

Heterologe Expression und Funktionsanalyse
des CMS-assoziierten offenen Leserahmens *orf107*
aus *Sorghum bicolor* in *Nicotiana tabacum*
und *Arabidopsis thaliana*

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



vorgelegt von
Kerstin Stockmeyer
aus Essen
Kiel, 2006

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den

Der Dekan

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Das mitochondriale Genom Höherer Pflanzen	2
1.2.1 Organisation	2
1.2.2 Gene des Chondrioms	3
1.2.3 Rekombinationsprozesse	5
1.3 Prozessierung mitochondrialer und plastidärer Transkripte	8
1.3.1 RNA-Edierung in Mitochondrien und Plastiden	9
1.3.2 Spleißen der Transkripte	11
1.4 Cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) bei Höheren Pflanzen	13
1.4.1 CMS bei <i>Zea mays</i> und <i>Sorghum bicolor</i>	14
1.4.2 Restauration der Fertilität	17
2. Problemstellung	20
3. Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Organismen	22
3.1.1.1 Bakterienstämme	22
3.1.1.2 Pflanzenmaterial	22
3.1.2 Oligonukleotide	23
3.1.3 Plasmide	24
3.1.4 Membranen und Papiere	25
3.1.5 Chemikalien	25
3.1.6 Enzyme	25
3.1.7 Nährmedien	26
3.1.8 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Kulturbedingungen	28
3.2.1.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Escherichia coli</i>	28

3.2.1.2 Pflanzen	28
3.2.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> bzw. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
3.2.2.1 Elektroporation	29
3.2.2.2 CaCl ₂ -vermittelte Transformation	30
3.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren	30
3.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i> bzw. <i>E. coli</i>	30
3.2.3.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe	30
3.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.2.3.4 Isolierung von Gesamt-DNA und -RNA aus <i>Nicotiana tabacum</i> SR1	32
3.2.4 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
3.2.5 Extraktion von Gesamtprotein aus Pflanzenblättern und Proteinbestimmung	32
3.2.6 Gelelektrophorese	33
3.2.6.1 DNA-Gelelektrophorese	33
3.2.6.2 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen	33
3.2.7 Reinigung und Elution von DNA aus Agarosegelen	34
3.2.8 Dephosphorylierung von DNA	34
3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten	34
3.2.10 Radioaktive Markierung von DNA	35
3.2.11 Southern Blot und DNA-DNA-Hybridisierung	35
3.2.12 Western Blot und Detektion	35
3.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.13.1 Standard-Polymerase-Kettenreaktion	36
3.2.13.2 Reverse-Transkription-PCR („One Step-RT-PCR“)	37
3.2.14 DNA-Sequenzierung	37
3.2.15 Stabile Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> SR1 mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 [pMP90]	37
3.2.16 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Infiltrationsmethode	38
3.2.17 Biolistische Transformation	39

3.2.18	Protoplastierung von Tabak BY2-Zellen und PEG-vermittelte Transformation	40
3.2.19	Protoplastierung von <i>A. thaliana</i> -Blattgewebe	40
3.2.20	Histologische Detektion der β -Glucuronidase-Aktivität in transgenen Arabidopsis und Tabak Pflanzen	40
3.2.21	MitoTracker [®] -Färbung	41
3.2.22	Licht-Mikroskopie	41
3.2.23	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)	42
3.2.24	Auswertung von Nukleotid- und Proteinsequenzen	42
3.2.25	Digitale Bildbearbeitung	42
4.	Ergebnisse	43
4.1	Konstruktion binärer <i>orf107</i> -Vektoren zur heterologen, stabilen Expression	43
4.2	Nachweis der Funktionalität und Spezifität der verwendeten Promotoren	47
4.2.1	Generierung von Vektoren zur histochemischen GUS-Färbung	47
4.2.2	Analyse der Verteilung der GUS-Aktivität	48
4.3	Heterologe Expression von <i>orf107</i> in <i>Nicotiana tabacum</i> Pflanzen	50
4.4	Generierung und Charakterisierung von transgenen <i>orf107 Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	55
4.4.1	Nachweis der Fremd-DNA in den erzeugten transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	56
4.4.2	Nachweis der Transkription der <i>orf107</i> -DNA in transgenen Pflanzen	58
4.4.3	Phenotypische Analyse der transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	59
4.5	Nachweis der <i>orf107</i> Translation in transgenen Pflanzen	64
4.5.1	Herstellung eines <i>orf107</i> -Biotag-Vektors	64
4.5.2	Chemolumineszente Analyse	65
4.6	Import von ORF107-GFP-Fusionsproteinen in Mitochondrien	67
4.6.1	Import von ORF107 in Mitochondrien ohne Signalsequenz	67
4.6.2	Import von ORF107 in Mitochondrien mit Signalsequenz	71

5. Diskussion	74
5.1 Die Expression von <i>orf107</i> hat keinen Einfluss auf den Phentyp und die Pollenfertilität der transgenen Pflanzen	74
5.1.1 Aktivität der verwendeten Promotoren in transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> Pflanzen	74
5.1.2 Transkription und Translation der heterologen <i>orf107</i> -DNA	76
5.1.3 Phentyp der transgenen <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	77
5.1.4 Ist das ORF107 Protein trotz der verwendeten Signalsequenzen an falscher Stelle lokalisiert?	83
5.1.5 Das <i>orf107</i> Transkript lag nicht vollständig ediert vor	87
5.2 Import eines ursprünglich mitochondrialen Proteins in Mitochondrien ohne Signalsequenz	89
5.3 Erzeugung künstlicher männlicher Sterilität bei Pflanzen	91
5.4 Ausblick	95
6. Zusammenfassung	96
7. Literatur	100
8. Anhang	131

Abkürzungen

A	Adenin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus (engl. „Cauliflower Mosaic Virus“)
cDNA	komplementäre DNA (engl. „complementary DNA“)
CMS	cytoplasmatisch männliche Sterilität
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „desoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein (engl. Green Fluorescent Protein)
GUS	β-Glucuronidase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: „messenger RNA“)
nt	Nukleotid
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
orf	offener Leserahmen (engl.: „open reading frame“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. „ribonucleic acid“)
RT	Reverse Transkription
T	Thymin
T-DNA	Transfer-DNA
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
U	Uracil
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: „rounds per minute“)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

Häufig verwendete Genbezeichnungen

<i>atp</i>	Gen für eine Untereinheit der F ₀ /F ₁ -ATP-Synthase
<i>cox</i>	Gen für eine Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase
<i>gus</i>	Gen für die β-Glucuronidase
<i>nptII</i>	Gen für die Neomycin-Phosphotransferase
<i>gfp</i>	Gen für das Grün Fluoreszierende Protein

1. Einführung

1.1 Einleitung

Zusätzlich zur genetischen Information im Zellkern besitzen pflanzliche Zellen extranukleäre DNA, die in den Mitochondrien und Plastiden lokalisiert ist. Das pflanzliche Genom besteht folglich aus Kerngenom, Chondriom (Genom der Mitochondrien) und Plastom (Genom der Plastiden). Nach der Endosymbiontentheorie sind Mitochondrien und Plastiden aus zunächst eigenständigen Organismen hervorgegangen, die durch eine Ureukaryontenzelle aufgenommen worden sind. So sind die Mitochondrien wahrscheinlich aus α -Purpurbakterien und die Plastiden aus Cyanobakterien entstanden (Gray und Doolittle 1982; Gray 1992; Palmer 1992; Palmer 1993; Dyll et al. 2004). Mitochondrien und Plastiden stellen semiautonome Organellen dar, deren eigene genetische Information für ihre Biogenese und Funktionsausübung nicht ausreicht.

Beim Vergleich der Kodierungskapazitäten der organellären Genome mit den ursprünglich eigenständigen Organismen fällt ein Verlust an genetischer Information in den Mitochondrien und Plastiden auf. Durch „endosymbiotischen Gentransfer“ (Gray 1992; Brennicke et al. 1993) wurde im Laufe der Evolution ein Großteil der organellären Gene des aufgenommenen Bakteriums in den Zellkern transferiert. Von solchen Genen abgeleitete mitochondriale bzw. plastidäre Proteine werden daher im Zellkern transkribiert, an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert und dann in die Mitochondrien bzw. Plastiden importiert (Kouranov und Schnell 1996; Schatz 1996; Hauke und Schatz 1997). Zudem besitzen die Organellen einen eigenen Transkriptions- und Translationsapparat, an dem auch kernkodierte Genprodukte beteiligt sind. Die Genexpression der Plastiden sowie der Mitochondrien wird maßgeblich durch posttranskriptionelle RNA-Prozessierungen reguliert. Dazu zählen die exo- und endonukleolytische Verkürzung der 5'- und 3'-Enden der Primärtranskripte, das Spleißen der mRNA in *cis* oder *trans* und die RNA-Edierung. Die RNA-Edierung ist ein spezieller Prozess, durch den bei Höheren Pflanzen die Nukleotidsequenz der mRNA verändert wird, indem C nach U und seltener auch U nach C Transitionen durchgeführt werden (Mayfield et al. 1995; Binder et al. 1996; Maier et al. 1996).

Eine koordinierte Interaktion zwischen Zellkern und Mitochondrien bzw. Plastiden ist Voraussetzung für das funktionelle Zusammenwirken dieser verschiedenen Gen-Expressionsapparate. Ein Beispiel für eine gestörte Zellkern-Mitochondrien-Interaktion stellt die cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) dar, wodurch die betroffenen Pflanzen keinen funktionsfähigen Pollen bilden können (Schnable und Wise 1998; Kempken und Pring 1999; Linke und Börner 2005). Obwohl die genauen Mechanismen, die zu solchen Störungen führen meist unbekannt sind, werden chimäre offene Leserahmen, wie z.B. der in dieser Arbeit untersuchte *orf107* aus der Hirse *Sorghum bicolor* Linie IS1112C, häufig mit CMS in Verbindung gebracht.

1.2 Das mitochondriale Genom Höherer Pflanzen

1.2.1 Organisation

Mitochondrien kommen mit wenigen Ausnahmen bei allen Eukaryonten vor. Im Gegensatz zu den Plastomen unterscheiden sich die Chondriome verschiedener Organismengruppen bezüglich ihrer Größe, ihres Informationsgehaltes und der physikalischen Struktur stark voneinander (Gray 1989). Während die Plastidengenome heutiger Pflanzen eine Größe von 120 kb bis 217 kb aufweisen (Palmer 1990; Whitfeld und Bottomley 1993), variiert die Größe der Chondriome Höherer Pflanzen hingegen stark und reicht von 200 kb (*Brassica hirta*) bis 2400 kb bei *Cucumis melo* (Levings und Brown 1989). Starke Variationen der Größe des mitochondrialen Genoms sind sogar innerhalb einer Familie zu erkennen, was am Beispiel der Cucurbitaceae deutlich wird. Das Chondriom der Zuckermelone *Cucumis melo* ist mit 2400 kb um mehr als das siebenfache größer als das 330 kb große Chondriom der Wassermelone *Citrullus vulgaris*.

Diese auffällige Größendifferenz ist auf einen hohen Anteil an duplizierten Sequenzen und Intronen in der mitochondrialen DNA, sowie intergenische Sequenzabschnitte, die zwischen den kodierenden Regionen liegen, zurückzuführen (Backert et al. 1997a; Unseld et al. 1997).

Die mitochondrialen Genome der Protisten (5,7 bis 76 kb), der Tiere (14 bis 42 kb) und der Pilze (18 bis 176 kb) sind wesentlich kleiner als die der Höheren Pflanzen (Roe et al. 1985; Gray 1998). Trotz der Größenunterschiede ist die Anzahl der kodierten Gene wahrscheinlich gleich groß (Schuster und Brennicke 1994).

1.2.2 Gene des Chondrioms

Die Chondriome mehrerer verschiedener Eukaryonten, z.B. des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (Oda et al. 1992), der Alge *Prototheca wickerhamii* (Wolff et al. 1994), der Höheren Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Brennicke et al. 1996, Unseld et al. 1997) und weiterer Höherer Pflanzen sind vollständig sequenziert worden (siehe Tabelle 1). Die mitochondrialen Gene kodieren für Untereinheiten von Enzymen der Atmungskette, die in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind (z.B. ATP-Synthase, Cytochrom-c-Oxidase und NADH-Dehydrogenase) und für Komponenten des Translationsapparates, wie z.B. ribosomale Proteine der kleinen und großen Ribosomen-Untereinheit und ribosomale RNA (Übersicht in Schuster und Brennicke 1994, Giegé und Brennicke 2001). Die Genomgröße korreliert nicht mit dem jeweiligen Informationsgehalt, da die Kodierungskapazität bei den Pflanzen beschränkt ist. Das 366 kb große Chondriom von *Arabidopsis* kodiert nur für 58 Gene, während das 184 kb große Chondriom von *Marchantia* für 66 Gene kodiert (Marienfeld et al. 1999). So enthält z.B. das Chondriom von *Arabidopsis thaliana* lediglich Gene für einige Untereinheiten der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung, rRNA und tRNA-Sequenzen, einige ribosomale Proteine, jedoch kein Gen für eine RNA-Polymerase (Unseld et al. 1997). Alle bislang bekannten Chondriome photosynthetischer Eukaryonten weisen keine Sequenzbereiche mit Homologien zu Sequenzen der RNA-Polymerasen auf. Daher ist davon auszugehen, dass die RNA-Polymerasen der Mitochondrien im Kern kodiert vorliegen. Nur bei dem Protisten *Reclinomonas americana* sind Teile einer aus mehreren Untereinheiten bestehenden RNA-Polymerase im Chondriom vorhanden (Lang et al. 1997).

Tab. 1: Sequenzierte mitochondriale Genome Höherer Pflanzen.

Organismus	Genomgröße (kb)	Anzahl der Gene	Anzahl der Edierungsstellen	Referenz
<i>A. thaliana</i>	367	55	441	(Unselde et al. 1997)
<i>B. vulgaris</i> (TK81-0)	369	59	~370	(Kubo et al. 2000)
<i>B. vulgaris</i> (TK81-MS)	501	52	~370	(Satoh et al. 2004)
<i>B. napus</i>	222	53	427	(Handa 2003)
<i>N. tabacum</i>	431	60	nicht bestimmt	(Sugiyama et al. 2005)
<i>O. sativa</i>	491	56	491	(Notsu et al. 2002)
<i>T. aestivum</i>	453	78	nicht bestimmt	(Ogihara et al. 2005)
<i>Z. mays</i> (NB)	570	58	nicht bestimmt	(Clifton et al. 2004)

Zusätzlich zu mitochondrialen Genen sind im Chondriom Höherer Pflanzen auch DNA-Sequenzen plastidären und nukleären Ursprungs zu finden (Schuster und Brennicke 1988, Lonsdale 1989). Wie Joyce und Gray (1989) zeigten, werden z.B. beim Weizen plastidäre tRNA Gene in den Mitochondrien transkribiert. Auch zirkuläre und lineare Plasmid-DNA konnte in pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesen werden (Backert et al. 1997b; Backert et al. 1998; Handa et al. 2002).

Aufgrund der komplexen Verteilung der genetischen Information, der Makromolekülsynthese und des Proteinbedarfs in Abhängigkeit von physiologischen Parametern und externen Einflüssen ist eine koordinierte Interaktion der einzelnen beteiligten genetischen Systeme notwendig. Den Einfluss der Entwicklung auf die Mitochondrien verdeutlicht die Reaktion dieser Organellen auf den erhöhten Energiebedarf während des Pollenwachstums und der Pollenreifung. Dabei kommt es zu einer Antherenspezifischen Erhöhung der Transkription mitochondrialer und nukleärer Gene, die für mitochondriale Proteine kodieren (Huang et al. 1994; Smart et al. 1994; Leon et al. 1998). So konnte bei einigen für mitochondriale Enzyme kodierenden Kerngenen in generativen Geweben eine sechs bis zehnfach verstärkte Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden (Huang et al. 1994; Grohmann et al. 1996; Heiser et al. 1996).

1.2.3 Rekombinationsprozesse

Im Chondriom der Höheren Pflanzen finden im Gegensatz zu den Vertebraten häufig inter- und intraspezifische Rekombinationen statt (Palmer und Shields 1984). Durch Restriktions-Fragment-Analysen konnte gezeigt werden, dass das Chondriom Höherer Pflanzen aus multizirkulären Molekülen aufgebaut ist (Übersicht bei Palmer 1992). Klein et al. (1994) konnten zeigen, dass das mitochondriale Genom von *A. thaliana* in verschiedene Subzirkel unterteilt ist, die durch häufig auftretende Rekombinationen entstanden sind. Die mitochondrialen Genome von *Brassica campestris* (Palmer und Shields 1984), der Sonnenblume (Siculella und Palmer 1988) und dem Spinat (Stern und Palmer 1986) zum Beispiel zeichnen sich durch eine trizirkuläre Struktur aus. Es wird angenommen, dass ein Hauptzirkel durch homologe Rekombinationen, bei denen Paare von direkten und invertierten Sequenzwiederholungen beteiligt sind, in subgenomische zirkuläre Moleküle geteilt wird (Palmer und Herbon 1988; Fauron et al. 1991; Bonen und Brown 1993). Durch Rekombination an zwei invertierten Sequenzwiederholungen kommt es zur Sequenz-Inversion des DNA-Bereiches zwischen den Sequenzwiederholungen („flip-flop“). Verschiedene Modelle der homologen Rekombination zwischen Sequenzwiederholungen sind in Abbildung 1 dargestellt.

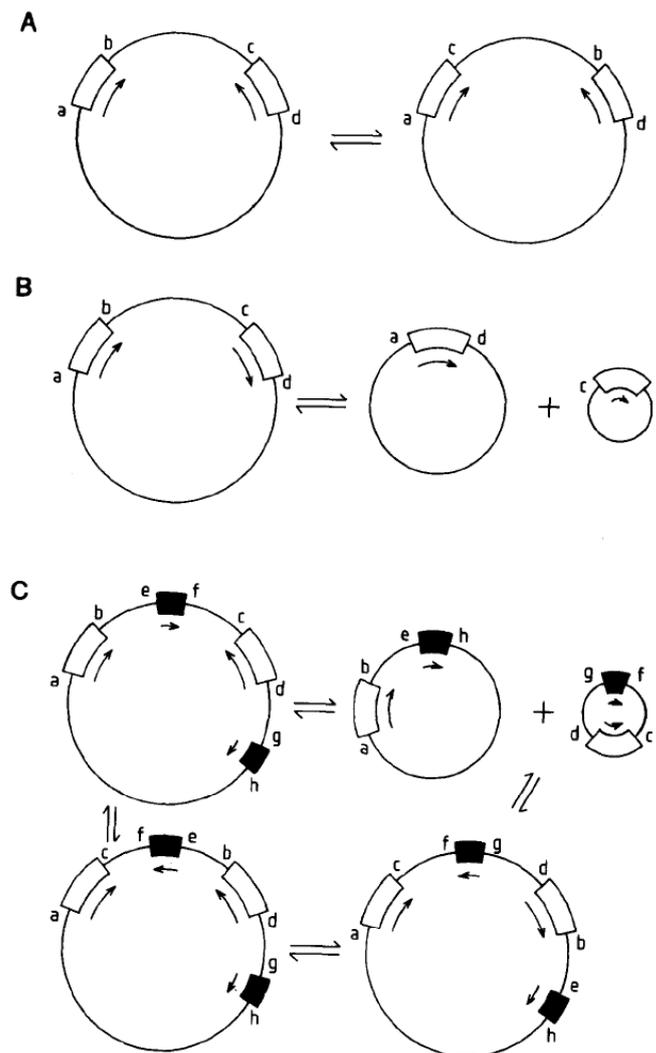


Abb. 1: Mögliche Modelle der homologen Rekombination zwischen Sequenzwiederholungen.

(A) Rekombination zwischen invertierten Sequenzwiederholungen führt zur Sequenz-Inversion („flip-flop“). (B) Durch Rekombination zwischen einem Paar direkter Sequenzwiederholungen erfolgt die Bildung zweier Subzirkel („looping out“). (C) Bei Rekombination zwischen verschachtelten invertierten und direkten Sequenzwiederholungen können vier verschiedene Genom-Anordnungen entstehen. Abbildung entnommen aus Lonsdale (1984).

Findet z.B. eine Rekombination zwischen einem Paar direkter Sequenzwiederholungen statt, so zerfällt der Hauptzirkel in zwei Subzirkel, wobei jeder Subzirkel eine Sequenzwiederholung enthält („looping out“; Übersicht in Lonsdale 1989).

So lässt sich bei dem 430 kb großen *Nicotiana tabacum* Chondriom eine durch homologe Rekombination entstandene multizirkuläre Organisation, bestehend aus zwei Hauptzirkeln und sechs subgenomischen Zirkeln, vorhersagen (Sugiyama et al. 2005).

Folkerts und Hanson (1989) vermuten, dass das mitochondriale Genom von *Petunia hybrida* aus einem 443 kb großen Hauptzirkel besteht, der drei rekombinante Wiederholungen enthält. Solch eine Anordnung sagt die Formation von acht subgenomischen Zirkeln voraus. Die Rekombination erfolgt eher durch einen homologen als einen ortsspezifischen Mechanismus (Conklin und Hanson 1993).

Es sind auch Rekombinationen zwischen kurzen Sequenzwiederholungen dokumentiert, die eine Deletion zur Folge haben. Bei einer fertilen Mais-Revertante mit Texas (*cms-T*) Cytoplasma, die aus einer Gewebekultur erhalten wurde, führte eine Rekombination zwischen zwei 127 bp großen direkten Wiederholungen zur Deletion derjenigen mitochondrialen Mais-DNA, die als Ursache für die CMS angesehen wird (Rottmann et al. 1987; Fauron et al. 1990).

Derartige Rekombinationen scheinen ebenfalls an der Bildung verschiedener „non-chromosomal stripe (NCS)“ Mutationen in essentiellen mitochondrialen Genen im Mais beteiligt zu sein. NCS-Mutationen zeichnen sich durch die Streifen auf den Blättern, schlechtes Wachstum und verringerten Ertrag aus (Newton et al. 1990; Hunt und Newton 1991).

Eine Ausnahme stellt das Chondriom von *Brassica hirta* dar, das nur aus einem einzigen zirkulären Molekül besteht (Palmer und Herbon 1987). Intramolekulare Rekombinationen sind folglich nicht obligatorisch für pflanzliche Chondriome. Kartierungen sagen voraus, dass das mitochondriale Genom von *Marchantia polymorpha* ebenfalls aus einem einzelnen zirkulären Molekül, ähnlich dem von Pilzen oder Tieren, besteht. Oldenburg und Bendich (2001) konnten jedoch durch Restriktionsanalysen und Pulsfeld-Gelelektrophoresen zeigen, dass nahezu die komplette mitochondriale DNA in Form multigenomischer linearer und verzweigter Moleküle vorliegt.

Ebenfalls einen Sonderfall bildet das Chondriom im *cms-S* Cytoplasma des Mais, denn es besitzt eine relativ große Kopienzahl von zwei linearisierten Plasmiden. Durch Rekombination zwischen den Enden der beiden Plasmide und homologen Sequenzen in dem eigentlich zirkulären Genom, wird dieses linearisiert (Schardl et al. 1984). Bei den fertilen Revertanten sind die beiden Plasmide nicht mehr nachweisbar und das Chondriom liegt wieder in der zirkulären Struktur vor (Schardl et al. 1985). Gleichfalls konnte in *Brassica napus* ein 11 kb großes, autonom replizierendes lineares Plasmid nachgewiesen werden (Handa et al. 2002).

Die Rekombinationen haben zur Folge, dass mitochondriale Gene sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und Anordnung in verschiedenen Pflanzenarten stark unterscheiden (Gray 1989). Eine weitere Konsequenz ist die Entstehung chimärer Leserahmen bzw. Gene. Dies sind transkribierte Bereiche, die eine oder mehrere Sequenzen mit Homologien zu anderen Genen besitzen (Lonsdale 1989). Solche chimären Leserahmen können durch homologe Rekombination entstehen, wenn sie sich zum Teil oder ganz in rekombinanten Sequenzwiederholungen befinden. Eine Übersicht über chimäre Leserahmen, die mit der unter Punkt 1.4 beschriebenen cytoplasmatisch männlichen Sterilität korrelieren, zeigt Tabelle 2 (S. 14).

1.3 Prozessierung mitochondrialer und plastidärer Transkripte

Mitochondriale und plastidäre Transkripte unterliegen vielfältigen Prozessierungsreaktionen. Dazu zählen exo- und endonukleolytische Veränderungen der 5'- und 3'-Nichtkodierungsbereiche sowie die RNA-Edierung und das Spleißen von Intronen aus Mosaikgenen. Die Prozessierung der nichttranslatierten Sequenzen wirkt sich auf die Stabilität und Struktur der RNA aus, während durch die RNA-Edierung die kodierende Information der Transkripte verändert wird.

An ihrem 3'-Ende weisen mitochondriale und plastidäre Transkripte häufig palindromartige Sequenzen auf, für die eine Stamm-Schleifen-Bildung als Sekundärstruktur in Frage kommt (Schuster et al. 1986). Derartige Stamm-Schleifen-Formationen stellen in tierischen Mitochondrien und Bakterien Terminatoren der Transkription dar (Clayton 1984; Cheng et al. 1991; Cohen 1995). In pflanzlichen Mitochondrien und Plastiden dienen diese Strukturen als Prozessierungssignale und Transkript-stabilisierende Elemente (Stern und Grusis 1987; Sugita und Sugiura 1996; Dombrowski et al. 1997). An diese Regionen binden Protein-Komplexe, die Exo- und Endonukleasen enthalten (Hsu-Ching und Stern 1991; Sugita und Sugiura 1996). Bei einer Dissoziation der Proteine von der RNA werden die Transkripte durch die Nukleasen abgebaut. Dieser Prozess wird durch die Polyadenylierung der Transkripte initiiert (Kudla et al. 1996; Carpousis et al. 1999; Gagliardi et al. 2001).

1.3.1 RNA-Edierung in Mitochondrien und Plastiden

Die RNA-Edierung ist ein Prozess, bei dem die RNA durch Insertionen, Deletionen und Transitionen posttranskriptionell modifiziert wird. Sie wurde erstmals bei Trypanosomen beschrieben (Benne et al. 1986). Auch bei Viren, Schleimpilzen, Amöben und Säugetieren wurde RNA-Edierung nachgewiesen (Smith et al. 1997; Übersicht in Knoop und Brennicke 1999). Dabei handelt es sich um Exzisionen oder Insertionen einzelner oder mehrerer Nukleotide. Zudem werden die Basen durch Deaminierungsreaktionen verändert. Bei Höheren Pflanzen wurde die RNA-Edierung zunächst an mitochondrialen Transkripten beobachtet (Covello und Gray 1989; Gualberto et al. 1989; Hiesel et al. 1989).

Hierbei kommt es in Mitochondrien insbesondere zu Transitionen von C nach U. Als Folge wird die Aminosäure-Sequenz des abgeleiteten Polypeptides verändert. Durch *in vitro* Analysen der RNA-Edierung in Lysaten von Weizenmitochondrien (Blanc et al. 1995) und eine *in organello* Analyse dieses Prozesses in Mitochondrien von *Solanum tuberosum* (Yu und Schuster 1995) konnte nachgewiesen werden, dass es sich auf biochemischer Ebene wahrscheinlich weniger um Basen- oder Nukleotidaustausche, als vielmehr um eine oxidative Deaminierung bzw. Transaminierung handelt. Die Transitionen finden hierbei überwiegend an der ersten und zweiten Position eines Kodons statt (Gray und Covello 1993). Gelegentlich kommt es auch zu U nach C Transitionen. Dies ist offenbar überwiegend bei den Farnen der Fall. Die Edierung von Stopp-Kodonen ist hier notwendig, um kontinuierliche offene Leserahmen in der mRNA zu erzeugen (Hiesel et al. 1994).

Der Prozess der RNA-Edierung führt dazu, dass Proteinsequenzen nicht mehr vollständig aus der DNA-Sequenz vorhersagbar sind. Von edierten Transkripten abgeleitete Polypeptide bestehen zumeist aus Aminosäure-Sequenzen, die den hochkonservierten Sequenzen anderer Organismen ähnlicher sind, als von der DNA abgeleitete Polypeptide (Gray et al. 1992; Pring et al. 1993). In Tabelle 1 ist die Anzahl der Edierungsstellen mehrerer sequenzierter mitochondrialer Genome Höherer Pflanzen aufgeführt.

In pflanzlichen Mitochondrien werden fast alle mRNAs, sowie einige rRNAs und tRNAs ediert. Eine Ausnahme stellt der offene Leserahmen T-*urf13* aus Mais dar (Ward und Levings 1991). Die mangelnde RNA-Edierung wird darauf zurückgeführt, dass T-*urf13* teilweise aus nicht-kodierenden Sequenzen besteht.

Aufgrund der Tatsache, dass die RNA-Edierung bei fast allen untersuchten mitochondrialen Transkripten vorkommt, kann angenommen werden, dass Proteine, die ausgehend von unedierter mRNA synthetisiert werden, eine inaktive oder weniger aktive Funktion haben könnten (Übersicht in Gray et al. 1992). Nicht geklärt ist bisher, wie in den pflanzlichen Organellen ein C oder U in den RNA-Molekülen zur Umwandlung bestimmt wird. Als Spezifitätsfaktoren könnten „Guide-RNAs“ wirken, die, ähnlich wie bei Trypanosomen, über Basenpaarungen die einzelnen Edierungsstellen markieren (Knoop und Brennicke 1999). Derartige Moleküle wurden aber nie beobachtet und auch die Genomanalyse gibt dafür keine Hinweise (Bolle und Kempken 2006).

