organello* Puffers (2 mM vs. 1 mM ADP; Succinat vs. Malat und Glutamat) zu veränderten Prozessierungsbedingungen. Während die Expression des Fremd-Gens und die Prozessierung der Transkripte in Mitochondrien aus Weizen von der Supplementierung des Puffers mit GTP und rNTPs (Farrè und Araya, 2001) abhängig ist, erfolgt die Transkription und mRNA-Prozessierung bei Mitochondrien aus *Z. mays* ohne Zugabe exogener Nukleotiden.

Die Daten der Sequenzierung des *A. thaliana cox2* Amplikons wiesen aufgrund der beobachteten Diversität der endogenen wie fremden *cox2* Sequenz auf einen eindeutigen transgenen Ursprung der nachgewiesenen Transkripte hin (siehe Kap. 3.4.1). PCR-Artefakte durch einen Wechsel der Matrize während der reversen Transkription oder der PCR an sich („*template switching*“) konnten durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 3.4.1). Zudem wurde bereits für das Intron des *cox2* Transkripts aus *Acorus calamus* gezeigt, dass unter *in vitro* Bedingungen kein Selbstspleißen erfolgt (Albertazzi *et al.*, 1998). Demnach kann auch für die *cox2* mRNA aus *A. thaliana* eine enzymatisch katalysierte Prozessierung angenommen werden.

Offensichtlich ist hier die bei Gruppe II Intronen konservierte Sekundärstruktur ausreichend für die Interaktion mit den an der Prozessierung beteiligten *trans*-Faktoren und

ermöglichen so eine Exzision des Introns des *A. thaliana cox2* Transkripts in Mitochondrien von *Z. mays*. Das Spleißen eines in den Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* eingebrachten mitochondrialen Gruppe IIB Introns rI1 der Grünalge *Scenedesmus obliquus* (Herdenberger *et al.*, 1994) zeigt bereits die Austauschbarkeit des zum Spleißen benötigten Organells und Wirtsorganismus.

Für *Z. mays* sind bereits drei für das Spleißen von neun der siebzehn plastidären Gruppe IIB Intronen notwendigen kernkodierten *trans*-Faktoren identifiziert worden (Jenkins *et al.* 1997, Ostheimer *et al.*, 2003). Da die Exzision der Introne der Gruppe IIB fast ausschließlich von dem Vorhandensein des CRS2 Proteins sowie zweier akzessorischer Proteine abhängig ist (Jenkins *et al.* 1997, Ostheimer *et al.*, 2003), scheinen plastidäre Gruppe II Introne trotz ihrer Variabilität in Größe und Sequenz ausreichend gemeinsame Eigenschaften aufzuweisen, um von einem wenig heterogenen Satz an *trans*-Faktoren prozessiert zu werden. Mitochondriale Introne könnten eine ähnliche Charakteristik aufweisen. Dies würde die Austauschbarkeit der Wirtssysteme beim Spleißen der Introne erklären.

Die Verwendung des *in vitro* Elektroporationssystems und der nachfolgenden *in organello* Inkubation ermöglichten bereits eine Charakterisierung der am Spleißen der *cox2* Transkripte beteiligten *cis*-Sequenzen (Farrè und Araya, 2002). Während der Exzision des Introns interagieren die Sequenzen der im 3'-Bereich des Exons 1 gelegenen Intronbindestellen I und II mit den entsprechenden komplementären Sequenzen der Exonbindestelle I und II des Introns. Gerichtete Mutagenesen der Nukleotidfolge in den Intronbindestellen I und II bzw. den Exonbindestellen I und II verhinderten das Spleißen der *cox2* mRNA (Farrè und Araya, 2002). Durch eine Veränderung der entsprechenden Nukleotidsequenz in der jeweils interagierenden Bindestelle konnte die Prozessierungsaktivität restauriert werden (Farrè und Araya, 2002). Darüber hinaus ist die Domäne VI des Introns von entscheidender Bedeutung für das Spleißen der *cox2* Transkripte, da eine Deletion dieser Sequenz zum Ausbleiben der Prozessierung führte (Farrè und Araya, 2001). Auch in Plastiden ist eine Inhibierung des Spleißens in Abhängigkeit von der Domäne VI beschrieben (Holländer und Kück, 1999).

Während die Verwendung transgener Ansätze die Identifizierung der beim Spleißen beteiligten *cis*-Sequenzen ermöglichen, sollten *in vitro* Bindungsstudien zukünftig auch die Identifizierung der an der mitochondrialen Exzision der Intronen beteiligten *trans*-Faktoren erlauben.

4.5 Effiziente RNA-Edierung des *Arabidopsis thaliana cox2* Transkripts in Mais-Mitochondrien

4.5.1 Identische *cis*-Sequenzen der *cox2* Transkripte von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* ermöglichen die RNA-Edierung im heterologen System

Da sowohl in *Z. mays* (Yang und Mulligan, 1991; Grosskopf und Mulligan, 1996), *Triticum aestivum* (Covello und Gray, 1990; Kurihara-Yonemoto und Handa, 2001) sowie *Petunia hybrida* (Sutton *et al.*, 1991) nachweislich eine annähernd vollständige Edierung der gespleißten *cox2* Transkripte im Gegensatz zu nur partiell edierten ungespleißten Transkripten vorliegt, konnte eine *in organello* erfolgte Edierung der *A. thaliana* RNA in Mitochondrien von *Z. mays* angenommen werden.

Durch Sequenzierung der von gespleißten Transkripten amplifizierten *cox2* RT-PCR Produkte wurde die RNA-Edierung der *A. thaliana cox2* Transkripte nachgewiesen (siehe Kap. 3.4.1). Die verifizierten C nach U Austauschereignisse erfolgten mit einer Ausnahme ausschließlich in Sequenzbereichen, bei denen im *cox2* Transkript von *Z. mays* ebenfalls eine Edierungsstelle vorliegt. Eine über die bekannten Positionen hinaus erfolgte RNA-Edierung der Transkripte wurde nicht beobachtet. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Mitochondrien von *Zea mays* *trans*-Faktoren enthalten, welche auch die Edierungsstellen in den Transkripten des Fremdgens spezifisch erkennen. In einem für Mitochondrien aus Weizen etablierten Elektroporations- und Expressionssystem (Farrè und Araya, 2001) konnte gezeigt werden, dass die Transkripte des eingebrachten *cox2* Gens aus *Triticum timopheevi* ebenfalls in einem heterologen System ediert werden (Farrè *et al.*, 2001).

Notwendige Voraussetzung für die Prozessierung der Transkripte des Fremdgens sollten ähnliche oder identische Sequenzen im Bereich der Edierungsstelle sein. In transgenen wie *in vitro* Ansätzen zur Analyse der die Edierung plastidärer Transkripte bedingenden *cis*-Sequenzen (siehe Kap. 1.2.4) wurde der Bereich auf eine Region von -42 bis -2 (*ndhB*, Bock *et al.*, 1996), -16 bis +5 (*psbL*, Chaudhuri und Maliga, 1996) respektive -20 bis -1 (*petB*, Miyamoto *et al.*, 2004) eingegrenzt. Die Verwendung des für Weizen Mitochondrien etablierten *in organello* Systems erlaubte bereits die Identifizierung der notwendigen *cis*-Sequenz für die Edierung des C259 der *cox2* mRNA aus *T. timopheevi* (Farrè *et al.*, 2001). Der für die Edierung notwendige 5'-Bereich beschränkt sich bei dieser Edierungsstelle auf 16 Nukleotide. In der 3'-Region ist hingegen die Sequenzfolge von maximal sechs Nukleotiden von Bedeutung. Ein für Mitochondrien der Erbse entwickeltes *in vitro* Edierungssystem (Takenaka und Brennicke, 2003) erlaubte die Eingrenzung des *cis*-aktiven Bereichs der Edierungsstelle C20 des *atp9* Transkripts auf eine Region von -15 bis -5 (Takenaka *et al.*, 2004). Demnach scheinen bei der RNA-Edierung in Plastiden wie Mitochondrien lediglich die der Edierungsstelle nahen Sequenzen ausschlaggebend für die Katalyse der Reaktion. Modulierend hingegen sind darüber hinaus weitere stromauf- wie auch stromabwärts gelegene Sequenzbereiche (Farrè *et al.*, 2001). Einige Unterschiede der Sequenz des *A. thaliana cox2* Transkripts im Vergleich zur endogenen mRNA liegen im Bereich der Edierungsstellen des Fremdgens. In Abhängigkeit von der erfolgten Prozessierung der *A. thaliana cox2* Transkripte im heterologen System ist daher eine Untersuchung des Einflusses dieser Divergenzen auf die RNA-Edierung möglich.

In Mitochondrien aus Mais wurde die RNA-Edierung des Cytosins C379 der *A. thaliana* mRNA nachgewiesen (vgl. Kap. 3.4.1). Im endogenen Transkript liegt an der vergleichbaren Position ebenfalls eine Edierungsstelle vor (Yang und Mulligan, 1991). Demnach scheint der Unterschied (vgl. Abb. 24, A) der *cox2* Sequenz von *Z. mays* und *A. thaliana* an Position -54 sowie -49 im 5'-Bereich dieser Edierungsstelle des transgenen Transkripts keinen Einfluss auf die Prozessierung des Cytosins in der *A. thaliana* mRNA zu haben. Ebenso wird die Edierung nicht durch die Divergenz an Position +18 inhibiert.

Für die *cox2* Transkripte von *Z. mays* sind zwei Cytosin zu Uracil-Transitionen an den Positionen C466 bzw. C467 beschrieben (Yang und Mulligan, 1991). Sowohl die Edierung des C467, als auch die Prozessierung beider Nukleotide in der Sequenz 5' CCA 3' (kodiert für Prolin) führt zu einem für Leucin kodierenden Triplet CTA bzw. TTA. Obwohl die homologe Sequenz von *A. thaliana* ein dem C466 vergleichbares Cytosin aufweist (C460, siehe Abb. 24, B), wird dieses nicht in Mitochondrien von *Z. mays* ediert. Im Gegensatz zu der Edierungsstelle C467 liegt bei *A. thaliana* ein Thymin vor, so dass diese Sequenz hier prädiert ist und ebenfalls für Leucin (CTA) kodiert. Möglicherweise inhibiert dieses an Position +2 bezüglich des C460 gelegene Thymin die Edierung dieses Cytosins. Bei der Analyse des Edierungsgrades einiger cDNA Klone des endogenen *cox2* Transkripts wurden sowohl RNA-Edierungen des C466 allein, als auch des C466 und des C467 nachgewiesen (Yang und Mulligan, 1991). In keinem der analysierten cDNA-Produkte wurde hingegen eine Edierung des C467 unabhängig von der Prozessierung des C466 beobachtet (Yang und Mulligan, 1991). Dies könnte auf eine Abhängigkeit der RNA-Edierung des C467 von der C-U-Transition an Position C466 hindeuten. Da eine alleinige Edierung des C467 die Kodierungseigenschaften des Triplets verändern würde, sollte dieser Prozessierungsschritt bereits zur Aufrechterhaltung der konservierten Aminosäuresequenz ausreichen. Demnach ist die Edierung des Cytosins an Position C466 nicht zwingend notwendig. Eine Abhängigkeit der Edierung des C467 von der des C466 würde jedoch die Notwendigkeit der Prozessierung auch dieses Cytosins (C466) erklären, da das Triplet 5' TCA 3' im Gegensatz zu 5' TTA 3' bzw. 5' CTA 3' für Serin kodiert. Entsprechend könnte dann das bei *A. thaliana* vorliegende prädierte Thymin (T461) die RNA-Edierung des C466 behindern, da der bei *Z. mays* aktive *trans*-Faktor möglicherweise durch die im endogenen *cox2* Transkript so nicht vorliegende Nukleotidfolge an dieser Stelle an der Katalyse behindert wird. Gerichtete *in vitro* Mutagenesen der *A. thaliana cox2* Sequenz an dieser Position in Kombination mit einer nachfolgenden *in organello* Expression sollten einen Aufschluss über den Einfluss dieses Thymins an Position +2 relativ zur Edierungsstelle erbringen.

In dem vergleichbaren *in organello* System für Weizen Mitochondrien wurde bereits der Einfluss der im 5'- sowie im 3'-Bereich gelegenen *cis*-Sequenzen an der Edierungsstelle C259

des Transkripts des *cox2* Gens aus *Triticum timopheevi* untersucht (Farrè *et al.*, 2001). *In vitro* Mutagenesen der Nukleotide an der Position -1 vor der Edierungsstelle verminderten die RNA-Edierung des Cytosins. Dem gegenüber inhibierte die Substitution des Thymins an Position +2 die RNA-Edierung des C259. Obwohl die Edierungsstellen nicht vergleichbar sind und vermutlich verschiedene *trans*-Faktoren beteiligt sind, deuten diese Ergebnisse auch auf einen möglichen Einfluss des im direkten 3'-Bereich der Edierungsstelle C460 des *A. thaliana* Transkripts gelegenen Thymins auf die Prozessierung des C460 hin.

Darüber hinaus könnten jedoch auch die Unterschiede der Sequenzen an Position -4, -17, -43 und -64 (vgl. Abb. 24 B) einen Einfluss auf die Edierung des C460 haben. Da die T-C Divergenz 17 Nukleotide im 5'-Bereich der Edierungsstelle durch eine im endogenen Transkript gelegene Edierungsstelle begründet ist, entfällt dieser Unterschied in Abhängigkeit von der Prozessierung der *Z. mays cox2* mRNA. Durch die Analyse von Konstrukten, bei denen Nukleotide im 5'-Bereich der Edierungsstelle C259 des *T. thimopheevi cox2* Gens deletiert wurden, konnte der für die Edierung dieser Position notwendige 5'-Sequenzabschnitt auf einen Bereich von 16 Nukleotiden vor der Edierungsstelle begrenzt werden (Farrè *et al.*, 2001). Demnach liegt das zwischen der *cox2* Sequenz von *Z. mays* und *A. thaliana* divergierende Nukleotid an Position -4 innerhalb einer eventuell auch hier für die RNA-Edierung kritischen Region.

Im 3'-Bereich der Edierungsstelle liegt zudem ein weiteres zu edierendes Cytosin vor. In Abhängigkeit von der RNA-Edierung dieses C476 könnte hier ebenso eine veränderte Sequenz vorliegen. Zudem weist die *cox2* Sequenz von *A. thaliana* im Vergleich zur endogenen mRNA an Position +33 ein Guanin an Stelle eines Thymins auf. Auch dies könnte die RNA-Edierung beeinflussen. Aufgrund der von Farrè *et al.* (2001) ermittelten Daten scheint jedoch der für die spezifische Erkennung des zu edierenden Cytosins notwendige 3'-Bereich auf eine kritische Region von sechs Nukleotiden stromab der Edierungsstelle beschränkt. Falls der für die Edierung des C460 der *A. thaliana cox2* respektive der Positionen C466/467 der endogenen mRNA notwendige *trans*-Faktor bei *Z. mays* eine ähnliche Charakteristik aufweist, sollten die Divergenzen im 3'-Bereich keinen Einfluss auf die Edierung dieses Cytosins haben.

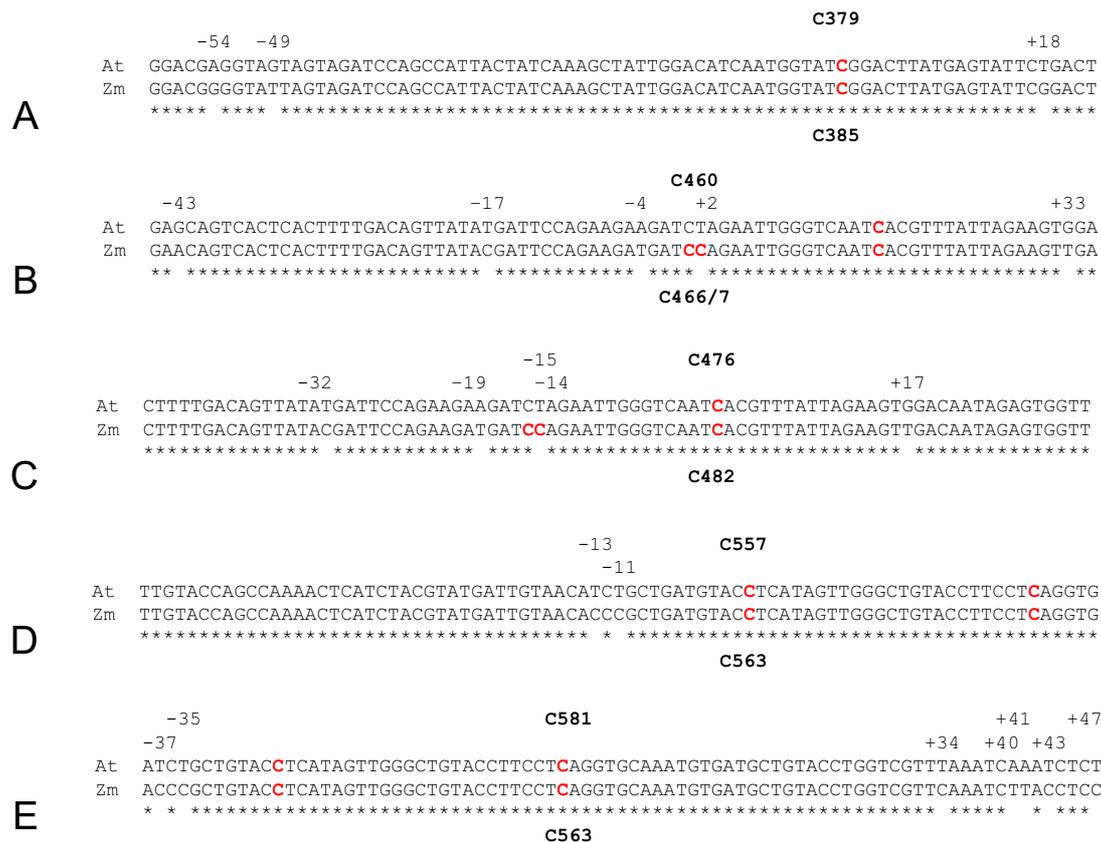


Abbildung 24: Vergleich der *cox2* cDNA Sequenzen von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* im Bereich der Edierungsstellen C379, C460, C476, C557 und C581.