Genetische Veränderungen an Mitochondrien *in planta* sind aufgrund des Mangels an geeigneten Selektionsmarkern bislang nicht möglich. Durch *in vitro* Systeme mit Lysaten von Mitochondrien könnte die Charakterisierung der an der RNA-Edierung beteiligten *cis*- und *trans*-Faktoren ermöglicht werden. Die Effizienz der Prozessierung ist jedoch in diesen *in vitro* Experimenten mit einer maximalen Edierungsrate von 6% (Araya et al. 1992) bislang relativ gering. In den Mitochondrien sind sowohl die Enzymkomplexe der Transkription, als auch der Translation mit Membranen assoziiert (Fox 1996). In intakten Organellen sollte eine effiziente RNA-Edierung ablaufen, da alle an der Prozessierung beteiligten Faktoren in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen. In Mitochondrien aus *Zea mays* konnte die vollständige *in organello* RNA-Edierung des durch Elektroporation in die Organellen eingebrachten *cox2* Gens aus *A. thaliana* innerhalb des untersuchten Bereichs nachgewiesen werden (Staudinger und Kempken 2003; Staudinger und Kempken 2004; Staudinger et al. 2005; Bolle und Kempken 2006). Solch ein Ansatz gestattet folglich die Charakterisierung der an der RNA-Edierung beteiligten *cis*-Sequenzen.

Das Phänomen der mitochondrialen RNA-Edierung konnte auch bei plastidären Transkripten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Mitochondrien kommt die Edierung in den Plastiden in weitaus geringerem Umfang vor und es kommt hier jedoch nur zu Transitionen von C nach U, die meistens an der zweiten Position eines Kodons stattfinden (Hoch et al. 1991). Anhand von vergleichenden Untersuchungen der Sequenz einiger cDNAs mit der DNA-Sequenz von *Zea mays* wird angenommen, dass in dem Plastom nur 25 Edierungs-Positionen vorkommen und somit nur 0,13% der Kodone ediert werden (Maier et al. 1995). In Tabak-Chloroplasten konnten 34 verschiedene Edierungs-Positionen nachgewiesen werden (Tsudzuki et al. 2001; Schmitz-Linneweber et al. 2002).

Dennoch konnten Bock et al. (1994) am Beispiel des *psbF* Gens zeigen, dass die RNA-Edierung in Plastiden essentiell ist. Die RNA-Edierung in den Chloroplasten scheint eher ein Korrektur-Mechanismus für T-nach-C Mutationen (Covello und Gray 1993) zu sein, als der Erzeugung von Protein-Vielfalt zu dienen. Der Mechanismus der RNA-Edierung in den Plastiden konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. Es gibt jedoch Hinweise auf ein Gen, das für ein spezifisches RNA-Edierungsereignis in Chloroplasten verantwortlich ist (Kotera et al. 2005).

Es existiert eine sehr interessante Parallele zwischen der fehlenden RNA-Edierung bei der Hirse und durch Punktmutationen im *atp6* Gen des Menschen hervorgerufenen Krankheiten (Kempken et al. 1998). Eine Punktmutation an Position 8993 bewirkt einen Austausch des beim Menschen konservierten Leucin durch ein Arginin. Dadurch kann eine schwere Erbkrankheit, das sog. Leigh-Syndrom, das zum frühen Kindstod führen kann, ausgelöst werden (Tatuch et al. 1992; Shoffner 1996). Bei der Hirse wird erst durch die RNA-Edierung an dieser Position das Leucin-Kodon erzeugt. Außerdem treten sowohl die Reduzierung der *atp6*-RNA-Edierung als auch das Leigh-Syndrom gewebespezifisch auf (Kempken et al. 1998).

1.3.2 Spleißen der Transkripte

Die Intronen organellärer Gene werden aufgrund der Primärsequenz, der Sekundärstruktur und der katalytischen Eigenschaften in Gruppe I und Gruppe II Intronen unterteilt (Michel und Dujon 1983; Saldanha et al. 1993). Die Intronen der Gruppe I benötigen zur Exzision ein freies, spezifisch an die RNA gebundenes Guanosin als Co-Faktor (Cech und Bass 1986). Die Funktion des Guanosin übernimmt bei den Intronen der Gruppe II ein am 3'-Ende des Introns lokalisiertes Adenosin (Sharp 1994).

In nur wenigen mitochondrialen bzw. plastidären Genen kommen Intronen der Gruppe I vor. Diese wurden zum Beispiel im mitochondrialen *coxI* Gen einiger Pflanzenarten (Ohta et al. 1993; Cho et al. 1998) und der plastidären Leucin-tRNA (Kuhnel et al. 1990) nachgewiesen. Intronen der Gruppe II sind dagegen in Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten weit verbreitet (Michel et al. 1989; Ferat und Michel 1993). Diese Intronen stellen große katalytische RNAs dar, die durch kleine konservierte Sequenzbereiche und eine konservierte strukturelle Organisation aus sechs großen helikalen Domänen und

charakteristischen Interaktionen dieser Domänen definiert sind (Michel et al. 1989; Michel und Ferat 1995; Bonen und Vogel 2001). Es gibt Hinweise auf einen gemeinsamen Vorfahren der Gruppe II Intronen und der nukleären pre-mRNA Intronen (Sharp 1991; Michel und Ferat 1995). Beide Intronotypen weisen einen ähnlichen Ablauf des Spleißvorgangs und ähnliche RNA-Strukturen in ihren katalytischen Bereichen auf (Valadkhan und Manley 2001) und bei der Katalyse der Reaktionen scheinen RNA-gebundene Magnesium-Ionen beteiligt zu sein (Sontheimer et al. 1997; Gordon et al. 2000).

Die Exzision der Gruppe II Intronen aus den Primärtranskripten erfolgt über zwei Transesterreaktionen, vergleichbar dem Spleißmechanismus bei nukleären Transkripten. Dabei greift die 2'-Hydroxylgruppe eines im Intron gelegenen Adenosins die 5'-Spleißstelle an. Das Adenosin liegt 7 bis 8 Nukleotide vor dem 3'-Ende des Introns innerhalb der Domäne VI. Darauf folgt ein nukleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe des stromaufwärts gelegenen Exons auf die 3'-Spleißstelle. Schließlich liegt ein exzisiertes Intron als Lariat mit einer internen 2'-5'-Verknüpfung und einem kurzen Nukleotidschwanz vor (Peebles et al. 1986; Schmelzer und Schweyen 1986). Die Domäne VI ist von essentieller Bedeutung für die Bildung des Lariats. Dies konnte durch Untersuchungen an selbst-spleißenden Intronen der Gruppe II gezeigt werden, bei denen einzelne Domänen deletiert wurden (Koch et al. 1992; Holländer und Kück 1999).

Im Gegensatz zum Ribonukleoprotein-katalysierten Spleißen nukleärer Intronen wurde ein Selbstspleißen mehrerer Gruppe II Intronen *in vitro* beobachtet (Schmelzer und Schweyen 1986; van der Veen et al. 1986). Der Nachweis des Einflusses einer Kern-Mutation auf das Ausbleiben des *in vivo* Spleißens eines *in vitro* selbstspleißenden mitochondrialen Introns (Collins und Lambowitz 1985) führte zu der Annahme, dass eine Protein-Interaktion für die Katalyse *in vivo* notwendig ist. In Plastiden von Pflanzen und Algen ist das Spleißen der Transkripte ebenfalls von Kern-kodierten Faktoren abhängig (Choquet et al. 1988; Hess et al. 1994; Jenkins et al. 1997). Plastidäre Intronen werden in pflanzlichen Mitochondrien nicht gespleißt (Bolle, pers. Mitteilung).

1.4 Cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) bei Höheren Pflanzen

Cytoplasmatisch männliche Sterilität bewirkt bei Pflanzen, dass kein funktionsfähiger Pollen gebildet werden kann, während die weibliche Fertilität nicht betroffen ist. Dieses Phänomen, das zuerst 1931 von Rhoades bei *Zea mays* beschrieben wurde, tritt oft bei alloplasmischen Pflanzen auf, in denen nukleäres und cytoplasmatisches genetisches Material zweier verschiedener Arten kombiniert vorliegt. Mehr als 150 Pflanzenarten mit CMS-Linien sind nunmehr bekannt (Laser und Lersten 1972; Hanson 1991; Schnable und Wise 1998; Kempken und Pring 1999). Durch Kreuzungs-Analysen von Rhoades wurde nachgewiesen, dass der CMS-Phenotyp nicht nach den Mendelschen Gesetzen, sondern mütterlich vererbt wird. Die phenotypischen Eigenschaften der männlichen Sterilität sind sehr unterschiedlich. Sie reichen vom Absterben des Pollens, dem Scheitern, normales sporogenes Gewebe zu entwickeln, dem Fehlen der Dehiszenz bis zu der Unfähigkeit reifen Pollens, auf kompatiblem Stigma zu keimen (Stockmeyer und Kempken 2006).

In der Pflanzenzüchtung werden CMS-Linien für die Produktion von Hochleistungs-Hybridsaatgut unter Nutzung des Heterosis-Effektes und der dadurch bedingten Steigerung der Produktivität bevorzugt eingesetzt. Der Einsatz von CMS-Pflanzen ist sehr nützlich, da Selbstbestäubungen durch Pollensterilität vermieden und spezifische Kreuzbestäubungen ermöglicht werden können, wodurch das aufwendige manuelle Entfernen der Antheren überflüssig wird (Duvick 1965; Kaul 1988).

Aufgrund intra- und interspezifischer Kreuzungen konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatisch männliche Sterilität durch Störungen der Kern-Cytoplasma-Interaktion ausgelöst wird (Hanson und Conde 1985). Anhand von somatischen Hybridisierungs-Experimenten (z.B. bei *Nicotiana*) wurde nachgewiesen, dass die CMS mit den Mitochondrien und nicht mit den Plastiden kosegregiert (Belliard et al. 1978; Clark et al. 1985).

Bei vielen Kulturpflanzen konnten offene Leserahmen, die im Cytoplasma von CMS-Linien zu finden sind und mit CMS in Verbindung gebracht werden, identifiziert werden (Dewey et al. 1986; Young und Hanson 1987; Mackenzie et al. 1994; Kempken und Pring 1999). Diese sind überwiegend durch Rekombination entstanden und enthalten daher häufig chimäre Sequenzen mehrerer Gene oder offener Leserahmen (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Chimäre offene Leserahmen (*orf*), die mit der CMS bei Höheren Pflanzen korrelieren.

— = Sequenz unbekannter Herkunft

Organismus	chimärer <i>orf</i>	enthaltene Sequenz	Referenz
<i>Brassica</i>	<i>orf138</i>	—	Bonhomme et al. 1992, Grelon et al. 1994
<i>Brassica</i>	<i>orf224</i>	<i>orfB</i> , <i>rps3</i>	Singh und Brown 1991, L'Homme und Brown 1993
<i>Brassica</i>	<i>orf263</i>	<i>nad5</i> , <i>atp6</i>	Landgren et al. 1996
<i>Helianthus</i>	<i>orf522</i>	<i>orfB</i>	Köhler et al. 1991
<i>Oryza sativa</i>	<i>orf79</i>	<i>cox1</i> , <i>orf107</i>	Akagi et al. 1994
<i>Petunia</i>	<i>pcf</i>	<i>atp9</i> , <i>cox2</i> , <i>urfS</i>	Nivison und Hanson 1989
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>orf239</i>	—	Chase und Ortega 1992
<i>Raphanus sativus</i>	<i>atp6</i>	<i>orf105</i>	Makaroff et al. 1989
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>cox1</i>	—	Bailey-Serres et al. 1986
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>orf107</i>	<i>atp9</i> , <i>orf79</i>	Tang et al. 1996b
<i>Triticum</i>	<i>orf256</i>	<i>cox1</i>	Rathburn und Hedgcoth 1991
<i>Zea mays cms-C</i>	<i>atp6-C</i>	<i>atp9</i>	Dewey et al. 1991
<i>Zea mays cms-C</i>	<i>cox2-C</i>	<i>atp6</i>	Dewey et al. 1991
<i>Zea mays cms-C</i>	<i>atp9-C</i>	—	Dewey et al. 1991
<i>Zea mays cms-S</i>	<i>orf77</i>	<i>atp9</i>	Zabala et al. 1997
<i>Zea mays cms-T</i>	T- <i>urf13</i>	<i>rrn26</i>	Dewey et al. 1986

Der Einbau der entsprechenden Genprodukte in die mitochondriale Membran oder in Multienzym-Komplexe könnte zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und somit der Pollenentwicklung führen.

In mehreren Fällen scheinen Gene, die für die ATP-Synthase kodieren, an der CMS beteiligt zu sein, zum Beispiel *atp6* im „Ogura“-Cytoplasma von Rettich (Makaroff et al. 1990), *atp6* als Promotor im 5'-Bereich des T-*urf13* in *cms-T* Mais (Levings 1990) oder *atp9* im *pcf* Gen von *Petunia* (Nivison und Hanson 1989).

1.4.1 CMS bei *Zea mays* und *Sorghum bicolor*

Bei *Zea mays* konnten Dewey et al. (1986, 1987a) mit Hilfe der Durchmusterung einer mitochondrialen Genbank erstmals einen DNA-Bereich isolieren, der mit der CMS in Verbindung gebracht wird. Dieses DNA-Fragment aus Mais mit Texas (*cms-T*) Cytoplasma (Rogers und Edwardson 1952) enthält einen offenen Leserahmen (T-*urf13*), der durch Rekombinationsereignisse entstanden ist und für ein 13 kDa großes Protein (URF13) kodiert, das mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist. T-*urf13*

enthält Sequenzen unbekannter Herkunft, Sequenzen des *rrn26* Gens und 3'-Bereiche dieses Gens.

Pflanzen mit *cms*-T-Cytoplasma, das die cytoplasmatisch männliche Sterilität vererbt, sind anfällig für den Befall durch die phytopathogenen Pilze *Bipolaris maydis* (Rasse T) und *Phyllosticta maydis* und deren wirtsspezifische Toxine (Lim und Hooker 1972). 1970 besaßen in den USA 85% der für die Herstellung von Hybridsaatgut eingesetzten Maislinien das T-Cytoplasma. In den Jahren 1969 und 1970 kam es zu einem epidemischen Befall durch *Bipolaris maydis* und *Phyllosticta maydis*, woraufhin der kommerzielle Gebrauch der genannten Maislinien dann weitgehend eingestellt wurde (Ullstrup 1972).

Korth et al (1991) konnten zeigen, dass T-*urf13* für drei integrale Membran- α -Helices kodiert und URF13 als Oligomer in der Membran vorliegt. Bei Anwesenheit von Pilz-Toxinen findet eine Toxin-URF13-Bindung statt (Braun et al. 1990). Es wird vermutet, dass durch die Toxin-Bindung die Konformation der URF13 Oligomere verändert wird, was zur Bildung einer hydrophilen Membranpore führt (Levings und Vasil 1995; Rhoads et al. 1995).

Durch die Bindung eines T-Toxin ähnlichen antherenspezifischen Faktors an die URF13 Oligomere könnte folglich die Membranpore geöffnet und die innere Mitochondrienmembran somit depolarisiert werden (Flavell 1974). Der dadurch bewirkte Verlust der mitochondrialen Aktivität in den Antheren während der Pollenentwicklung würde ein Absterben der Pollen bewirken und CMS auslösen (Levings und Siedow 1992; Rhoads et al. 1995). Untersuchungen an transgenem, Toxin-sensitivem aber fertilem Tabak, lassen darauf schließen, dass T-*urf13* nötig ist, CMS auszulösen, dieses aber alleine nicht vermag (Chaumont et al. 1995). Dies unterstützt die Hypothese von Flavell hinsichtlich eines antherenspezifischen Faktors zur Auslösung von CMS.

Die Untrennbarkeit von CMS und der Toxin-Sensitivität gegen die Pilztoxine konnte anhand von fertilen Toxin-resistenten Revertanten, die aus Kalluskulturen regeneriert wurden, nachgewiesen werden. Von 200 untersuchten Revertanten waren alle fertil (Gengenbach und Green 1975; Brettell et al. 1980; Umbeck und Gengenbach 1983).

Mit Ausnahme der Revertante T-4, bei der ein vorzeitiges Stopp-Kodon durch eine Rasterschubmutation eingeführt worden war, war bei den Revertanten T-*urf13*

wahrscheinlich aufgrund homologer Rekombination nicht mehr nachzuweisen (Rottmann et al. 1987; Wise et al. 1987b; Fauron et al. 1990).

Bei der Hirse *Sorghum bicolor* sind mehrere CMS vererbende Cytoplasmen charakterisiert und in sieben Gruppen (A1 bis A6 und 9E) eingeteilt worden (Pring et al. 1995; Xu et al. 1995). Die sterilen Linien der Gruppen A3, A4 und 9E bilden sterilen Pollen aus, während die sterilen Linien der Gruppen A1, A2, A5 und A6 nur verkümmerte Antheren ohne Pollen aufweisen. In dem CMS vererbenden Cytoplasma IS1112C, das zur A3-Gruppe gezählt wird, konnten zwei chimäre offene Leserahmen nachgewiesen werden, die ausschließlich in diesem Cytoplasma vorkommen: *orf265/130* und *orf107* (Tang et al. 1996a; Tang et al. 1996b). *Orf107* ist ein chimäres Gen, das durch Rekombination entstanden ist und aus Sequenzen, die homolog zum *atp9* aus der Hirse, Sequenzen unbekannter Herkunft sowie Sequenzen, die Homologien zum CMS-assoziierten *orf79* im Reis (Iwabuchi et al. 1993; Akagi et al. 1994) sind, besteht (Tang et al. 1996b). In sterilen Hirselinien unterscheidet sich das Transkriptmuster von *orf265/130* nicht von dem in fertilen Linien, während bei *orf107* je nach untersuchter Linie Unterschiede festgestellt werden konnten (Tang et al. 1996a; Tang et al. 1996b).

In sterilen Linien (z.B. A3Tx398) und in partiell oder vollständig restaurierten Linien konnte von den insgesamt vier *orf107*-Transkripten der Größe 1,11 kb, 0,87 kb, 0,81 kb und 0,38 kb das 0,38 kb umfassende Transkript kaum nachgewiesen werden, während es in der fertilen Linie IS1112C verstärkt auftrat. Dies korrelierte mit einer gleichzeitigen Abnahme der übrigen Transkripte. Hieraus wurde geschlossen, dass die Restaurierung der Fertilität mit der Prozessierung der *orf107* Transkripte in Zusammenhang steht (Tang et al. 1996b).

Durch Sequenzierung der cDNA des unprozessierten *orf107* Transkriptes konnten insgesamt vier Edierungsstellen nachgewiesen werden (Tang et al. 1996b). Zwei Edierungsstellen befinden sich im *atp9* homologen Bereich und zwei im Bereich unbekannter Herkunft. Während die erste Edierungsstelle in allen untersuchten Linien zu 100% ediert wird, liegt bei den übrigen drei Edierungsstellen eine linienspezifische RNA-Edierung vor (Pring et al. 1998). Die RNA-Edierung an der zweiten Edierungsstelle betrug in der sterilen Linie A3Tx398 14% und in der fertilen Linie IS1112C 0%. Die Edierungsstellen drei und vier wurden in den sterilen Linien A3Tx398 und A3Tx7000 stärker ediert als in der fertilen Linie IS1112C, sowie der partiell fertilen Linie F₁ und der

partiell bis vollständig fertilen Linie F₂. Diese Ergebnisse ließen auf einen Zusammenhang zwischen RNA-Edierung und CMS in der Hirse schließen.

Über die Rolle, welche die von den CMS-assoziierten offenen Leserahmen abgeleiteten Proteine bei der Auslösung dieses Phänomens spielen, ist bis heute wenig bekannt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass viele der offenen Leserahmen für hydrophobe Domänen kodieren und möglicherweise Membranproteine darstellen (Levings und Vasil 1995). Auch *orf107* aus der Hirse kodiert für ein sehr hydrophobes Protein mit zwei transmembranen Domänen, das somit ein Membranprotein sein könnte (Pring et al. 1999).

1.4.2 Restauration der Fertilität

Die Fertilität von CMS-Pflanzen kann durch das Einkreuzen von kernkodierten „restorer of fertility“ Genen (*Rf* Gene) wieder hergestellt werden (Levings 1990). Die Genprodukte der *Rf* Gene nehmen dabei häufig Einfluss auf die Transkription und Translation der offenen Leserahmen, indem z.B. Transkripte prozessiert werden oder die Transkript- bzw. Proteinmenge erniedrigt wird (Schnable und Wise 1998; Kempken und Pring 1999). Bei *Phaseolus* hingegen korreliert eine irreversible Deletion des DNA-Fragments *pvs* mit der Restauration der Fertilität (Mackenzie und Chase 1990).

Es gibt zwei Arten der Restauration der Fertilität: die sporophytische und die gametophytische. Bei der sporophytischen Restauration ist die *Rf*-Genausstattung des diploiden Sporophyten und bei der gametophytischen Restauration diejenige im haploiden Pollen für die Wiederherstellung der Fertilität verantwortlich (Duvick 1965; Kaul 1988).

Bei der sporophytischen Restauration der Fertilität beim Mais mit *cms*-T-Cytoplasma werden zwei *Rf* Gene, *Rf1* und *Rf2*, benötigt (Duvick 1965; Laughnan und Gabay-Laughnan 1983; Liu et al. 2001). *Rf1* beeinflusst die Transkription des T-*urf13*, bei der mehrere unterschiedlich große Transkripte entstehen, und bewirkt das Auftreten eines neuen 1,6 kb großen Transkriptes (Dewey et al. 1986). Obwohl dieses Transkript nur einen geringen Anteil an den T-*urf13* Transkripten hat, wird die URF13-Menge um 80% reduziert (Dewey et al. 1987b; Kennell und Pring 1989). Cui et al. (1996) konnten anhand von Sequenzvergleichen des durch Transposon-Tagging isolierten *Rf2* Genes (Schnable und Wise 1994) zeigen, dass das *Rf2* Genprodukt eine starke Homologie zur Aldehyd-Dehydrogenase besitzt. Die Aldehyd-Dehydrogenase könnte phytotoxine Aldehyde, die

eventuell durch URF13 entstehen, zu Säuren oxidieren, wodurch ein Absterben der Pollen verhindert würde. Auch der von Flavell (1974) postulierte antherenspezifische Faktor, der Ähnlichkeit mit den T-Toxinen besitzt (siehe 1.4.1), könnte ein Aldehyd sein und durch die ALDH degradiert werden. Dieses würde ebenfalls zu einer Restauration der Fertilität führen.

Eine gametophytische Restauration tritt bei der Hirse mit IS1112C Cytoplasma auf. Die Fertilität wird dort durch die kernkodierte Restorer gene *Rf3* und *Rf4* wieder hergestellt. Während die Funktion von *Rf4* bisher weitgehend unbekannt ist, konnte gezeigt werden, dass *Rf3* die endonukleolytische Transkript-Prozessierung des *orf107* vermittelt (Tang et al. 1996b; Tang et al. 1998), wodurch die Menge an ORF107 stark reduziert wird. Pring et al. (1998, 1999) konnten bei dem A3 Cytoplasma einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der RNA-Edierung an zwei von insgesamt vier Edierungsstellen des *orf107* und der Transkript-Prozessierung nachweisen. Das unprozessierte *orf107* Transkript ist in der sterilen Linie A3Tx398 stärker ediert als in der fertilen Linie IS1112C. Es wird daher angenommen, dass die Transkript-Prozessierung von der RNA-Edierung abhängt (Pring et al. 1998; Pring et al. 1999).

Laut Howad et al. (1999) könnte durch *Rf4* das verbleibende ORF107 Protein inhibiert werden. Möglicherweise könnten in der CMS-Linie A3Tx398 die beiden Restorer gene auch fehlen oder mutiert sein, wodurch weder Transkript-Prozessierung noch Protein-Inhibierung stattfinden könnten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt hinsichtlich der Restauration der männlichen Fertilität ist eine mögliche Involvierung der RNA-Edierung des mitochondrialen *atp6* Gens, das für eine Untereinheit der ATP-Synthase kodiert. Howad und Kempken (1997a, 1997b) konnten zeigen, dass die *atp6*-RNA-Edierung in den Antheren der beiden CMS-Linien A3Tx398 und A3Tx7000 im Vergleich zu etiolierten Sprossen stark reduziert ist.

Im Gegensatz dazu konnte bei der RNA-Edierung der *atp9*, *nad4* und *nad3-rps12* Transkripte kein Unterschied festgestellt werden. Die Restauration der Fertilität in F₁ und F₂ Linien korreliert mit einem Anstieg der *atp6*-RNA-Edierung in den Antheren.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Verlust der *atp6*-RNA-Edierung in der Hirse CMS bewirken kann. Denn durch eine ausbleibende RNA-Edierung kann auch keine funktionelle ATP-Synthase im Pollen gebildet werden. Der dadurch bedingte Energiemangel würde zu einem Absterben des Pollens führen. Grund für den Verlust der

atp6-RNA-Edierung könnte eine direkte oder indirekte Beeinflussung durch das unprozessierte *orf107*-Transkript sein. Eine veränderte *atp6*-RNA-Edierung wird beim Reis ebenfalls mit CMS in Verbindung gebracht (Iwabuchi et al. 1993). Gleichfalls verursachte die Transformation von Tabak mit nicht-ediertem mitochondrialem *atp9* CMS (Hernould et al. 1993).

2. Problemstellung

Ein bedeutendes Ziel der Pflanzenzüchtung ist die Erzeugung von F_1 -Hybriden, da diese wegen des Heterosiseffekts ertragreicher und widerstandsfähiger gegenüber Krankheiten als reinerbige Sorten sind (Lefort-Buson et al. 1987; Kaul 1988; Basra 2000). Für die Erzeugung von Hybridsaatgut durch die Kreuzung optimaler Elternlinien ist es wichtig, dass eine Selbstbefruchtung der Saatgut-produzierenden Pflanze ausgeschlossen werden kann. In manchen Fällen treten natürliche Mutanten auf, die männlich steril sind, also keinen fertilen Pollen bilden können. Bei vielen Getreidearten ist es jedoch notwendig, zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen männlich spezifische Gametozide anzuwenden (Jan und Rutger 1988) oder die Antheren manuell zu entfernen, was die Produktion von Samen teuer und sehr arbeitsintensiv macht.

Bei Höheren Pflanzen tritt neben der durch mutierte Kerngene bedingten genischen männlichen Sterilität (GMS) häufig das Phänomen der cytoplasmatisch männlichen Sterilität (CMS) auf, das durch eine Störung der koordinierten Interaktion zwischen Zellkern und Cytoplasma hervorgerufen wird (siehe Kap. 1.4). Betroffene Pflanzen besitzen zwar einen normalen Phenotyp, sind aber nicht in der Lage, fertilen Pollen oder funktionelle Antheren zu bilden. Sie sind daher besonders nützlich für die Herstellung von Hybrid-Samen, da Selbstbestäubungen vermieden und spezifische Kreuzbestäubungen ermöglicht werden. Die Nutzung der CMS ist jedoch begrenzt, da dieses Phänomen zum einen nicht für alle Pflanzenarten bekannt ist, andererseits oft aber nur eine CMS-Plasmaquelle verwendbar ist.

Die CMS wird oftmals mit dem Vorhandensein einzigartiger chimärer mitochondrialer Gene in Verbindung gebracht. Der Einbau von Proteinen, welche von derartigen Genen hergeleitet sind, in mitochondriale Membranen oder Multi-Protein-Komplexe könnte zu einer Störung der mitochondrialen Funktion führen (Dewey et al. 1986; Dewey et al. 1991; Tang et al. 1996b; Kempken und Pring 1999).

In der Hirse *Sorghum bicolor* ist der mit der CMS assoziierte chimäre offene Leserahmen *orf107* mit einer Größe von 324 bp identifiziert worden (Iwabuchi et al. 1993; Howad et al. 1999). Er kommt nur in Mitochondrien der fertilen Linie IS1112C, die das CMS-vererbende Cytoplasma A3 enthält, vor. *Orf107* ist ein durch Rekombination entstandenes

chimäres Gen, das aus einem Sequenzanteil mit Homologie zum *atp9* der Hirse, einem Bereich mit Homologie zum ebenfalls CMS-assoziierten *orf79* im Reis sowie aus einer Sequenz unbekannter Herkunft besteht (Tang et al. 1996b). Es wird angenommen, dass das ORF107 Protein 11,85 kDa groß und hydrophob ist. Zur Analyse eines Effektes des *S. bicolor* ORF107 Proteins auf die mitochondriale Genexpression und die Pollenentwicklung sollte das entsprechende Gen im Rahmen dieser Arbeit in einem heterologen System mit verschiedenen Blüten- bzw. Antheren-spezifischen Promotoren zur differentiellen Expression in Abhängigkeit vom Gewebetyp und Entwicklungszustand in die Kern-DNA von *A. thaliana* Pflanzen eingebracht werden. Zum Import des Proteins aus dem Cytosol in die Mitochondrien wurde die kodierende Sequenz mit mitochondrialen Importsequenzen versehen. Die Funktionalität und Spezifität der verwendeten Promotoren sollte durch Verwendung von GUS-Reportergenkonstrukten (Jefferson et al. 1987) nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der *orf107* Expression sollte die kodierende Sequenz des *orf107* mit einem „Biotag“ fusioniert werden. Das hiervon exprimierte Fusionsprotein wird aufgrund des „Biotags“ biotinyliert (Ackerman et al. 1992) und kann nachfolgend mit Peroxidasegekoppeltem Neutravidin nachgewiesen werden. Zum anderen sollte eine Fusion mit dem Reporter gen für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP; Akashi et al. 1998) durch Fluoreszenzmikroskopie einen Nachweis des gebildeten Proteins und dessen subzelluläre Lokalisation ermöglichen.

Sollte das ORF107 Protein eine Sterilität des Pollens bewirken, dann könnte dieses System in der Pflanzenzüchtung zur Erzeugung künstlicher männlicher Sterilität (Stockmeyer und Kempken 2006) eingesetzt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Organismen

3.1.1.1 Bakterienstämme

Agrobacterium tumefaciens:

C58C1 [pMP90]: T-DNA⁻, vir⁺ der Nopaline-Gruppe, rif^r; enthält Helfer-Plasmid pMP90, gen^r (Koncz und Schell 1986)

Escherichia coli (K12):

XL1-Blue: recA1, lac⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44, relA1, λ⁻, [F', proAB, lacI^qZ, ΔM15, Tn10 (tet^r)]; Rezipientenstamm für die Vermehrung von Plasmid-Vektoren und deren Derivaten, rekombinationsdefizient (Stratagene, Heidelberg) (Bullock et al. 1987)

3.1.1.2 Pflanzenmaterial

Allium cepa (L.)

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.:** Linie Columbia 0 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA)

***Nicotiana tabacum* (L.):** L. cv Bright Yellow 2 (BY2) (Nagata et al. 1992), L. cv. SR1

***Nicotiana plumbaginifolia* (L.):** das Saatgut wurde freundlicherweise von Dr. J. Schulze (Braunschweig) zur Verfügung gestellt

***Sorghum bicolor* (L.) Moench:** Linie IS1112C; das Saatgut wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Pring (Gainesville, Florida) zur Verfügung gestellt

3.1.2 Oligonukleotide

Als PCR-Startermoleküle und für die Sequenzierung von DNA wurden die Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg) der nachfolgenden Tabelle 3 verwendet.

Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

* Die Positionen der Oligonukleotide sind gemäß der DNA-Sequenzen aus der „NCBI data library“ angegeben.

† Ursprungs-Organismen bzw. -Plasmide der genannten Gene mit Referenzen und NCBI „accession“-Nummern: ¹*Saccharomyces cerevisiae* (Maarse et al. 1984; gi:3581), ²*S. bicolor* (Tang et al. 1996b; gi:1620544), ³GUS Gen Fusionsvektor pBI101 (Jefferson et al. 1986; Jefferson et al. 1987; gi:2088506), ⁴*A. thaliana* (Heiser et al. 1996; gi:1234869), ⁵Shuttle-Vektor pYEp352-Bio6 (Myers et al. 1986; Ackerman et al. 1992), *Propionobacterium shermanii* (Murtif et al. 1985; gi:150926), ⁶*A. thaliana* (Jack et al. 1992; gi:940179), ⁷*A. thaliana* (Paul et al. 1992; gi:16143), ⁸*N. plumbaginifolia* (Boutry und Chua 1985; gi:19684), ⁹Binärer Vektor pBI121(gi: 19569229), ¹⁰*A. thaliana* (Sakamoto et al. 1996; gi:1507654)

Nr.	Sequenz (5'→3')	Spezifität †	Position *
FK226	<u>GGA TCC ATG CTT TCA CTA CGT CAA TCT</u>	<i>coxIV</i> Präsequenz ¹	130 - 150
FK227	<u>GGA GAA TTC CTC GAG TAA GTT TTG GGC AGT TTT CAC</u>	<i>coxIV</i> Präsequenz ¹	240 - 220
FK228	<u>CCC GGG CTC GAG ATG TCG CGA CTC TAC ATG TTA G</u>	<i>orf107</i> ²	691 - 712
FK229	<u>CCC GGG AAT TCT TCG GCT GTG ACC CAC GAA CTC AA</u>	<i>orf107</i> ²	1040 - 1017
FK258	<u>CAA CAG ACA ATC GGC TGC T</u>	<i>nptII</i> ³	460 - 478
FK259	<u>CGG CGA TAC CGT AAA GCA C</u>	<i>nptII</i> ³	1126 - 1108
FK353	<u>GGG GAT CCG CTT TGG ACG GAT GAC G</u>	<i>orf107</i> ²	1011 - 996
FK455	<u>GGG CTC GAG CCT TTG GAC GGA TGA CG</u>	<i>orf107</i> ²	1011 - 996
FK508	<u>GGA AGC TTC TGC AGA TCT TTA TCT AGC T CG G</u>	PSST Promotor ⁴	1 - 23
FK509	<u>GGG ATC CCA TTT AGA TTT GTC TCT CTG AGT TTT T</u>	PSST Promotor ⁴	1710 - 1685
FK512	<u>CCC GGG CGC GCC CTT TGG ACG GAT GAC GCT C</u>	<i>orf107</i> ²	
FK513	<u>CCC GGC GCG CCG GAA TTC GAG CTC GGT ACC CGG</u>	Biotag ⁵	1 - 21
FK514	<u>CCC GGC GCG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG</u>	Biotag ⁵	302 - 281
FK577	<u>GGA AGC TTT CTT AAG AAT TAT AGT AGC AC</u>	AP3 Promotor ⁶	6 - 26
FK578	<u>GGG ATC CGT TGA AGA GAT TTG GTG GAG A</u>	AP3 Promotor ⁶	1730 - 1710
FK579	<u>GGA AGC TTT CTA GAC ATA ACG GTG AGA G</u>	A9 Promotor ⁷	1 - 20
FK580	<u>GGG ATC CTC TAA TTA GAT ACT ATA TTG TTT G</u>	A9 Promotor ⁷	1460 - 1437
FK581	<u>GGA TCC ATG GCT TCT CGG AGG CTT CTC</u>	<i>atp2-1</i> Präsequenz ⁸	393 - 413
FK582	<u>GGA GAA TTC CTC GAG TGA TGG CTG AGA TGC CGG TG</u>	<i>atp2-1</i> Präsequenz ⁸	590 - 571
FK587	<u>GTA ATC CAA TTC GGC TAA GCG GC</u>	<i>nptIII</i> ⁹	12049 - 12071
FK588	<u>CCG TCG ATA CTA TGT TAT ACG CC</u>	<i>nptIII</i> ⁹	12649 - 12627
FK606	<u>GGG ATG AAA AGA AAG GAA ACT TTC</u>	<i>orf107</i> ²	784 - 807
FK607	<u>CCC GGG CTC GAG ATG TTA GAA GGT GCA AAA TCA</u> ATA GG	<i>atp9</i> ¹⁰	546 - 571
FK608	<u>GTT TCC AAT ACC GAT AGC AGC TC</u>	<i>atp9</i> ¹⁰	623 - 601

3.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Einige dieser Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: Dr. B. Hedtke, Berlin und I. Small, Versailles, Frankreich (COXIV-GFP-Plasmid; pOL-GFP-S65C), Dr. H. Hillebrand, Ludwigshafen (pBI121), Dr. M. Piotrowsky, Bochum (pBIN 35S-mGFP4), Dr. K. Krause, Kiel (pYEp352-Bio6) und D. Twell, Albany, USA (pLAT59-12).

Plasmid	Charakteristika	Referenz
COXIV-GFP-Plasmid	2xCaMV35S-Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>gfp</i> S65C; zur transienten Expression	Reichel et al. 1996
pBI121	binärer Vektor mit GUS-Kassette unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors; Größe 12,9 kb	Bevan 1984, Clontech
pBIN 35S-mGFP4	binärer Vektor mit GFP-Kassette unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors; zur stabilen Transformation	Haseloff 1997
pBluescriptII/SK+	Klonierungs- und Sequenzierungsvektor; Phagemid; Größe 2,9 kb	Short et al. 1988, Stratagene
pCL427	<i>A. thaliana</i> PSST Promotor; <i>atp2-1</i> Präsequenz; <i>A. thaliana atp9-orf107</i>	diese Arbeit
pCL432	<i>A. thaliana</i> A9 Promotor; <i>atp2-1</i> Präsequenz; <i>A. thaliana atp9-orf107</i>	diese Arbeit
pCL434	CaMV35S-Promotor; <i>atp2-1</i> Präsequenz; <i>orf107</i>	diese Arbeit
pGI192	<i>coxIV</i> Präsequenz aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in pMON	Kempken, pers. Mitteilung
pKS175	<i>orf107</i> aus cDNA von <i>Sorghum bicolor</i> A3Tx398 in pMON	Stockmeyer 1999
pKS178	<i>orf107</i> in pBI121	Stockmeyer 1999
pKS184	<i>coxIV</i> Präsequenz u. <i>orf107</i> in pBI121	Stockmeyer 1999
pKS327	<i>orf107</i> in pOL-GFP-S65C	diese Arbeit
pKS329	<i>A. thaliana</i> PSST Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>orf107</i>	diese Arbeit
pKS348	CaMV35S-Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>orf107-biotag</i>	diese Arbeit
pKS352	CaMV35S-Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>orf107-gfp</i>	diese Arbeit
pKS354	<i>A. thaliana</i> PSST Promotor; <i>gus</i> Gen	diese Arbeit
pKS372	<i>A. thaliana</i> A9 Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>orf107</i>	diese Arbeit
pKS408	CaMV35S-Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>A. thaliana atp9-orf107</i>	diese Arbeit
pKS409	<i>A. thaliana</i> A9 Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>A. thaliana atp9-orf107</i>	diese Arbeit
pKS424	<i>A. thaliana</i> PSST Promotor; <i>coxIV</i> Präsequenz; <i>A. thaliana atp9-orf107</i>	diese Arbeit
pLAT59-12	<i>L. esculentum</i> LAT59 Promotor in pSK+	Twell et al. 1991
pMON	Derivat des pBluescript; T-Klonierungsvektor	Borovkov und Rivkin 1997
pOL-GFP-S65C	2xCaMV35S-Promotor; <i>gfp</i> S65C; ohne Präsequenz; zur transienten Expression	Peeters et al. 2000
pSW378	<i>A. thaliana</i> A9 Promotor; <i>gus</i> Gen	diese Arbeit
pSW379	<i>A. thaliana</i> AP3 Promotor; <i>gus</i> Gen	diese Arbeit
pYEp352-Bio6	1.3S (Biotin enthaltende) Untereinheit der <i>P. shermanii</i> Transcarboxylase	Ackerman et al. 1992; Murtif et al. 1985

3.1.4 Membranen und Papiere

Filterpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nylon-Membran Nytran 0,2	Schleicher & Schuell (Dassel)

3.1.5 Chemikalien

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid 19:1 (AppliChem, Darmstadt), 6-Benzylaminopurin (Duchefa, Haarlem, Niederlande), Cefotaxim (Duchefa), Desoxynukleosid- (dNTP) Triphosphate (Qbiogene), Gentamycin (Duchefa), Glukose-Monohydrat (Serva, Heidelberg), Kanamycin (Roth, Karlsruhe), 100 Bp Marker (MBBL, Bielefeld), MES = 2-(N-Morpholino-) ethansulfonsäure (Biomol, Hamburg), MitoTracker[®] Orange CM-H₂TMRos (Invitrogen, Karlsruhe), MS-Medium = Murashige & Skoog Medium, Mikro- u. Makroelemente (Duchefa), Murashige & Skoog Vitamin-Mix (Duchefa), Naphthylelessigsäure (Duchefa), Polyvinylpyrrolidon (Sigma), Rifampicin (Duchefa), RSA = Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg), Vancomycin (Duchefa), X-Gluc = 5-Bromo-4-chloro-3-indolyglukuronid (Duchefa).

Radiochemikalien:

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP spez. Aktivität: 110 TBq/mmol (= 3000 Ci/mmol; GE Healthcare, München).

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

3.1.6 Enzyme

RNase-freie DNaseI (Roche, Mannheim; MBI Fermentas, Leon-Rot), Klenow-Fragment (Ambion, Austin, USA), Restriktionsendonukleasen (Qbiogene, Heidelberg), Restriktionsendonuklease *XcmI* (NewEngland Biolabs, Beverly, USA), RNaseA (Sigma, München), *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg), T4-DNA-Ligase (Qbiogene,

Heidelberg), *Taq*-DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg; Qbiogene, Heidelberg), Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP, Roche, Mannheim)

3.1.7 Nährmedien

Agrobacterium tumefaciens:

Zur Anzucht von *A. tumefaciens* (siehe 3.2.1.1) wurde autoklaviertes (121°C, 1 bar Überdruck, 20 min) 2YT-Medium [1,6% (w/v) Trypton, 1% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,5] verwendet. Für die Herstellung von Festmedien wurde 1,5% (w/v) Agar zugefügt. In Tabelle 5 sind die für eine Selektion eingesetzten Antibiotikakonzentrationen aufgeführt.

Escherichia coli:

E. coli-Kulturen wurden in autoklaviertem Luria-Bertani (LB)-Medium [1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,2] angezogen (Sambrook et al. 1989). Festmedium enthielt zusätzlich 1,5% (w/v) Agar. Für ein Wachstum unter Selektionsbedingungen wurde das Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt (siehe Tabelle 5).

Dem Medium für Indikatorplatten für die „Blau-Weiß-Selektion“ wurde 12,5 mg/l Tetrazyklin, 40 mg/l X-Gal, 50 mg/l Ampicillin und 0,2 mM IPTG zugefügt.

Tab. 5: Antibiotikakonzentrationen für die Selektion von *E. coli* und *A. tumefaciens*.

Antibiotikum	Konzentration (mg/l)	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicillin	50	—
Gentamycin	—	25
Kanamycin	50	50
Rifampicin	—	50

***Nicotiana tabacum* SR1:**

2MS-Medium (Murashige und Skoog 1962): 4,3 g MS-Medium (Mikroelemente: 0,025 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 36,7 mg FeNaEDTA, 6,2 mg H_3BO_3 , 0,83 mg KJ, 16,9 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Makroelemente: 332,02 mg CaCl_2 , 170 mg KH_2PO_4 , 1,900 g KNO_3 , 180,54 mg MgSO_4 , 1,650 g NH_4NO_3), 0,5 g MES-Puffer, 20 g Saccharose, 1 ml 1000x MS-Vitamin-Mix (2 mg Glycin, 100 mg myo-Inositol, 0,5 mg Nicotinsäure, 0,5 mg Pyridoxin-HCl, 0,1 mg Thiamin-HCl), 8 g Agar, ad 1 l A. dest., pH 5,7-5,8.

MG-Medium: analog zu 2MS-Medium, aber mit 2% Glukose statt Saccharose; zusätzlich: 100 mg/l Kanamycin, 200 mg/l Cefotaxim, 100 mg/l Vancomycin, 1 mg/l 6-Benzylaminopurin und 0,2 mg/l α -Naphthylelessigsäure.

1/2 MS-Medium: analog zu 2MS-Medium, aber mit 1% Saccharose; enthält keinen Agar.

3.1.8 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Aqua dest., DEPC-behandelt	: 0,1% Diethylpyrokarbonat, Inkubation über Nacht bei 37°C, 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert
Denhardts (1x)	: 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Ficoll, 0,02% RSA
Lugol'sche Lösung	: 2 g KJ und danach 1 g J in 100 ml Aqua dest. lösen
SSC (1x)	: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0
SSPE (1x)	: 180 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4
Tris-Borat (1x)	: 100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3

3.2 Methoden

Alle Methoden wurden, soweit nicht gesondert beschrieben, nach Sambrook et al. 1989 durchgeführt.

Die gentechnischen Experimente wurden gemäß der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) nach den Richtlinien des Gentechnikgesetzes (GenTG) und der Gentechniksicherheits-Verordnung (GenTSV) vom 01.07.1990 durchgeführt.

3.2.1 Kulturbedingungen

3.2.1.1 *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*

Die Anzucht der *A. tumefaciens*- bzw. *E. coli*-Kulturen erfolgte in 2YT- oder LB-Medium (siehe 3.1.7). Flüssigkulturen wurden in einem Inkubationsschüttler bei 220 rpm und 37°C für ca. 12 h (*E. coli*) bzw. 28°C für 18 h (*A. tumefaciens*) angezogen.

Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C zur Anzucht von *E. coli*-Zellen bzw. ca. 36 h bei 25°C zur Anzucht von *A. tumefaciens* inkubiert.

3.2.1.2 Pflanzen

Anzucht nicht steriler Pflanzen:

Zur Transformation bestimmte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen sowie bereits transformierte Pflanzen wurden in TKS2 Erde, die mit Sand abgestreut war, bei einem Licht-Dunkel-Zyklus mit 16 h Licht [$100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD (Photosynthetisch aktive Photonenfluss-Dichte)] und 8 h Dunkel bei 22°C angezogen. Die Anzucht von Hirse und *Nicotiana glauca* erfolgte auf die gleiche Art und Weise.

Sterilisation des Saatguts, Aussaat und Anzucht auf Festmedium:

Saatgut wurde für 5 min mit 70% (v/v) Ethanol behandelt und anschließend wurde das Ethanol durch zweimaliges Waschen mit sterilem Wasser entfernt. Danach wurden die

Samen in 0,1% (v/v) Agarose aufgenommen und auf Murashige und Skoog (MS)-Medium (4,3 g/l MS Salze, 20 g/l Saccharose, 0,5 g/l MES, 1x MS-Vitamine, 10 g/l Agar, pH 5,7) (Murashige und Skoog 1962) unter sterilen Bedingungen ausgesät. Die Anzucht erfolgte unter den gleichen Klima- und Lichtbedingungen wie die Anzucht nicht steriler Pflanzen.

Anzucht von Tabak BY2-Zellen:

Tabak BY2-Zellen wurden in 250 ml Erlenmeyer-Kolben, die 4 g/l Murashige und Skoog (MS) Salze, 100 mg/l Myoinositol, 1 mg/l Thiamin-HCl, 0,2 mg/l 2,4-D, 255 mg/l KH₂PO₄ und 30 g/l Saccharose (pH 5,0) enthielten, bei 25°C im Dunkeln geschüttelt. Die Zellen wurden wöchentlich subkultiviert.

Anzucht von *Nicotiana tabacum* SR1:

Zur Transformation bestimmte Tabakpflanzen sowie bereits transformierte Pflanzen wurden anhand von Stecklingen auf 2MS-Medium bei einem Licht-/Dunkel-Zyklus mit 8 h Licht und 16 h Dunkel bei 25 °C steril angezogen.

3.2.2 Transformation von *Escherichia coli* bzw. *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.2.1 Elektroporation

Für die Elektroporation mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad, München) wurden ca. 40 µl elektrokompetenter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* Zellen eingesetzt. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Standardbedingungen (Spannung: 1,8 kV, Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF) mit 100 ng Plasmid-DNA oder 3 µl eines durch Filterblattdialyse oder Reinigung mit dem „Gelextraktions- und PCR-Reinigungs-Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, siehe 3.2.9) entsalzten Ligationsansatzes.

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Antibiotika-haltigem LB- bzw. 2YT-Medium (siehe 3.2.1.1).

3.2.2.2 CaCl₂-vermittelte Transformation

Zur Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmiden, die größer als 12 kb waren, wurde die CaCl₂-Methode angewandt. Es wurden 100 µl kompetenter *E. coli* Zellen mit dem zuvor im Wärmeschrank auf ca. 15 µl eingetrockneten Ligationsansatz und 50 µl TCM-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂) gemischt und 30 min auf Eis gehalten.

Nach einem 1 minütigen Hitzeschock bei 43°C und 2 min auf Eis wurden 500 µl auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz wurde für ca. 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Selektion erfolgte auf Antibiotika-haltigem LB-Medium mit 300 µl, 200 µl bzw. dem Rest des Ansatzes (siehe 3.2.1.1).

3.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* bzw. *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus 3 ml Übernachtskulturen von *A. tumefaciens* bzw. *E. coli* (siehe 3.2.1.1) mit dem „NukleoSpin Plasmid“-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Vorschrift des Herstellers.

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus 25 ml bakterieller Übernachtskulturen wurde das „JETstar Plasmid Midi Kit“ nach Angaben der Firma Genomed (Löhne) verwendet.

3.2.3.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe

Gesamt-DNA aus *A. thaliana* wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Lecellier und Silar (1994) extrahiert. Hierzu wurde Blattmaterial mit flüssigem Stickstoff im Mörser bzw. mittels Plastikpistill im Eppendorf-Reaktionsgefäß homogenisiert. Anschließend wurde Extraktionspuffer [1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0] hinzugegeben. Zur Abtrennung von Proteinen wurde das Homogenat mit dem gleichen

Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und zentrifugiert (5 min, 10000 rpm, 4°C; Beckman Coulter Zentrifuge Allegra™ 21R, Rotor F2402H). Der wässrige Überstand wurde abgenommen, zum Abbau der vorhandenen RNA mit DNase-freier RNaseA versetzt und mindestens eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Daran anschließend erfolgte eine weitere Phenolysierung mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch. Nachfolgend wurde die Extraktion der Phenol-Anteile aus dem nach der Zentrifugation (5 min, 10000 rpm, 4°C) erhaltenen wässrigen Überstand mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vorgenommen.

Die Fällung der DNA erfolgte mit 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina Ethanol bei -80°C über mindestens 30 Minuten. Durch eine Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4°C) wurde ein Präzipitat erhalten, das mit 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und nach dem Trocknen in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst wurde.

Alternativ zu der beschriebenen Methode wurde Gesamt-DNA aus maximal 100 mg Blattgewebe mit Hilfe des „NuKleoSpin Plant –Kits“ (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* in kleinem Maßstab erfolgte nach Hoge et al. (1982). Antheren wurde mit flüssigem Stickstoff mittels Plastikpistill im Eppendorf-Reaktionsgefäß homogenisiert und mit kochendem RNA-Lysepuffer [0,2 M NaBorat, 30 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 9,0] aufgeschlossen. Durch eine zweimalige Phenolysierung wurden die Proteine entfernt. Nachfolgend erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren mit 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina Ethanol bei -80°C über mindestens 30 Minuten. Die RNA wurde dann selektiv mit 4 M Lithiumchlorid bei 4°C über Nacht gefällt. Anschließend konnte die RNA durch eine Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4°C; Beckman Coulter Zentrifuge Allegra™ 21R, Rotor F2402H) sedimentiert und mit 70% (v/v) Ethanol von Salzresten gereinigt werden. Nach erneuter Zentrifugation wurde die RNA getrocknet, in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.2.3.4. Isolierung von Gesamt-DNA und -RNA aus *Nicotiana tabacum* SR1

Antheren oder Blätter von *Nicotiana tabacum* wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff durch Mörsern aufgeschlossen und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 750 µl 60°C warmem Lysepuffer wurde das Lysat 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde 500 µl 60°C heißes Phenol gegeben und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Gesamt-Nukleinsäuren wurden danach mit Ethanol gefällt und in 800 µl A. dest. gelöst. Anschließend erfolgte unter Zugabe von 800 µl 4 M LiCl eine selektive Fällung der RNA. Die Pellets wurden dann zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 80 µl A. dest. gelöst. Die im Überstand verbliebene DNA wurde nach Dialyse gegen TE-Puffer (1x) mit Ethanol gefällt (Methode verändert nach Hoge et al. 1982).

Alternativ zu der beschriebenen Methode wurde Gesamt-DNA oder RNA aus maximal 100 mg Antheren- bzw. Blattgewebe mit Hilfe des DNeasy Plant Kits (Qiagen) oder RNeasy Plant Total RNA Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.4 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde unter Verwendung der von dem jeweiligen Enzymhersteller empfohlenen Puffer nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

3.2.5 Extraktion von Gesamtprotein aus Pflanzenblättern und Proteinbestimmung

Das Blattmaterial (0,3 g) wurde mit 200 µl TEPI-Puffer [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1mM PMSF, je 5 µg/ml der Protease-Inhibitoren Aprotinin und Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1% (w/v) SDS] versetzt und mittels Plastikpistill im Eppendorf-Reaktionsgefäß homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 10 min bei 14000 rpm im Rotor F2402H der Beckman Coulter Zentrifuge Allegra™ 21R zentrifugiert.

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.

3.2.6 Gelelektrophorese

3.2.6.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe mittels 0,8-2%-iger (w/v) Agarosegele in 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (vgl. 3.1.8) nach Sambrook et al. (1989). Als Größenstandard wurde mit *Hind*III hydrolysierte *Lambda*-DNA oder ein erweiterter 100-5000 bp Marker (MBBL, Bielefeld) verwendet.

3.2.6.2 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen

Die denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen wurde in einer P8DS Elektrophoresekammer der Firma Emperor Penguin (Portsmouth) in Gelen von 8 x 9 cm Größe und 1 mm Dicke nach Lämmlí (1970) durchgeführt. Die verwendeten Sammelgele enthielten 4,2% (w/v) Polyacrylamid. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12- bzw. 14%igen (w/v) Polyacrylamidtrenngelen in einfach konzentriertem Laufpuffer [50 mM Tris-HCl, 2,89 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS]. Vor dem Auftragen wurden die aufzutrennenden Proteinproben mit dem 0,2fachen Volumen Probenpuffer [6,96% (w/v) SDS, 5,75% (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,29% (v/v) β -Mercaptoethanol] versetzt und 10 min bei 95°C im Heizblock Thermostat 5320 der Firma Eppendorf (Hamburg) inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 bis 130 V für ca. 2 h. Als Größenstandard wurde der „Dalton Marker VII-L“ (Sigma, Saint Louis) verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 2 bis 3 h in Färbelösung [45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliantblau G250] gelegt und anschließend über Nacht in Entfärbelösung [40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure] wieder entfärbt.

3.2.7 Reinigung und Elution von DNA aus Agarosegelen

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

Alternativ wurde zur Isolierung kleiner DNA-Fragmente die „freeze and squeeze“-Methode angewendet (Benore-Parsons und Anderson 1995). Dazu werden Agaroseblöckchen, welche die zu eluierende DNA enthalten, aus dem Gel geschnitten, mindestens 30 min bei -20°C eingefroren und danach zwischen Daumen und Zeigefinger „ausgedrückt“. Dabei enthalten die ersten Flüssigkeitstropfen (max. 70 µl) die DNA.

Eine weitere Alternative stellte die „Zentrifugations“-Methode nach Heery et al. (1990) dar.

3.2.8 Dephosphorylierung von DNA

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

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA Ligase nach Angaben des Herstellers (QBiogene) über Nacht verwendet. Für die Klonierung von *Taq*-PCR Fragmenten wurde ein durch die Restriktionsendonuklease *XcmI* hydrolysierter und dadurch mit T-Überhängen vorliegender Klonierungsvektor pMON (Borovkov und Rivkin 1997) verwendet. *Pfu*-PCR Produkte, die keine Überhänge enthalten, wurden in den mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* linearisierten Vektor pBluescriptII/SK+ inseriert.

Bei Ligationen mit phosphorylierten Enden, die nach Hydrolyse von zwischenklonierten Fragmenten mittels Restriktionsendonukleasen erhalten werden, wurde die linearisierte Vektor-DNA zuvor dephosphoryliert (siehe 3.2.8). Dadurch konnte eine Selbst- bzw. Religation des Vektors ausgeschlossen werden.

3.2.10 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten, die als Sonde zur DNA-DNA-Hybridisierung dienen, erfolgte mit Hilfe des „DECA prime II“ Kits (Ambion, Austin, USA) unter Zusatz von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (siehe 3.1.5) nach dem entsprechenden Protokoll. Überschüssige, nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit Hilfe einer Sephadex G50 Säule abgetrennt.

3.2.11 Southern Blot und DNA-DNA-Hybridisierung

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente (vgl. 3.2.6.1) wurden nach je 30-minütiger Denaturierung (in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, pH 13) und Neutralisierung (in 2 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 5,5) mittels Kapillarblot in 20x SSPE-Puffer (siehe 3.1.8) auf eine Nylonmembran übertragen (Southern 1975). Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran in 2x SSPE gewaschen. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung im „UV-Stratalinker“ (Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert.

Die Southern-Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erfolgte unter stringenten Bedingungen nach Southern (1975) und Sambrook et al. (1989). Nach mindestens einstündiger Vorhybridisierung [in 5x SSPE-Puffer, 0,2% (w/v) SDS, 50% (v/v) Formamid und 5x Denhardts, pH 7,5] bei 37°C und anschließender Zugabe der [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten DNA-Sonde (vgl. 3.2.10) wurde die Hybridisierung über Nacht ebenfalls bei 37°C in Hybridisierungsflaschen durchgeführt.

Nachfolgend wurde die unspezifisch gebundene DNA-Sonde durch Waschen der Membran in 5x SSPE und 0,2% (w/v) SDS bei 55-65°C entfernt. Die getrocknete Membran wurde bei -80°C für 1 bis 14 Tage mit Konica Minolta (Hohenbrunn) Röntgenfilmen in Expositions-kassetten („Quanta Fast Detail“, Dupont) exponiert.