Dargestellt sind die Edierungsstellen (rot markiertes C, hervorgehobenes C) C379 (A), C460 (B), C476 (C), C557 (D) und C581 (E) des gespleißten *A. thaliana cox2* Transkripts sowie die Lage der Unterschiede in der Nukleotidsequenz stromauf wie stromab der Edierungsposition. Die Numerierung der divergierenden Basen erfolgte im Relation zum edierten Cytosin.

Das Cytosin C476 der *A. thaliana* *cox2* Sequenz entspricht dem C482 des endogenen Transkripts (siehe Abb. 24, C). Eine Edierung dieser Position wurde sowohl *in planta* (Giegè und Brennicke, 1999), als auch in dem hier verwendeten heterologen System nachgewiesen. Demnach scheinen die im 5'-Bereich gelegenen Sequenz-Unterschiede zwischen dem *cox2* von *A. thaliana* und *Z. mays* keinen Einfluss auf die Prozessierung zu haben. An Position -58 liegt bei *A. thaliana* ein Guanin, bei *Z. mays* ein Adenin vor (siehe Abb. 24, C). Die Unterschiede an den Positionen -32 bzw. -14 bezüglich des C476 kommen aufgrund der im *Z. mays* gelegenen Edierungsstellen zustande. Da zudem das Cytosin C466 des Mais Transkripts ediert werden kann, könnte auch an der Position -15 eine Abweichung der Sequenzen bestehen.

In Mitochondrien von *Z. mays* wurde das Cytosin C557 des *A. thaliana* Transkripts ediert vorgefunden. Demnach ist die Prozessierung unabhängig von dem Unterschied der Sequenzen an Position -65, -13 oder -11 (vgl. Abb. 24, D). Für eines der beiden im endogenen Transkript gelegenen Cytosine (-13) ist eine Edierung beschrieben (Yang und Mulligan, 1991). Eine Prozessierung des Cytosins an Position -11 ist hingegen nicht publiziert. Die RNA-Edierung des endogenen Transkripts führt so zumindest an Position -13 zu einer erhöhten Ähnlichkeit der vor der Edierungsstelle gelegenen 5'-Bereiche beider Transkripte. Da aber bereits für das endogene *cox2* Transkript eine Edierung des C563 unabhängig von der Prozessierung des im 5'-Bereich gelegenen Cytosins beschrieben ist (Yang und Mulligan, 1991), sollte die Edierung des C557 der *cox2* Transkripte ebenfalls nicht von dem in der 5'-Region gelegenen Thymins an Position -13 abhängig sein.

Ebenso wie das Cytosin C557 wird C581 des *A. thaliana* Transkripts in Mitochondrien von *Z. mays* ediert. Folglich kann ein Einfluss der an Position -35 sowie -37 gelegenen C-T Unterschiede (siehe Abb. 24, E) auf die Edierung dieses Cytosins ausgeschlossen werden. Desweiteren sind die Sequenzen im 3'-Bereich dieser Edierungsstelle zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* verschieden. Die RNA-Edierung des Cytosins 34 Nukleotide stromabwärts im endogenen Transkript führt zu einer höheren Ähnlichkeit an dieser Position. In Anlehnung an die Daten von Farrè *et al.* (2001) scheint eine Inhibierung der Prozessierung durch die stromab von sechs Nukleotiden gelegenen Divergenzen jedoch unwahrscheinlich (s.o.).

4.5.2 Die RNA-Edierung der *Arabidopsis thaliana* *cox2* Transkripte in Mitochondrien von Mais erfolgt unabhängig vom Spleißen der mRNA

Eine Prozessierung des Cytosins an Position 385 des Exons 1, drei Nukleotide im 5'-Bereich des inserierten Introns, ist bei *cox2* Transkripten aus *Z. mays* Mitochondrien unabhängig vom Spleißen der Primärtranskripte (Yang und Mulligan, 1991). In der *cox2* mRNA von *A. thaliana* liegt an gleicher Stelle eine Edierungsposition vor. Das entsprechende Intron der Gruppe II hingegen ist an einer 318 bp entfernten Stelle inseriert. In Mitochondrien aus Mais wird das Cytosin des transgenen Transkripts jedoch ediert vorgefunden. Demnach scheint die Prozessierung des Cytosins nicht von den im endogenen Transkript vorliegenden Intronsequenzen abhängig zu sein. Da zudem ungespleißte endogene *cox2* Transkripte an dieser Stelle ediert werden (Yang und Mulligan, 1991), ist auch der Einfluss der im Exon 2 gelegenen Nukleotide nicht kritisch für die Edierung. Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass ausschließlich zwei Nukleotide im 3'-Bereich der Edierungsstelle wichtig für die Prozessierung des Cytosins sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zwei *trans*-Faktoren vorliegen, deren Selektivität jeweils von den unterschiedlichen Sequenzen im 3'-Bereich dieser Edierungsstelle abhängig ist.

Eine vergleichbare Situation ist für die RNA-Edierung des Cytosins an Position 698 der *A. thaliana* *cox2* Sequenz zu beobachten. Diese Edierungsstelle liegt nur zwei Nukleotide entfernt von der Exon-Intron-Grenze. Demnach liegt in gespleißten Transkripten im 3'-Bereich der Edierungsstelle eine andere Nukleotidsequenz vor als in ungespleißten Primärtranskripten (vgl. Abb. 25, A und B). Das endogene *cox2* Transkript weist an der vergleichbaren Position ebenso eine Edierungsstelle auf (Yang und Mulligan, 1991). Die Insertion des Introns bei dem *cox2* Gen von Mais hingegen liegt an einer von der des Gens aus *A. thaliana* verschiedenen Stelle vor (Unseld *et al.*, 1997). Der bei der RNA-Edierung des endogenen Transkripts aktive *trans*-Faktor sollte demnach für die im 3'-Bereich der *cox2* Sequenz von *Z. mays* gelegenen Nukleotidfolge spezifisch sein. Eine Edierung dieses Cytosins erfolgte jedoch auch in ungespleißten Transkripten des *A. thaliana* Transgens in Mitochondrien von Mais. Demnach erscheint ein Einfluss der Intronsequenz im *cox2* Transkript von *A. tha-*

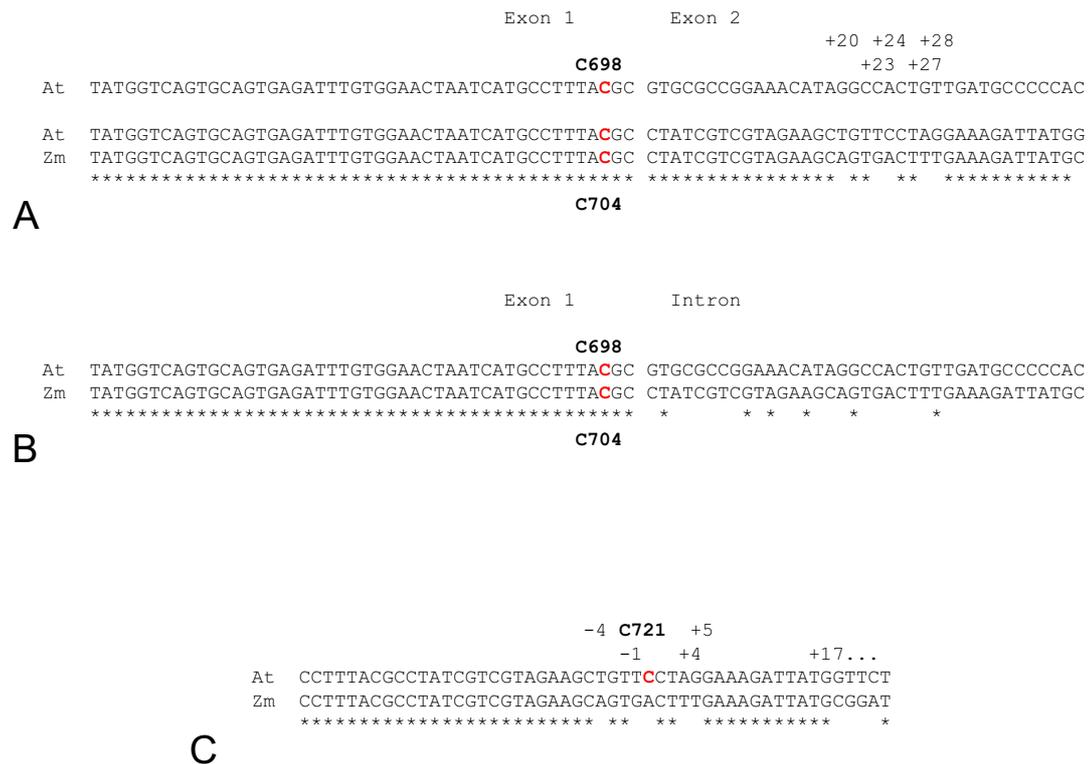


Abbildung 25: Sequenzunterschiede im 5'- und 3'-Bereich der *A. thaliana* *cox2* Edierungsstellen C698 respektive C721.

A, **B**. Durch die Exzision des Introns ändert sich die Sequenz direkt zwei Nukleotide hinter der Edierungsstelle C698 im Vergleich zum ungespleißten Primärtranskript (**A**, gespleißt; **B**, ungespleißt). **C**. Sequenzdivergenzen zwischen dem *cox2* von *A. thaliana* und *Z. mays* an der Edierungsstelle C721 des *A. thaliana* Transkripts.

liana auf die Interaktion der mRNA mit einem *trans*-Faktor des Proteoms von *Z. mays* unwahrscheinlich. Neben dem Dinukleotid GC am 3'-Ende des Exons 1 der *A. thaliana* *cox2* mRNA sind die 3'-Sequenzen zwischen ungespleißtem und gespleißtem Transkript lediglich an Position +5 identisch. Demnach ergibt sich hieraus eine 3'-Konsensus-Sequenz von 5' GT(C/G)T 3'. Möglicherweise ist jedoch auch das Dinukleotid an Position +2 und +3 im Exon 1 stromab der Edierungsstelle C698 des *A. thaliana* Transkripts ausreichend für die Prozessierung dieses Cytosins in Mitochondrien aus *Z. mays*.

Ebenso erfolgt die RNA-Edierung des an der Position C721 vorliegenden Cytosins der *A. thaliana* *cox2* mRNA in Mitochondrien von *Z. mays*. Die im 5'-Bereich, 20 Nukleotide vor dem zu edierenden Cytosin vorliegenden Insertion des Introns könnte auch hier Sequenzinformationen für die Bindung des *trans*-Faktors enthalten. Die Sequenz des endogenen Transkripts der Mitochondrien von *Z. mays* stromaufwärts dieses Cytosins ist jedoch von der des Transgens aufgrund der an dieser Stelle bei Mais nicht vorliegenden Insertion des Introns verschieden. Demnach kann die jenseits des Nukleotids an der Position -20 gelegene Sequenzinformation nicht kritisch für die Erkennung der Edierungsstelle sein.

Auffällig ist zudem, dass das endogene *cox2* Transkript an der Stelle, die dem der *A. thaliana* *cox2* Sequenz entspricht, kein zu edierendes Cytosin aufweist (vgl. Abb. 25, C). Der Bereich, welcher das C721 umgibt, ist zwischen *A. thaliana* und *Z. mays* wenig ähnlich. Möglicherweise wird die RNA-Edierung des *A. thaliana* Transkripts an dieser Stelle durch einen für ähnliche *cis*-Sequenzen im mitochondrialen Transkriptom spezifischen *trans*-Faktor katalysiert.

4.6 RNA-Edierung der *in organello* synthetisierten *Sorghum bicolor atp6-1* und *atp9* sowie chimärer *atp6* Transkripte

Zur Analyse der RNA-Edierung mitochondrialer Transkripte wurden neben dem *cox2* Gen aus *A. thaliana* zwei mitochondriale Gene von *Sorghum bicolor* kloniert und in Mitochondrien von *Z. mays* eingebracht. Beide Gene, *atp6-1* sowie *atp9*, kodieren für Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase. Sie weisen innerhalb der die Edierungsstellen enthal-

tenden kodierenden Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zu den homologen Genen von Mais auf, so dass die RNA-Edierung der entsprechenden Cytosine im heterologen System erfolgen sollte.

4.6.1 Potentieller Einfluss der „*prepiece*“ Region des *atp6* Gens auf die Edierung der *atp6* Transkripte

In den Mitochondrien von *S. bicolor* wird das *atp6-1* Transkript vollständig ediert vorgefunden (Kempken *et al.*, 1991). Im Gegensatz hierzu konnte kein C zu T Austausch in *in organello* synthetisierten *atp6-1* Transkripten des *S. bicolor* Gens nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.4.2). Die Analyse des Edierungsgrades der endogenen *atp6* Transkripte hingegen zeigte, dass diese vollständig ediert vorlagen (vgl. Kap. 3.2.3). Da der Sequenzbereich, der die betrachtete Edierungsstelle an Position 953 des endogenen Transkripts umgibt, etwa 200 Nukleotide stromaufwärts dieses Cytosins und 100 Nukleotide stromabwärts eine vollkommene Sequenzidentität in Bezug auf die *S. bicolor atp6-1* Sequenz aufweist (vgl. Anhang, Abb. 29), wäre ebenso eine RNA-Edierung der *atp6-1* mRNA aufgrund des bisher bekannten Einflusses der Sequenzen im nahen 5'- sowie 3'-Bereich der Edierungsstelle auf die Prozessierung zu erwarten gewesen.

Als mögliche Ursache für das Ausbleiben der RNA-Edierung kommen die zwischen den beiden Genen verschiedenen Bereiche in Betracht. Die Sequenzen der beiden *atp6* Gene unterscheiden sich sowohl in der 5' nichttranslatierten Region, als auch im 3' untranslatierten Bereich. Darüber hinaus weisen die pflanzlichen *atp6* Transkripte einen als „*core*“ bezeichneten Abschnitt der kodierenden Sequenz auf, der eine hohe Homologie zu den vergleichbaren *atp6* Sequenzen von Pflanzen, Pilzen und Bakterien zeigt (Mullen *et al.*, 1992). Charakteristisch für pflanzliche *atp6* Gene hingegen ist eine vor diesem „*core*“-Anteil gelegene Sequenz innerhalb des offenen Leserahmens, die „*prepiece*“ genannt wird (Mullen *et al.*, 1992). Die Linie IS1112C der Hirse *S. bicolor* weist beispielweise durch eine Duplikation des *atp6* Gens zwei Kopien dieses Gens auf (Mullen *et al.*, 1992). Beide unterscheiden sich untereinander sowie auch im Vergleich zur *atp6* Sequenz von *Z. mays* innerhalb des

5' nichttranslatierten Bereichs sowie der Sequenz des „*prepiece*“-Anteils. Die Funktion dieses variablen Sequenzabschnitts ist bislang nicht bekannt.

Zur weiteren Untersuchung dieser zwischen *S. bicolor* und *Z. mays* verschiedenen Bereiche, die möglicherweise die Edierung des *S. bicolor atp6-1* Transkripts in den Mitochondrien von *Z. mays* beeinflussen könnten, wurden chimäre *atp6* Konstrukte angefertigt. Hierbei wurden *S. bicolor atp6-1* Sequenzen mit denen des endogenen *atp6* Gens von Mais neu kombiniert.

Die Substitution des 5' nichttranslatierten Bereichs der *S. bicolor atp6-1* Sequenz durch die entsprechende Sequenz des *atp6* aus Mais sollte zu einer erhöhten Transkription dieses chimären Konstrukts führen. Die Kopie 1 des *S. bicolor atp6* Gens weist einen von der Konsensussequenz mitochondrialer Promotoren (5' YRTA 3') abweichende Sequenz von 5' CTTA 3' auf (Yan und Pring *et al.*, 1997). *In planta* wurde eine vergleichsweise niedrige Transkriptionsrate dieses Gens im Vergleich zu der bei *S. bicolor* (Linie IS1112C) ebenfalls vorkommenden Kopie 2 des *atp6* Gens gefunden (Kempken und Howad, 1996). Der Promotor des *atp6-2* Gens hingegen entspricht in seiner Basenfolge 5' CGTA 3' (Yan und Pring, 1997) der des Konsensusmotivs mitochondrialer Promotoren. Demnach könnte auch in Mitochondrien aus *Z. mays*, deren *atp6* Gen ebenfalls einen typischen mitochondrialen Promotor (5' CGTA 3') aufweist (Rapp *et al.*, 1993), die Transkription des *S. bicolor atp6-1* vermindert sein. Diese reduzierte Transkriptionsrate könnte dann zu einer nur langsamen Akkumulation der mRNA führen. Im Falle limitierender Mengen der an der RNA-Edierung beteiligten *trans*-Faktoren bzw. bei einer Konkurrenz der RNA des Transgens mit den endogenen Transkripten um diese Faktoren, könnte dies zu einer geringen Effizienz der RNA-Edierung dieser Transkripte führen. Die Analyse der Transkripte dieses *in organello* transkribierten, im Plasmid pMS282 vorliegenden chimären *atp6* Gens hingegen zeigte, dass der Austausch der 5' nichttranslatierten Sequenz allein die Edierung dieses Transkripts nicht restauriert (vgl. Kap. 3.4.3).

Ebenso wie eine verringerte Transkriptionsrate könnte eine Struktur im 3'-Nichtkodierungsbereich des *S. bicolor atp6-1* Gens inkompatibel zu den an der Prozessierung des 3'-Endes oder der Transkriptstabilisierung der mRNA beteiligten RNA-Bindeproteinen im hetero-

logen System sein. Eine somit vorliegende verringerte Halbwertszeit der Transkripte könnte dann ebenfalls die Ursache für die beobachtete ausbleibende bzw. schlechte Edierungseffizienz der *atp6-1* mRNA sein.

Der Einfluss der Prozessierung der Transkripte auf die Edierung ist beispielsweise bei den *atp6* mRNAs einer CMS-Linie von *Oryza sativa* bekannt (Iwabuchi *et al.*, 1993). Die zwei im Chondriom von *O. sativa* vorliegenden Genkopien des *atp6* Gens (N-*atp6* und B-*atp6*) unterscheiden sich lediglich ab Position 49 in der 3' nichtkodierenden Sequenz. Während N-*atp6* Transkripte vollständig ediert vorliegen, erfolgt keine oder nur eine partielle Edierung der B-*atp6* mRNA. Erst die Prozessierung des 2 kb großen B-*atp6* Primärtranskripts durch ein kernkodiertes Genprodukt (RF-1, RF: „restorer of fertility“) führt zu einer 1,5 kb großen B-*atp6* mRNA, die dann vollständig ediert vorgefunden wird.

Zudem wurde für das *nad3* Transkript bereits eine Abhängigkeit der RNA-Edierung vom Transkriptgehalt nachgewiesen. Ein nukleär kodiertes Genprodukt sorgt sowohl für eine erhöhte Menge der *nad3* mRNA sowie deren gesteigerten Edierungsgrad (Lu und Hanson, 1992). Als Ursache für die beobachtete geringe Edierungseffizienz der Transkripte in Abwesenheit dieses Proteins wurde angenommen, dass eine Hydrolyse der *nad3* Transkripte erfolgt, bevor eine vollständige RNA-Edierung vorliegt. Eine gesteigerte Stabilität und damit eine erhöhte Halbwertszeit würde so zu einem erhöhten Anteil edierter *nad3* Transkripte führen.

Die Substitution der 3'-Nichtkodierungssequenz des *S. bicolor atp6-1* Gens durch die entsprechende Sequenz des endogenen *atp6* liegt, in Kombination mit dem endogenen *atp6* Promotor, als chimäres Konstrukt in den Plasmiden pIB306 sowie pIB334 vor (vgl. Kap. 3.4.3). Die hiervon in Mitochondrien von *Z. mays* erhaltenen Transkripte hingegen wurden wiederum nicht ediert vorgefunden (siehe Kap. 3.4.3). Kennzeichnend für die Konstrukte pIB306 sowie pIB334 ist der „prepiece“-Anteil der kodierenden Sequenz des *atp6-1* Gens der Hirse. Im Fall des pIB306 liegt zudem die als „core“ bezeichnete, zwischen Mais und der Hirse sehr ähnliche Region der kodierenden Sequenz aus *S. bicolor* vor. Demgegenüber weist das Konstrukt pIB334 den „core“-Bereich des endogenen *atp6* Gens auf. Folglich könnte der den beiden Plasmiden gemeinsame Unterschied, also die vor dem „core“-Anteil

gelegene „*prepiece*“-Region, die Ursache für die ausbleibende RNA-Edierung sein. Der Austausch dieser Sequenz des *S. bicolor atp6-1* durch den entsprechenden Bereich des *Z. mays atp6* Gens liegt im Konstrukt pIB325 vor. Auch hier ergab die Untersuchung der mRNA des chimären *atp6* Gens hingegen, dass keine RNA-Edierung erfolgt (siehe Kap. 3.4.3). Erst die im Plasmid pIB323 vorliegende Kombination des 5' nichttranslatierten Bereichs des endogenen *atp6* mit der „*prepiece*“-Region des *Z. mays* Gens ermöglichte die Restaurierung der Edierung der mRNA dieses chimären *atp6* Gens (vgl. 3.4.3). Da dieses Konstrukt den „*core*“-Anteil der kodierenden Sequenz sowie den 3' nichttranslatierten Bereich des *S. bicolor atp6-1* Gens trägt, konnte ein spezifischer Nachweis der Transkripte erfolgen. Zudem weist die erfolgte RNA-Edierung darauf hin, dass die wenigen Unterschiede innerhalb des „*core*“-Bereichs für die RNA-Edierung nicht kritisch sind. Vielmehr scheint die Restaurierung der Edierung auf einen Einfluss der „*prepiece*“-Region auf die Prozessierung hinzudeuten. Durch die Kombination dieser beiden Anteile des endogenen Gens erhöht sich der Grad der Ähnlichkeit des chimären Konstrukts zu dem des endogenen Gens. Möglicherweise beinhaltet der „*prepiece*“-Anteil einen Sequenzabschnitt, der für die Bindung der an der RNA-Edierung beteiligten *trans*-Faktoren notwendig ist. Zudem ähnelt die berechnete Sekundärstruktur dieses chimären *atp6* Transkripts dem der endogenen *atp6* mRNA (vgl. Anhang, Abb. 31 und 33). Ein Einfluss einer solchen Faltung der RNA auf die RNA-Edierung kann nicht ausgeschlossen werden.

4.6.2 Das *S. bicolor atp9* Transkript wird in Mitochondrien von Mais nur partiell ediert

Neben dem *atp6-1* Gen der Hirse wurde das *atp9* Gen aus *S. bicolor* kloniert (siehe Kap. 3.4.5). Die Edierung der Transkripte des ebenfalls in die Mitochondrien aus Mais eingebrachten *atp9* Gens aus *S. bicolor* erfolgte lediglich an drei respektive einer (vgl. Kap. 3.4.5) von acht bekannten Edierungsstellen (Salazar *et al.*, 1991). Dem gegenüber ist eine vollständige Edierung des jeweils endogenen *atp9* Transkripts in Mitochondrien von *S. bicolor* (Salazar *et al.*, 1991) und *Z. mays* (Grosskopf und Mulligan, 1996) beschrieben.

Auch hier erlaubt der Vergleich der *atp9* Sequenzen von *S. bicolor* und *Z. mays* in Kombination mit der nachgewiesenen Edierung des transgenen Transkript einen Rückschluss auf mögliche Einflüsse der Sequenzdivergenzen auf die RNA-Edierung.

Der Sequenzbereich um die Edierungsstelle C20 des *Z. mays atp9* Transkripts ist in einer Region von 20 Nukleotiden stromaufwärts ebenso wie im 3'-Bereich vollkommen identisch mit der Sequenz von *S. bicolor* (vgl. Abb. 26). An der Position -13 bezüglich des C82 liegt eine Divergenz der Sequenzen vor. Da das *S. bicolor* Transkript an dieser Stelle jedoch in Mais Mitochondrien ediert vorgefunden wurde, scheint dieser Unterschied keinen kritischen Einfluss auf die Edierung auszuüben. Die Abweichung in der Nukleotidsequenz an Position +10 relativ zur Edierungsstelle C92 (vgl. Abb. 26) des Mais *atp9* scheint die Prozessierung der *S. bicolor* Transkripte im heterologen System ebenso wenig zu inhibieren. Demgegenüber wurde die Edierung des der Mais *atp9* Edierungsstelle C134 entsprechenden Cytosins in der *S. bicolor* Sequenz nicht nachgewiesen, obwohl die Bereiche stromaufwärts sowie stromab vollkommen identisch sind (siehe Abb. 26).

Auch eine Edierung des dem C191 entsprechenden Nukleotids wäre zu erwarten gewesen, wenn die Edierung einzelner Cytosine als unabhängig von der Prozessierung anderer Edierungsstellen erfolgt. Demgegenüber wäre keine Edierung des *S. bicolor* C219 anzunehmen, da die *Z. mays* Sequenz an dieser Stelle ein Thymin aufweist (vgl. Abb. 26). Falls keine ähnlichen zu edierenden Sequenzen im Transkriptom von *Z. mays* vorkommen, ein *trans*-Faktor also an mehreren Edierungspositionen aktiv sein würde, wäre es möglich, dass der entsprechende Faktor nicht im Proteom der Mais Mitochondrien vorkommt. Gleiches ist für die Edierung des C238 der *S. bicolor atp9* Sequenz anzunehmen, da auch an dieser Stelle ein Thymin in der DNA-Sequenz des Mais Gens fixiert vorkommt.

Die Edierung des C219 ist für die *S. bicolor* Sequenz beschrieben, nicht aber für die mRNA aus *Z. mays*. Folglich kann auch hier nicht zwingend von einer Prozessierung der fremden RNA in Mais Mitochondrien ausgegangen werden. Die Edierung des dem C212 des *atp9* aus Mais entsprechenden Cytosins hingegen wäre zu erwarten, da sowohl 20 Nukleotide im Bereich stromauf der Edierungsstelle, als auch zehn Nukleotide im 3'-Bereich des Cytosins zwischen *S. bicolor* und *Z. mays* vollkommen identisch sind (vgl. Abb. 26).

```

                                C20
Zm ATGTTAGAAGGAGCTAAATCAATAGGTGCTGGAGCTGCTACAATTGCTTTAGCGGGAGCT 60
Sb ATGTTAGAAGGAGCTAAATCAATAGGTGCTGGAGCTGCTACAATTGCTTTAGCGGGAGCT 60
*****

                                -13          C82          C92          +10
Zm GCTGTCGGTATTGGAACGTTCTCAGTTCCTCGATTCATTCGTCGGCGGAAATCCTTCA 120
Sb GCTGTCGGGATTGGAACGTTCTCAGTTCCTCGATTCATTCGTCGGCGGAAATCCTTCA 120
*****

                                C134
Zm TTGGCTAAACAATCATTTCGGTTATGCCATTTGGGCTTTGCTCTCACCGAAGCTATTGCA 180
Sb TTGGCTAAACAATCATTTCGGTTATGCCATTTGGGCTTTGCTCTCACCGAAGCTATTGCA 180
*****

                                -9          C191          C212
Zm TCGTTTGCCCAATGATGGCCTTTCTGATCTCATTTCGTTTCTAA----- 225
Sb TTGTTTGCCCAATGATGGCCTTTCTGATCTCATTTCGTTTCCGATCGCATAAAAAGAAA 240
* *****

                                C204          C213

Zm -----
Sb GGAAAGTTCAACTTAAG 258

```

Abbildung 26: Vergleich der kodierenden Sequenz des *atp9* Gens von *S. bicolor* und *Z. mays*. Die Sequenzen des kodierenden Bereichs des *atp9* Gens von *S. bicolor* (NCBI „Accession No.“: S81080) und *Z. mays* (NCBI „Accession No.“: AY506529) sind vergleichend dargestellt. Die jeweiligen Edierungsstellen (Salazar *et al.*, 1991; Grosskopf und Mulligan, 1996) sind hervorgehoben.

Da die Edierung der Transkripte des *atp6-1* Gens erst nach dem Austausch der zwischen *Z. mays* und *S. bicolor* divergierenden Sequenzen im 5'-Bereich erfolgte, könnte auch bei den Transkripten des *atp9* Gens eine Beeinflussung durch die unterschiedliche 5'-Region vorliegen. Die multiplen 5'-Termini des *atp9* Transkripts in *S. bicolor* weisen auf einen Promotor hin, der innerhalb oder vor der im 5'-Bereich der kodierenden Sequenz des *atp9* Gens gelegenen tRNA *trnfM* liegt (Yan *et al.*, 1997). Da das in dieser Arbeit verwendete, klonierte *atp9* Fragment aus *S. bicolor* lediglich einen geringen Anteil des *trnfM* Gens einschließt, nicht aber den Promotor der *trnfM*, könnte dies die Ursache für eine geringe Transkriptionsrate sein.

Falls zudem eine korrekte Prozessierung des *atp9* Transkripts durch exo- bzw. endonukleolytische Veränderung des *trnfM-atp9*-Co-Transkripts notwendige Bedingung für ein stabiles *atp9* Transkript bzw. für die vollständige Edierung der mRNA ist, müsste aufgrund des klonierten *atp9* Gens von einer instabilen bzw. nicht effizient edierten mRNA ausgegangen werden. Da im Transkriptom von *Z. mays* kein bicistronisches Transkript des endogenen *atp9* Gens mit einer im 5'-Bereich gelegenen tRNA *trnfM* vorliegt, wäre zudem die korrekte Prozessierung eines klonierten *S. bicolor trnfM-atp9* Konstrukts in Mitochondrien von *Z. mays* nicht zwingend zu erwarten.

4.6.3 Wenig effiziente RNA-Edierung der für die Untereinheiten der ATP-Synthase kodierenden Transkripte

Auffällig ist die nur geringe Edierungseffizienz, d.h. die partielle Edierung der Transkripte des chimären *atp6* Gens sowie des *atp9* Gens aus *S. bicolor* in den Mitochondrien von *Z. mays* (vgl. Kap. 3.4.3 und Kap. 3.4.5). Zudem zeigt die Analyse der RNA-Edierung der *de novo* synthetisierten Transkripte des endogenen *atp6* Gens, dass nach einstündiger Inkubation erhaltene mRNA nicht vollständig ediert vorlag (siehe Kap. 3.2.3). Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass die zur *in organello* Inkubation gewählten Bedingungen einen Einfluss auf die Prozessierung der Transkripte haben, die für die Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase kodieren. Da im Gegensatz zur Edierung der *atp6* und *atp9* mRNA eine effizientes Spleißen sowie eine vollständige RNA-Edierung der *A. thaliana cox2* mRNA nachgewiesen wurde (vgl. Kap. 3.4.1), könnten die *atp6* bzw. *atp9* Transkripte selektiv betroffen sein.

Eine limitierende Anzahl an *trans*-Faktoren könnte für die schlechte Edierungseffizienz verantwortlich sein. Unter einer solchen Voraussetzung konkurrieren die Transkripte der endogenen Gene mit denen der eingebrachten Fremd-DNA um diese Faktoren. Ein derartiger Kompletions-Effekt wurde bei der Expression einer zusätzlichen Kopie des *psbL* Gens in transgenen Plastiden beobachtet (Chaudhuri *et al.*, 1995). Darüber hinaus zeigte die Überexpression der Transkripte *rpoB-2* (Reed und Hanson, 1997; Chateigner-Boutin

und Hanson, 2003) sowie *ndhF-2* (Chateigner-Boutin und Hanson, 2002) in transgenen Tabak-Linien, dass die entsprechenden endogenen mRNAs weniger häufig ediert werden. Zudem wirkte sich die zusätzliche Genkopie negativ auf die Edierung einiger anderer, nicht homologer Transkripte aus (Chateigner-Boutin und Hanson, 2002), was auf gemeinsame *trans*-Faktoren verschiedener Edierungsstellen hindeuten könnte. Ebenso wurde in *in vitro* Studien für die Edierung der plastidären *psbE* mRNA (Miyamoto *et al.*, 2004) sowie des mitochondrialen *atp9* Transkripts (Takenaka *et al.*, 2004) gezeigt, dass die Zugabe eines Kompetitor-Fragments, welches die im 5'-Bereich der Edierungsstelle gelegene *cis*-aktive Sequenz enthält, die Edierung des Transkripts verhindert. Sollte eine solche Konkurrenz der Transkripte der endogenen DNA sowie der eingebrachten Gene ebenso in den Mitochondrien von Mais auftreten, wäre der Grad der Edierung der mRNA der Transgene von deren Transkriptionsrate, der Stabilität der Transkripte sowie der Verfügbarkeit der *trans*-Faktoren abhängig.