3.2.12 Western Blot und Detektion

Western-Blots wurden mit einer „Semi-Dry-Blot“ Apparatur (VWR, Darmstadt) durchgeführt. Im Anschluss an die denaturierende Gelelektrophorese der zu

untersuchenden Proteine (vgl. Kap. 3.2.6.2) wurde das ungefärbte Gel in Kathodenpuffer [20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS] äquilibriert. Die Proteine wurden dann bei $0,65 \text{ mA/cm}^2$ Gel und Raumtemperatur in 2 h auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, die zuvor für 5 min in Anodenpuffer [20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 30% (v/v) Methanol] geschwenkt wurde. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran anschließend in Ponceau-Rot-Lösung [0,2% (w/v) Ponceau-Rot, 3% Trichloressigsäure] gefärbt und die Banden des verwendeten Proteinmarkers auf der Membran markiert. Durch Schwenken in destilliertem Wasser wurde die Membran dann entfärbt.

Nach dem Proteintransfer im Western-Blot wurde die Membran zur Blockierung freier Bindestellen über Nacht in 1facher „Roti-Block“-Lösung (Roth, Karlsruhe) geschwenkt und einmal 15 min bzw. danach zweimal 5 min in TBST [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 8,0] gewaschen. Die Inkubation mit 1:1500 verdünntem Neutravidin [„NeutravidinTM Horseradish Peroxidase Conjugated“, Pierce, Rockford, Illinois, USA] erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in 1% (v/v) „Roti-Block“-Lösung“ in TBST. Vor der Detektion, die auf der Entwicklung von Chemolumineszenz beruht, wurde die Membran einmal 15 min und nachfolgend viermal 5 min in TBST gewaschen. Zur Detektion wurden je 5 ml der beiden Detektionslösungen (Lösung1: 2,5 μM Luminol, 400 μM p-Coumarsiure, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5; Lösung 2: 5,4 mM H_2O_2 , 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) gemischt und auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte eine Exposition der Membran von 15 sec bis 7 min auf Konica Minolta (Hohenbrunn) Röntgenfilmen.

3.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.13.1 Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verändert nach Saiki et al. (1988) und Kawasaki und Wang (1989) durchgeführt. Gesamt-DNA (60 ng) bzw. 0,1-1 ng Plasmid-DNA 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, Qiogene (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg)] unter

Zugabe von 5 mM dNTPs (Qbiogene, Heidelberg), je 5 pmol der Oligonukleotide und 1 Einheit *Taq*-DNA-Polymerase [Qbiogene (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg)] im „PTC100“ (MJ Research Inc., Hess. Oldendorf) oder im „MiniCycler“ (MJ Research Inc.) amplifiziert.

Für Klonierungs-PCRs wurde an Stelle der *Taq*- die *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Das PCR-Programm startete mit einer Anfangsdenaturierung von 2 min bei 94°C. Anschließend folgten 43 Zyklen bestehend aus Denaturierung (1 min, 94°C), Hybridisierung (1 min) und Elongation (72°C). Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotiden und betrug zwischen 50 und 58°C. Die Elongation wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes gewählt.

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

Zur Amplifikation von cDNA aus Gesamt-RNA wurde das “One Step RT-PCR”-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zuvor wurde die als Matrize eingesetzte RNA mit einer RNase-freien DNaseI (Roche, München; MBI Fermentas, Leon-Rot) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt und anschließend mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden auf DNA-Kontaminationen überprüft.

3.2.14 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

3.2.15 Stabile Transformation von *Nicotiana tabacum* SR1 mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 [pMP90]

Die durch *A. tumefaciens* vermittelte stabile Transformation von Tabak erfolgte an Blattscheiben nach der Kokultivierungsmethode von Horsch et al. (1985). Ausreichend für ca. 50 Blattscheibchen wurden 15 ml 2YT-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika)

mit 150 µl einer über-Nacht-Kultur inokuliert und für ca. 20 h bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zum Entfernen des Kulturüberstandes für 5 min bei 5500 rpm sedimentiert, in 10 ml 2YT-Medium resuspendiert und in eine Petri-Schale gegeben.

Die Blätter einer steril angezogenen Tabakpflanze wurden unter Entfernung der Blattränder und der Mittelrippe in etwa 0,5 cm² große Stücke zerschnitten. Danach wurden die Blattstückchen für 5-15 min in die Agrobakterien-Suspension getaucht. Zur Infektion wurden die beimpften Tabakblattstücke auf 2MS-Platten ausgelegt und für 2-3 Tage bei 25°C im Dunkeln gelagert.

Die von Agrobakterien überwucherten Blattscheiben wurden für 3x10 min bei ca. 130 rpm in 100 ml 1/2 MS-Medium gewaschen und anschließend in 1/2 MS-Medium mit 400 mg/l Cefotaxim und 100 mg/l Vancomycin getaucht. Zur Regeneration transformierter Tabakpflanzen wurden die Blattscheiben auf MG-Platten mit 100 mg/l Kanamycin zur Selektion ausgelegt. Unter dem Einfluß der im Medium enthaltenen Hormone entwickelte sich nach ca. 14 Tagen Kallusgewebe, aus welchem sich nach etwa 14 Tagen kleine Sprosse differenzierten, die dann zur Bewurzelung in sterile Pflanzenboxen (Duchefa) mit ca. 100 ml 2MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin umgesetzt wurden. Um nach der Infektionsphase ein Wachstum der Agrobakterien zu verhindern, wurden den Medien stets 400 mg/l Cefotaxim und 100 mg/l Vancomycin zugegeben.

3.2.16 *Arabidopsis thaliana*-Infiltrationsmethode

Die Arabidopsis-Transformation erfolgte nach dem „floral dip“-Protokoll (Clough und Bent 1998). Hierzu wurden Arabidopsis-Pflanzen bis zur Blüte unter Langtagbedingungen in der Klimakammer angezogen (22°C, 16 h Licht, ca. 60 µE s⁻¹m⁻², Anzuchtsdauer ca. 4 Wochen). Nach der Bildung primärer Blüten wurden die Infloreszenzen abgeschnitten, um möglichst viele sekundäre Blüten zu erhalten. Es wurde zunächst eine Über-Nacht-Kultur der Agrobakterien, die das jeweils zu transformierende Plasmid enthielten, angezogen. Mit 2 ml dieser Kultur wurden 200 ml 2YT-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28°C und 220 rpm. Anschließend wurden die Bakterien zum Entfernen des Kulturüberstandes für 10 min bei 4000 rpm im Rotor JLA-16250 der Beckman Coulter Zentrifuge Avanti™ J-20XP sedimentiert und in

400 ml Infiltrationsmedium [5%ige Saccharose-Lösung mit 0,05% des Detergenz Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA)] resuspendiert. Die Pflanzen wurden komplett in die Bakterienlösung getaucht und 2-3 sec leicht geschüttelt. Über Nacht wurden sie in eine Plastiktüte gelegt, dann nach dem Entfernen der Plastiktüte aufrecht gestellt. Nach dem Erreichen der Samenreife wurde das Giessen eingestellt. Zur Regeneration transformierter Pflanzen wurden die Samen mit 70% (v/v) Ethanol sterilisiert, 2 Tage bei 4°C stratifiziert und auf Selektionsmedium (MS-Medium m. 50 mg/l Kanamycin) in Petrischalen ausgelegt. Nach etwa 14 Tagen war eine deutliche Unterscheidung zwischen putativ transgenen und nicht transgenen Pflanzen möglich. Keimlinge, die die Kanamycin-Resistenz nicht enthalten, entwickeln sich nicht über das Keimblattstadium hinaus und bleichen, während resistente Pflanzen sich normal entwickeln. Putative Transformanten wurden dann in Erde gesetzt.

3.2.17 Biolistische Transformation

Die transiente Transformation von Epidermiszellen der Küchenzwiebel (*Allium cepa*) wurde mit einer „particle gun“ (PDS-1000 „He biolistic particle delivery system“) der Firma BioRad (München) durchgeführt (Klein et al. 1987; Sanford 1988). Hierzu wurden die Proben folgendermaßen vorbereitet: 2 mg 1,5 -3 µm kolloidales Gold der Firma Chempur (Karlsruhe) wurde 3 x in reinem Ethanol gewaschen, in 50 µl Aqua bidest aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gehalten.

Zu 50 µl dieses Goldes wurden 50 µl eisgekühltes 2,5 M Calciumchlorid, 20 µl 0,1 M Spermidin und 5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wurde für 2 min auf einem Vortexer gemischt. Danach folgte eine Zentrifugation von 1 min bei 5000 rpm im Rotor F2402H der Beckman Coulter Zentrifuge Allegra™ 21R. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen, das Goldpellet in 250 µl eisgekühltem Ethanol aufgenommen und resuspendiert. Danach folgte eine erneute Zentrifugation von 1 min bei 5000 rpm. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wieder in 50 µl eisgekühltem Ethanol aufgenommen. Jeweils 10 µl der Goldsuspension wurden auf Folien der Makrocarrierhalter der Firma BioRad (München) pipettiert. Nach dem Verdunsten des Ethanols wurde ein Makrocarrierhalter zusammen mit einem Stopnetz in die oberste Schiene der PDS-1000 Anlage eingesetzt. Die zu

transformierenden Zwiebelepidermiszellen wurden in die Mitte auf MS-Platten [2 g/l Murashige und Skoog Salze, 30 g/l Saccharose (pH 5,8), 1% (w/v) Agar] gelegt und diese auf die zweite Schiene der PDS-1000 Anlage überführt. Zum Beschuss wurde ein Vakuum von 27 Quecksilber-Einheiten angelegt. Die Transformation erfolgte dann mit einem Druck von 1100 psi. Die beschossenen Zwiebelepidermen wurden für 1 Tag auf den MS-Platten in der Klimakammer (Bedingungen siehe 3.2.16) inkubiert.

3.2.18 Protoplastierung von Tabak BY2-Zellen und PEG-vermittelte Transformation

Die Protoplastierung der Tabak BY2-Zellen erfolgte 4 Tage nach der Subkultivierung über Nacht bei 25°C in einer Petri-Schale mit 20 ml der Zellen und 13 ml Enzymlösung [1% (w/v) Cellulase Onozuka RS, 0,5% (w/v) Macerozyme Onozuka RS (beide von Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,1% (w/v) Pectinase (Buchs SG, Schweiz), 0,5% (w/v) BSA, 0,01% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 50 mM CaCl₂, 10 mM Na-Acetat (pH 5,8) und 0,25 M Mannitol].

Die Polyethylenglykol-vermittelte Transformation wurde nach der Methode von Neuhaus und Boevink (2001) durchgeführt. Ungefähr 7×10^5 Protoplasten wurden mit 30 µg Plasmid-DNA in einem Medium, das 40% (w/v) PEG 4000 (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,4 M Mannitol und 0,1 M Ca(NO₃)₂, pH 8-9, enthielt, vermischt.

3.2.19 Protoplastierung von *A. thaliana*-Blattgewebe

Die Herstellung von Protoplasten aus *A. thaliana* Blättern erfolgte in dem gleichen Medium wie bei den Tabak BY2-Zellen (siehe 3.2.18).

3.2.20 Histologische Detektion der β -Glukuronidase-Aktivität in transgenen Arabidopsis und Tabak Pflanzen

Das GUS-Reportergen-System (Jefferson et al. 1986; Jefferson et al. 1987) wurde genutzt, um die Funktionalität der verwendeten Promotoren zu überprüfen. Bei der Farbreaktion wird das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolylglukuronid (X-Gluc) durch die β -

Glucuronidase, welche durch das *gus* Gen kodiert wird, zu farblosem Indoxyl gespalten. Durch oxidative Dimerisierung entsteht aus dieser Verbindung der Farbstoff Indigoblau. Das zu analysierende *A. thaliana*- bzw. *N. tabacum*-Gewebe wurde vollständig mit der Substrat-Lösung [50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,05 % (w/v) Triton X-100, 1 mM X-Gluc] überdeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert, bis eine blaue Farbreaktion erkennbar war. Anschließend wurde bei Raumtemperatur das Chlorophyll aus dem Pflanzenmaterial extrahiert. Dazu wurde sukzessive für 30 min in 30% (v/v) Ethanol, für 1 h in 70% (v/v) Ethanol und bis zur kompletten Entfärbung in 96% (v/v) Ethanol inkubiert. Die Präparate wurden in 96% (v/v) Ethanol bei Raumtemperatur aufbewahrt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axioskop angefertigt. Als Negativkontrolle diente Gewebe einer Wildtyp-Pflanze.

Neben einer groben quantitativen Abschätzung der Expressionsintensität erlaubt diese Methode auch eine Bestimmung der Expressionsverteilung im untersuchten Gewebe.

3.2.21 MitoTracker®-Färbung

Zur Überprüfung der Respirationsaktivität von Mitochondrien wurde den protoplastierten *N. tabacum* BY2- und *A. thaliana* Protoplasten der mitochondrienspezifische Farbstoff MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben (Endkonzentration 25 nM). Der Farbstoff fluoresziert nur in seiner oxidierten Form, so dass eine Akkumulation in den Mitochondrien und die nachfolgende Oxidation auf die Identität der Organellen, die Integrität der mitochondrialen Membran und die Oxidationsfähigkeit hinweisen.

Es wurden 17 µl protoplastierte BY2-Zellen mit 1 µl MitoTracker®-Stammlösung, bzw. eine Zwiebelhaut mit 400 µl versetzt. Bei den Zwiebel-Epidermiszellen wurde mit einer Endkonzentration von 500 nM gearbeitet.

3.2.22 Licht-Mikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen im Hellfeld wurden mit dem „Axiophot“-Mikroskop (Zeiss, Jena) bzw. „M420“ Makroskop (Wild, Heerbrugg) durchgeführt. Zur Aufnahme der

mikroskopischen Abbildungen wurde die „ImageAccess“-Software in Verbindung mit einer Sony 3CCD Iriskamera verwendet.

3.2.23 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Detektion von Fluoreszenz erfolgte im Phasenkontrast am Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM; Leica Microsystems, Heidelberg) mit einer Anregung von 488 nm und einer Emission im grünen (500-540 nm) und roten (560-610 nm) Bereich. Zur Aufnahme der mikroskopischen Abbildungen wurde die Version 2.5 der „Leica confocal“-Software verwendet.

3.2.24 Auswertung von Nukleotid- und Proteinsequenzen

Vergleiche der Primärstruktur von Proteinen und DNA erfolgten mit dem Programm CLUSTAL, Version W, (Higgins und Sharp 1988; Higgins et al. 1992; Thompson et al. 1994). Das Hydropathieprofil des ORF107 wurde mit dem Programm WIN PEP erstellt. Das Auffinden homologer Bereiche in DNA- bzw. cDNA-Sequenzen in den entsprechenden Datenbanken ermöglichten die BLAST-Algorithmen (Altschul et al. 1990; Altschul et al. 1997) sowie das FASTA-Programm (Pearson 1990). Diese 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.

3.2.25 Digitale Bildbearbeitung

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

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob *orf107*, ein CMS-assoziiertes offenes Leseraster aus Hirse-Mitochondrien (Iwabuchi et al. 1993; Tang et al. 1996b; Howad et al. 1999), CMS-Phenotypen in den heterologen Systemen *Nicotiana tabacum* bzw. *Arabidopsis thaliana* bewirken kann. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass *orf107* in männlich sterilen Hirselinien tatsächlich der Auslöser von CMS ist. Betroffene Pflanzen, die keinen fertilen Pollen oder funktionelle Antheren bilden können, sind wichtig für die Erzeugung von Hybridsaatgut (siehe Kap. 1.4). Dafür wurden Vektorkonstrukte mit verschiedenen Blüten- bzw. Antheren-spezifischen Promotoren und mitochondrialen Import-Sequenzen erstellt.

Die Funktionalität und Spezifität der verwendeten Promotoren konnte durch einen GUS-Test bestätigt werden. Das ORF107 Transkript wurde durch RT-PCR und das ORF107 Protein durch Biotinylierung nachgewiesen. Der Import von ORF107 als GFP-Fusionsprotein in die Mitochondrien sollte durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Transgene Pflanzen wurden hinsichtlich ihres Phenotyps, Blütenbaus und Fertilität des Pollens analysiert.

4.1 Konstruktion binärer *orf107*-Vektoren zur heterologen, stabilen Expression

Der Transfer der genetischen Information für das ORF107 Protein aus *Sorghum bicolor* in die pflanzlichen Wirtsorganismen *A. thaliana* und *N. tabacum* erfolgte auf der Basis eines binären Vektorsystems mittels *Agrobacterium tumefaciens*. Hierzu wurden Derivate des binären Vektorplasmids pBI121 (Bevan 1984) hergestellt (siehe Kap. 3.1.3), die eine stabile Transformation von *A. thaliana* und *N. tabacum* Pflanzen und die Expression des ORF107 Proteins ermöglichen sollten. Dieser in Abbildung 2 dargestellte Vektor umfasst 13 kbp und trägt das *nptII* Gen, das Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin verleiht, sowie das Reportergen *gus* (*uidA*) aus *E. coli* für die β -Glucuronidase (Schlaman et al. 1994) unter der Kontrolle des CaMV-(Blumenkohlmosaikvirus)-35S-Promotors (Rojiyaa et al. 1987).

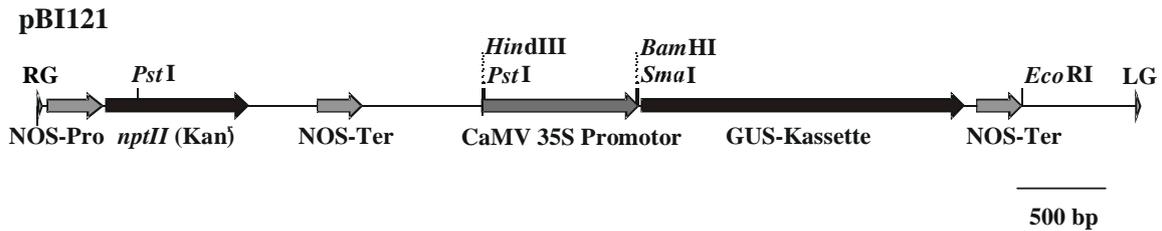


Abb.2: Vektor pBI121 zur Pflanzentransformation.

Dargestellt ist die T-DNA, die in die Pflanzen transferiert wird (leicht verändert nach Bevan 1984). RG/LG: rechte bzw. linke Grenze; NOS-Pro/NOS-Ter: Promotor bzw. Terminator der Nopalin-Synthase des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; *nptII*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase (verleiht Kanamycin-Resistenz); GUS-Kassette: enthält Gen für die β -Glucuronidase. Zusätzlich sind Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angegeben.

Die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit erstellten Vektorkonstrukte tragen die *orf107* cDNA der sterilen Hirselinie A3Tx398 unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV35S-Promotors (Abb. 3A und F) oder verschiedener Blüten- bzw. Antheren-spezifischer Promotoren von *Lycopersicon esculentum* (Abb. 3B) und *A. thaliana* (Abb. 3C-F).

Es wurden zwei mitochondriale Targeting-Sequenzen zum Import des ORF107 Proteins in die Mitochondrien benutzt: die Signal-Sequenz von *coxIV* (Maarse et al. 1984) aus der Hefe für die innere Mitochondrienmembran bzw. von *Nicotiana plumbaginifolia atp2-1* (Boutry und Chua 1985) für die mitochondriale Matrix.

Die Sequenzierung der *orf107* cDNA aus der sterilen Hirselinie A3Tx398 zeigte, dass die der cDNA Synthese zugrundeliegende *orf107* mRNA aus der Hirse an der zweiten von vier Edierungsstellen (Tang et al. 1996b) nicht ediert vorlag. An der entsprechenden Stelle in der Nukleotidsequenz (Position 749, vergl. NCBI „accession“-Nummer gi: 1620544) der verwendeten *orf107* cDNA befindet sich folglich noch ein Cytosin anstelle eines Thymins. Dies bewirkt, dass sich in dem abgeleiteten ORF107 Protein an entsprechender Position nicht die Aminosäure Phenylalanin sondern Serin befindet.

Da die zweite, in dem *atp9* homologen Bereich gelegene Edierungsstelle nie vollständig, sondern nur zu 14% ediert wird (Tang et al. 1996b), entsprach das Ergebnis der Sequenzierung der *orf107* cDNA den statistischen Erwartungen.

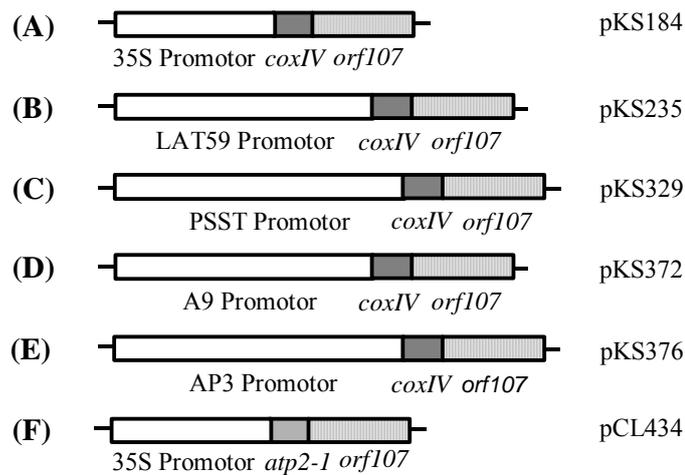


Abb. 3: Vektorkonstrukte für die stabile *orf107* Expression.

Abgebildet ist jeweils die in der T-DNA enthaltene Expressionskassette. Die Vektoren pKS184, pKS235, pKS329, pKS372 und pKS376 enthalten die mitochondriale *coxIV* Signalsequenz, während im Vektorkonstrukt pCL434 *orf107* mit der mitochondrialen *atp2-1* Signalsequenz fusioniert ist.

Alternativ wurde ein modifiziertes *orf107* Gen verwendet. In diesem Gen sind die ersten 93 Basenpaare, die homolog zum *Sorghum bicolor atp9* sind (siehe Abb. 31 im Anhang), gegen die entsprechende homologe Originalsequenz von *A. thaliana* ausgetauscht worden (dargestellt in Abb. 4). Dabei wurde beim *orf107* das erste der beiden im Leserahmen positionierten Startkodone, durch das eine N-terminale, fünf Aminosäuren lange Extension des ORF107 erzeugt wird, entfernt (siehe Abb. 32 im Anhang). Durch diesen Austausch wurde das heterologe *orf107* Gen hinsichtlich der *atp9* Sequenz an den Wirtsorganismus *A. thaliana* angepasst.

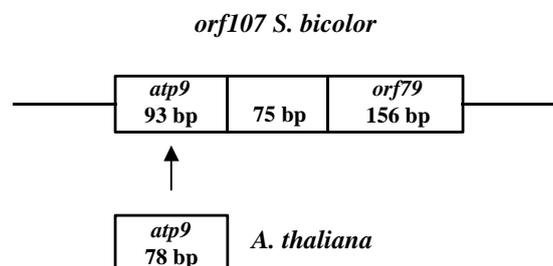


Abb. 4: Herstellung des modifizierten *orf107*.

Das Gen *orf107* aus der Hirse besteht aus Sequenzen, die homolog zum *atp9* (93 bp) sind, nebst Sequenzen unbekannter Herkunft (75 bp) und zum *orf79* aus Reis homologe Sequenzen (Tang et al. 1996b). Der zum *S. bicolor atp9* homologe Anfang wurde gegen die Sequenz des *atp9* aus *A. thaliana* ausgetauscht.

Auch die Vektorkonstrukte mit dem modifizierten *orf107* enthalten verschiedene Promotoren: den konstitutiven CaMV35S-Promotor (Abb. 5A), den Tapetum-spezifischen A9 Promotor (Abb. 5B und E) oder den verstärkt im Pollen aktiven PSST Promotor (Abb.5C und D).

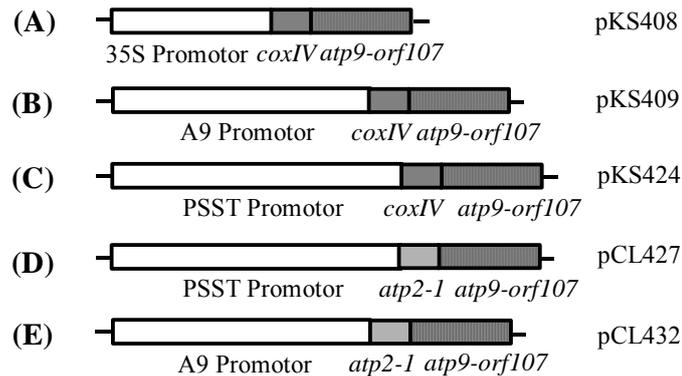


Abb. 5: Vektorkonstrukte für die stabile Expression des modifizierten *orf107*.

Abgebildet ist jeweils die in der T-DNA enthaltene Expressionskassette. Die Vektoren pKS408, pKS409 und pKS424 enthalten die mitochondriale *coxIV* Signalsequenz, während in den Vektorkonstrukten pCL427 und pCL432 der modifizierte *orf107* (*atp9-orf107*) mit der mitochondrialen *atp2-1* Signalsequenz fusioniert ist.

Die Kontrolle der Konstrukte erfolgte über die Transformation von *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit anschließender Selektion auf Kanamycin (siehe 3.1.7) und Restriktionsanalyse (Daten nicht gezeigt). Die erstellten Vektorkonstrukte wurden in *A. tumefaciens* C58C1[pMP90] Zellen transformiert, auf dieser Ebene erneut über Restriktionsanalysen überprüft und zur Transformation von *A. thaliana* Pflanzen nach der „floral dip“-Methode (siehe Kap. 3.2.16) verwendet.

4.2 Nachweis der Funktionalität und Spezifität der verwendeten Promotoren

4.2.1 Generierung von Vektoren zur histochemischen GUS-Färbung

Zur Analyse der Funktionalität und Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Blüten- bzw. Antheren-spezifischen Promotoren PSST (Heiser et al. 1996), A9 (Paul et al. 1992) und AP3 (Jack et al. 1992) aus *A. thaliana* und LAT59 (Twell et al. 1990) aus *L. esculentum* wurden wiederum Vektorkonstrukte basierend auf dem binären Pflanzentransformations-Vektor pBI121 (siehe Kap. 4.1) erstellt. Die für die PCR-Amplifikation der entsprechenden Promotoren verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die Klonierung des LAT59 Promotors wurde das Plasmid pLAT59-12 vom Erstbeschreiber (Twell et al. 1990) zur Verfügung gestellt. Aus diesem Plasmid konnte der LAT59 Promotor durch eine Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Bam*HI isoliert und direkt in den ebenfalls mit diesen beiden Enzymen hydrolysierten Vektor pBI121 (Abb. 2) ligiert werden. Die Vektoren pKS234, pKS354, pSW378 und pSW379 enthalten unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors das Reportergen *gus* (*uidA*) für die β -Glucuronidase aus *E. coli* (siehe Abb. 6).

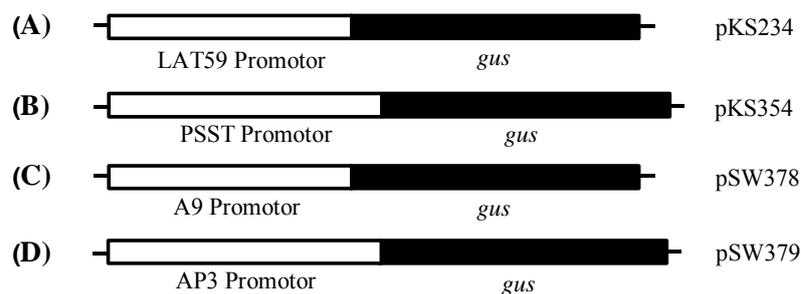


Abb. 6: Expressionskassetten der Vektorkonstrukte zur histochemischen GUS-Färbung. Abgebildet ist jeweils die in der T-DNA enthaltene Expressionskassette, bestehend aus dem Reportergen *gus* unter der Kontrolle des (A) LAT59 Promotors (pKS234), (B) PSST Promotors (pKS354), (C) A9 Promotors (pSW378) und (D) des AP3 Promotors pSW379.

4.2.2 Analyse der Verteilung der GUS-Aktivität

Zu Beginn dieser Studie wurde für die heterologe Expression des *orf107* *N. tabacum* verwendet. Bei diesen Experimenten wurde der Promotor LAT59 zur Steuerung der Expression des *orf107* eingesetzt. Wegen der wesentlich kürzeren Vegetationsdauer wurde später aber stattdessen *A. thaliana* verwendet. In diesem Expressionssystem erfolgten die weiteren Analysen mit den Promotoren PSST, A9 und AP3.

Antheren transgener *A. thaliana*- bzw. *N. tabacum*-Pflanzen, die mit den Promotor-*gus*-Konstrukten transformiert worden waren, wurden hinsichtlich der Verteilung der GUS-Aktivität und somit der gewebespezifischen Expressionsmuster *in situ* untersucht. Hierzu wurde der GUS-Test (Jefferson et al. 1987) angewandt, der auf Umsetzung von chromogenen β -Glucuroniden durch die von dem *gus* Gen kodierte β -Glucuronidase zu einem blau gefärbten Indigofarbstoff beruht (siehe Kap. 3.2.20). Das *gus* Gen eignet sich als Reporter gen für Pflanzen, da bei keiner der untersuchten Pflanzenarten, mit Ausnahme von Rizinus, eine endogene GUS-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Jefferson et al. 1987; Rezmer et al. 1999). Als Kontrolle wurden Wildtyp-Antheren verwendet.