Die Stabilität der Transkripte könnte durch die physiologischen Bedingungen des *in organello* Systems verändert werden. Bislang ist die molekulare Ursache für eine Modulation der Transkriptgehalte mitochondrialer Gene oder der Translation der kodierten Proteine in Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen bei Mitochondrien nicht untersucht. Bei *Spinacia oleracea* ist jedoch bekannt, dass 5' untranslatierte Bereiche plastidärer mRNAs, die für Untereinheiten der plastidären ATP-Synthase kodieren, plastidäre Polypeptide binden (Hotchkiss und Hollingworth, 1999). Als Funktion dieser Protein-mRNA Wechselwirkung werden zwei mögliche Einflüsse auf die Expression der Gene diskutiert: Zum einen könnten die verschiedenen interagierenden Proteine eine koordinierte Expression der Untereinheiten der ATP-Synthase bedingen, zum anderen könnte es durch diese Polypeptide aber auch zu einer globalen Modulation der Expression der ATP-Synthase Gene in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen kommen. Da auch die Expression der mitochondrialen ATP-Synthase einer solchen kontrollierten Expression mitochondrial wie kernkodierter Gene bedarf, könnten ähnliche Mechanismen in Mitochondrien vorliegen.

Zudem wurde für die mRNA des *psbA* Gens in Plastiden von *C. reinhardtii* gezeigt, dass ein an die 5'-Sequenz der mRNA bindender Protein-Komplex eine ADP-abhängige Serin-

Threonin-Phosphotransferase enthält (Danon und Mayfield, 1994). Hohe ADP-Gehalte, wie sie im Dunkeln in Plastiden auftreten, vermitteln die Dissoziation des Proteinkomplexes und sind damit für die Reduktion der Translation der *psbA* mRNA verantwortlich.

Für die Transkripte des *rbcL* wie auch des *atpB* Gens in Plastiden von *C. reinhardtii* wurde bereits ein Sequenzabschnitt von Nukleotid 38 bis 47 respektive von 31 bis 42 relativ zum 5'-Ende des Transkripts bestimmt, der für die Stabilität und Akkumulation der beiden Transkripte verantwortlich ist (Anthonisen *et al.*, 2001). Auch einige mitochondriale Transkripte weisen konservierte Sequenzelemente innerhalb der 5'-Nichtkodierungsregion auf (Pring *et al.*, 1992). Auch die Funktion dieser Sequenzen wird in Zusammenhang mit der Translation oder Regulation gebracht (Pring *et al.*, 1992).

Das Fehlen dieser Strukturen bei den mRNAs der klonierten Fremdgene könnte, ebenso wie eine Inkompatibilität der an sie bindenden *trans*-Faktoren, zur Instabilität der entsprechend erhaltenen Transkripte führen. Zudem könnten der Redoxzustand einiger Proteine, Thioredoxine oder auch andere Metabolite die Stabilität der mRNAs oder die Translationsfrequenz modulieren, um eine koordinierte Expression der entsprechenden mRNAs zu erzielen. Eine vom ADP/ATP-Verhältnis abhängige Stabilität der Transkripte, die für Untereinheiten der ATP-Synthase kodieren, könnte die unter den in dieser Arbeit gewählten Inkubationsbedingungen beobachtete schlechte Effizienz der Edierung der endogenen *atp6* Transkripte ebenso wie die der mRNA der eingebrachten Fremdgene erklären.

Es ist nicht auszuschliessen, dass eine direkte Beeinflussung der an der RNA-Edierung beteiligten *trans*-Faktoren durch die physiologischen Bedingungen erfolgt. In *in vitro* Systemen konnte der Nachweis der Protein-RNA-Interaktion eines *trans*-aktiven Faktors mit dem für die RNA-Edierung notwendigen *cis*-Element bei den plastidären Transkripten *petD* und *psbE* (Miyamoto *et al.*, 2004) sowie bei der mitochondrialen *atp9* mRNA (Takenaka *et al.*, 2004) erbracht werden. Bisläng sind jedoch keine in *trans* agierenden, die RNA-Edierung in Mitochondrien katalysierenden Proteine isoliert, identifiziert und näher charakterisiert worden. Bei der Untersuchung der Parameter der *atp9* Edierung wurde jedoch in dem für *P. sativum* etablierten *in vitro* System gezeigt, dass eine maximale RNA-Edierung bei einer Konzentration an Ribonukleotiden von 15 mM erfolgt (Takenaka und Brennicke, 2003).

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogene DNA mittels Elektroporation in isolierter Mitochondrien von *Zea mays* eingebracht und eine Transkription der eingebrachten wie auch endogener Gene in einem transienten System aufrecht erhalten werden kann. Da zudem die *in organello* synthetisierten Transkripte einer Prozessierung unterlagen, bietet die beschriebene Kombination beider Methoden die Möglichkeit, die Prozessierung von Transkripten fremder oder veränderter Gene zu untersuchen.

Die Prozessierung der Transkripte des in die Organellen eingebrachten *cox2* Gens aus *A. thaliana* verlief mit sehr hoher Effizienz. Aufgrund der Sequenzunterschiede im Vergleich der *A. thaliana* und *Z. mays cox2* Sequenz im Bereich der Edierungsstelle C460 wird die Edierung dieses Cytosins vermutlich inhibiert. Gerichtete *in vitro* Mutagenesen der divergierenden Nukleotide könnten hier einen Einfluss der Sequenzdifferenzen auf die RNA-Edierung zeigen.

Die bei *Z. mays*, nicht jedoch bei *A. thaliana* in den Transkripten des *cox2* Gens vorliegenden Edierungsstellen bieten zudem die Möglichkeit einer heterologen Transkription des *cox2* Gens aus *Z. mays* in Mitochondrien von *A. thaliana*. Vermutlich liegen die für die Edierung verantwortlichen *trans*-aktiven Faktoren nicht im mitochondrialen Proteom vor, wenn keine Edierungsstelle im Chondriom gegeben ist. Durch die *in organello* Analyse der Transkriptprozessierung des *Z. mays cox2* Transkripts in Mitochondrien von *A. thaliana* könnte eine Art-spezifische Edierung gezeigt werden.

Für das in die Mitochondrien von *Z. mays* eingebrachte *S. bicolor atp9* oder das chimäre *atp6* Konstrukt konnte lediglich eine partielle Prozessierung nachgewiesen werden. Falls die physiologischen Bedingungen des *in organello* Systems einen Einfluss auf die RNA-Edierung oder die Stabilität der Transkripte haben, könnte die Veränderung der Pufferzusammensetzung die Edierungseffizienz der *atp6* bzw. *atp9* mRNA in Mais Mitochondrien verändern. Sollten die 5'- oder 3'-Sequenzen der klonierten Gene, abhängig oder unabhängig von den physiologischen Bedingungen, eine Rolle bei der Transkriptionsrate bzw. der Stabilisierung der mRNA spielen, würde die Expression der kodierenden Sequenzen der *atp6*

bzw. *atp9* Gene unter Kontrolle der *cox2* nichttranslatierten Bereiche möglicherweise eine Analyse der RNA-Edierung dieser Transkripte erlauben. Die Analyse der Prozessierung weiterer, nicht für die Untereinheiten der mitochondriale ATP-Synthase kodierenden Gene sollte einen zusätzlichen Einblick in die Edierungseffizienz der isolierten Mitochondrien unabhängig von *atp6* bzw *atp9* spezifischen negativen Einflüssen des *in organello* Systems ermöglichen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein *in vitro* Elektroporationssystem für Mitochondrien aus Mais beschrieben. Dieser Ansatz ermöglicht es, fremde DNA in Mitochondrien einzubringen. Darüber hinaus erlaubt die nachfolgende transiente Expression der Fremd-DNA die Analyse der *in organello* synthetisierten Transkripte. Zudem gestattet dieser Ansatz die Charakterisierung der an der RNA-Edierung beteiligten, bislang wenig untersuchten *cis*-Sequenzen.

Mittels Elektroporation isolierter Mitochondrien konnte die eingesetzte Plasmid-DNA unabhängig von der Konformation der DNA in Mitochondrien aus *Zea mays* eingebracht werden. Die Effizienz der Methode war abhängig von der Größe der verwendeten Plasmid-DNA sowie der bei der Elektroporation verwendeten Feldstärke. Das größte erfolgreich in die Mitochondrien eingebrachte Plasmid hatte eine Größe von 11 kb. Ein erheblicher Teil der in die Organellen eingebrachten Fremd-DNA war in der mitochondrialen Matrix lokalisiert.

Die isolierten Mitochondrien waren in ein mit Glutamat und Malat sowie 1 mM ADP versetzten *in organello* Puffer in der Lage, die Transkription endogener Gene über einen Zeitraum von bis zu drei Stunden aufrecht zu erhalten. Die Transkriptionsaktivität der Organellen war gegenüber Oligomycin, einem Inhibitor der mitochondrialen ATP-Synthase, ebenso sensitiv wie gegenüber höheren Konzentrationen an ADP (5 mM). Die in diesem System *in organello* in einem Zeitraum von bis zu sieben Stunden transkribierten mRNAs wurden ediert (*nad9* und *atp6*) sowie gespleißt (*cox2*).

Zudem konnten Transkripte des klonierten und mittels Elektroporation in die Organellen eingebrachten *atp6-1* sowie des *atp9* Gens aus *S. bicolor* sowie des *cox2* Gens von *A. thaliana* nachgewiesen werden.

Das Spleißen des im *A. thaliana* vorliegenden Introns der Gruppe II erfolgte in Mitochondrien von *Z. mays* sehr effizient. Darüber hinaus konnte die vollständige *in organello* RNA-Edierung aller sechs Edierungsstellen des transgenen *cox2* Transkripts innerhalb des untersuchten Bereichs belegt werden. Im Gegensatz dazu wurde die *atp9* RNA des *S. bicolor*

Gens in Mitochondrien von Mais nur partiell an drei der sechs Edierungsstellen ediert vorgefunden. Die Transkripte des *S. bicolor atp6-1* Gens hingegen wurden nicht im heterologen System ediert.

Zur Untersuchung der die Edierung des *S. bicolor atp6-1* Transkripts beeinflussenden Sequenzen wurden chimäre *atp6*-Konstrukte mit Anteilen aus der 5'- und 3'-Nichtkodierungssequenz sowie des „prepiece“- und „core“-Bereichs des *atp6* bzw. *atp6-1* Gens aus *Z. mays* und *S. bicolor* erzeugt. *In organello* erhaltene Transkripte dieser Gene zeigten nur bei der Kombination der „core“-Region der kodierenden Sequenz sowie des 3' nichttranslatierten Bereichs des *atp6-1* von *S. bicolor* mit dem 5'-Anteil der nichtkodierenden Sequenz und des „prepiece“ des endogenen *atp6* eine zumindest partielle Edierung der in Maismitochondrien *in organello* erhaltenen Transkripte.

Summary

In order to study *cis*-acting components of RNA editing in higher plant mitochondria an *in organello* approach has been established for mitochondria from *Zea mays*. Introduction of foreign DNA into isolated organelles via electroporation in combination with transient expression allows for analysis of transcription of the transgene and transcript processing. Plasmid DNA has been found to be transferred into isolated electroporated mitochondria regardless of the conformation of the plasmid. The translocation of foreign DNA across the mitochondrial membrane is limited by the size of the plasmid and the field strength used for electroporation. Foreign DNA up to 11 kb has been detected inside the organelles after electroporation. A significant part of the foreign DNA has been shown to be located in the mitochondrial matrix.

Isolated mitochondria are active in transcription for up to three hours in a special *in organello* buffer system. The activity of organellar transcription is sensitive to oligomycin, an inhibitor of the ATP synthase, and higher levels of ADP (5 mM). Transcripts of mitochondrial genes have been shown to be edited (*nad9* and *atp6*) and spliced (*cox2*) *in organello* for up to seven hours. Cloned genes of *atp6-1*, *atp9* of *Sorghum bicolor* and *cox2* of *Arabidopsis thaliana* have been introduced into isolated mitochondria from *Z. mays*. Transcripts of all transgenes have been detected.

The *A. thaliana cox2* transcripts containing a group II intron are efficiently spliced in maize mitochondria. Furthermore sequence analysis verified RNA editing of all editing sites within the amplified *cox2* cDNA. In contrast, *atp9* mRNA of the introduced gene from *S. bicolor* shows partial editing at three out of six editing sites. Transcripts of sorghum *atp6-1* are not edited *in organello* at any of the sites analysed.

Chimeric *atp6* genes have been constructed by fusion of *atp6* sections from sorghum and maize *atp6* to analyse the possible function of the regions that are different between these two genes. Transcripts of a transgene harbouring the maize 5' noncoding sequence and a part of the translated sequence („*prepiece*“), coding for the aminoterminal extension of ATP6, in combination with the conserved „*core*“ section of the coding sequence and the 3'

untranslated sequence of *S. bicolor* have been found to be partially edited. Other constructs with different *atp6* fusions are transcribed, but mRNAs are not processed.

6 Literatur

Literatur

- Adams, KL, Song, K, Roessler, PG, Nugent, JM, Doyle, JL, Doyle, JJ und Palmer, JD (1999) Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13863–13868.
- Albertazzi, FJ, Kudla, J und Bock, R (1998) The *cox2* locus of the primitive angiosperm plant *Acorus calamus*: molecular structure, transcript processing and RNA editing. *Mol Gen Genet*, 259: 591–600.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW und Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215: 403–410.
- Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W und Lipman, DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389–3402.
- Anthonisen, IL, Salvador, ML und Klein, U (2001) Specific sequence elements in the 5' untranslated regions of *rbcL* and *atpB* gene mRNAs stabilize transcripts in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *RNA*, 7: 1024–1033.
- Araya, A, Domec, C, Bègu, D und Litvak, S (1992) An *in vitro* system for the editing of ATP synthase subunit 9 mRNA using wheat mitochondrial extracts. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 1040–1044.
- Backert, S, Lurz, R, Oyarzabal, OA und T, Börner (1997) High content, size and distribution of single-stranded DNA in the mitochondria of *Chenopodium album* (L.). *Plant Mol Biol*, 33: 1037–1050.

- Baldauf, SL und Palmer, JD (1990) Evolutionary transfer of the chloroplast *tutA* gene to the nucleus. *Nature*, 344: 262–265.
- Bègu, D, Graves, PV, Domee, C, Arselin, G, Litvak, S und Araya, A (1990) RNA editing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9: direct protein and cDNA sequencing. *Plant Cell*, 2: 1283–1290.
- Benne, R, Van den Burg, J, Brakenhoff, JP, Sloof, P, Van Boom, JH und Tromp, MC (1986) Major transcripts of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46: 819–826.
- Binder, S und Brennicke, A (1993) A tRNA gene transcription initiation site is similar to mRNA and rRNA promoters in plant mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 21: 5012–5019.
- Binder, S, Hatzack, F und Brennicke, A (1995) A novel pea mitochondrial *in vitro* transcription system recognizes homologous and heterologous mRNA and tRNA promoters. *J Biol Chem*, 270: 22182–22189.
- Binder, S, Thalheim, C und Brennicke, A (1994) Transcription of potato mitochondrial 26S rRNA is initiated at its mature 5' end. *Curr Genet*, 26: 519–523.
- Blanc, V, Litvak, S und Araya, A (1995) RNA editing in wheat mitochondria proceeds by a deamination mechanism. *FEBS Lett*, 373: 56–60.
- Bock, H, Brennicke, A und Schuster, W (1994) *Rps3* and *rpl16* genes do not overlap in *Oenothera* mitochondria: GTG as a potential translation initiation codon in plant mitochondria? *Plant Mol Biol*, 24: 811–818.
- Bock, R (2000) Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, 82: 549–557.
- Bock, R, Hagemann, R, Kössel, H und Kudla, J (1993) Tissue- and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids - a new regulatory mechanism? *Mol Gen Genet*, 240: 238–244.

- Bock, R, Hermann, M und Fuchs, M (1997) Identification of critical nucleotide positions for plastid RNA editing site recognition. *RNA*, 3: 1194–1200.
- Bock, R, Hermann, M und Kössel, H (1996) *In vivo* dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J*, 5: 5052–5059.
- Bock, R und Maliga, P (2000) In vivo testing of a tobacco plastid DNA segment for guide RNA function in *psbL* editing. *Mol Gen Genet*, 247: 439–443.
- Bonen, L und Vogel, J (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet*, 17: 322–331.
- Borovkov, AY und Rivkin, MI (1997) *XcmI*-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques*, 22: 812–814.
- Brennicke, A, Grohmann, L, Hiesel, R, Knoop, V und Schuster, W (1993) The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Lett*, 325: 140–145.
- Brennicke, A, Marchfelder, M und Binder, S (1999) RNA editing. *FEMS Microbiol Rev*, 23: 297–316.
- Briat, JF, Laulhere, JP und Mache, R. (1979) Transcription activity of a DNA-protein complex isolated from spinach plastids. *Eur J Biochem*, 98: 285–292.
- Brown, GG, Auchincloss, AH, Covello, PS, Gray, MW, Menassa, R und Singh, M (1991) Characterization of transcription initiation sites on the soybean mitochondrial genome allows identification of a transcription-associated sequence motif. *Mol Gen Genet*, 228: 345–355.
- Bullock, WO, Fernandez, JM und Short, JM (1987) XL1-Blue1: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5: 376–379.

- Calvin, NM und Hanawalt, PC (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, 170: 2796–2801.
- Caoile, AG und Stern, DB (1997) A conserved core element is functionally important for maize mitochondrial promoter activity *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 25: 4055–4060.
- Carpousis, JA, Vanzo, NF und Raynal, LC (1999) mRNA degradation. A tale of poly(a) and multiprotein machines. *Trend Genet*, 15: 24–28.
- Cech, TR (1986) RNA as an enzyme. *Sci Amer*, 255: 76–84.
- Chapdelaine Y, B. L. (1991) The wheat mitochondrial gene for subunit I of the NADH dehydrogenase complex: a *trans*-splicing model for this gene-in-pieces. *Cell*, 65: 465–472.
- Chateigner-Boutin, AL und Hanson, MR (2002) Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared *cis* elements. *Mol Cell Biol*, 22: 8448–8456.
- Chateigner-Boutin, AL und Hanson, MR (2003) Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res*, 31: 2586–2594.
- Chaudhuri, S, Carrer, H und Maliga, P (1995) Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids. *EMBO J*, 14: 2951–2957.
- Chaudhuri, S und Maliga, P (1996) Sequences directing C to U editing of the plastid *psbL* mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. *EMBO J*, 15: 5958–5964.
- Cheng, SWC, Lynch, EC, Leason, KR, Court, DL, Shapiro, BA und Friedmann, DI (1991) Functional significance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science*, 254: 1205–1207.

- Cho, Y, Qiu, YL, Kuhlman, P und Palmer, JD (1998) Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 14244–14249.
- Choquet, Y, Goldschmidt-Clermont, M, Girard-Bascou, J, Kück, U, Bennoun, P und Rochaix, JD (1988) Mutant phenotypes support a *trans*-splicing mechanism for the expression of the tripartite *psaA* gene in the *C. reinhardtii* chloroplast. *Cell*, 52: 903–913.
- Clayton, DA (1984) Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem*, 53: 573–594.
- Cohen, SN (1995) Surprise at the end of procaryotic RNA. *Cell*, 80: 829–832.
- Collins, RA und Lambowitz, AM (1985) RNA splicing in neurospora mitochondria. defective splicing of mitochondrial mRNA precursors in the nuclear mutant *cyt18-1*. *J Mol Biol*, 184: 413–428.
- Collombet, JM, Wheeler, VC, Vogel, F und Coutelle, C (1997) Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. A novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders. *J Biol Chem*, 272: 5342–5347.
- Covello, PS und Gray, MW (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Nature*, 341: 662–666.
- Covello, PS und Gray, MW (1990) Differences in editing at homologous sites in messenger RNAs from angiosperm mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 18: 5189–5196.
- Covello, PS und Gray, MW (1991) Sequence analysis of wheat mitochondrial transcripts capped *in vitro*: definitive identification of transcription initiation sites. *Curr Genet*, 20: 245–251.
- Dai, L und Zimmerly, S (2002) The dispersal of five group II introns among natural populations of *Escherichia coli*. *RNA*, 8: 1294–1307.

- Daley, DO, Adams, KL, Clifton, R, Qualmann, S, Millar, AH, Palmer, JD, Pratje, E und Whelan, J (2002a) Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from *Cox2*. *Plant J*, 30: 11–21.
- Daley, DO, Clifton, R und J, Whelan (2002b) Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 10510–10515.
- Danon, A und Mayfield, SP (1994) ADP-dependent phosphorylation regulates RNA binding *in vitro*: implications in light-modulated translation. *EMBO J*, 13: 12227–12235.
- De Benedetto, C, De Gara, L, Arrigoni, O, Albrizio, M und Galleriani, R (1992) The structure of the cytochrome oxidase subunit II gene and its use as a new character in the construction of the phylogenetic tree of Angiospermae. *Plant Sci*, 81: 75–82.
- DM, Heery, Gannon, F und Powell, R (1990) A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Genet*, 6: 173.
- Dombrowski, S, Brennicke, A und Binder, S (1997) 3'-inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators. *EMBO J*, 16: 5069–5076.
- Drager, RG, Zeidler, M, Simpson, CL und Stern, DB (1996) A chloroplast transcript lacking the 3' inverted repeat is degraded by 3' to 5' exonuclease activity. *RNA*, 2: 8123–8130.
- Dyall, SD, Brown, MT und Johnson, PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 304: 253–257.
- Echeverria, M, Robert, D, Carde, JP und Litvak, S (1991) Isolation from wheat mitochondria of a membrane-associated high molecular weight complex involved in DNA synthesis. *Plant Mol Biol*, 16: 301–315.

- Elias, JM und Miller, F (1975) A comparison of the unlabeled enzyme method with immunofluorescence for the evaluation of human immunologic renal disease. *Am J Clin Pathol*, 64: 464–471.
- Enrriquez, JA, Fernandez-Silva, P, Perez-Martos, A, Lopez-Perez, MJ und Montoya, J (1996) The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP. *Eur J Biochem*, 237: 601–610.
- Enrriquez, JA, Lopez-Perez, MJ und Montoya, J (1991) Saturation of the processing of newly synthesized rRNA in isolated brain mitochondria. *FEBS Lett*, 280: 32–36.
- Enrriquez, JA, Perez-Martos, A, Fernandez-Silva, P, Lopez-Perez, MJ und Montoya, J (1993) RNA synthesis in isolated mitochondria from brain cortex, cerebellum and stem: evidence of different transcriptional rates. *Int J Biochem*, 25: 1951–1956.
- Enrriquez, JA, Ramos, J, Perez-Martos, A, Lopez-Perez, MJ und Montoya, J (1994) Highly efficient DNA synthesis in isolated mitochondria from rat liver. *Nucleic Acids Res*, 22: 1861–1865.
- Falk, J, Schmidt, A und Krupinska, K (1993) Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves. *Plant Physiol*, 141: 176–181.
- Farrè, JC und Araya, A (2001) Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles. *Nucleic Acids Res*, 29: 2484–2491.
- Farrè, JC und Araya, A (2002) RNA splicing in higher plant mitochondria: determination of functional elements in group II intron from a chimeric *cox II* gene in electroporated wheat mitochondria. *Plant J*, 29: 203–213.
- Farrè, JC, Leon, G, Jordan, X und Araya, A (2001) *Cis* recognition elements in plant mitochondrion RNA editing. *Mol Cell Biol*, 21: 6731–6737.

- Ferat, JL und Michel, F (1993) Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature*, 364: 358–361.
- Fernandez-Silva, P, Micol, V und Attardi, G (1996) Mitochondrial DNA transcription initiation and termination using mitochondrial lysates from cultured human cells. *Methods Enzymol*, 264: 129–139.
- Fey, J, Vermel, M, Grienenberger, J, Marèchal-Drouard, L und Gualberto, JM (1999) Characterization of a plant mitochondrial active chromosome. *FEBS Lett*, 458: 124–128.
- Fox, TD (1996) Genetics of mitochondrial translation. In *Translation control* (herausgegeben von Hershey, J, Mathews, M und Sonnenberg, N), Seiten 733–758. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Fox, TD und Leaver, CJ (1981) The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons. *Cell*, 26: 315–323.
- Freyer, R, Kiefer-Meyer, MC und Kössel, H (1997) Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 6285–6290.
- Gagliardi, D, Perrin, R, Marèchal-Drouard, L, Grienenberger, JM und Leaver, CJ (2001) Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3'-to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures. *J Biol Chem*, 276: 43541–43547.
- Gaines, GL (1996) *In organello* RNA synthesis system from HeLa cells. *Methods Enzymol*, 264: 43–49.
- Giegè, P und Brennicke, A (1999) RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 15324–15329.

- Giegè, P, Hoffmann, M, Binder, S und Brennicke, A (2000) RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria. *EMBO Rep*, 1: 164–170.
- Giese, A, Thalheim, C, Brennicke, A und Binder, S (1996) Correlation of nonanucleotide motifs with transcript initiation of 18S rRNA genes in mitochondria of pea, potato and Arabidopsis. *Mol Gen Genet*, 252: 429–436.
- Gordon, PM, Sontheimer, EJ und Piccirilli, JA (2000) Metal ion catalysis during the exon-ligation step of nuclear pre-mRNA splicing: extending the parallels between spliceosome and group II introns. *RNA*, 6: 199–205.
- Gray, M (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol*, 141: 233–357.
- Gray, MW (1998) Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature*, 396: 109–110.
- Gray, MW und Doolittle, WF (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev*, 46: 1–42.
- Greenleaf, AL, Kelly, JL und Lehman, IR (1986) Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci*, 83: 3391–3394.
- Grohmann, L, Rasmusson, AG, Heiser, V, Thieck, O und Brennicke, A (1996) The NADH binding subunit of respiratory chain complex I is nuclear-encoded in plants and identified only in mitochondria. *Plant J*, 10: 793–803.
- Grohmann, L, Thieck, O, Herz, U, Schröder, W und Brennicke, A (1994) Translation of *nad9* mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts. *Nucleic Acids Res*, 22: 3304–3311.
- Groot, GS, van Harten-Loosbroek, N, van Ommen, GJ und Pijst, HL (1981) RNA synthesis in isolated yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 9: 6369–6377.

- Grosskopf, D und Mulligan, RM (1996) Developmental- and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings. *Curr Genet*, 29: 556–563.
- Gruissem, W, Narita, JO, Greenberg, BM, Prescott, DM und Hallick, RB (1983) Selective *in vitro* transcription of chloroplast genes. *J Cell Biochem*, 22: 31–46.
- Gruissem, W und Zurawski, G (1985) Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpB* and *psbA* genes. *EMBO J*, 4: 3375–3383.
- Grundstein, M und Hogness, DS (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci*, 72: 3961–3965.
- Gualberto, JM, Bonnard, G, Lamattina, L und Grienemberger, JM (1991) Expression of the wheat mitochondrial *nad3-rps12* transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation. *Plant Cell*, 3: 1109–1120.
- Gualberto, JM, Lamattina, L, Bonnard, G, Weil, JH und Grienemberger, JM (1989) RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature*, 341: 660–662.
- Hajdukiewicz, PTJ, Allison, LA und Maliga, P (1997) The two RNA polymerase encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J*, 16: 4041–4048.
- Handa, H (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, 31: 5907–5916.
- Haouazine-Takvorian, N, Takvorian, A, Jubier, MF und Lejeune, B (1997) Genes encoding subunit 6 of NADH dehydrogenase and subunit 6 of ATP synthase are co-transcribed in maize mitochondria. *Curr Genet*, 31: 63–69.

- Hayes, R, Kudla, J und Grussem, W. (1999) Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem Sci*, 24: 199–202.
- Hedtke, B, Börner, T und Weihe, A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science*, 277: 809–811.
- Hedtke, B, Meixner, M, Gillandt, S, Richter, E, Börner, T und Weihe, A (1999) Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant J*, 17: 557–561.
- Heiser, V, Brennicke, A und Grohmann, L (1996) The plant mitochondrial 22 kDa (PSST) subunit of respiratory chain complex I is encoded by a nuclear gene with enhanced transcript levels in flowers. *Plant Mol Biol*, 31: 1195–1204.
- Herdenberger, F, Holländer, V und Kück, U (1994) Correct *in vivo* RNA splicing of a mitochondrial intron in algal chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 22: 2869–2875.
- Hermann, M und Bock, R (1999) Transfer of plastid RNA-editing activity to novel sites suggests a critical role for spacing in editing-site recognition. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 4856–4861.
- Herrin, DL, Bao, Y, Thompson, AJ und Chen, YF (1991) Self-splicing of the *Chlamydomonas chloroplast psbA* introns. *Plant Cell*, 3: 1095–1107.
- Hess, WR, Hoch, B, Zeltz, P, Hübschmann, T, Kössel, H und Börner, T (1994) Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell*, 6: 1455–1465.
- Hess, WR, Prombona, A, Fieder, B, Subramanian, AR und Börner, T. (1993) Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J*, 12: 563–571.

- Hiesel, R, Combettes, B und Brennicke, A (1994) Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the Bryophyta. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 629–633.
- Hiesel, R, Wissinger, B, Schuster, W und Brennicke, A (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Science*, 246: 1632–1634.
- Higgins, DG, Bleasby, AJ und Fuchs, R (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, 8: 189–191.
- Higgins, DG und Sharp, PM (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Genes Dev*, 73: 237–244.
- Hirose, T, Kusumegi, T, Tsudzuki, T und Sugiura, M (1999) RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet*, 262: 462–467.
- Hoch, B, Maier, RM, Appel, K, Igloi, GL und Kössel, H. (1991) Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature*, 353: 178–180.
- Hoffmann, M und Binder, S (2002) Functional importance of nucleotide identities within the pea *atp9* mitochondrial promoter sequence. *J Mol Biol*, 320: 943–950.
- Hoge, JHC, Springer, J, Zantige, B und Wessels, JGH (1982) Absence of differences in polysomal RNA from vegetative monokaryotic and dikaryotic cells of the fungus *Schizophyllum commune*. *Exp Mycol*, 6: 225–232.
- Holländer, V und Kück, U (1999) Group II intron splicing in chloroplasts: identification of mutations determining intron stability and fate of exon RNA. *Nucleic Acids Res*, 27: 2345–2353.
- Hoppengardener, B, Bhalla, T, Staber, C und Reenan, R (2003) Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science*, 301: 832–836.

- Hotchkiss, TL und Hollingsworth, MJ (1999) ATP synthase 5' untranslated regions are specifically bound by chloroplast polypeptides. *Curr Genet*, 35: 512–520.
- Hsu-Ching, C und Stern, DB. (1991) Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *J Biol Chem*, 266: 24205–24211.
- Huang, J, Matzinger, DF und Levings, CS (1994) Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number. *Plant Cell*, 6: 439–448.
- Hübschmann, T und Börner, T (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Mol Biol*, 36: 493–496.
- Inaba, K und Oda, T (1977) RNA synthesis in mitochondria isolated from rat liver. *Acta Med Okayama*, 31: 141–146.
- Jarrell, KA, Peebles, CL, Dietrich, RC, Romiti, SL und Perlmann, PS (1988) Group II intron self-splicing. Alternative reaction conditions yield novel products. *J Biol Chem*, 263: 3432–3439.
- Jenkins, BD, Kulhanek, DJ und A, Barkan (1997) Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell*, 9: 283–296.
- Kagawa, Y und Racker, E (1966) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 8. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 241: 2461–2466.
- Kaleikau, EK, Andre, CP und Walbot, V (1992) Structure and expression of the rice mitochondrial apocytochrome b gene (*cob-1*) and pseudogene (*cob-2*). *Curr Genet*, 22: 463–470.
- Kapoor, S, Suzuki, JY und Sugiura, M (1997) Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J*, 11: 327–337.