Die Abbildung 7 demonstriert die Funktionalität und Spezifität der bei Arabidopsis verwendeten Promotoren am Beispiel des PSST bzw. A9 Promotors. Der verstärkt im Pollen aktive PSST Promotor (Heiser et al. 1996) führte zu einer *gus*-Expression in transgenem Pollen, was an der blauen Färbung des Pollens erkenntlich ist (Abb. 7C und D). Die Verwendung des Tapetum-spezifischen A9 Promotors (Paul et al. 1992) bewirkte hingegen ausschließlich eine *gus*-Expression im Tapetum, der inneren Zellschicht der Anthere (Abb. 7E und F). Pollen und Tapetum in Antheren nicht transformierter Pflanzen blieben ungefärbt (Abb. 7A und B). Auch der in den Antheren und Petalen aktive AP3 Promotor zeigte die zu erwartende Aktivität (Abb. 8).

Bei dem besonders in reifen Antheren und Pollen aktiven LAT59 Promotor (Twell et al. 1990) konnte in transgenen Tabak-Antheren ebenfalls eine durch GUS-Aktivität bedingte Blaufärbung in Pollen, Tapetum und angrenzendem Antherengewebe nachgewiesen werden (Abb. 9C und D). Die Antheren und Pollenkörner untransformierter Kontrollpflanzen zeigten wiederum keinerlei Färbung (siehe Abb. 9A und B).

Somit waren die gewählten Promotoren für eine gewebespezifische Expression des heterologen *orf107* in *A. thaliana* und *N. tabacum* geeignet.

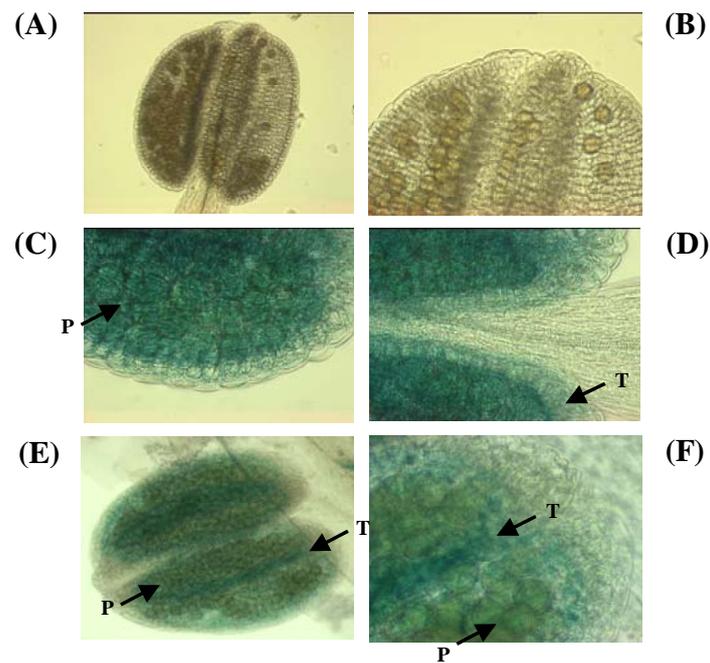


Abb. 7: Histochemische Lokalisation der *gus*-Expression in *A. thaliana* Antheren.

Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Handschnitten. In der Wildtyp-Anthere (**A, B**) ist keine Blaufärbung zu erkennen. Die blau gefärbten Pollenkörner (P) (**C, D**) bzw. das Tapetum (T) (**E, F**) der Transformanten weisen auf β -Glucuronidase-Aktivität hin. Zur Durchführung der GUS-Analyse siehe Kap. 3.2.20. Die Transformanten tragen die GUS-Kassette unter der Kontrolle des verstärkt im Pollen aktiven PSST Promotors (**C, D**) bzw. des Tapetum-spezifischen A9 Promotors (**E, F**). Die Promotoren führten zu einer GUS-Expression in den transgenen Pflanzen. Vergrößerung: 10x (**A** und **E**), 20x (**B-D**) und 40x (**F**).

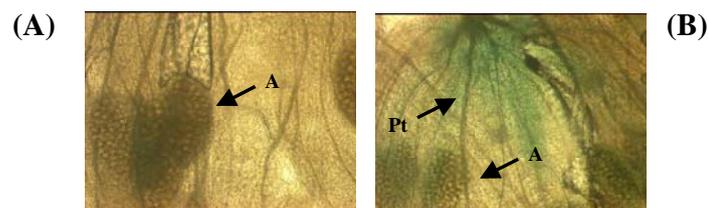


Abb. 8: Analyse der Verteilung der GUS-Aktivität in *A. thaliana* Blüten.

Die Blüte des Wildtyps (**A**) ist ungefärbt. Die Blüte der transformierten Pflanze (**B**) mit der GUS-Kassette unter der Kontrolle des in Antheren und Petalen aktiven AP3 Promotors weist eine Blaufärbung in den Antheren (A) und Petalen (Pt) auf. Dies deutet auf β -Glucuronidase-Aktivität und somit auf die Funktionalität und Gewebespezifität des verwendeten AP3 Promotors hin. Die Durchführung der GUS-Analyse ist in Kap. 3.2.20 beschrieben. Vergrößerung: 10x.

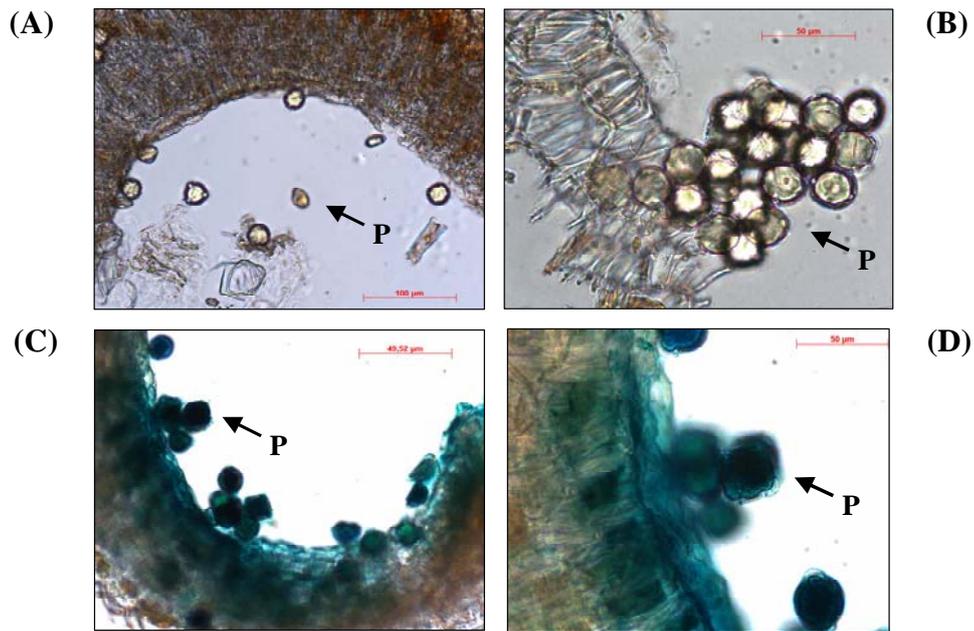


Abb. 9: Histochemische Lokalisation der *gus*-Expression in *N. tabacum* Antheren. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Handschnitten. Die Wildtyp-Anthere (**A**, **B**) weist keine Blaufärbung auf. Die blau gefärbten Pollenkörner (**P**) (**C**, **D**) bzw. das Tapetum (**T**) und angrenzendes Gewebe der Transformanten weisen auf β -Glucuronidase-Aktivität hin. Zur Durchführung der GUS-Analyse siehe Kap. 3.2.20. Die Transformanten tragen die GUS-Kassette unter der Kontrolle des Antheren- und Pollen-spezifischen LAT59 Promotors. Der Promotor führte zu einer GUS-Expression in den transgenen Pflanzen. Skalierung: 100 μ m (**A**), 50 μ m (**B** und **D**) und 49,52 μ m (**C**).

4.3 Heterologe Expression von *orf107* in *Nicotiana tabacum* Pflanzen

Konstitutive Expression von *orf107* fusioniert mit der mitochondrialen Signalsequenz *coxIV* aus der Hefe in Tabak führte in einer zuvor durchgeführten Studie zu einer signifikanten Reduktion des Pflanzenwachstums und der Fähigkeit, Wurzeln auszubilden. Ein ähnlicher, aber weniger beeinträchtigter Phänotyp konnte beobachtet werden, wenn *orf107* ohne eine mitochondriale Signalsequenz exprimiert wurde (Stockmeyer 1999). Ein Grund für den ungewöhnlichen Phänotyp konnte eine durch Verwendung des konstitutiv aktiven CaMV35S-Promotors bedingte Überexpression des Transgens sein. In dieser Studie wurde zur weiteren Analyse der heterologen *orf107* Expression in *N. tabacum* das Vektorkonstrukt pKS235 (siehe 4.1) mit dem Antheren- und Pollenspezifischen Promotor LAT59 (Twell et al. 1990) aus der Tomate verwendet.

Das Einbringen der heterologen *orf107* cDNA mit mitochondrialer *coxIV* Signalsequenz und LAT59 Promotor in *N. tabacum* erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte *leaf-disk*-Transformation von Tabakblättern (Horsch et al. 1985). Diese Methode (siehe 3.2.15) verbindet die natürliche Fähigkeit von *A. tumefaciens* zum Gentransfer mit dem Phänomen der Regenerationsfähigkeit ganzer Pflanzen aus Blattgewebe (Chilton et al. 1977; Vasil et al. 1979). Zur Infektion von *N. tabacum* wurde der Stamm *A. tumefaciens* C58C1 (vgl. Kap. 3.1.1.1) verwendet.

Als Kontrolle wurden dabei vier nicht infizierte Blattstücke auf Antibiotika-freies 2MG-Medium (siehe 3.1.7) mit Pflanzenhormonen aufgebracht, während vier Blattstücke auf Antibiotika-haltiges 2MG-Medium überführt wurden. Bei den mit den pKS235-enthaltenden Agrobakterien inokulierten Tabakblättern trat nach ungefähr zwei Wochen Kallusbildung ein. Nach einer weiteren Woche begannen die Kanamycin-resistenten Kalli, sich zu Sprossen zu differenzieren. Aus den Sprossen entwickelten sich unterschiedlich schnell bewurzelte Tabakpflanzen, die nach ungefähr 5 Monaten die Blühreife erlangten. Die vier nicht mit *A. tumefaciens* infizierten Blätter auf dem Selektivmedium zeigten keine Kallusbildung sondern starben ab. Die nicht infizierten Blätter auf Medium ohne Antibiotika differenzierten nach ebenfalls zwei Wochen zu Kalli und danach zu Sprossen, die zu kleinen Tabakpflanzen heranwuchsen. Dies zeigte einerseits, dass der verwendete Tabak die Fähigkeit zur Regeneration aus Blattstücken besitzt und andererseits, dass das verwendete 2MG-Medium zur Selektion und Kultivierung von Transformanten geeignet war. Die weitere Entwicklung der aus den Kontrollblättern regenerierten Tabakpflanzen wurde nicht verfolgt.

Nach der Regeneration Kanamycin-resistenter Tabakpflanzen wurde mittels Southern-Blot überprüft, ob es sich tatsächlich um transgene Pflanzen handelt. Dazu wurde Gesamt-DNA aus fünf putativen Transformanten und einer Wildtyp-Pflanze isoliert (siehe 3.2.3.4) und mit *EcoRI* hydrolysiert. Die Erkennungssequenz von *EcoRI* kommt in der Transfer-DNA des zur Transformation verwendeten Vektors pKS235 zweimal vor, so dass nach erfolgter Integration in das Pflanzengenom ein 3,6 kb Fragment nachzuweisen sein sollte. Der von der gelelektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-DNA angefertigte Southern-Blot (vgl. 3.2.11) wurde mit einem [$\alpha^{32}\text{P}$] radioaktiv markiertem *coxIV-gus* PCR-Fragment aus dem Vektor pKS235 als Sonde hybridisiert (siehe Abbildung 10).

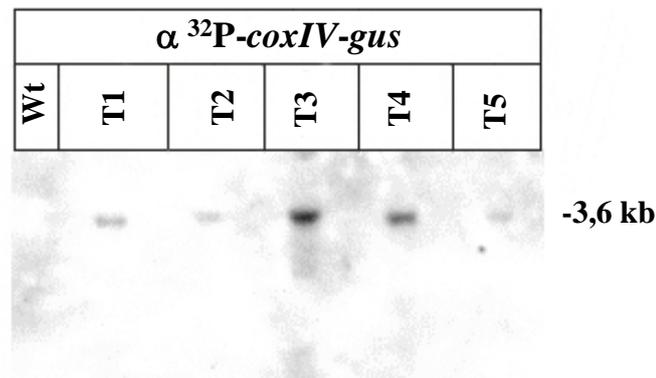


Abb. 10: Nachweis der Integration der T-DNA durch Southern-Hybridisierung.

Genomische DNA verschiedener Tabak-Transformanten (T1-T5) mit der mitochondrialen Zielsequenz *coxIV* und *orf107* unter der Kontrolle des pollenspezifischen Promotors LAT59 (und als Kontrolle DNA einer untransformierten Pflanze, Wt) wurde isoliert (vergl. 3.2.3.4), mit *EcoRI* hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Sonde zur Hybridisierung des Southern Blots (siehe 3.2.11) wurde ein [α^{32}]P-markiertes (siehe 3.2.10) *coxIV-gus* PCR-Fragment aus dem Vektor pKS235 verwendet.

Wie im Autoradiogramm in Abbildung 10 dargestellt, konnte bei den fünf Transformanten (T1-T5) die erwartete 3,6 kb Bande erhalten und somit eine erfolgte Integration der T-DNA nachgewiesen werden. Bei der Wildtyp-Pflanze wurde kein Signal erhalten.

Der Nachweis zur Transkription der *orf107*-DNA erfolgte durch RT-PCR von Antheren-RNA der mit pKS235 transformierten *N. tabacum* Pflanzen. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Antheren einer Wildtyp-Pflanze und aus pKS235-Transformanten (mit LAT59 Promotor, *coxIV* Signalsequenz und *orf107*) isoliert (siehe Kap. 3.2.3.4). Vor der RT-PCR wurde eine DNase-Behandlung mit anschließender Kontroll-PCR durchgeführt, um DNA-Kontaminationen auszuschließen (siehe Kap. 3.2.13.2; Daten nicht gezeigt).

Abbildung 11 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer RT-PCR. Mit den beiden Oligonukleotiden FK226 und FK229 konnte bei sechs pKS235-Transformanten (T1-T6) ein RT-PCR Produkt von 462 bp nachgewiesen werden. Das entspricht der Größe des *coxIV-orf107*-Transkriptes. In dem Ansatz mit Wildtyp DNA (Wt) und in der Wasser-Kontrolle (H₂O) konnte jeweils kein Produkt amplifiziert werden.

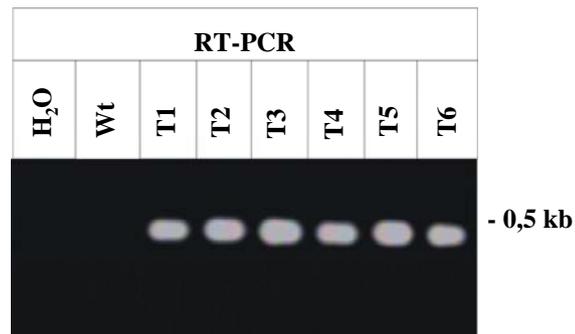


Abb. 11: Nachweis der Transkription der *orf107*-DNA.

Die aus den Tabak-Antheren isolierte Gesamt-RNA wurde, im Anschluss an eine DNase-Behandlung, für die RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK226 und FK229 eingesetzt. Als Kontaminationskontrolle wurde eine RT-PCR ohne Zugabe von DNA durchgeführt (H₂O). Wie die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR Produkte zeigt, konnte ein 462bp großes *coxIV-orf107*-Transkript bei sechs pKS235-Transformanten (T1-T6) mit LAT59 amplifiziert werden. Ausgehend von der zur Kontrolle verwendeten, aus Antheren einer Wildtyp-Pflanze isolierten RNA konnte unter gleichen Bedingungen mittels RT-PCR kein Produkt erhalten werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

Transgene Tabakpflanzen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Größe, Entwicklung, Blattmorphologie und in dem Blühzeitpunkt nicht von untransformierten SR1 Pflanzen (siehe Abb. 12).



(A)

(B)

Abb. 12: Phenotyp von Wildtyp- und transgenen Tabak Pflanzen.

Die Abbildung zeigt eine transgene Pflanze, die mit dem Plasmid pKS235 (mit LAT59 Promotor, *coxIV* Signalsequenz u. *orf107*) transformiert wurde (A) und eine Wildtyp-Pflanze (B). Die Pflanzen sind ca. 4 Monate alt u. weisen den Tabak Phenotyp auf.

Die Blüten transgener Pflanzen ähnelten mit fünf pinkfarbenen Kronblättern und fünf Antheren in jeder Blüte in Form und Farbe denen untransformierter Tabakpflanzen und bildeten nach Selbstung Samen. Männlich sterile Tabakpflanzen zeichnen sich durch weiße Antheren aus, die nur wenige oder überhaupt keine Pollenkörner enthalten, während fertile Pflanzen gelb-weiße Antheren mit normalen Pollenkörnern besitzen (Hernould et al. 1993). Die Fähigkeit zur Pollenkeimung wurde *in vitro* vergleichend an frisch geöffneten Blüten von Wildtyp-Pflanzen und Transformanten untersucht (siehe Abb. 13). Pollenkörner von je zwei bis vier Blüten wurden dazu in einer 5%igen Saccharose-Lösung mit pH 5,8, der 3,75 mg/l H_3BO_3 zugesetzt waren, für vier Stunden bei 28°C inkubiert. Die Pollen der Transformanten (Abb. 13B) unterschieden sich mit einer durchschnittlichen Keimungsrate von 70% nicht von denen untransformierter Pflanzen (Abb. 13A). Bei männlich sterilen Tabakpflanzen beträgt die Pollenkeimung weniger als 2% (Hernould et al. 1993). Die Analyse der Phenotypen ergab folglich, dass die Transformanten fertil waren. Die Expression des heterologen *orf107* in transgenen Tabakpflanzen hatte keinen Effekt auf die phenotypischen und reproduktiven Eigenschaften der Pflanzen.

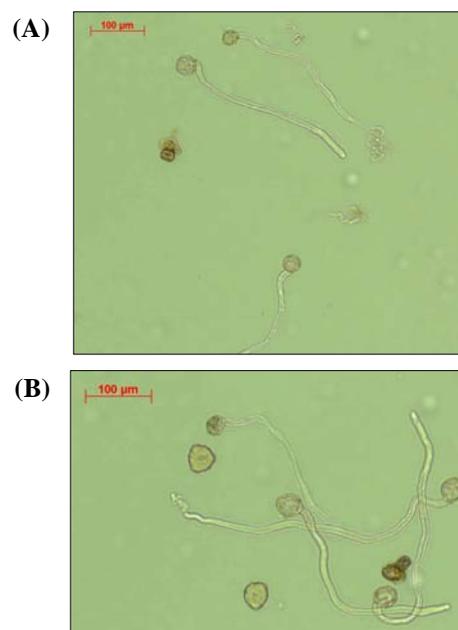


Abb. 13: *In vitro* Pollenkeimung.

Zum Nachweis der Fertilität des Pollens wurde ein *in vitro* Keimungstest durchgeführt. Hierzu wurde Pollen gerade geöffneter Pflanzen für 4 Stunden in einem Saccharose-Medium inkubiert. (A) Pollenkörner untransformierter Tabakpflanzen. (B) Pollenkörner aus pKS235-Transformanten (mit LAT59 Promotor, mitochondrialer *coxIV* Signalsequenz und *orf107*).

4.4 Generierung und Charakterisierung von transgenen *orf107* *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Nachdem zu Beginn dieser Studie Tabakpflanzen zur Analyse der heterologen Expression des *orf107* verwendet wurden, wurde im weiteren Verlauf wegen des wesentlich kürzeren Entwicklungszyklus mit *A. thaliana* gearbeitet. Nach Transformation mit den verschiedenen *orf107*- bzw. modifizierter *orf107*-Vektorkonstrukten und Regeneration Kanamycin-resistenter *A. thaliana* Pflanzen wurden je 10 Transformanten pro verwendetem Vektorkonstrukt analysiert.

Zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen wurde die „floral dip“-Methode etabliert (vgl. 3.2.16). *Arabidopsis thaliana* Pflanzen werden dabei bis zur Blüte angezogen (siehe 3.2.1.2) und die Infloreszenzen zunächst zurück geschnitten, um eine vermehrte Bildung sekundärer Blüten zu induzieren. Zur Transformation werden die Pflanzen in eine Suspension aus Agrobakterien, die jeweils das gewünschte Vektorkonstrukt enthalten, getaucht und bis zur Samenreife gewässert. Die abgeernteten Samen werden sterilisiert und auf Selektionsmedium (in diesem Fall mit dem Antibiotikum Kanamycin) ausgelegt (Clough und Bent 1998).

Nach etwa 14 Tagen ist eine deutliche Unterscheidung zwischen putativ transgenen und nicht transgenen Pflanzen möglich. Keimlinge, die die Kanamycin-Resistenz nicht enthalten, entwickeln sich nicht über das Keimblattstadium hinaus und bleichen, resistente Pflanzen hingegen entwickeln sich normal (siehe Abb. 14).

Zur Infektion von *A. thaliana* wurde wie auch bei *N. tabacum* der Stamm *A. tumefaciens* C58C1 (siehe Kap. 3.1.1.1) verwendet. Dieser Stamm enthält das Helferplasmid pMP90, das die agrobakteriellen Virulenz-Gene beinhaltet. Durch eine Transformation der Bakterien (vgl. 3.2.2.1) mit den erstellten Vektorkonstrukten lagen in den Agrobakterien die erforderlichen Plasmide des binären Transformationssystems gleichzeitig vor, so dass während des „floral dip“ eine Übertragung der Expressionskassetten in das Pflanzengenom ermöglicht wurde.

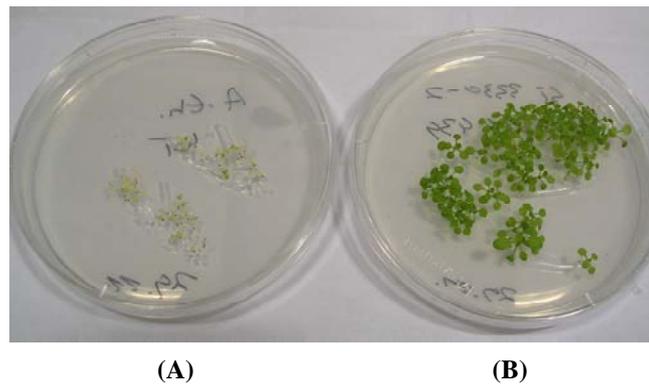


Abb.14: Regeneration von *A. thaliana* auf Selektionsmedium.

Die Abbildung zeigt ca. 3 Wochen alte Wildtyp- (A) u. transgene Keimlinge (B) auf Selektionsmedium mit Kanamycin. Während nicht transgene Keimlinge nur bis zum Keimblattstadium anwachsen u. dann absterben, entwickeln sich resistente, transgene Keimlinge normal weiter.

4.4.1 Nachweis der Fremd-DNA in den erzeugten transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Wegen der wesentlich geringeren Menge an Blattmaterial bei Arabidopsis verglichen mit Tabak und der daraus resultierenden niedrigeren Ausbeute bei einer DNA-Isolation, wurde im weiteren Verlauf mittels PCR der Nachweis einer erfolgten Transformation durchgeführt.

Nach Regeneration Kanamycin-resistenter Arabidopsis Pflanzen wurde die genomische DNA der transformierten Individuen isoliert (siehe Kap. 3.2.3.2) und eine PCR-Amplifikation (vgl. 3.2.13.1) des 666 bp großen *nptII* Gens mit dem Oligonukleotidpaar FK258 und FK259 durchgeführt. Das für die Neomycin-Phosphotransferase, welche Kanamycin-Resistenz verleiht, kodierende *nptII* Gen befindet sich in der Transfer (T)-DNA der verwendeten Vektoren. Es kann somit zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation und Bestätigung der phenotypischen Selektion der Transformanten auf Kanamycin verwendet werden. Zudem kommt *nptII* normalerweise nicht in Pflanzen vor (Fraley 1983) und eignet sich daher als Reportergen. Bei der PCR (beispielhaft dargestellt in Abb. 15A) wurde DNA aus Wildtyp-Pflanzen (Wt) als Negativkontrolle bzw. das Plasmid pBI121 (PK) als Positivkontrolle eingesetzt. Bei allen untersuchten Transformanten und der Positivkontrolle konnte das zu erwartende 666 bp große PCR-

Fragment nachgewiesen werden. Die DNA des untransformierten *A. thaliana* Wildtyps ebenso wie der DNA-freie Ansatz (H₂O) ergaben der Erwartung entsprechend keine amplifizierten Fragmente.

Da ein PCR-Produkt des *nptII* Gens auch durch eine Kontamination der genomischen DNA mit agrobakterieller Plasmid-DNA bedingt sein konnte, wurden die DNA-Präparationen der Transformanten mit positiver PCR in einer weiteren PCR mit dem Oligonukleotidpaar FK587/FK588 auf das Vorhandensein des bakteriellen *nptIII* Gens durchmustert (siehe Abb. 15B). Dieses Gen für die bakterielle Kanamycin-Resistenz ist in den binären Vektorplasmiden außerhalb der T-DNA lokalisiert und kann demnach nicht ins Pflanzengenom übertragen werden. Ein bei dieser PCR entstandenes 600 bp großes Produkt konnte demnach nur Folge einer Kontamination der transformierten Pflanze mit *A. tumefaciens* sein. Dies würde die Aussage über eine erfolgreiche Transformation der Pflanzen verfälschen.

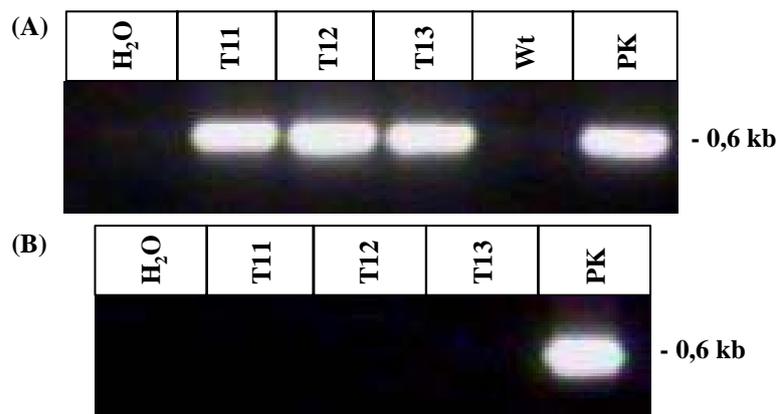


Abb. 15: Analyse von *A. thaliana* T-DNA-Insertionslinien durch PCR.

Aus einer Wildtyp-Pflanze (Wt) und drei möglichen pKS372-Transformanten T11-T13 (mit A9 Promotor, mitochondrialer *coxIV* Signalsequenz und *orf107*) wurde genomische DNA isoliert (vergl. 3.2.3.2). (A) Durch eine PCR (Kap. 3.2.13.1) mit den *nptII*-spezifischen Oligonukleotiden FK258/FK259 konnte bei den Transformanten und der Positivkontrolle (PK, Plasmid pBI121) das erwartete 666 bp Produkt erhalten und eine Integration der T-DNA gezeigt werden. Bei der PCR mit Wildtyp-DNA und in der Wasserkontrolle (H₂O) konnte kein Fragment amplifiziert werden. (B) Eine PCR mit den *nptIII*-spezifischen Oligonukleotiden FK587/FK588 lieferte bei den in der ersten PCR positiv getesteten Transformanten kein Produkt. Lediglich bei der Positivkontrolle (PK, Plasmid pBI121) wurde das 600 bp Amplifikat erhalten. Die Transformanten enthielten somit keine bakterielle Plasmid-DNA. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1 % Agarosegel.

Echte Transformanten, welche die T-DNA in ihrem Genom integriert hatten und frei von bakterieller Plasmid-DNA waren, lieferten dementsprechend in der ersten PCR das 666 bp große *nptII* PCR-Produkt und in der zweiten PCR kein Produkt.

Diese Analyse wurde für alle Transformanten durchgeführt. Auf eine Darstellung aller Ergebnisse wurde verzichtet.

4.4.2 Nachweis der Transkription der *orf107*-DNA in transgenen Pflanzen

Der Nachweis der Transkription der *orf107*-DNA erfolgte durch RT-PCR von Antheren-RNA der mit den verschiedenen *orf107*-Vektorkonstrukten transformierten *A. thaliana* Pflanzen und wird im Folgenden an zwei Beispielen dargestellt (siehe Abb. 16). Auf die Darstellung aller RT-PCRs wurde verzichtet. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Antheren einer Wildtyp-Pflanze und aus pKS372-Transformanten (mit A9 Promotor, *coxIV* Signalsequenz und *orf107*) sowie pKS424-Transformanten (mit PSST Promotor, *coxIV* Signalsequenz und modifiziertem *orf107*) isoliert (siehe Kap.3.2.3.3). Vor der RT-PCR wurde eine DNase-Behandlung mit anschließender Kontroll-PCR durchgeführt, um DNA-Kontaminationen auszuschließen (siehe Kap. 3.2.13.2; Daten nicht gezeigt).

Mit den beiden Oligonukleotiden FK226 und FK229 konnte bei sechs pKS372-Transformanten (T11-T16) ein RT-PCR Produkt von 462 bp, was der Größe des *coxIV-orf107*-Transkriptes entspricht, nachgewiesen werden (Abb. 16A). Ebenso ergab eine RT-PCR mit den gleichen Oligonukleotiden bei vier pKS424-Transformanten (T37-T40) das 447 bp große modifizierte *coxIV-orf107*-Transkript (Abb. 16B). In dem Ansatz mit Wildtyp DNA (Wt) und in der Wasser-Kontrolle (H₂O) konnte jeweils kein Produkt amplifiziert werden. Auf diese Art konnte die Transkription der *orf107*- bzw. modifizierten *orf107*-DNA bei allen anderen verwendeten *orf107*-Vektorkonstrukten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse unterstützen zudem die unter 4.2.2 gemachten Aussagen zur Funktionalität der verwendeten Promotoren.

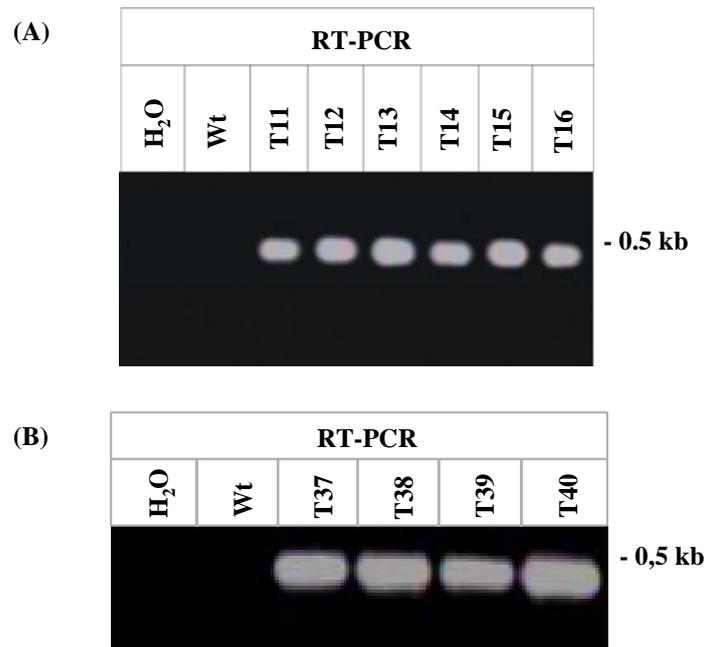


Abb. 16: Nachweis der Transkription der *orf107*- bzw. modifizierten *orf107*-DNA
Die aus den Antheren isolierte Gesamt-RNA wurde, im Anschluss an eine DNase-Behandlung, für die RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK226 und FK229 eingesetzt. Als Kontaminationskontrolle wurde eine RT-PCR ohne Zugabe von DNA durchgeführt (H₂O). Wie die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR Produkte zeigt, konnte ein 462 bp großes *coxIV-orf107*-Transkript bei sechs pKS372-Transformanten (T11-T16) mit A9 Promotor (A) und (B) ein 447 bp großes modifiziertes *coxIV-orf107*-Transkript bei vier pKS424-Transformanten (T37-T40) mit PSST Promotor amplifiziert werden. Ausgehend von der zur Kontrolle verwendeten, aus Antheren einer Wildtyp-Pflanze isolierten RNA konnte unter gleichen Bedingungen mittels RT-PCR kein Produkt erhalten werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

4.4.3 Phenotypische Analyse der transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Nach Transformation mit den verschiedenen *orf107*- bzw. modifizierter *orf107*-Vektorkonstrukten, Regeneration Kanamycin-resistenter *A. thaliana* Pflanzen und Nachweis der Fremd-DNA, wurden die transgenen Pflanzen phenotypisch analysiert. Die Transformanten wiesen alle den Wildtyp-Phenotyp und normale vegetative Entwicklung auf (in Abb. 17 beispielhaft dargestellt). Die Größe 30 Tage alter Transformanten ($18,3 \pm 3,5$ cm) war vergleichbar mit der Größe von Wildtyp-Pflanzen ($18,4 \pm 3,0$ cm) ebenso die Anzahl der Blätter und Blüten.

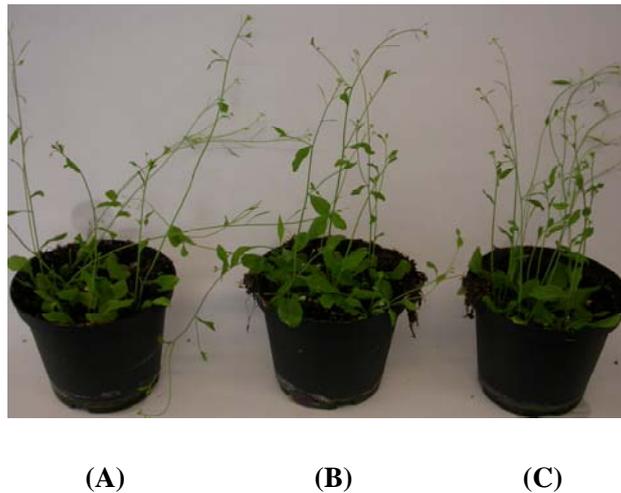


Abb. 17: Phenotyp von Wildtyp- und transgenen Arabidopsis Pflanzen.

Die Abbildung zeigt Wildtyp-Pflanzen (A), transgene Pflanzen, die mit dem Plasmid pKS424 (mit PSST Promotor, *coxIV* Signalsequenz u. modifiziertem *orf107*) (B) oder mit pKS372 (mit A9 Promotor, *coxIV* Signalsequenz u. *orf107*) (C) transformiert wurden. Die Pflanzen sind ca. 4 Wochen alt u. weisen alle den Arabidopsis Wildtyp-Phenotyp auf.

Es gab auch keine Unterschiede in der Blütenmorphologie zum Wildtyp. Die Blüten waren wie gewöhnlich 2-3 mm lang und bestanden aus vier grünen Kelchblättern (Sepalen), vier weißen Kronblättern (Petalen), sechs Staubblättern (Stamina) und zwei zum Fruchtknoten (Pistill) verwachsenen Fruchtblättern (Carpelle) (siehe Abb. 18). Auch die Dehiszenz, das Ausschütten der Pollen und Schotenbildung nach Selbstung der Pflanzen, fand statt.

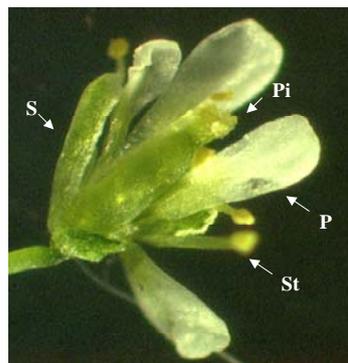


Abb. 18: Morphologie der *A. thaliana* Blüte.

Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme einer *A. thaliana* Blüte (bei 15facher Vergrößerung) mit vier Kelchblättern (Sepalen, S), vier Kronblättern (Petalen, P), sechs Staubblättern (Stamina, St) und Fruchtknoten (Pistill, Pi).

Ebenso wies der Pollen der Transformanten eine normale homogene Form und Größe auf (siehe Abb. 19 und 20). Pollen männlich steriler *A. thaliana* Pflanzen ist dagegen häufig unregelmäßig geformt und ungewöhnlich gefärbt (Moffatt und Somerville 1988; Gomez-Casati et al. 2002).

Zur Überprüfung der Pollenfertilität wurde unter anderem ein Stärke-Nachweis mit Lugol'scher Lösung (siehe Kap. 3.1.8) durchgeführt. Lugol'sche Lösung ist eine Jodjodkalium-Lösung, deren Jod-Ionen sich in helikale Stärke-Moleküle einlagern können, wodurch eine dunkle bis schwarze Färbung entsteht. Fertiler Pollen produziert besonders in der späten Entwicklungsphase viel Stärke als Speicherstoff, während steriler Pollen wenig oder überhaupt keine Stärke produziert. Sowohl reifer Pollen einer Wildtyp-Pflanze (Abb. 19A), als auch der einer Transformanten (in Abb. 19B beispielhaft an einer pCL434 Transformanten dargestellt), zeigte eine schwarze Färbung, was auf eine normale Stärkeablagerung und männliche Fertilität hinweist. Bei den transgenen Arabidopsis Pflanzen, die mit den übrigen *orf107*-Vektorkonstrukten transformiert waren, konnte ebenfalls die auf männliche Fertilität hindeutende Pollenfärbung erzielt werden.

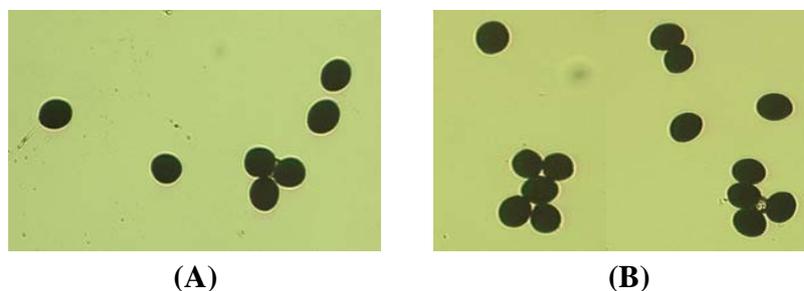


Abb. 19: Pollenfärbung mit Lugol'scher Lösung.

(A) Färbung von Pollen aus einer *A. thaliana* Wildtyp-Pflanze, (B) Pollenfärbung einer pCL434-Transformanten mit konstitutiv exprimierter *atp2-1* Signalsequenz und *orf107*. Beide Pollen-Arten sind schwarz gefärbt, was auf Stärkeablagerung und männliche Fertilität hindeutet, und sind gleich groß und geformt. Vergrößerung: 20x.

Als weiterer Nachweis der Vitalität und Fertilität wurde eine „Alexander“ Färbung reifer Pollenkörner durchgeführt (siehe Abb. 20). Diese Färbemethode basiert auf der Anwesenheit und Dichte des intakten Cytoplasmas. Die Färbelösung enthält Malachitgrün, das Cellulose in den Pollenwänden anfärbt, und Säurefuchsin, welches das Protoplasma

des Pollens anfärbt. Somit kann bei dieser Färbung Pollen, der früh in der Entwicklung abgestorben ist und kein Cytoplasma entwickelt hat (schwach Grün), von reifen Pollenkörnern (dunkel Purpur) unterschieden werden (Alexander 1969; Alexander 1980).

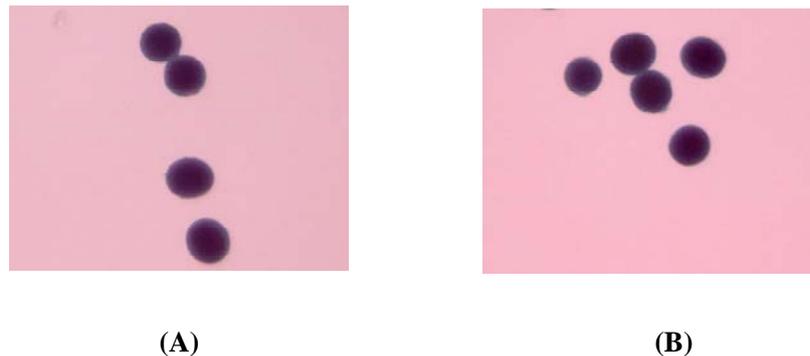


Abb. 20: Pollenfärbung mit Alexander Lösung.

(A) Färbung von Pollen aus einer *A. thaliana* Wildtyp-Pflanze, (B) Pollenfärbung einer pCL434-Transformanten mit konstitutiv exprimierter *atp2-1* Signalsequenz und *orf107*. Beide Pollen-Arten sind dunkel Purpur gefärbt, was auf intaktes Cytoplasma hindeutet, und gleich groß. Vergrößerung: 40x.

Reifer Pollen der Wildtyp-Pflanze (Abb. 20A), der Transformante (Abb. 20B) und der anderen transgenen Pflanzen konnte durch die „Alexander“ Färbung dunkel Purpur gefärbt werden.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Pollenfertilität ist die Messung der Fähigkeit von Pollenkörnern, *in vitro* zu keimen und Pollenschläuche auszubilden (Gomez-Casati et al. 2002). Dabei werden Pollenkörner in flüssigem Keimungsmedium oder festem Agarosemedium mit dem Lichtmikroskop untersucht und die Anzahl gekeimter Pollenkörner sowie ungekeimter ermittelt. In dieser Studie wurden drei verschiedene Keimungsmedien in flüssigem und festen Zustand benutzt (Brewbaker und Kwack 1963; Fan et al. 2001; Schreiber und Dresselhaus 2003). Obwohl bei Verwendung dieser Keimungsmedien von einer bis zu 98 prozentigen Keimungsrate der *A. thaliana* Pollen berichtet wird, konnte bei Wildtyp-Pollen und Pollen aus Transformanten gleichermaßen nur eine maximale Keimungsrate von 20% erreicht werden (nicht gezeigt).

Die untersuchten *A. thaliana* Transformanten der F₀-Generation zeigten folglich keinerlei Charakteristika männlich steriler Pflanzen, wie z. B. verkürzte Antheren (Stintzi und Browse 2000) oder geschlossen bleibende Blüten und nur gering keimungsfähiger Pollen (Gomez-Casati et al. 2002).

Auch bei *A. thaliana* F₁ Pflanzen, die *orf107* mit mitochondrialer *coxIV* Signalsequenz unter Kontrolle des A9 Promotors exprimierten, konnte Samenbildung und somit männliche Fertilität beobachtet werden (Kempken, pers. Mitteilung). Die F₁-Generation wurde analysiert, um zu überprüfen, ob das dort homozygote *orf107* Gen aufgrund eines höheren Gen-Dosiseffektes CMS auslösen kann. Die Phenotypen von Wildtyp-Pflanzen und transgenen F₁ Pflanzen sind in Abbildung 21 dargestellt. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnten die F₁-Generationen der mit den übrigen Vektorkonstrukten transformierten Pflanzen nicht mehr analysiert werden.

Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass *orf107* aus der Hirse bei keiner der verwendeten Expressionsstrategien in dem heterologen System *A. thaliana* CMS auslösen konnte.

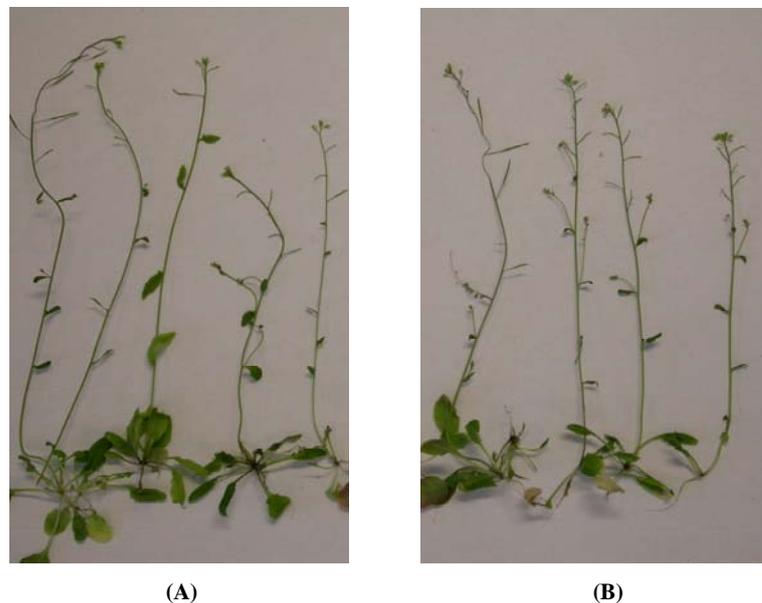


Abb. 21: Phenotyp von Wildtyp- und transgenen Arabidopsis Pflanzen der F₁ Generation.

Die Abbildung zeigt Wildtyp-Pflanzen (A) und transgene F₁-Pflanzen, die mit dem Plasmid pKS372 (mit A9 Promotor, *coxIV* Signalsequenz u. *orf107*) (B) transformiert wurden. Die Pflanzen sind ca. 8 Wochen alt u. weisen alle den Arabidopsis Phenotyp und Samenbildung auf. Abbildung zur Verfügung gestellt von F. Kempken.

4.5 Nachweis der *orf107* Translation in transgenen Pflanzen

Das ORF107 Protein hat wohl vermutlich aufgrund des Hydrophathie-Profiles nach Kyte und Doolittle (1982) und der Homologie zum ATP9 (Tang et al. 1996b) zwei transmembrane Domänen, die ein Loop von Aminosäure 27 bis 39 verbindet (siehe Abb. 33 im Anhang). Lediglich der 35 Aminosäuren lange, zum ORF79 aus Reis homologe Abschnitt im Anschluss an die zweite Transmembrandomäne wäre vermutlich für eine Expression löslichen Proteins z.B. in *E. coli* verwendbar, das man dann für eine Immunisierung von Mäusen einsetzen könnte. Abgesehen von der starken Hydrophobizität wäre der N-terminale Anteil wegen der Ähnlichkeit zum ATP9 nicht verwendbar, da man eine Kreuzreaktivität mit dem ATP9-Protein befürchten müsste. Bisher wurde kein ORF107-spezifischer Antikörper erstellt.

Mangels ORF107-spezifischer Antikörper ist der direkte Nachweis des ORF107 Proteins in Pflanzen nicht möglich. Um dennoch die rekombinante Expression des ORF107 in transgenen Linien nachweisen zu können, wurde ein Reporter-Konstrukt durch Kombination der kodierenden Sequenz des *orf107* mit einem Biotag hergestellt (siehe Kap. 4.5.1). Durch „*in organello*“-Studien an Mitochondrien, die aus einer männlich sterilen Hirse Linie mit A3 Cytoplasma isoliert wurden, konnte jedoch ein 12 kDa Polypeptid nachgewiesen werden (Bailey-Serres et al. 1986). Diese Größe korrespondiert mit der angenommenen Größe des *orf107* Genproduktes.

4.5.1 Herstellung eines *orf107*-Biotag-Vektors

Zum Nachweis der Expression des ORF107 Proteins wurde das Vektorkonstrukt pKS348 (Abb. 22) hergestellt. Dieses Konstrukt enthält den CaMV35S-Promotor, die *coxIV* Signalsequenz und die kodierende *orf107*-Sequenz fusioniert mit einer Biotag-Sequenz prokaryotischer Herkunft (Ackerman et al. 1992). Bei der Biotag-Sequenz aus *Propionibacterium shermanii* handelt es sich um eine 1.3S Biotinylierungs-Untereinheit der Transcarboxylase (EC 2.1.3.1), einem Enzym der Propionsäure-Fermentation. Diese Sequenz führt zur Bindung von Biotin, welches spezifisch mit Neutravidin interagieren kann.

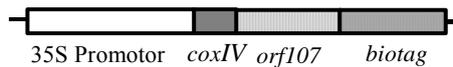


Abb. 22: Reporterkonstrukt pKS348 zum Nachweis der ORF107 Expression.

Abgebildet ist die in der T-DNA enthaltene Expressionskassette, bestehend aus dem CaMV35S-Promotor, der mitochondrialen *coxIV*-Signalsequenz und der kodierenden *orf107*-Sequenz fusioniert mit einer Biotag-Sequenz.

Bei Verwendung von Neutravidin, das mit einer Peroxidase gekoppelt ist, kann nachfolgend die Detektion des biotinylierten Proteins durch den Umsatz eines Chemilumineszenz- bzw. Farbsubstrats erfolgen.

4.5.2 Chemolumineszente Analyse

Nach der Transformation von *A. thaliana* Pflanzen mit dem Vektorkonstrukt pKS348 wurde Gesamtprotein aus den Blättern von Transformanten mit bzw. ohne Zugabe des Detergenz SDS zum Extraktionspuffer isoliert (siehe Kap. 3.2.5). Als Kontrolle diente der Proteinextrakt aus einer Arabidopsis Wildtyp-Pflanze. Im Anschluss an die Auftrennung auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (vergleiche Kap. 3.2.6.2), Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und Inkubation des Western-Blots mit dem Peroxidase-gekoppelten Neutravidin erfolgte die Detektion durch Chemolumineszenz (siehe Kap. 3.2.12). In Abbildung 23A ist das Ergebnis der so erfolgten Detektion aus einer Wildtyp-Pflanze (Wt) ohne SDS (-SDS) und aus einer Transformanten (T52) ohne bzw. mit SDS (+SDS) dargestellt. In den beiden Spuren, die mit je 15 µg der Proteinextrakte aus der Transformanten beladen wurden, konnte eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 17 kDa nachgewiesen werden, die in der Wildtyp Kontrolle nicht detektiert wurde. Die Größe des Proteins entspricht der zu erwartenden Größe des ORF107-Biotag Fusionsproteins, das aus dem ca. 12 kDa ORF107 plus dem ungefähr 5 kDa Biotag Protein besteht. Die weiteren Banden, die bei Verwendung von Gesamtproteinextrakten aus der Wildtyp-Pflanze und ebenso bei der Transformante auftraten, könnten auf diverse andere biotinylierte Proteine in den Pflanzen-Extrakten zurückzuführen sein. Unter Verwendung des SDS-haltigen Puffers konnte ein deutlich

stärkeres Signal erhalten werden. Dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei dem ORF107 Protein um ein Membranprotein handelt (Pring et al. 1999).

Nach dem erfolgten Nachweis des ORF107-Biotag Proteins in einer pKS348-Transformanten wurde das Experiment mit je 30 μ g derselben und zwei weiteren Transformanten sowie zur Kontrolle wieder einer Wildtyp-Pflanze wiederholt (Abb. 23B). Da bei dem ersten Nachweis die Isolation des Fusionsproteins mit SDS Zusatz wesentlich effizienter war, wurden die Proteine diesmal ausschließlich mit SDS isoliert. Bei den drei Transformanten (T52-T54) konnte wiederum die Bande des 17 kDa ORF107-Biotag Proteins nachgewiesen werden, jedoch nicht bei dem Wildtyp.

Die *orf107* Translation konnte somit indirekt durch Biotinylierung eines ORF107-Biotag Fusionsproteins nachgewiesen werden.

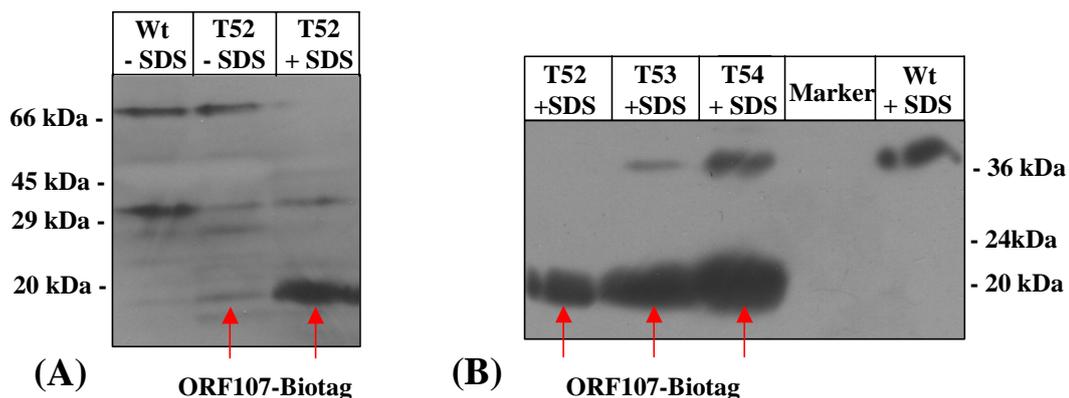


Abb. 23: Nachweis des biotinylierten ORF107-Biotag Proteins.

Die Proteine wurden aus Blättern isoliert (siehe Kap. 3.2.5), auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kap. 3.2.6.2), auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Neutravidin versetzt (vergleiche Kap. 3.2.12). Es wurden jeweils 15 μ g pflanzliches Gesamtprotein in (A) bzw. 30 μ g in (B) aufgetragen. Dargestellt ist ein Autoradiogramm nach Hybridisierung des Western-Blots mit Peroxidase-gekoppeltem Neutravidin und nachfolgendem Nachweis durch Chemolumineszenz. (A) Eine effiziente Isolation des 17 kDa ORF107-Biotag Fusionsproteins aus einer Arabidopsis Transformante (T52) war nur möglich, wenn dem Extraktionspuffer SDS hinzugefügt wurde. In dem Proteinextrakt einer Wildtyp-Pflanze (Wt) konnte das entsprechende Protein nicht nachgewiesen werden. (+SDS: Aufarbeitung mit SDS, -SDS: Aufarbeitung ohne SDS). (B) Proteinaufarbeitungen aus drei Transformanten (T52-T54) und einer Wildtyp-Pflanze (Wt), jeweils mit SDS-Zusatz. Im Gegensatz zu den Proteinextrakten der Transformanten konnte bei dem Wildtyp kein 17 kDa Signal detektiert werden.

4.6 Import von ORF107-GFP-Fusionsproteinen in Mitochondrien

In dieser Studie sollte *A. thaliana* mit dem heterologen, ursprünglich mitochondrialen Gen *orf107* transformiert werden. Aufgrund der in dem rekombinanten *orf107*-Konstrukt eingefügten, für eine mitochondriale Importsequenz kodierenden Nukleotidsequenz sollte das hiervon im Cytoplasma translatierte ORF107 Protein in Mitochondrien importiert werden. Zur *in vivo* Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des ORF107 Proteins durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurden Vektorkonstrukte zur Expression von ORF107-GFP-Fusionsproteinen erstellt.

GFP ist ein stark fluoreszierendes Protein aus dem marinen Nesseltier *Aequorea victoria*, dessen Chromophor ein Bestandteil der Primärstruktur des Proteins ist (Ward et al. 1989). Der Vorteil des GFP als Reportergen besteht darin, dass Expressionsstudien mit nicht-invasiven Methoden in lebenden Zellen durchgeführt werden können (Chalfie et al. 1994). Außerdem ist die Fluoreszenz unabhängig von Substraten oder Cofaktoren (Prasher et al. 1992). GFP wurde schon vielfach als Fusionsprotein und Reportergen in Expressionsstudien verwendet (Übersicht in Cubitt et al. 1995). Bei den höheren Pflanzen konnte die GFP-cDNA z.B. erfolgreich in *A. thaliana* exprimiert werden (Haseloff und Amos 1995). Die optischen Eigenschaften von GFP wurden durch gezielte Aminosäureveränderungen für unterschiedliche Fragestellungen optimiert (Haseloff et al. 1997).

4.6.1 Import von ORF107 in Mitochondrien ohne Signalsequenz

Die Tatsache, dass bei konstitutiver Expression von *orf107* im Tabak auch ohne mitochondriale Signalsequenz ein schädigender Einfluss beobachtet wurde (Stockmeyer 1999), führte zu der Hypothese, dass das ORF107 Protein auch ohne das Hinzufügen einer geeigneten Signalsequenz in die Mitochondrien importiert werden könnte.

Zur transienten Expression des *orf107* ohne Signalsequenz und zur *in vivo* Bestimmung der zellulären Lokalisation von ORF107 wurde das Plasmid pKS327 hergestellt (s. Abb. 24).



Abb.: 24: Schematische Darstellung der Expressionskassette von pKS327.

Das Plasmid pKS327 entstand durch Klonierung von *orf107* in die *SalI*-Schnittstelle des Plasmids pOL-GFP-S65C (Peeters et al. 2000). Die Expressionskassette von pOL-GFP-S65C enthält den CaMV35S-Promotor (mit doppeltem Enhancer), Translations Leader (TL) des Tobacco Etch Virus, *gfp*-S65C und den CaMV35S-Terminator.

Dazu wurde die kodierende Sequenz des *orf107* aus einem cDNA-Pool der sterilen Hirselinie A3Tx398 unter Verwendung der Oligonukleotide FK228 und FK455 amplifiziert. Über die beiden Oligonukleotide wurden für die Klonierung notwendige Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *XhoI* in das Amplikon eingebracht. Zur Fusionierung dieser Sequenz mit dem *gfp* Gen wurde das PCR-Produkt in die *XhoI* kompatible *SalI*-Schnittstelle des Plasmids pOL-GFP-S65C (Peeters et al. 2000) kloniert. Mit dem Plasmid pKS327 wurden sowohl Zwiebel-Epidermen (siehe 3.2.17) als auch Tabak BY2-Zellen (siehe 3.2.18) transient transformiert. Als Nachweis des Imports eines im Cytoplasma translatierten CoxIV-GFP-Fusionsproteins nach Kerntransformation wurde hierbei ein CoxIV-GFP-Plasmid verwendet (Reichel et al. 1996).

Bei den Zwiebel-Epidermen wurde die sogenannte biolistische Transformation durch eine Genkanone („particle gun“) angewandt. Dabei werden kleine Wolfram- oder Goldpartikel, die mit DNA beschichtet sind, unter starker Beschleunigung direkt in die Zellen geschossen (Klein et al. 1987). Mit dieser Methode konnten einige transgene Getreidearten, wie z.B. Weizen oder Gerste, erhalten werden, die durch andere Techniken schwierig zu transformieren sind (Vasil et al. 1992; Ritala et al. 1994).