- Kawasaki, ES und Wang, AM (1998) Detection of gene expression. In *PCR Technology, principles and applications for DNA amplification* (herausgegeben von Ehrlich, H.), Seiten 89–97. Stockton Press, New York.
- Kelly, JL, Greenleaf, AL und Lehman, IR (1986) Isolation of the nuclear gene encoding a subunit of the yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem*, 261: 10348–10351.
- Kempken, F. (1996) Struktur und Funktion von extranukleären und mobilen Erbträgern bei Pflanzen und Pilzen. *Habilitationsschrift, Ruhr-Universität Bochum*.
- Kempken, F, Mullen, JA, Pring, DR und Tang, HV (1991) RNA editing of sorghum mitochondrial *atp6* transcripts changes 15 amino acids and generates a carboxy-terminus identical to yeast. *Curr Genet*, 20: 417–422.
- Koch, JL, Boulanger, SC, Dib-Hajj, SD, Hebbbar, SK und Perlman, PS (1992) Group II introns deleted for multiple substructures retain self-splicing activity. *Mol Cell Biol*, 12: 1950–1958.
- Koulintchenko, M, Konstantinov, Y und Dietrich, A (2003) Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J*, 22: 1245–1254.
- Krömer, S, Sitt, M und Heldt, HW (1988) Mitochondrial oxidative phosphorylation participating in photosynthesis metabolism of leaf cell. *FEBS Lett*, 226: 352–356.
- Kubo, N und Kadowaki, K (1997) Involvement of 5' flanking sequences for specifying RNA editing sites in plant mitochondria. *FEBS Lett*, 413: 40–44.
- Kudla, J, Albertazzi, FJ, Blazevic, D, Hermann, M und Bock, R (2002) Loss of the mitochondrial *cox2* intron in a family of monocotyledonous plants and utilization of mitochondrial intron sequences for the construction of a nuclear intron. *Mol Genet Genomics*, 267: 223–230.
- Kudla, J, Hayes, R und Gruißem, W (1996) Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *EMBO J*, 15(24): 7137–7146.

- Kudla, J, Igloi, GL, Metzloff, M, Hagemann, R und Kössel, H (1992) RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by a C to U substitution within the initiation codon. *EMBO J*, 11: 1099–1103.
- Kugita, M, Yamamoto, Y, Fujikawa, T, Matsumoto, T und Yoshinaga, K (2003) RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res*, 31: 2417–2423.
- Kuhn, J und Binder, S (2002) RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 30: 439–446.
- Kuhn, J, Tengler, U und Binder, S (2001) Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria. *TMol Cell Biol*, 21: 731–742.
- Kuhsel, MG, Strickland, R und Palmer, JD (1990) An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science*, 250: 1570–1573.
- Kumar, R und Levings, CS (1993) RNA editing of a chimeric maize mitochondrial gene transcript is sequence specific. *Curr Genet*, 23: 154–159.
- Kurihara-Yonemoto, S und Handa, H (2001) Low temperature affects the processing pattern and RNA editing status of the mitochondrial *cox2* transcripts in wheat. *Curr Genet*, 40: 203–208.
- Lamattina, L und Grienberger, JM (1991) RNA editing of the transcript coding for subunit 4 of NADH dehydrogenase in wheat mitochondria: uneven distribution of the editing sites among the four exons. *19, Nucleic Acids Res*: 3275–3282.
- Lang, BF, Burger, G, O'Kelly, CJ, Cedergren, R, Golding, GB, Lemieux, C, Sankoff, D, Turmel, M und Gray, MW (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387: 493–497.

- Learn, GH, Jr, Shore, JS, Furnier, GR, Zurawski, G und Clegg, MT. (1992) Constraints on the evolution of plastid introns: the group II intron in the gene encoding tRNA^{Val}(UAC). *Mol Biol Evol*, 9: 856–871.
- Lecellier, G und Silar, P (1994) Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr Genet*, 25: 122–123.
- Leon, P, Arroyo, A und Mackenzie, S (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 453–480.
- Lerbs-Mache, S (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci*, 90: 5509–5513.
- Lippok, B, Brennicke, A und Wissinger, B. (1992) The *cox II* gene in carrot mitochondria contains two introns. *Mol Gen Genet*, 232: 322–327.
- Logan, DC, Millar, AH, Sweetlove, LJ, Hill, SA und Leaver, CJ (2001) Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol*, 125: 662–672.
- Lohrmann, J, Sweere, U, Zabaleta, E, Baurle, I, Keitel, C, Kozma-Bognar, L, Brennicke, A, Schäfer, E, Kudla, J und Harter, K (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics*, 265: 2–13.
- Lu, B und Hanson, MR (1992) A single nuclear gene specifies the abundance and extent of RNA editing of a plant mitochondrial transcript. *Nucleic Acids Res*, 20: 5699–5703.
- Lu, B und Hanson, MR (1994) A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited *atp6* transcripts. *Plant Cell*, 6: 1955–1968.

- Lu, B und Hanson, MR (1996) Fully edited and partially edited *nad9* transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 24: 1369–1374.
- Lupold, DS, Caoile, AG und Stern, DB (1999) The maize mitochondrial *cox2* gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units. *J Biol Chem*, 274: 3897–3903.
- Mahendran, R, Spottswood, MR und Miller, DL (1991) RNA editing by cytidine insertion in mitochondria of *Physarum polycephalum*. *Nature*, 349(6308): 434–438.
- Maier, RM, Neckermann, K, Igloi, GL und Kössel, H (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol*, 251: 614–628.
- Maier, RM, Zeltz, P, Kössel, H, Bonnard, G, Gualberto, JM und Grienberger, JM. (1996) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 32: 343–365.
- Manley, JL und Proudfoot, NJ (1994) RNA 3' ends: formation and function - meeting review. *Genes Dev*, 8: 259–264.
- Marchfelder, A, Brennicke, A und Binder, S (1996) RNA editing required for efficient excision of tRNA(Phe) from precursors in plant mitochondria. *J Biol Chem*, 271: 1898–1903.
- Marèchal-Drouard, L, Cosset, A, Remacle, C, Ramamonjisoa, D und Dietrich, A (1996) A single editing event is a prerequisite for efficient processing of potato mitochondrial phenylalanine tRNA. *Moll Cell Biol*, 16: 3504–3510.
- Marienfeld, J, Unseld, M, Brandt, P und Brennicke, A (1996) Genomic recombination of the mitochondrial *atp6* gene in *Arabidopsis thaliana* at the protein processing site creates two different presequences. *DNA Res*, 3: 287–290.

- Martin, W, Rujan, T, Richly, E, Hansen, A, Cornelsen, S, Lins, T, Leister, D, Stoebe, B, Hasegawa, M und Penny, D (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 12246–12251.
- Martin, W, Stoebe, B, Goremykin, V, Hapsmann, S, Hasegawa, M und KV, Kowallik (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*, 393: 162–165.
- Martinez-Abarca, F und Toro, N. (2000) Group II introns in the bacterial world. *Mol Microbiol Rev*, 38: 917–926.
- Masters, BS, Stohl, LL und Clayton, DA (1987) Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, 51: 89–99.
- Mehta, A und Driscoll, DM (2002) Identification of domains in apobec-1 complementation factor required for RNA binding and apolipoprotein-B mRNA editing. *RNA*, 8: 69–82.
- Michel, F und Ferat, JL (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem Biophys Acta*, 64: 435–461.
- Michel, F, Umesono, K und Ozeki, H (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns—a review. *Genes Dev*, 82: 5–30.
- Miller, JF, Dower, LS und Tompkins, LS (1988) High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Camphylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Procl Natl Acad Science*, 85: 856–860.
- Miyagi, T, Kapoor, S, Sugita, M und Sugiura, M (1998) Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol Gen Genet*, 257: 299–307.
- Miyamoto, T, Obokata, J und Sugiura, M (2002) Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of *cis*-acting elements

- and *trans*-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. *Mol Cell Biol*, 22: 6726–6734.
- Muise, RC und Hauswirth, WW (1992) Transcription in maize mitochondria: effects of tissue and mitochondrial genotype. *Curr Genet*, 22: 235–242.
- Mullen, JA, Pring, DR, Kempken, F, Ferguson, J und Chase, CD (1992) Sorghum mitochondrial *atp6*: divergent amino extensions to a conserved core polypeptide. *Plant Mol Biol Evol*, 20: 71–79.
- Mulligan, RM, Lau, GT und Walbot, V (1988) Numerous transcription initiation sites exist for the maize mitochondrial genes for subunit 9 of the ATP synthase and subunit 3 of cytochrome oxidase. *Proc Natl Acad Sci*, 85(21): 7998–8002.
- Mulligan, RM, Leon, P, Calvin, N und Walbot, V (1989) Introduction of DNA into maize and rice mitochondria by electroporation. *Maydica*, 34: 207–216.
- Mulligan, RM, Leon, P und Walbot, V. (1991) Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression. *Mol Cell Biol*, 11: 533–543.
- Mulligan, RM, Williams, MA und Shanahan, DM (1999) RNA editing site recognition in higher plant mitochondria. *J Hered*, 90: 338–344.
- Newton, K. (1994) Procedures for isolating mitochondria and mitochondrial DNA and RNA. In *The maize handbook* (herausgegeben von Freeling, M und Walbot, V), Seiten 549–556. Springer, New York.
- Nishiwaki, S, Nakazono, M, Tsutsumi, N und Hirai, A (1995) Structure of a gene subunit 9 of NADH dehydrogenase (*nad9*) in rice mitochondria and RNA editing of its transcript. *Plant Cell Physiol*, 36: 1135–1138.
- Niswender, C (1998) Recent advances in mammalian RNA editing. *Cell Mol Life Sci*, 54.

- Nivison, HT, Sutton, CA, Wilson, RK und Hanson, MR (1994) Sequencing, processing and localization of the petunia CMS-associated mitochondrial protein. *Plant J*, 5: 613–623.
- Notsu, Y, Masood, S, Nishikawa, T, Kubo, N, Akiduki, G, Nakazono, M, Hirai, A und Kadowaki, K (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics*, 268: 434–445.
- Nudler, E, Kashlev, M, Nikiforov, V und Goldfarb, A (1995) Coupling between transcription termination and RNA polymerase inchworming. *Cell*, 81: 351–357.
- Nugent, JM und Palmer, JD (1991) RNA-mediated transfer of the gene *cox* II from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell*, 66: 473–481.
- Osinga, KA, De Haan, M, Christianson, T und Tabak, HF (1982) A nonanucleotide sequence involved in promotion of ribosomal RNA synthesis and RNA priming of DNA replication in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 10(24): 7993–8006.
- Ostheimer, GJ, Williams-Carrier, R, Belcher, S, Osborne, E, Gierke, J und Barkan, A (2003) Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA binding domain. *EMBO J*, 22: 3919–3929.
- Palmer, J (1990) Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet*, 6: 115–120.
- Pearson, W (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol*, 183: 63–98.
- Peebles, CL, Perlman, PS, Mecklenburg, KL, Petrillo, ML, Tabor, JH, Jarrell, KA und Cheng, HL (1986) A self-splicing RNA excises an intron lariat. *Cell*, 44: 213–223.
- Peeters, NM und Hanson, MR (2002) Transcript abundance supercedes editing efficiency as a factor in developmental variation of chloroplast gene expression. *RNA*, 8: 497–511.

- Podar, M, Perlman, PS und Padgett, RA (1998) The two steps of group II intron selfsplicing are mechanistically distinguishable. *RNA*, 4: 890–900.
- Poyton, RO, Bellus, G, McKee, EE, Sevarino, KA und Goehring, B (1996) *In organello* mitochondrial protein and RNA synthesis systems from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 264: 36–42.
- Pring, DR, Mullen, JA und Kempken, F (1992) Conserved sequences blocks 5' to start codons of plant mitochondrial genes. *Plant Mol Biol*, 19: 313–317.
- Qin, PT und Pyle, AM (1998) The architectural organization and mechanistic functions of group II intron structural elements. *Curr Opin Struct Biol*, 8: 301–308.
- Qui, YL, Cho, Y, Cox, JC und Palmer, JD (1998) The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature*, 394: 671–674.
- Rajasekhar, VK und Mulligan, RM (1993) RNA editing in plant mitochondria: α - phosphate is retained during C-to-U conversion in mRNAs. *Plant Cell*, 5: 1843–1852.
- Rapp, WD, Lupold, DS, Mack, S und DB, Stern (1993) Architecture of the maize mitochondrial *atp1* promoter as determined by linker-scanning and point mutagenesis. *Mol Cell Biol*, 13: 7232–7238.
- Rapp, WD und Stern, DB (1992) A conserved 11 nucleotide sequence contains an essential promoter element of the maize mitochondrial *atp1* gene. *EMBO J*, 11: 1065–1073.
- Rasmusson, AG, Svensson, AS, Knoop, V, Grohmann, L und Brennicke, A (1999) Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J*, 20: 79–87.
- Reed, ML und Hanson, MR (1997) A heterologous maize *rpob* editing site is recognized by transgenic tobacco chloroplasts. *Mol Cell Biol*, 17: 6948–6952.
- Reed, ML, Peeters, NM und Hanson, MR (2001) A single alteration 20 nt 5' to an editing target inhibits chloroplast RNA editing *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 29: 1507–1513.

- Rurek, M, Nuc, K, Raczynska, KD und Augustyniak, H (2003) Lupin *nad9* and *nad6* genes and their expression: 5' termini of the *nad9* gene transcripts differentiate lupin species. *Genes Dev*, 315: 123–132.
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB und Ehrlich, HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Saldanha, R, Mohr, G, Belfort, M und Lambowitz, AM (1993) Group I and group II introns. *FASEB*, 7: 15–24.
- Sambrook, J, Fritsch, EF und Maniatis, T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F, Nicklen, S und Coulson, AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 74: 5463–5467.
- Sasaki, Y, Kozaki, A, Ohmori, A, Iguchi, H und Nagano, Y (2001) Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants. *J Biol Chem*, 276: 3937–3940.
- Schmelzer, C und Schweyen, RJ (1986) Self-splicing of group II introns *in vitro*: mapping of the branch point and mutational inhibition of lariat formation. *Cell*, 46: 557–565.
- Schuster, D, Lisitzky, I und Klaff, P (1999) Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol*, 120: 937–944.
- Schuster, W und Brennicke, A (1990) RNA editing of ATPase subunit 9 transcripts in *Oenothera* mitochondria. *FEBS Lett*, 268: 252–256.
- Schuster, W, Hiesel, R, Isaac, PG, Leaver, CJ und Brennicke, A (1986) Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 14: 5943–5954.
- Sharp, PA (1991) 'The easy pieces'. *Science*, 254: 663.

- Sharp, PA (1994) Split genes and RNA splicing. *Cell*, 77: 805–815.
- Slater, EC und Ter Welle, HF (1969) Applications of oligomycin and related inhibitors in bioenergetics. In *Inhibitors, tools in cell research* (herausgegeben von Bücher, T und Sies, H). Springer Verlag, Berlin.
- Smart, CJ, Moneger, F und Leaver, CJ (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell*, 6: 811–825.
- Soll, J und Schleiff, E (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 198–208.
- Sontheimer, EJ, Sun, S und JA, Piccirilli (1997) Metal ion catalysis during splicing of premessenger RNA. *Nature*, 388: 801–805.
- Southern, EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98: 503–517.
- Staudinger, M und Kempken, F (2003) Electroporation of isolated higher-plant mitochondria: transcripts of an introduced *cox2* gene, but not an *atp6* gene, are edited in organello. *Mol Genet Genomics*, 269: 553–561.
- Stern, DB und Gruissem, W (1987) Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell*, 51: 1145–1157.
- Suck, R, Zeltz, P, Falk, J, Acker, A, Kössel, H und Krupinska, K (1996) Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the alpha-subunit of plastome-encoded RNA polymerase. *Curr Genet*, 30: 515–521.
- Sugita, M und Sugiura, M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol*, 32: 315–326.

- Sutton, CA, Conklin, PL, Pruitt, KD und Hanson, MR (1991) Editing of pre-mRNAs can occur before *cis*- and *trans*-splicing in *Petunia* mitochondria. *Mol Cell Biol*, 11: 4274–4277.
- Sutton, CA, Zoubenko, OV, Hanson, MR und Maliga, P (1995) A plant mitochondrial sequence transcribed in transgenic tobacco chloroplasts is not edited. *Mol Cell Biol*, 15: 1377–1381.
- Svab, Z, Hajdukiewicz, P und Maliga, P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci*, 87(21): 8526–8530.
- Svab, Z und Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci*, 90(3): 913–917.
- Takenaka, M und Brennicke, A (2003) *In vitro* RNA editing in pea mitochondria requires NTP or dNTP, suggesting involvement of an RNA helicase. *J Biol Chem*, 278: 47526–47533.
- Takenaka, M, Neuwirt, J und Brennicke, A (2004) Complex *cis*-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 32: 4137–4144.
- Tandler, B und Walter, RJ (1977) Epon-maraglas embedment for electron microscopy. *Stain Technol*, 52: 238–239.
- Thompson, JD, Higgins, DG und Gibson, TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673–4680.
- Thuring, RW, Sanders, JP und Borst, P (1975) A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal Biochem*, 66: 213–220.
- To, KY, Cheng, MC, Chen, LF und Chen, SC (1996) Introduction and expression of foreign DNA in isolated spinach chloroplasts by electroporation. *Plant J*, 10: 737–743.