Die transiente Expression des ORF107-GFP-Fusionsproteins und die subzelluläre Verteilung der Fluoreszenz in den transformierten Zwiebel-Epidermen wurden *in vivo* mit einem Konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm untersucht. Fluoreszenz wurde im grünen (500-540 nm) bzw. roten (560-610 nm) Kanal detektiert (siehe Abb. 25).

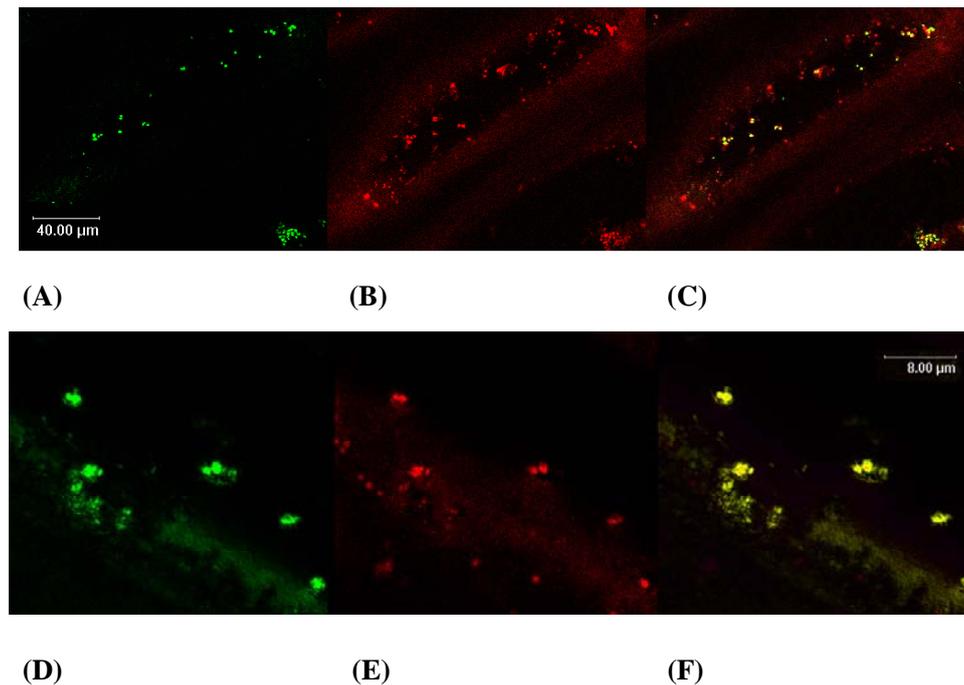


Abb.: 25: Nachweis des ORF107-GFP-Imports in Mitochondrien ohne Signalsequenz.

Die Abbildung zeigt CLSM-Mikroskopische Aufnahmen der mit pKS327 transient transformierten Zwiebel-Epidermen (siehe Kap. 3.2.17).

(A-C) Zwiebel-Epidermen, die mit dem CoxIV-GFP-Plasmid, einer Kontrolle für mitochondriales Targeting transformiert wurden. (D-F) Expression des ORF107-GFP-Fusionsproteins ohne das *coxIV* Signalpeptid. GFP (A und D)- und MitoTracker[®] Orange CM-H₂TMRos (B und E)-Fluoreszenz wurden getrennt detektiert und mittels Version 2.5 der „Leica confocal“-Software überlagert (C und F). Die Fotos wurden bei einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen. Skalierung: 40 µm (A-C) bzw. 8 µm (D-F).

Das CoxIV-GFP-Kontrollplasmid, von dem ein mitochondriales Targeting des davon erhaltenen Proteins bekannt ist, führte zu der erwarteten punktförmigen GFP-Lokalisation (Abb. 25A). Ebenso bewirkte das ORF107-GFP-Konstrukt pKS327 eine leuchtend grüne GFP-Fluoreszenz in typischen mitochondrialen Strukturen mit punktförmiger Morphologie (Abb. 25D). Dies deutet darauf hin, dass die ORF107-GFP-Fusionsproteine effizient in die Mitochondrien importiert wurden. Zur Überprüfung ob es sich bei den Strukturen mit punktförmiger Morphologie tatsächlich um Mitochondrien handelt, wurde eine Gegenfärbung mit dem für Mitochondrien spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker[®] Orange CM-H₂TMRos (Invitrogen, Karlsruhe) für lebende Zellen durchgeführt. Der Farbstoff fluoresziert nur in seiner oxidierten Form, so dass eine Akkumulation in den

Mitochondrien und die nachfolgende Oxidation auf die Identität der Organellen, die Integrität der mitochondrialen Membran und die Oxidationsfähigkeit hinweisen.

Diese Färbung bestätigte die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz in den Mitochondrien (Abb. 25B und E). Durch das Wechseln der Fluoreszenzfarbe von grün oder rot zu orange-gelb in einer Überlagerungsansicht kann die Kollokalisierung visualisiert werden (Abb. 25C und F).

Als zusätzliche Kontrolle wurden Tabak BY2-Protoplasten mit dem Vektorkonstrukt pKS327 transient transformiert (siehe Kap. 3.2.18). Protoplasten pflanzlicher Zellen lassen sich unter geeigneten osmotischen Bedingungen leicht durch enzymatischen Verdau der Zellwand mit Cellulasen herstellen und stellen nur noch vom Plasmalemma umgebenes Zellinneres dar. Sie können in Gegenwart von Polyethylenglykol oder durch Elektroporation DNA aufnehmen (Shillito et al. 1985).

Die Analyse der Tabak BY2-Protoplasten mit dem Konfokalen Laserscanning-Mikroskop zeigte die gleichen Ergebnisse wie die transformierten Zwiebel-Epidermen (Abb. 26). Sowohl bei der Kontrolle mit dem CoxIV-GFP-Kontrollplasmid (Abb. 26A) als auch nach Transformation mit dem ORF107-GFP-Konstrukt (Abb. 26D) konnte GFP-Fluoreszenz in mitochondrialen Strukturen beobachtet werden. Auch eine Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker[®] (Abb. 26B und E) bestätigte erneut, dass es sich bei den grün leuchtenden Strukturen um Mitochondrien handelte. Eine Kollokalisierung der GFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz des Farbstoffs in den Mitochondrien konnte wiederum durch eine Änderung der Fluoreszenzfarbe von grün oder rot zu orange-gelb in einer Überlagerungsansicht visualisiert werden (Abb. 26C und F).

Die beschriebenen Ergebnisse der transienten Expressionsanalysen in Tabak BY2-Zellen und Zwiebel-Epidermiszellen gaben einen direkten Hinweis auf den Import des ORF107-GFP-Fusionsproteins in Mitochondrien ohne die Verwendung einer mitochondrialen Signalsequenz.

Dieser Teil der Promotion wurde bereits veröffentlicht (Stockmeyer et al. 2005).

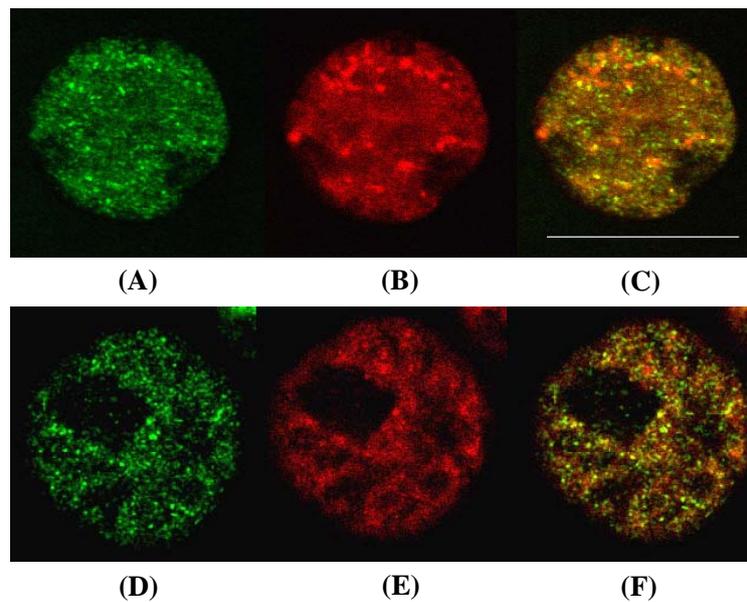


Abb. 26: *In vivo* Lokalisation von ORF107-GFP-Fusionsproteinen in Tabak BY2-Protoplasten. Die Abbildung zeigt CLSM-Mikroskopische Aufnahmen der mit pKS327 transient transformierten Tabak BY2-Protoplasten (siehe 3.2.18). (A-C) Tabak BY2-Protoplasten, die mit dem CoxIV-GFP-Plasmid, einer Kontrolle für mitochondriales Targeting transformiert wurden. (D-F) Expression des ORF107-GFP-Fusionsproteins ohne das *coxIV* Signalpeptid. GFP (A und D)- und MitoTracker[®] Orange CM-H₂TMRos (B und E)-Fluoreszenz wurden getrennt detektiert und mittels Version 2.5 der „Leica confocal“-Software überlagert (C und F). Die Fotos wurden bei einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen. Skalierung: 200 μ m.

4.6.2 Import von ORF107 in Mitochondrien mit Signalsequenz

Zur Analyse des Imports und der Lokalisierung von ORF107 in Mitochondrien *in planta* wurden stabil transformierte *A. thaliana* Linien hergestellt, die das ORF107 Protein wiederum als GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CaMV35S-Promotors und mit mitochondrialer Signalsequenz *coxIV* exprimieren.

Dabei wurde das Plasmid pKS352 (Abb. 27) verwendet, das von dem Plasmid pBIN 35S-mGFP4 (Haseloff et al. 1997) hergeleitet wurde. Bei der *mgfp4*-Kassette handelt es sich um eine Abwandlung der ursprünglichen GFP-Sequenz, bei der im Bereich eines kryptischen Pflanzenintrons unter Einhaltung der Aminosäuresequenz der AT-Gehalt dieser Region minimiert wurde (Haseloff und Amos 1995).



Abb. 27: Schematische Darstellung der Expressionskassette von pKS352. Das Plasmid pKS352 entstand aus pBIN35S-mGFP4 (Haseloff et al. 1997). Die Expressionskassette von pKS352 besteht aus *orf107*, der mitochondrialen Signalsequenz *coxIV* aus Hefe und *mgfp4* unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors.

Das Plasmid pKS352 enthält die mit FK226/FK227 PCR-amplifizierte *coxIV* Signalsequenz und die *orf107* cDNA aus der sterilen Hirselinie A3Tx398 (amplifiziert mit FK228/FK353) fusioniert mit *mgfp4*.

Die subzelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz wurde in *A. thaliana* Protoplasten (siehe 3.2.19) mit dem Konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) wiederum bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm untersucht. Fluoreszenz wurde im grünen (500-540 nm) bzw. roten (560—610 nm) Kanal detektiert (siehe Abb. 28).

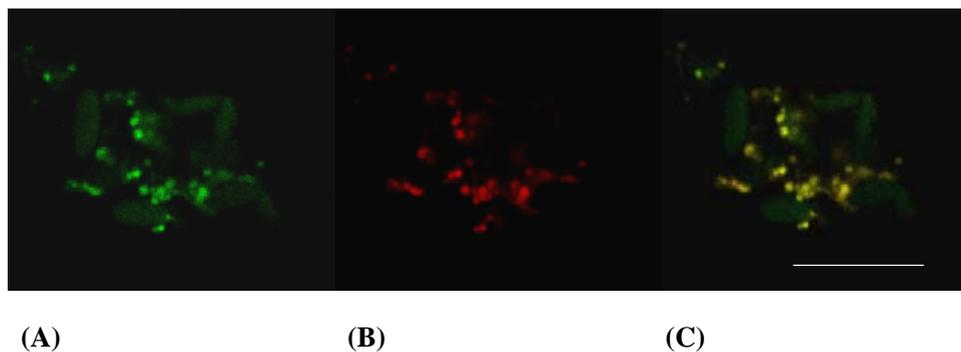


Abb. 28: Lokalisation des ORF107-GFP-Fusionsproteins in Mitochondrien.

(A-C) CLSM-Mikroskopische Aufnahmen von Protoplasten (siehe 3.2.19) stabil transformierter Arabidopsis Pflanzen. Die Pflanzen gingen aus einer Transformation mit dem Plasmid pKS352 hervor, das zu konstitutiver Expression des ORF107-GFP-Fusionsproteins mit der mitochondrialen Signalsequenz *coxIV* führt. GFP (A)- und MitoTracker[®] Orange CM-H₂TMRos (B)-Fluoreszenz wurden getrennt detektiert und überlagert (C). Die Aufnahmen wurden bei einer 40fachen Vergrößerung durchgeführt. Skalierung: 8 µm.

Unter den eingestellten Mikroskopbedingungen zeigten Protoplasten von untransformierten Arabidopsis Pflanzen keine Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Auch bei dieser Expressionsstrategie führte das ORF107-GFP Konstrukt zu grüner GFP-Fluoreszenz in den Mitochondrien (Abb. 28A). Ebenso wie bei der unter 4.6.1 erwähnten transienten Expression wurde eine Kollokalisierung von GFP- und Mitotracker-Fluoreszenz beobachtet (Abb. 28C), was wiederum verdeutlicht, dass das ORF107-GFP-Fusionsprotein in die Mitochondrien importiert wurde.

5. Diskussion

Kreuzungen von Höheren Pflanzen führen mitunter zu cytoplasmatisch männlich sterilen Pflanzen, die aufgrund einer gestörten Kern-Mitochondrien-Interaktion nicht in der Lage sind, funktionsfähigen Pollen zu bilden. CMS-Pflanzen sind wichtig für die Produktion von Hybridsamen, da keine aufwendige Entfernung der Antheren notwendig ist. Die betroffenen Linien enthalten oftmals mitochondriale offene Leserahmen, die mit der cytoplasmatisch männlichen Sterilität in Verbindung gebracht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der chimäre mitochondriale offene Leserahmen *orf107* aus *Sorghum bicolor*, der mit CMS assoziiert ist, in einem transgenen Ansatz analysiert. *Orf107* kommt nur in Mitochondrien der fertilen Linie IS1112C, die das CMS-vererbende Cytoplasma A3 enthält, vor.

Zur Untersuchung eines Effekts des ORF107 Proteins auf die mitochondriale Genexpression und Pollenentwicklung, wurde das entsprechende Gen unter der Kontrolle verschiedener Blüten- bzw. Antheren-spezifischer Promotoren und mitochondrialer Signalsequenzen in die heterologen Systeme *A. thaliana* und *N. tabacum* eingebracht. *A. thaliana* und *N. tabacum* wurden verwendet, weil beide Pflanzen Modellorganismen mit gut etablierten Transformationsprotokollen darstellen.

5.1 Die Expression von *orf107* hat keinen Einfluss auf den Phentyp und die Pollenfertilität der transgenen Pflanzen

5.1.1 Aktivität der verwendeten Promotoren in transgenen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen

In Pflanzen sind viele Promotoren konstitutiv und in jedem Gewebe aktiv, wie z.B. der CaMV35S-Promotor (Rojiyaa et al. 1987). Andere Promotoren hingegen führen zu einer Expression der von ihnen regulierten Gene in Abhängigkeit vom Gewebetyp und der Entwicklung der Pflanze.

Die Gewebespezifität von Promotoren wird häufig durch bestimmte Sequenzen verliehen (Eyal et al. 1995). So konnten in verschiedenen Pflanzenarten sogenannte „späte“ Gene, die während der späten Entwicklungsphase des Pollens aktiv sind, identifiziert werden (McCormick 1991; McCormick 1993). Zwei solcher späten Pollen-spezifischen Gene sind die Gene *LAT52* und *LAT59* aus der Tomate (Twell et al. 1990), die zur Familie der Pectatlyase-ähnlichen Gene gehören (Wing et al. 1990; McCormick 1991). Bei den Promotoren dieser Gene konnten kurze, proximale Bereiche identifiziert werden, die die Pollenspezifität verleihen (Twell et al. 1991). Durch *in vivo* Kompetitions-Experimente wurde gezeigt, dass ein *trans*-agierender Faktor mit den für die Pollen-spezifische Expression zuständigen kurzen, proximalen Sequenzen beider LAT-Promotoren interagiert. Angrenzende, stromaufwärts gelegene Elemente, die 52/56 Box in *LAT52* und die 56/59 Box in *LAT59*, modulieren die Stärke der Expression im Pollen (Twell et al. 1991). Die proximalen, für die Pollenspezifität zuständigen Promotorsequenzen und die weiter stromaufwärts gelegenen, die Transkription verstärkenden Regionen sind in den Promotoren *NT59* aus Tabak und *AT59* aus *Arabidopsis* konserviert (Kulikauskas und McCormick 1997).

Bei *APETALA3* (*AP3*) handelt es sich um ein weiteres gewebe- und entwicklungsabhängig exprimiertes Gen, das in *A. thaliana* identifiziert wurde (Jack et al. 1992). Dieses homöotische Blütengen spezifiziert die Organidentität der Antheren und Petalen. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor *LEAFY* (*LFY*), der von dem Blütenmeristem-Identitätsgen *LEAFY* kodiert wird, an einen Sequenzbereich des *AP3*-Promotors bindet (Lamb et al. 2002). Bei dem Tapetum-spezifischen *A9*-Promotor aus *A. thaliana* konnte durch *A9-gus*-Fusionen ein 329 bp Bereich identifiziert werden, der für die Gewebespezifität verantwortlich ist (Paul et al. 1992).

Des Weiteren konnte für den Promotor des Gens für die 22kDa PSST-Untereinheit des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette, der in *Arabidopsis* und der Kartoffel nukleär kodiert vorliegt, eine Pollen- und Antheren-spezifische Expression gezeigt werden. Auch in dem Promotor dieses Gens kommen bestimmte Sequenzen vor, die die Organ-spezifische Aktivität verleihen. In transgenen *Arabidopsis* Pflanzen konnte durch Experimente mit Promotor-Deletionskonstrukten gezeigt werden, dass die stromaufwärts

gelegene -200/-100 Region des PSST-Promotors für die gewebespezifische Expression verantwortlich ist (Zabaleta et al. 1998).

Zur heterologen Expression von *orf107* wurden in dieser Arbeit neben dem konstitutiven CaMV35S-Promotor die Blüten- bzw. Antheren-spezifischen Promotoren PSST (Heiser et al. 1996), A9 (Paul et al. 1992) und AP3 (Jack et al. 1992) von *A. thaliana* und LAT59 (Twell et al. 1990) aus *L. esculentum* verwendet (siehe 4.2.1). Durch histochemische GUS-Färbung von Antheren transgener *A. thaliana*- bzw. *N. tabacum*-Pflanzen, die mit Promotor-*gus*-Konstrukten (vgl. Kap. 4.2.1) transformiert worden waren, konnte die Funktionalität und Gewebespezifität der verwendeten Promotoren nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.2.2). Bei Verwendung des verstärkt im Pollen aktiven PSST Promotors trat eine durch *gus*-Expression bedingte Blaufärbung in transgenem Pollen auf. Der Tapetum-spezifische A9 Promotor hingegen bewirkte ausschließlich eine *gus*-Expression im Tapetum. Der in den Antheren und Petalen aktive AP3 Promotor zeigte ebenfalls die zu erwartende Aktivität. Auch bei dem LAT59 Promotor, der besonders in reifen Antheren und Pollen aktiv ist, konnte eine blaue Färbung in Pollen, Tapetum und angrenzendem Antherengewebe transgener Pflanzen nachgewiesen werden (vgl. 4.2.2). Die gewählten Promotoren konnten somit für eine gewebespezifische Expression des heterologen *orf107* in *A. thaliana* und *N. tabacum* verwendet werden.

5.1.2 Transkription und Translation der heterologen *orf107*-DNA

Die Expression von ORF107 bzw. des veränderten ORF107 auf transkriptionaler Ebene konnte durch RT-PCR nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.3 und 4.4.2). Auf translationaler Ebene wurde die rekombinante Expression des ORF107 in transgenen Arabidopsis-Linien durch Biotinylierung gezeigt (siehe Kap. 4.5.2). Hierzu wurde ein Reporter-Konstrukt verwendet, in dem die kodierende Sequenz des *orf107* fusioniert mit einer prokaryotischen Biotin-bindenden Sequenz vorlag (vgl. 4.5.1). Auch in anderen Systemen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, wurde schon die Methode der Biotinylierung zum Nachweis eines rekombinant exprimierten Gens angewandt. Dabei wurde COX15P, ein Protein der inneren mitochondrialen Membran, als biotinyliertes

Protein exprimiert, und durch Avidin, das mit einer Peroxidase gekoppelt war, nachgewiesen (Glerum et al. 1997).

Die Tatsache, dass eine effiziente Isolation des 17 kDa ORF107-Biotag Proteins nur nach Zugabe des Detergenz SDS möglich war (vgl. Kap. 4.5.2), unterstützt die Annahme, dass ORF107 ein Membranprotein darstellt (Pring et al. 1999). Eine Vielzahl der offenen Leserahmen, die mit CMS assoziiert sind, kodiert für hydrophobe Domänen und somit möglicherweise für Membranproteine (Levings und Vasil 1995). Auch *orf107* kodiert für ein sehr hydrophobes Protein mit zwei Transmembrandomänen (siehe Abb. 33 im Anhang). Die Wirkung solcher Membranproteine bei Auslösung von CMS könnte im nativen System darin bestehen, dass deren Einbau in die mitochondriale Membran zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und somit der Pollenentwicklung führt. Denkbar wäre auch, dass das ORF107 Protein aufgrund seiner homologen Bereiche zum mitochondrial kodierten ATP9 (Tang et al. 1996b) die Biogenese der mitochondrialen ATPase behindert, oder aber die Funktionalität der ATPase im Anschluss an den Einbau einer oder mehrerer ORF107 Proteine an Stelle der ATP9 Untereinheit beeinträchtigt.

Der konstitutive CaMV35S-Promotor führte in dieser Studie nachweislich zur Expression des ORF107-Biotag Fusionsproteins (siehe Kap. 4.5.2). Da die Biotinylierung ein post-translationaler Prozess ist (Murtif et al. 1985), ist davon auszugehen, dass auch bei Verwendung der gewebespezifischen Promotoren, deren Funktionalität nachgewiesen wurde (vgl. Kap. 4.2), das ORF107 Protein unabhängig von einer Biotinylierung exprimiert wird.

5.1.3 Phenotyp der transgenen *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

In der vorliegenden Arbeit konnte weder eine konstitutive, noch Blüten- oder Pollenspezifische Expression des *orf107* oder des modifizierten *orf107* ungeachtet der verwendeten Signalsequenzen in den transgenen Tabak- oder Arabidopsis-Pflanzen CMS auslösen. Bei den hier verwendeten Signalsequenzen handelt es sich um *coxIV* (Maarse et al. 1984) aus der Hefe für die innere Mitochondrienmembran bzw. *atp2-1* (Boutry und Chua 1985) aus *Nicotiana plumbaginifolia* für die mitochondriale Matrix. Beide

Signalsequenzen wurden schon erfolgreich bei der heterologen Expression ursprünglich mitochondrial kodierter Gene angewandt (He et al. 1996; Gomez-Casati et al. 2002).

Transgene Pflanzen zeigten keinerlei phenotypische Abweichungen vom Wildtyp (vgl. Kap. 4.3 und 4.4.3). Die regenerierten F₀-Pflanzen bildeten nach Selbstung keimungsfähigen bzw. stärkehaltigen Samen (siehe Kap.4.3 und 4.4.3). Dies bedeutet, dass die Pflanzen männlich fertil waren. Auch bei *A. thaliana* F₁-Pflanzen, die *orf107* mit mitochondrialer *coxIV* Signalsequenz unter Kontrolle des A9 Promotors exprimierten, konnte Samenbildung und somit männliche Fertilität beobachtet werden (Kempken, pers. Mitteilung). Die F₁-Generation wurde analysiert, um zu überprüfen, ob der dort homozygote *orf107* aufgrund eines höheren Gen-Dosiseffektes CMS auslösen kann.

Der Pollen der *orf107*-Transformanten zeigte eine normale homogene Form und Größe (vgl. 4.3 und 4.4.3).

In einer Studie von Gomez-Casati et al. (2002) bewirkte die Expression des mitochondrial kodierten, unedierten *atp9* Gens aus *T. sativum* unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV35-Promotors oder der Blüten-spezifischen Promotoren AP3 und A9 nach Kerntransformation von *A. thaliana* männliche Sterilität. Ebenso löste die Expression des unedierten *atp9* Gens aus *T. sativum* in transgenem Tabak CMS aus (Hernould et al. 1993; Hernould et al. 1998). Pollen männlich steriler *A. thaliana* und *N. tabacum* Pflanzen, die das unedierte *atp9* aus Weizen exprimieren, ist unregelmäßig geformt und hat eine andere Größe und Färbung als Wildtyp-Pollen (Moffatt und Somerville 1988; Hernould et al. 1993; Gomez-Casati et al. 2002). Die Morphologie dieser sterilen Pollen ist in Abb. 29 dargestellt.

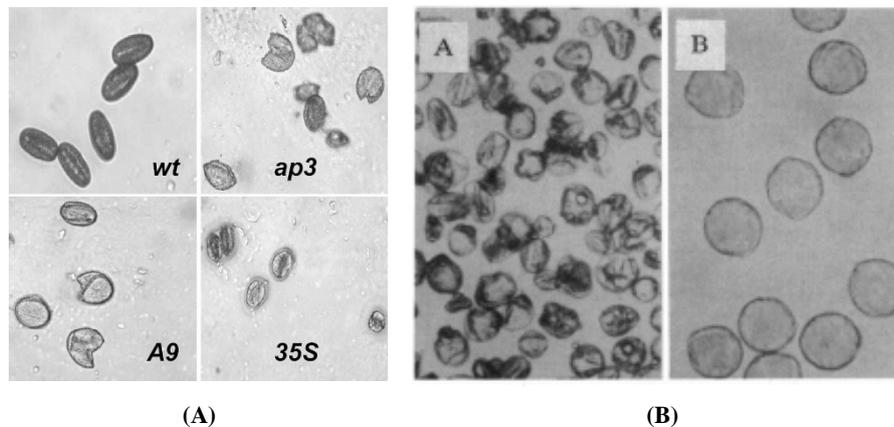


Abb. 29: Morphologie von Pollenkörnern aus *A. thaliana* und *N. tabacum* Pflanzen, die unediertes *atp9* exprimieren.

(A) Dargestellt sind Pollenkörner aus Antheren von Wildtyp-Pflanzen (wt) und männlich sterilen Transformanten, die das Transgen unter der Kontrolle der Promotoren AP3, A9 bzw. CaMV35S exprimieren. Abbildung entnommen aus Gomez-Casati et al. (2002). (B) Die Abbildung zeigt Pollenkörner aus Antheren von Transformanten, die das unedierte *atp9* unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors exprimieren (A) und von Wildtyp-Pflanzen (B). Abbildung entnommen aus Hernould et al. (1993).

Bei den transgenen *A. thaliana* Pflanzen der vorliegenden Studie wurde zur Überprüfung der Fertilität ein Stärke-Nachweis mit Lugol'scher Lösung, die aus Jodjodkalium besteht, durchgeführt (siehe Kap. 4.4.3). Die Jod-Ionen der Lugol'schen Lösung können sich in helikale Stärke-Moleküle einlagern, wodurch eine dunkle bis schwarze Färbung entsteht. In der späten Entwicklungsphase produziert fertiler Pollen viel Stärke als Speicherstoff, während steriler Pollen wenig oder überhaupt keine Stärke produziert. Bei allen untersuchten *orf107* Transformanten zeigte der Pollen eine schwarze Färbung, was auf eine normale Stärkeablagerung und männliche Fertilität hinweist. Pollenkörner männlich steriler Hirselinien (z.B. A3Tx398) lassen sich zu keinem Zeitpunkt der Pollenreife mit Jodjodkalium anfärben und haben somit einen Mangel an Stärke (Howad und Kempken 1997a; Tang et al. 1998). Die Degeneration des Pollens in der männlich sterilen Hirselinie beginnt daher möglicherweise während der frühen Reifungs-Phase, bei der Stärke synthetisiert und in die Pollen eingelagert wird. In einer Studie von Wang et al. (2006) über den CMS-assoziierten *orf79* in Reis ließ sich Pollen männlich steriler Pflanzen ebenfalls nicht oder nur sehr schwach mit Jodjodkalium anfärben. Auch eine positive

„Alexander“ Färbung, die auf Anwesenheit und Dichte des intakten Cytoplasmas basiert (Alexander 1969; Alexander 1980), ließ bei den *orf107*-Transformanten auf Pollenfertilität schließen.

In *in vitro* Keimungsexperimenten zeigte Pollen der Tabak-Transformanten mit einer durchschnittlichen Keimungsrate von 70% keinen Unterschied zu untransformierten Pflanzen. Dadurch konnte ebenfalls Pollenfertilität nachgewiesen werden. Bei männlich sterilen Tabakpflanzen beträgt die Pollenkeimung weniger als 2% (Hernould et al. 1993).