- Tonkyn, JC und Gruissem, W (1993) Differential expression of the partially duplicated chloroplast S10 ribosomal protein operon. *Mol Gen Genet*, 241(1-2): 141–152.
- Toro, N (2003) Bacteria and Archaea Group II introns: additional mobile genetic elements in the environment. *Environ Microbiol*, 5: 143–151.
- Truscott, KN, Brandner, K und Pfanner, N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*, 13: 326–337.
- Unsel, M, Marienfeld, JR, Brandt, P und Brennicke, A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet*, 15: 57–61.
- Valadkhan, S und Manley, JL (2001) Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, 413: 701–707.
- Valerio, M, Diolez, P und Haraux, F (1994) Deactivation of F_0F_1 ATPase in intact plant mitochondria. Effect of pH and inhibitors. *Eur J Biochem*, 221: 1071–1078.
- van der Veen, R, Arnberg, AC, van der Horst, G, Bonen, L, Tabak, HF und Grivell, LA (1986) Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing *in vitro*. *Cell*, 44: 225–234.
- Vidal, S, Curran, J und Kolakofsky, D (1990) A stuttering model for paramyxovirus P mRNA editing. *EMBO J*, 9: 2017–2022.
- Villa, T, Pleiss, JA und Guthrie, C (2002) Spliceosomal snRNAs: Mg^{2+} -dependent chemistry at the catalytic core? *Cell*, 109: 149–152.
- Vogel, J und Börner, T (2002) Lariat formation and a hydrolytic pathway in plant chloroplast group II intron splicing. *EMBO J*, 21: 3794–3803.
- Wahle, E und Ruegsegger, U (1999) 3'-end formation mRNA processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 23: 277–295.

- Wakasugi, T, Hirose, T, Horihata, M, Tsudzuki, T, Kössel, H und Sugiura, M (1996) Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 8766–8770.
- Weihe, A, Hedtke, B und Börner, T (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res*, 25: 2319–2325.
- Whitfeld, P und Bottomley, W (1993) Organisation and structure of chloroplast genes. *Annu Rev Plant Physiol*, 34: 279–310.
- Williams, MA, Kutcher, BM und Mulligan, RM (1998) Editing-site recognition in plant mitochondria: the importance of 5'-flanking sequences. *Plant Mol Biol*, 36: 229–237.
- Wilson, SB und Pearson, CK (1996) Redox regulation of RNA synthesis in plant mitochondria. *Biochem Soc Trans*, 24: 296.
- Windhofer, F (2002) Untersuchungen zur Aktivität des Transposons *restless* in dem heterologen Wirt *Neurospora crassa*. *Dissertation, Ruhr-Universität Bochum*.
- Wintz, H und Hanson, MR (1991) A termination codon is created by RNA editing in the petunia *atp9* transcript. *Curr Genet*, 19: 61–64.
- Yan, B und Pring, DR (1997) Transcriptional initiation sites in sorghum mitochondrial DNA indicate conserved and variable features. *Curr Genet*, 32: 287–295.
- Yang, AJ und Mulligan, RM (1991) RNA editing intermediates of *cox2* transcripts in maize mitochondria. *Mol Cell Biol*, 11: 4278–4281.
- Yang, D, Oyaizu, Y, Oyaizu, H, Olsen, GJ und Woese, CR (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 4443–4447.
- Yu, W, Sanchez, H und Schuster, W (1998) Assays for investigating RNA editing in plant mitochondria. *Methods Enzymol*, 15: 63–74.

- Yu, W und Schuster, W (1995) Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria. *J Biol Chem*, 270: 18227–18233.
- Zabaleta, E, Heiser, V, Grohmann, L und Brennicke, A (1998) Promoters of nuclear-encoded respiratory chain complex I genes from *Arabidopsis thaliana* contain a region essential for anther/pollen-specific expression. *Plant J*, 15(1): 49–59.
- Zeltz, P, Kadowaki, K, Kubo, N, Maier, RM, Hirai, A und Kössel, H (1996) A promiscuous chloroplast DNA fragment is transcribed in plant mitochondria but the encoded RNA is not edited. *Plant Mol Biol*, 32: 647–656.
- Zito, F, Kuras, R, Choquet, Y, Kössel, H und Wollman, FA (1997) Mutations of cytochrome b6 in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol*, 33: 79–86.
- Zucker, M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31: 3406–3415.
- Zylber, EA, Perlman, S und Penman, S (1971) Mitochondrial RNA turnover in the presence of cordycepin. *Biochim Biophys Acta*, 240: 588–593.

7 Anhang

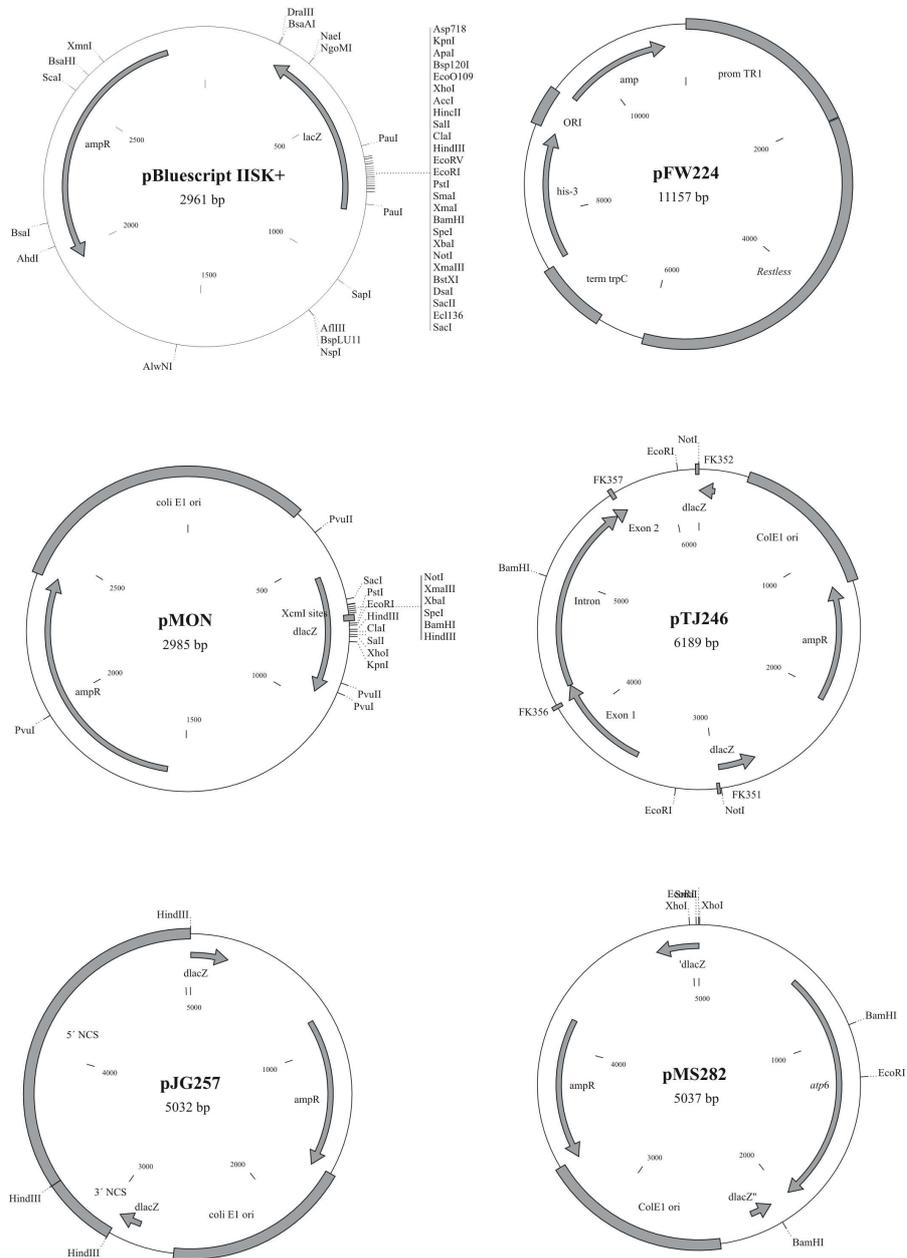


Abbildung 27: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

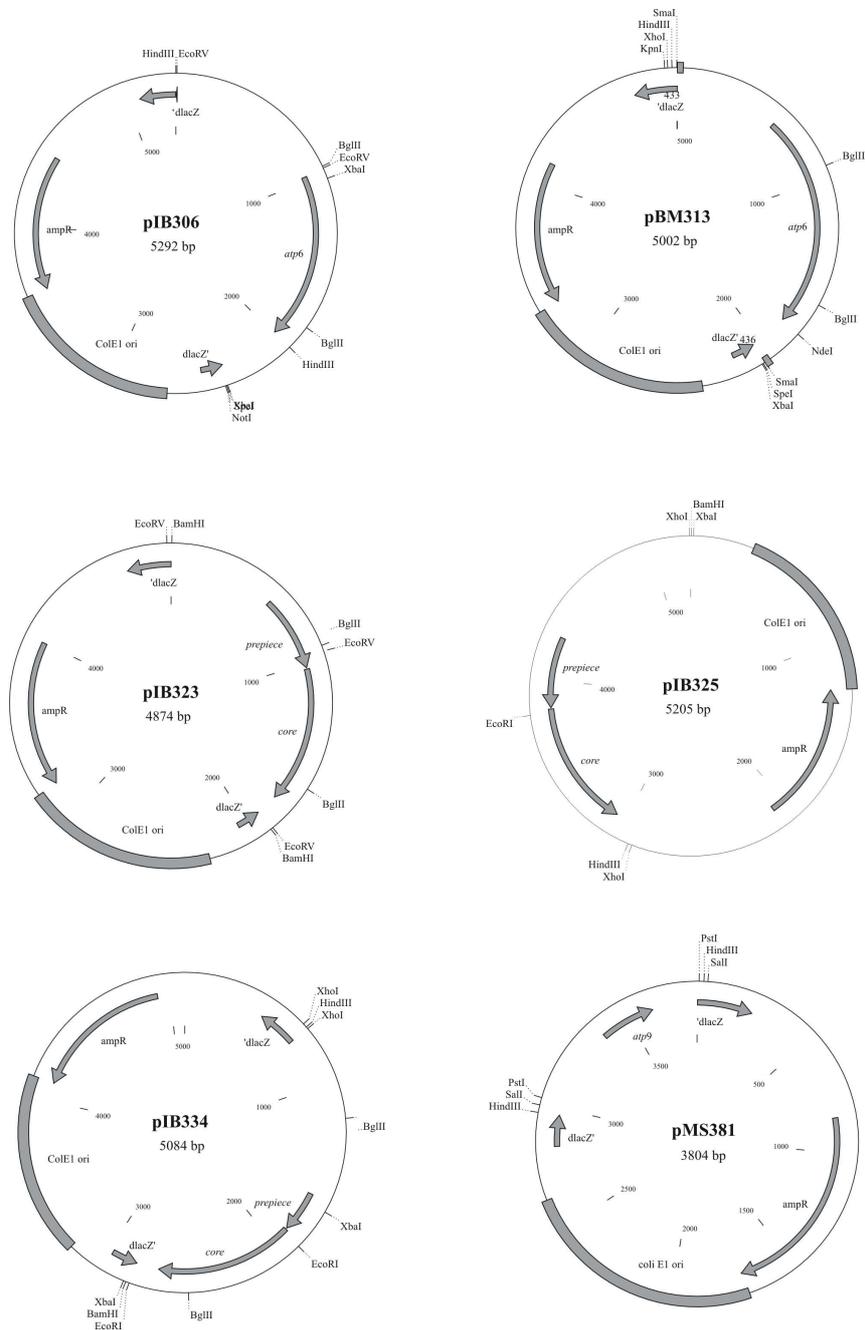


Abbildung 28: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren


```
Sb-atp6-1      ACCTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCTCTCATTGTTTTTCGTGCATTAAGCTCAGGAAT 776
AY506529      ACCTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCTCTCATTGTTTTTCGTGCATTAAGCTCAGGAAT 959
*****

Sb-atp6-1      ACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTTAAGTGGGTTGC 836
AY506529      ACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTTAAGTGGGTTGC 1019
*****

Sb-atp6-1      TTGGACTATGCTATTTCTGAATAATATTTTTTATTTCATAGGAGATCTTGGTCCCTTATT 896
AY506529      TTGGACTATGCTATTTCTGAATAATATTTTCTATTTCTTAGGAGATCTTGGTCCCTTATT 1079
*****

Sb-atp6-1      TATAGTTCTAGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAGCTCATGTTTC 956
AY506529      TATAGTTCTAGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAGCTCATGTTTC 1139
*****

Sb-atp6-1      TACGATCTCAATTTGTATTTACTTGAATGATGCTACAAATCTCCATCAAAATGAGTAA- 1014
AY506529      TACGATCTCAATTTGTATTTACTTGAATGATGCTACAAATCTCCATCAAAATGAGTCATT 1199
*****

Sb-atp6-1      -----
AY506529      TCATAATTGCATAAAAACGAGGAGCCAATCATAG 1233
```

AY506529	-----ATGATGATGATGACTAGATGG	21
pBM313	-----ATGATGATGATGACTAGATGG	21
Z11843	ATGTTAGAAAGGAGCGAAATTAATAGGTGCTGGAGCTGCTGTTAGAACCATGACTGAA---	57
	* * * * *	
AY506529	AGTTCCACTGATATGAAGAGAAGAAATAGAATATTGGCT--AATATGGTGCCAAATTCGTA	79
pBM313	AGTTCCACTGATATGAAGAGAAGAAATAGAATATTGGCT--AATATGGTGCCAAATTCGTA	79
Z11843	GGATCTTCTAATAACAAGTAATGCTAATGGTGTCCGATTCGGATTCCGGTTCAACTGGG	117
	* * * * *	
AY506529	ATTTA---AGTTTACCTGATTAT---TATGAATATGAAGAAGAATACCCTCCAGTTTCAA	133
pBM313	ATTTA---AGTTTACCTGATTAT---TATGAATATGAAGAAGAATACCCTCCAGTTTCAA	133
Z11843	ATTTATGAGGACCACCAGGCTGCACCCGCCGTCGATGAAAGGGTGGTGAATATCAA	177
	***** * * * * *	
AY506529	GAGAGGCAACCAGAG--GGTCTGTATACTCCTACGAATAGACAGATATTTATCTTCAATT	192
pBM313	GAGAGGCAACCAGAG--GGTCTGTATACTCCTACGAATAGACAGATATTTATCTTCAATT	192
Z11843	GCCGGTATAAGGGAGCAAATGAGTGAATTAATGAGGATGGACGGGGAGC-ACCCCGAAGT	236
	* * * * *	
AY506529	GGAAGGAGCATTCAAGACCGTG-AGGTCTACGCGAT-----TTCCGCCAACGGTT	242
pBM313	GGAAGGAGCATTCAAGACCGTG-AGGTCTACGCGAT-----TTCCGCCAACGGTT	242
Z11843	TGTGGCAGCCGCCAACGTTGTCATGGAGAAAGCGATAATATCGCTTTTTTGAAGGGCT	296
	* * * * *	
AY506529	ACTC-----TTTCC---CCAACGCGAGGCTGGGCACAGCTTTTCCGAAATATATGATGAT	294
pBM313	ACTC-----TTTCC---CCAACGCGAGGCTGGGCACAGCTTTTCCGAAATATATGATGAT	294
Z11843	GCTCGAGGATTTAAGGGCACATGGAAGAGAAGTGAAGCTTTCAAGTACGGAGTGCCGAA	356
	*** ** * * * * *	
AY506529	ATACGAGCG-CATGGGGTAGAAGCAAGTCGATTGGGTGAGCCTCTAAGAGATCTGTACGA	353
pBM313	ATACGAGCG-CATGGGGTAGAAGCAAGTCGATTGGGTGAGCCTCTAAGAGATCTGTACGA	353
Z11843	TGACGCTCCTCTTCTGGAGGAGGAAACCCAGCGGG--AAGCTCAGGAGGAGTTGACCTA	414
	*** * * * * * * * * * *	
AY506529	TGAGATGGAAAGGAACGGCGAGATAGTAAATAACGGCTCAATCATTATCCCTGGAGGCGG	413
pBM313	TGAGATGGAAAGGAACGGCGAGATAGTAAATAACGGCTCAATCATTATCCCTGGAGGCGG	413
Z11843	GCGAATGGAATGA--GGCGGGAGTTCGCGAGGAGTTGACCTAGCGAATGTGGATGAT	472
	***** ** * * * * *	
	prepiece core	
AY506529	CGGACCAGTAACAGAAAGCCCATTTGGATCAATTTGGAATTCACCCAATTTCTGGATCTGAA	473
pBM313	CGGACCAGTAACAGAAAGCCCATTTGGATCAATTTGGAATTCACCCAATTTCTGGATCTGAA	473
Z11843	CTG-CAGCAGCAGAAAGCCCATTTGGATCAATTTGGAATTCACCCAATTTCTGGATCTGAA	530
	* * * * *	
AY506529	TATTGGCAAGTACTATGTCTCATTACAAAATCTATCCTTGTCTATGCTACTACTCTCGG	533
pBM313	TATTGGCAAGTACTATGTCTCATTACAAAATCTATCCTTGTCTATGCTACTACTCTCGG	533
Z11843	TATTGGTGAAGTACTATGTCTCATTACAAAATCTATCCTTGTCTATGCTACTACTCTCGG	590
	***** * * * * *	
AY506529	TTTGGTCTACTTCTGGTTTTTGTGTTACGAAAAAGGAGGGGAAAGTCAGTGCCAAA	593
pBM313	TTTGGTCTACTTCTGGTTTTTGTGTTACGAAAAAGGAGGGGAAAGTCAGTGCCAAA	593
Z11843	TTTGGTCTACTTCTGGTTTTTGTGTTACGAAAAAGGAGGGGAAAGTCAGTGCCAAA	650
	***** * * * * *	
AY506529	TGCATTTCAATCCTTGGTGGAGCTTATTTATGATTTTCGTGCCGAACCTGGTAAACGAACA	653
pBM313	TGCATTTCAATCCTTGGTGGAGCTTATTTATGATTTTCGTGCCGAACCTGGTAAACGAACA	653
Z11843	TGCATTTCAATCCTTGGTGGAGCTTATTTATGATTTTCGTGCCGAACCTGGTAAACGAACA	710
	***** * * * * *	

Abbildung 30: Vergleich der kodierenden Sequenzen des pBM313 mit der *atp6* Sequenz aus *Zea mays*. Vergleichend dargestellt sind die klonierte *atp6* Sequenz des Plasmids pBM313, die publizierte DNA-Sequenz des *atp6* (NCBI „Accession No.“: AY506529) sowie die *atp6* RNA-Sequenz des chimären *atp6* (NCBI „Accession No.“: Z11843, Kumar und Levings, 1993) aus *Z. mays*. Hervorgehoben ist der Übergang vom „prepiece“ zum konservierten „core“-Anteil. (Fortsetzung umseitig)

```

AY506529      AATAGGTGGTCTTTCCGAAATGTGAAACACAAGTTTTTCCCTTGCCATCTCGGTCACCTT 713
pBM313       AATAGGTGGTCTTTCCGAAATGTGAAACACAAGTTTTTCCCTTGCCATCTCGGTCACCTT 713
Z11843       AATAGGTGGTCTTTCCGAAATGTGAAACACAAGTTTTTCCCTTGCCATCTCGGTCACCTT 770
*****

AY506529      TACTTTTTCGTTATTTTCGTAATCCCAGGGTATGATACCCCTTAGCTTCACAGTGACAAG 773
pBM313       TACTTTTTCGTTATTTTCGTAATCCCAGGGTATGATACCCCTTAGCTTCACAGTGACAAG 773
Z11843       TACTTTTTCGTTATTTTCGTAATCTTCAGGGTATGATACCCCTTAGCTTCACAGTGACAAG 830
*****

AY506529      TCATTTTCTCATTACTTTGGCTCTTTCATTTTCCATTTTATAGGCATTACGATCGTTGG 833
pBM313       TCATTTTCTCATTACTTTGGCTCTTTCATTTTCTATTTTATAGGCATTACGATCGTTGG 833
Z11843       TCATTTTCTCATTACTTTGGCTCTTTCATTTTCCATTTTATAGGCATTACGATCGTTGG 890
*****

AY506529      ATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTTAGCTTCTTATTACCAGCGGGAGTCCCACTGCC 893
pBM313       ATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTTAGCTTCTTATTACCAGCGGGAGTCCCACTGCC 893
Z11843       ATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTTAGCTTCTTATTACCAGCGGGAGTCCCACTGCC 950
*****

AY506529      ATTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCTCTCATTGTTTTTCGTGCATTAAGCTC 953
pBM313       ATTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCTCTCATTGTTTTTCGTGCATTAAGCTC 953
Z11843       ATTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCTCTTATTGTTTTTCGTGCATTAAGCTT 1010
*****

AY506529      AGGAATACGTTTATTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTTAAGTGG 1013
pBM313       AGGAATACGTTTATTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTTAAGTGG 1013
Z11843       AGGAATACGTTTATTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTTAAGTGG 1070

AY506529      GTTTGCTTGACTATGCTATTTCTGAATAATATTTTCTATTTCTTAGGAGATCTTGGTCC 1073
pBM313       GTTTGCTTGACTATGCTATTTCTGAATAATATTTTCTATTTCTTAGGAGATCTTGGTCC 1073
Z11843       GTTTGCTTGACTATGCTATTTCTGAATAATATTTTCTATTTCTTAGGAGATCTTGGTCC 1130
*****

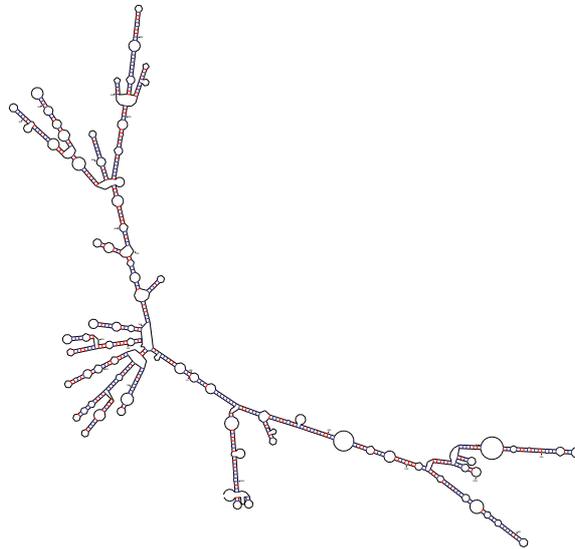
AY506529      CTTATTTATAGTTCTAGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAAAGCTCA 1133
pBM313       CTTATTTATAGTTCTAGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAAAGCTCA 1133
Z11843       CTTATTTATAGTTCTAGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAAAGCTTA 1190
*****

AY506529      TGTCTTACGATCTCAATTTGTATTTACTTGAATGATGCTACAAATCTCCATCAAAATGA 1193
pBM313       TGTCTTACGATCTCAATTTGTATTTACTTGAATGATGCTACAAATCTCCATCAAAATGA 1193
Z11843       TGTCTTACGATCTCAATTTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAATCTCCATTA----- 1245
*****

AY506529      GTCATTTCATAATTGCATAAAAAACGAGGAGCCAATCATAG----- 1233
pBM313       GTCATTTCATAATTGCATAAAAAACGAGGAGCCAATCATAGACTACATATGGTCTGATAC 1253
Z11843       -----

```

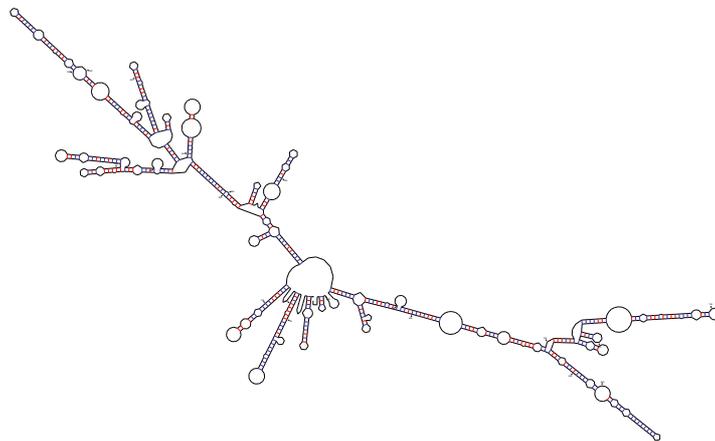
ps22ps by D. Stewart and M. Zuker
© 2004 Washington University



dG = -381.6 Zm atp6

Abbildung 31: Berechnete Sekundärstruktur der kodierenden Sequenz der *Z. mays. atp6* mRNA

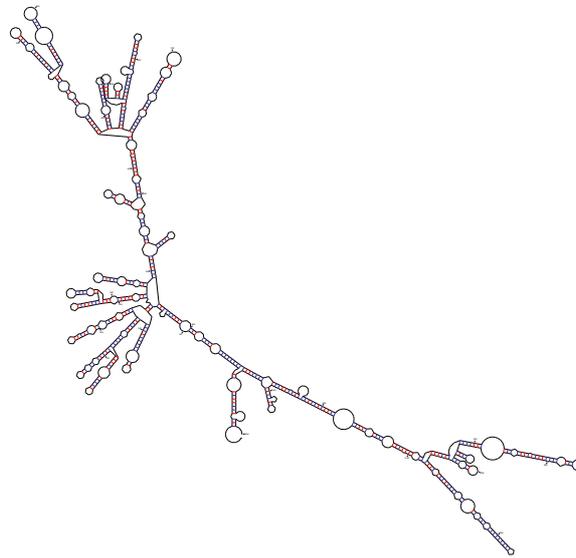
plt2ps by D. Stewart and M. Zuker
© 2004 Washington University



dG = -310.2 Sb atp6-1

Abbildung 32: Berechnete Sekundärstruktur der kodierenden Sequenz des *atp6-1* Transkripts von *S. bicolor*.

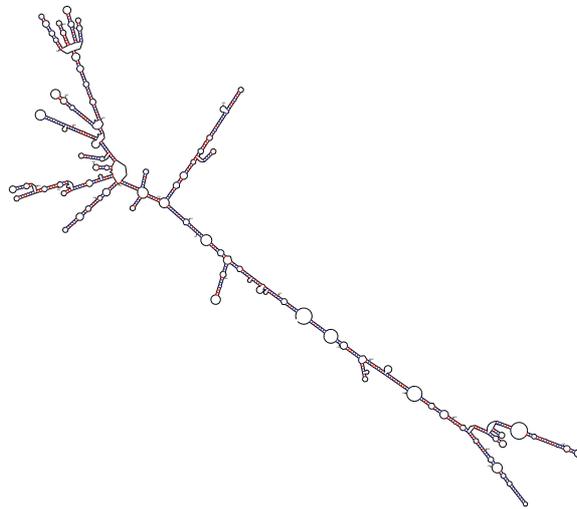
pl22ps by D. Stewart and M. Zuker
© 2004 Washington University



dG = -372.6 pIB323

Abbildung 33: Mögliche Sekundärstruktur der mRNA des chimären *atp6* Transkripts des Plasmids pIB323.

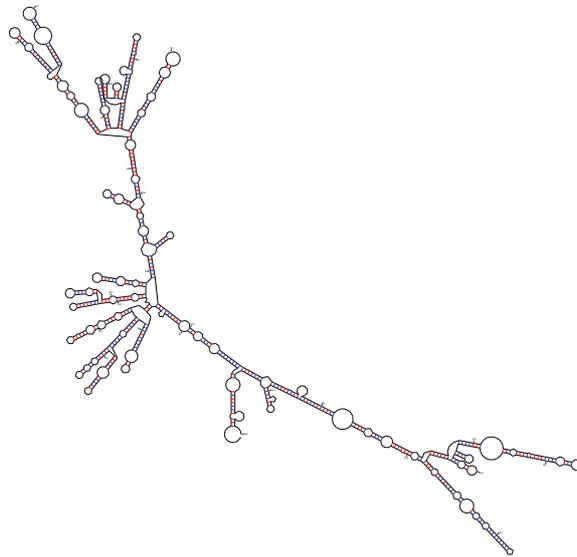
pI22ps by D. Stewart and M. Zuker
© 2004 Washington University



dG = -428.1 pIB306

Abbildung 34: Vorhergesagte 2D-Struktur des pIB306 Transkripts.

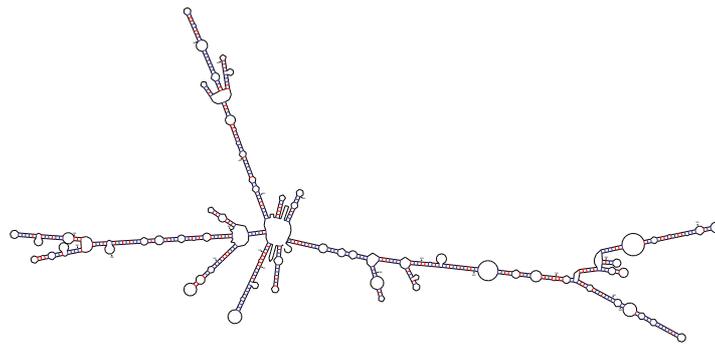
piB2ps by D. Stewart and M. Zuker
© 2004 Washington University



dG = -372.6 piB325

Abbildung 35: Vorhergesagte Sekundärstruktur des piB325-Transkripts

plf2ps by D. Stewart and M. Zuker
© 2004 Washington University



dG = -317.2 pIB334

Abbildung 36: Berechnete Sekundärstruktur der vom Plasmid pIB334 erhaltenen Transkripts.

Eigene Veröffentlichungen

Staudinger, M und Kempken, F (2003) Electroporation of isolated higher-plant mitochondria: transcripts of an introduced *cox2* gene, but not an *atp6* gene, are edited in organello. *Mol Genet Genomics*, 269(4): 553-561.

Staudinger, M und Kempken, F (2004) Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric *atp6* transcripts. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Mol Genet Genomics*.

Tagungsbeiträge

Kempken, F, Staudinger, M und Stockmeyer, K (2000) DNA Transfer in Mitochondrien. Botanikertagung 2000, Jena.

Saudinger, M und Kempken, F (2001) *In organello* splicing and editing by *in vitro* transformed mitochondria of *Zea mays*. Annual meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Bochum.

Staudinger, M, Löttgert, T und Kempken, F (2002) *In vitro* transformierte Mais Mitochondrien: Transkription und RNA-Edierung. 15. Meeting: Molecular biology of plants, Dabringhausen.

Staudinger, M, Löttgert, T und Kempken, F (2002) RNA-Edierung und Spleißen von Transkripten *in vitro* transformierter Mitochondrien. International Society of Endocytobiology - Germany (ISE-G) Meeting, Blaubeuren.

Staudinger, M und Kempken, F (2003) *In vitro* introduction of plasmid DNA into isolated plant mitochondria: A powerful tool to analyse mitochondrial RNA processing. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, Spanien.

Kempken, F und Staudinger, M (2003) Elektroporation von Mitochondrien und *in organello* RNA-Prozessierung. International Society of Endocytobiology - Germany (ISE-G)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Kempken, meinem akademischen Lehrer und Doktorvater, danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, für seine geistige wie materielle Unterstützung, die exzellenten Arbeitsbedingungen, seine wissenschaftlichen Anregungen sowie nicht zuletzt für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau PD Dr. S. Pöggeler gilt mein Dank für das überlassene Cosmid P9.

Herrn Prof. Dr. D.R. Pring danke ich für die Überlassung des Plasmids pAF1.

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der AG Kempken (Bochum) bzw. der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie (Kiel) für die Zusammenarbeit.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung Biologie der Pflanzenzelle des Botanischen Instituts für die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme in Kiel.

Insbesondere möchte ich Gaby, Jon, Kirsten, Lenard und Mario für die wissenschaftlichen Diskussionen sowie die nicht ganz so wissenschaftlichen Gespräche bei unzähligen „*Café con leche*“-Kolloquien herzlichst danken.

Kerstin und Nina gilt mein Dank für die Durchsicht dieser Arbeit. Besonders möchte ich darüber hinaus Kirsten und Jon für ihre kritischen Anmerkungen danken.

Lebenslauf

Matthias Staudinger

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 23.07.1972

Genurtsort: Dortmund

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1979-1983 Schragmüller Grundschule, Dortmund

1983-1992 Heinrich Heine Gymnasium, Dortmund

Abschluss Allgemeine Hochschulreife

1993-2000 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

Anfertigung der Diplomarbeit unter Betreuung von PD

Dr. J.-D. Schwenn am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen

Hauptfach: Biochemie und Biophysik

Nebenfächer: Humangenetik, Mikrobiologie

seit Mai 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von

Dr. F. Kempken

Mai 2000 - Sept. 2001 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation

unter der Betreuung von Hdoz. Dr. F. Kempken

am Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare

Botanik, Ruhr-Universität Bochum

seit Oktober 2001 Fortführung der experimentellen Arbeiten bei Prof. Dr.

F. Kempken in der Abteilung Botanische Genetik und

Molekularbiologie des Botanischen Instituts der Chris-

tian Albrechts Universität, Kiel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Die wörtlich oder inhaltlich anderen Quellen entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet worden.

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Staudinger, M und Kempken, F (2003) Electroporation of isolated higher-plant mitochondria: transcripts of an introduced *cox2* gene, but not an *atp6* gene, are edited in organello. *Mol Genet Genomics*, 269(4): 553-561.

Staudinger, M und Kempken, F (2004) Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric *atp6* transcripts. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Mol Genet Genomics*.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

Matthias Staudinger