Ähnliche Ergebnisse wurden von Experimenten mit transgenem Tabak berichtet, der mit *T-urf13* aus einer *cms-T* Maislinie transformiert worden war (von Allmen et al. 1991; Chaumont et al. 1995). Das Texas Cytoplasma (*cms-T*) von Mais, das zuerst in Texas bei der „Golden June“ Linie beschrieben wurde (Rogers und Edwardson 1952), trägt das CMS Merkmal. Pflanzen mit *cms-T* reagieren sensitiv auf ein von *Bipolaris maydis* Rasse T produziertes Pilztoxin und das Insektizid Methomyl (Wise et al. 1987a; Levings 1990). Das chimäre Gen *T-urf13* kodiert für das 13 kDa Polypeptid URF13, welches nicht essentiell und ein Bestandteil der inneren mitochondrialen Membran ist (Dewey et al. 1987a; Wise et al. 1987a).

URF13 wird mit dem *cms-T* Typ der CMS und der Krankheitsanfälligkeit in Verbindung gebracht. Dieses Protein könnte z. B. die mitochondriale Entwicklung durch Reduktion der mitochondrialen Leistung behindern, insbesondere wenn während dieses Entwicklungsstadiums der Bedarf an Energie hoch ist (Levings 1990). Es ist zudem möglich, dass eine Antheren-spezifische Substanz mit URF13 interagiert und eine Permeabilisierung der inneren mitochondrialen Membran, ähnlich einem Gift oder Methomyl, bewirkt. Das wiederum könnte zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien und zum Pollensterben führen (Flavell 1974). Von den Tabakpflanzen, die URF13 unter Kontrolle des CaMV-35S Promotors mit oder ohne eine mitochondriale Signalsequenz exprimierten, waren einige partiell oder vollständig männlich steril, die Mehrzahl der Pflanzen aber war fertil (Chaumont et al. 1995). Eine DNA Analyse der Nachkommenschaft steriler transgener Pflanzen zeigte, dass das Merkmal der Sterilität nicht mit der Anwesenheit des *urf13* Gens verbunden ist. Durch *in vitro* Zellkultur oder Zellregeneration können gelegentlich Veränderungen des Genoms hervorgerufen werden, die der Grund für die Pollensterilität sein können. Dies könnte bedeuten, dass URF13 in transgenem Tabak keine männliche Sterilität hervorruft, was evtl. auf das Fehlen eines

Antheren-spezifischen Faktors zurückzuführen ist (Chaumont et al. 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit könnte das Fehlen einer Antheren-spezifischen Substanz, die mit dem *orf107* Genprodukt interagiert (Kempken und Pring 1999), Grund für das Ausbleiben eines schädigenden Einflusses auf die Pollenentwicklung sein. Da in der URF13-Studie der CaMV35S-Promotor verwendet wurde, der in sporogenem Gewebe nur schwach exprimiert wird (von Allmen et al. 1991; Wintz et al. 1995), könnte auch die Menge an gebildetem URF13 in den Antheren-Zellen für einen schädigenden Effekt nicht ausreichend gewesen sein (Chaumont et al. 1995). In der vorliegenden Studie wurden neben dem konstitutiven CaMV35S-Promotor die beiden Blüten- bzw. Antheren-spezifischen Promotoren AP3 und A9 verwendet, die schon bei der Expression von „unediertem“ ATP9 zu CMS führten (Gomez-Casati et al. 2002). Es ist dennoch möglich, dass trotz verstärkter Aktivität dieser Promotoren in Petalen und Antheren (Jack et al. 1992) bzw. im Pollen (Paul et al. 1992) in den *orf107*-Transformanten die Menge an gebildetem heterologen ORF107 pro Zelle verglichen mit der großen Anzahl an Mitochondrien zu gering für einen schädigenden Effekt war. Die Stärke der Expression eines Proteins nach T-DNA-Integration hängt zudem nicht nur von dem verwendeten Promotor ab, sondern auch von dem Bereich des pflanzlichen Genoms, in dem die DNA integriert hat. So gibt es z.B. sehr Transkriptions-aktive und weniger aktive Bereiche.

Auch die Expression der CMS-assoziierten *urfS*-Sequenz, einem Teil des mitochondrialen zusammengesetzten *pcf* Gens in der Petunie (Young und Hanson 1987), konnte in transgenen Petunien und Tabak keine männliche Sterilität induzieren (Wintz et al. 1995). Die Autoren sahen eine falsche Lokalisation des URFS Proteins als Grund für einen ausbleibenden Effekt an. Zur Expression von *urfS* wurden der CaMV35S- bzw. ein Tapetum-spezifischer Promotor und zwei verschiedene Signalsequenzen verwendet. Bei den transgenen Pflanzen fraktionierte das von *urfS* kodierte 25 kDa Protein hauptsächlich in der löslichen Fraktion, während es in CMS Petunien auch im membranösen Anteil unreifer Knospen zu finden ist. In fertilen transgenen Pflanzen wurde es in der Tapetumschicht post-meiotischer Antheren exprimiert, während in CMS Pflanzen das endogene Protein sowohl in der Tapetumschicht als auch in sporogenem Gewebe pre-meiotischer Antheren exprimiert wird. In der vorliegenden Studie könnte eine falsche Lokalisation des ORF107 Genproduktes ebenfalls ein Grund für den nicht vorhandenen negativen Effekt auf die Pollenfertilität sein (vgl. Kap 5.1.4).

Im Gegensatz zu den beschriebenen Experimenten mit CMS-assoziierten Genen, die keine männliche Sterilität in heterologen Systemen hervorriefen, hatte das *orf239* Gen aus *Phaseolus vulgaris* einen negativen Effekt auf die Pollenentwicklung in transgenem Tabak (He et al. 1996). In männlich sterilen Phaseolus-Linien ist *orf239* ein Teil der mitochondrialen *pvs*-Sequenz unbekannter Herkunft (Chase und Ortega 1992; Johns et al. 1992). Das ORF239 Protein kommt ausschließlich in reproduktiven Geweben vor. Es wird angenommen, dass es die normale Pollenentwicklung beeinflusst und männliche Sterilität bewirkt (Abad et al. 1995). Mit dem *orf239* Gen transformierte Tabakpflanzen zeigten einen semi-sterilen oder komplett männlich sterilen Phenotyp, ungeachtet einer Verwendung oder Nicht-Verwendung einer mitochondrialen Zielsequenz (He et al. 1996). Ebenso zeigten transgene Reislinien, die das *orf79* Gen exprimierten, gametophytische männliche Sterilität (Wang et al. 2006). Die betreffenden Linien wiesen einen semi-männlich sterilen Phenotyp auf, dessen Pollen zu 50% oder mehr steril war. Das *orf79* Gen kommt in *Oryza sativa* mit Boro II Cytoplasma vor. Es wird zusammen mit einem verdoppelten *atp6* Gen (*B-atp6*) (Kadowaki et al. 1990; Iwabuchi et al. 1993) transkribiert, und kodiert für ein cytotoxisches Protein (Akagi et al. 1994). Für diese CMS-Linien wurden bereits zwei Restorer Gene (*Rf1a* und *Rf1b*) identifiziert (Kazama und Toriyama 2003; Wang et al. 2006), die zur Familie der „Petantricopeptide Repeat“ Proteine (PPR) gehören (Small und Peeters 2000). PPR-Proteine sind z.B. auch verantwortlich für die Wiederherstellung der Fertilität in *Petunia* (Bentolila et al. 2002) und *Raphanus* (Brown et al. 2003; Koizuka et al. 2003). Vermutlich kodieren viele PPR-Gene für RNA-Bindeproteine und spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Organellen (Lurin 2004; Schmitz-Linneweber et al. 2005). Die männliche Fertilität kann durch Blockierung der ORF79 Produktion durch endonukleolytisches Spalten (RF1A) oder Abbau (RF1B) der dicistronischen *B-atp6/orf79* mRNA wiederhergestellt werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit vorgenommenen Kerntransformation von *N. tabacum* und *A. thaliana* mit dem sonst mitochondrial kodierten ORF107 aus *S. bicolor* kann ein mitochondrial lokalisierter Einfluss von Restorer-Gen-Produkten auf die ORF107 RNA-Stabilität ausgeschlossen werden. Möglich wäre hingegen, dass die cytoplasmatische Translation des ORF107 durch solche kernkodierten Restorer-Proteine inhibiert würde. Da jedoch eine Translation des ORF107-Biotag-Konstrukts in den hiermit transformierten Pflanzen nachgewiesen wurde (vgl. Kap. 4.4.2), kann davon ausgegangen werden, dass

auch entsprechende weitere *orf107*-Konstrukte in den jeweiligen transgenen Pflanzen transkribiert und translatiert wurden.

Gomez-Casati et al. (2002) fanden heraus, dass die Expression des mitochondrial kodierten, unedierten *atp9* Gens aus *T. sativum* unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV35-Promotors oder der Blüten-spezifischen Promotoren AP3 und A9 nach Kerntransformation von *A. thaliana* männliche Sterilität auslöst. Die betroffenen Pflanzen zeigten bei der Verwendung der Blüten-spezifischen Promotoren ein normales vegetatives Wachstum, während der konstitutive Promotor zu einem gestauchten Wuchs führte. Die Blüten der Pflanzen blieben geschlossen, wiesen Abweichungen von der normalen Morphologie auf und zeigten damit einen CMS-Phenotyp. Ebenso bewirkte die Expression des unedierten *atp9* Gens aus *T. sativum* in transgenem Tabak CMS (Hernould et al. 1993; Hernould et al. 1998). Es wird angenommen, dass das modifizierte ATP9 Protein mit endogenem um den Einbau in den ATP-Synthase-Komplex konkurriert, wodurch eine gemischte Population funktionsfähiger und nicht funktionsfähiger Komplexe entsteht. Es kann auch sein, dass das nicht-edierte ATP9 in die innere Mitochondrienmembran inseriert und einen Protonenkanal formt, durch den der H^+ -Gradient unterbrochen wird (Hernould et al. 1993).

Allerdings konnten diese Daten in unserer Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.4 Ist das ORF107 Protein trotz der verwendeten Signalsequenzen an falscher Stelle lokalisiert?

Orf107 ist in der Hirse in den Mitochondrien lokalisiert, wird dort in der Matrix translatiert und in die innere mitochondriale Membran inseriert. Bei der heterologen Expression von *orf107* in *orf107*-Kern-Transformanten von *A. thaliana* oder *N. tabacum* wurden zwei mitochondriale Targeting-Sequenzen zum Import des ORF107 Proteins in die Mitochondrien benutzt: die Signal-Sequenz von *coxIV* (Maarse et al. 1984) aus der Hefe für die innere Mitochondrienmembran bzw. von *Nicotiana plumbaginifolia atp2-1* (Boutry und Chua 1985) für die mitochondriale Matrix.

Durch Daten mit ORF107-GFP-Fusionsproteinen in fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass das heterologe, im Cytoplasma translatierte ORF107 Protein

in die Mitochondrien von *A. thaliana* importiert wird (siehe 4.6). Es ist jedoch nicht klar, ob das ORF107 Protein auch korrekt in die innere Mitochondrienmembran inseriert wird.

Die innere Membran der Mitochondrien beinhaltet eine große Anzahl verschiedenster Proteine. Einige dieser Proteine werden vom mitochondrialen Genom kodiert und müssen nach ihrer Synthese in der Matrix in die Lipid-Doppelschicht inseriert werden. Zu den mitochondrial kodierten Proteinen gehören z.B. Untereinheiten der respiratorischen Kette und der ATP-Synthase. Die meisten Proteine der inneren Membran werden jedoch nukleär kodiert, im Cytoplasma synthetisiert und nach dem Import in die Mitochondrien in die Enzymkomplexe eingebaut (Schatz und Dobberstein 1996; Neupert 1997; Jensen und Johnson 2001). An dem Import sind zwei Translokasen beteiligt: die Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex; Dekker et al. 1998) und die Translokase der inneren Membran (TIM-Komplex; Berthold et al. 1995).

Mit Hilfe von Signalsequenzen werden die nukleär kodierten Proteine zu den Mitochondrien geleitet. Viele Matrix-Proteine besitzen eine Aminoterminal, positiv geladene Signalsequenz (Neupert 1997), die gewöhnlich von einer in der Matrix lokalisierten Protease (matrix processing peptidase, MPP) während oder nach dem Import abgespalten wird (Taylor et al. 2001). Einige Proteine der inneren Mitochondrienmembran tragen eine hydrophobe Signalsequenz, die in manchen Fällen zu einem Abbruch der Translokation über die innere Membran führt (Glick et al. 1992; Gärtner et al. 1995). Die Signalsequenz wird dann durch die MPP abgespalten und das Protein wird in die innere Membran inseriert. Alternativ gibt es Proteine der inneren mitochondrialen Membran, die zunächst in die Matrix transloziert und von dort zurück in die innere Membran exportiert werden (Herrmann et al. 1995; Rojo et al. 1995; Stuart und Neupert 1996; Herrmann et al. 1997).

Die Insertion von mitochondrial- und nukleär kodierten Proteinen in die innere mitochondriale Membran erfolgt durch die Translokase OXA1 (Hell et al. 1998; Hell et al. 2001; Szyrach et al. 2003). OXA1 ist ein Protein der inneren mitochondrialen Membran, welches Mitglied der Familie der OXA1/YIDC/ALB3 Proteine ist. Derartige Proteine vermitteln die Insertion von Proteinen in mitochondriale, bakterielle und chloroplastidäre Membranen (Luirink et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ribosomen an den OXA1 Komplex cotranslationale Proteininsertionen in den Mitochondrien ermöglicht (Szyrach et al. 2003). OXA1 durchspannt die innere Membran

fünfmal, wobei die aus ca. 100 Aminosäuren zusammengesetzte C-terminale Domäne in die Matrix hineinreicht (Herrmann et al. 1997; Jia et al. 2003). Der in der Matrix gelegene C-Terminus formt eine α -helikale Domäne, welche die mitochondrialen Ribosomen nahe der Polypeptid-Ausgangsseite binden kann (Jia et al. 2003). Einen ersten Hinweis auf einen cotranslationalen Insertionsmechanismus gaben elektronenmikroskopische Studien, die eine bevorzugte Lokalisation translationsaktiver Ribosomen nahe an der inneren mitochondrialen Membran aufzeigten (Watson 1972). Ein Modell der cotranslationalen Protein-Insertion ist in Abb. 30 dargestellt.

OXA1 ist essentiell für die Biogenese des Cytochrom-Oxidase Komplexes (Bauer et al. 1994; Bonnefoy et al. 1994). Durch Entfernen der C-terminalen Domäne wurde die Effizienz der Membraninsertion von COX2 stark verringert (Szyrach et al. 2003). Während OXA1 für die Integration von COX2 in die Membran absolut essentiell ist, inserieren andere Polypeptide, wie z.B. COX1, COX3, Cytochrom b und ATP6 auch in Abwesenheit von OXA1 in die innere Membran, wenn auch auf einem reduzierten Level (Hell et al. 2001).

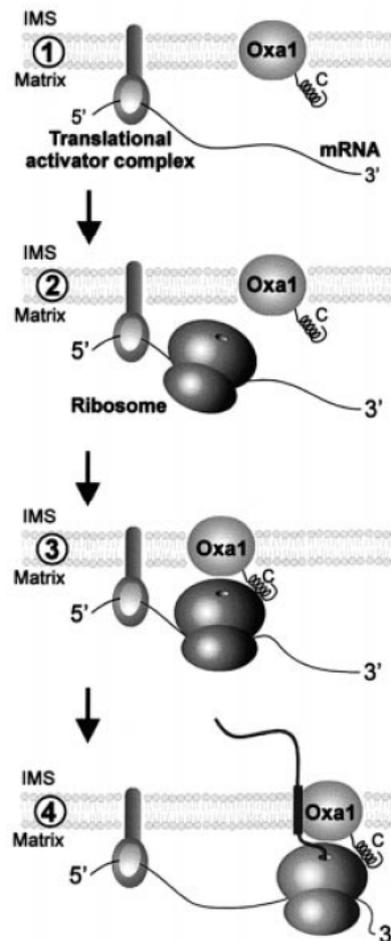


Abb. 30: Modell der cotranslationalen Protein-Insertion in die innere mitochondriale Membran.

(1) Membran-gebundene translationale Aktivatoren binden den 5'-untranslatierten Bereich mitochondrialer mRNAs und geleiten die Transkripte zur Matrix-Flanke der inneren Membran. (2) An die Bindung des translationalen Aktivators schließt sich die Initiation der Translation an. (3) Die Nähe der Ribosomen zur Membran ermöglicht ihre Bindung an die OXA1 Translokase mittels derer C-terminaler Matrix-Domäne. Alternativ könnten die Ribosomen schon vor der Initiation der Translation mit OXA1 verbunden sein. (4) Die Bindung des Ribosoms mit der OXA1 Translokase erleichtert die cotranslationale Insertion der in der Entstehung befindlichen Polypeptide. Diese physikalische Kopplung zwischen Translation und Translokation könnte das Targeting der Translations-Produkte unterstützen und/oder eine unkorrekte Faltung sehr hydrophober Polypeptide verhindern. IMS: Intermembran-Raum. Abb. entnommen aus Szyrach et al. (2003)

Zusätzlich beteiligt an der cotranslationalen Proteininsertion ist MBA1, ebenfalls ein Protein der inneren Mitochondrienmembran (Preuss et al. 2001; Herrmann und Neupert 2003). Dieses Protein bindet an die große Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen. Dabei kooperiert es mit der C-terminalen Ribosomen-bindenden Domäne von OXA1 (Ott et al. 2006).

Zudem vermittelt OXA1 auch die posttranslationale Insertion einiger nukleär kodierter Proteine, die durch einen Export-artigen Schritt aus der Matrix in die innere mitochondriale Membran gelangen (Hell et al. 1998). Durch Entfernung der C-terminalen Domäne wurde die Membraninsertion des nukleär kodierten SU9(1-112)-DHFR Proteins reduziert. Dies deutet darauf hin, dass auch bei diesem Prozess eine Interaktion des Proteins mit der C-terminalen Domäne von Bedeutung ist (Szyrach et al. 2003).

In dem experimentellen System dieser Studie wurde ORF107 aus der Hirse, ein Protein mitochondrialer Herkunft, in die Mitochondrien von *N. tabacum* bzw. *A. thaliana* importiert. Es ist möglich, dass das importierte ORF107 Protein vielleicht aufgrund fehlender Interaktion mit der C-terminalen OXA1-Domäne nicht korrekt oder nur unzureichend in die innere Mitochondrienmembran eingebaut wurde. Dies würde gut erklären, warum die heterologe Expression von *orf107* keinen Effekt auf die männliche Fertilität bewirkt.

5.1.5 Das *orf107* Transkript lag nicht vollständig ediert vor

Die Sequenzierung der in dieser Studie verwendeten *orf107* cDNA zeigte, dass die der cDNA Synthese zugrundeliegende *orf107* mRNA aus der Hirse *S. bicolor* an der zweiten von vier Edierungsstellen (Tang et al. 1996b) nicht ediert vorlag (vgl. 4.1.1). Die *orf107* cDNA stammte aus der sterilen Hirselinie A3Tx398. In dieser Linie wird die zweite, in dem *atp9* homologen Bereich gelegene Edierungsstelle (Position 59) nie vollständig, sondern nur zu 14% ediert (Tang et al. 1996b). Demnach entspricht das Ergebnis der Sequenzierung des cDNA Klons den statistischen Erwartungen.

In Annäherung an die in *S. bicolor* gehäuft vorliegende, unedierte Edierungsstelle an dieser Position des *orf107* Transkripts wurde die *orf107* cDNA nicht durch *in vitro* Mutagenese an dieser Position verändert, sondern so für die heterologe Expression verwendet.

Von den vier Edierungsstellen befinden sich zwei in dem zum *atp9* Gen homologen Bereich, zwei weitere liegen im Bereich des Gens, der keine Homologie zu bekannten Genen aufweist. Die erste Edierungsstelle (Position 35) ist im *atp9* homologen Bereich lokalisiert und wird auch in dem *atp9* Transkript ediert (Salazar et al. 1991). In den verschiedenen Hirselinien wird diese Position zu 90% bis 100% ediert (Tang et al. 1996b;

Pring et al. 1998). Bei der zweiten, ebenfalls in dem *atp9* homologen Bereich gelegenen Edierungsstelle (Position 59) beträgt die RNA-Edierung wie zuvor erwähnt in der sterilen Linie A3Tx398 14% und in der fertilen Linie IS1112C 0% (Pring et al. 1998). Die Edierungsstellen drei und vier (Position 116 und 118) liegen im Genbereich unbekannter Herkunft und weisen eine linienspezifische RNA-Edierung auf. Dabei sind an diesen Stellen die Primär-Transkripte in den sterilen Linien A3Tx398 und A3Tx7000 stärker ediert, als in der fertilen Linie IS1112C sowie in partiell fertilen Linien (Pring et al. 1998). Die *atp6*-RNA-Edierung ist in der Hirse liniens- und gewebespezifisch und in Antheren der cytoplasmatisch männlich sterilen Linie A3Tx398 stark reduziert (Howad und Kempken 1997a).

Eine linienspezifische RNA-Edierung kommt auch bei anderen Pflanzenarten vor, wie z.B. Raphanus (Krishnasamy et al. 1994) oder Petunia (Lu und Hanson 1992; Wilson und Hanson 1996).

Die Restoration der Fertilität erfolgt in der Hirse durch ein gametophytisches System bestehend aus zwei Genen (*Rf3* und *Rf4*), die komplementär agieren (Pring et al. 1999). In männlich sterilen Linien, die *Rf3* tragen, oder Linien, bei denen die Fertilität wiederhergestellt wurde, tritt eine verstärkte nukleolytische Transkript-Prozessierung innerhalb des *orf107* auf. Dadurch werden 75% des kompletten Transkripts gespalten. Somit verleiht oder reguliert *Rf3* die nukleolytische Prozessierungsaktivität. Ein Zusammenhang der Frequenz der RNA-Edierung an den Edierungsstellen drei und vier in *orf107* und der Transkript-Prozessierung deutet darauf hin, dass die Prozessierung möglicherweise von Transkripten abhängt, die an diesen Stellen ediert sind.

Grund dafür könnte eine durch die Edierung bedingte Veränderung der Sekundärstruktur des *orf107* Transkripts sein (Pring et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen RNA-Edierung und Transkript-Prozessierung konnte auch in Reislinien beobachtet werden, die das männlich sterile Cytoplasma Chinsurah Boro II tragen. Das B-*atp6* Transkript wird dort durch das *Rf1* Gen endonukleolytisch gespalten, wobei die prozessierten Transkripte stärker ediert waren als die nicht prozessierten (Iwabuchi et al. 1993).

5.2 Import eines ursprünglich mitochondrialen Proteins in Mitochondrien ohne Signalsequenz

In früheren Studien wurde beobachtet, dass die konstitutive Expression des *orf107* im Tabak ohne mitochondriale Signalsequenz einen schädigenden Einfluss auf das Wachstum der transgenen Pflanzen ausübte (Stockmeyer 1999). Da der mitochondrial exprimierte *orf107* bei *S. bicolor* mit dem Phenotyp der CMS in Verbindung gebracht wird, könnte der negative Einfluss der *orf107* Expression in transgenen Tabak-Pflanzen evtl. auf das ORF107 Protein selbst oder dessen Einfluss auf die Mitochondrien ähnlich wie in der Hirse zurückzuführen sein. Im letzteren Fall wäre davon auszugehen, dass auch ohne Signalsequenz zum Import des Proteins in Mitochondrien eine mitochondriale Lokalisation des ORF107 in den transgenen Tabak-Pflanzen möglich ist.

Zur Bestimmung der *in vivo* Lokalisation des ORF107 Proteins wurden in der vorliegenden Arbeit transiente Expressionsanalysen von ORF107-GFP-Fusionsproteinen verwendet. Die Anwendung dieser Methode zur *in vivo* Bestimmung der intrazellulären Lokalisation eines zu analysierenden Proteins wurde in einigen Studien beschrieben. Mittels transienter Expressionsanalysen untersuchten z.B. Akashi et al. (1998) und Duchene et al. (2005) die Lokalisation von Aminoacyl-tRNA Synthetasen aus *A. thaliana* in transient transformierten Tabak-Protoplasten.

Die Ergebnisse der transienten Expressionsanalysen in Tabak BY2-Zellen und Zwiebel-Epidermiszellen (vgl. 4.6.2) gaben einen direkten Hinweis auf den Import des ORF107-GFP-Fusionsproteins in Mitochondrien auch ohne die Verwendung einer mitochondrialen Signalsequenz. Dies bedeutet, dass das ORF107 Protein auch ohne mitochondriale Signalsequenz von dem TOM/TIM-Komplex erkannt und in pflanzliche Mitochondrien importiert wird. Die Ergebnisse zeigen folglich, dass ein Protein mitochondrialer Herkunft mitunter auch ohne das Hinzufügen einer mitochondrialen Signalsequenz in die Mitochondrien importiert werden kann.

Viele der mitochondrial lokalisierten Proteine werden in die Organellen importiert, da nur wenige mitochondriale Proteine vom Chondriom selbst kodiert und in der Matrix synthetisiert werden. Mehr als 98% der mitochondrialen Proteine werden als Vorläufer-Proteine im Cytoplasma gebildet (Schatz und Dobberstein 1996; Neupert 1997; Jensen und

Johnson 2001). Daher ergibt sich die Notwendigkeit des vektoriellen Transports vom Cytoplasma ins Mitochondrion. Ein typisches Vorläufer-Protein trägt eine N-terminale Extension (Signal- o. Presequenz), die das Protein über die äußere und innere Membran hinein in die Matrix dirigiert, wo die Signalsequenz abgespalten wird. Die Eigenschaften derartiger mitochondrialer Signalsequenzen sind zusammengefasst in Schneider et al. (1998) und Sjöling und Glaser (1998). Eine andere Gruppe von Vorläufer-Proteinen, die Metabolit-Transporter, wird ohne eine abspaltbare Signalsequenz synthetisiert, enthält aber verschiedene interne Signalsequenzen. Beide Arten von Vorläufer-Proteinen werden durch Rezeptoren der Translokase der äußeren mitochondrialen Membran (TOM Komplex) erkannt. Für den weiteren Verlauf des Proteinimports sind zwei verschiedene Translokasen der inneren Membran (TIM) verantwortlich. Die Proteine ohne abspaltbare Signalsequenz werden durch den Tim9-Tim10 Komplex durch den Intermembranraum geleitet und durch die Translokase TIM22 in die innere Membran inseriert. Die Signalsequenz-tragenden Proteine werden zu der Translokase TIM23 geleitet (Geissler et al. 2002).

Es sind weitere Proteine bekannt, die ohne eine typische Signalsequenz in die Mitochondrien importiert werden, zum Beispiel die Hefe-Proteine Tim23p (Davis et al. 1998) und PET9 (Adrian et al. 1986). Auch der ADP/ATP Carrier (AAC) enthält interne Signalsequenzen (Pfanner et al. 1987; Smagula und Douglas 1988). Im Gegensatz zu N-terminalen Signalsequenzen sind nur wenige interne charakterisiert (Folsch et al. 1996; Diekert et al. 1999). Brix et al. (1999) konnten zeigen, dass mehrere ca. zehn Aminosäuren lange Bereiche innerhalb des Proteins von dem TOM-Komplex erkannt werden.

Während die genannten Proteine nukleär kodiert sind und nicht von Eubakterien abstammen, handelt es sich im Falle des ORF107 um ein mitochondrial kodiertes Protein, das in der vorliegenden Studie in den Zellkern transferiert wurde. Ein anderes Beispiel für solch einen Prozess ist der Transfer des mitochondrialen *rps10* Gens einiger Angiospermen-Linien in den Zellkern. Es wird beschrieben, dass in Spinat, Mais und Oxalis die von nukleär lokalisierten *rps10* Genen abgeleiteten Genprodukte trotz des Fehlens einer Signalsequenz in die Mitochondrien importiert werden (Adams et al. 2000).

Das ORF107 Protein könnte auch interne Signalsequenzen enthalten, die einen Transport des abgeleiteten Proteins in die Mitochondrien ermöglichen. Mangels geeigneter Algorithmen zur Berechnung und Identifikation von internen Import-Sequenzen ähnlich

denen zur Vorhersage N-terminaler Signalsequenzen (Claros und Vincens 1996) ist hierzu jedoch keine Aussage möglich.

Ein funktioneller Transfer der genetischen Information von den Organellen in den Zellkern erfordert den Erwerb der grundlegenden Regulationsstrukturen der nukleären Transkription und der cytoplasmatischen Translation (Brennicke et al. 1993; Adams et al. 2000; Murcha et al. 2005). Die im Cytoplasma translatierten Proteine müssen zudem eine Importsignalsequenz enthalten, um von den für Mitochondrien (Truscott et al. 2003) und Plastiden (Soll und Schleiff 2004) bekannten Komplexen in die Organellen transportiert zu werden. Dieses Signalpeptid muss in den Organellen wieder entfernt werden.

Die Fähigkeit des ORF107 Proteins, in die Mitochondrien importiert zu werden, ist hinsichtlich des Gentransfers von den Mitochondrien zum Zellkern (Martin und Herrmann 1998; Palmer et al. 2000) von großer Bedeutung. Denn die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass das Hinzufügen einer mitochondrialen Signalsequenz für den Import vormals mitochondrial lokalisierter Proteine nicht immer notwendig ist. Das würde die Möglichkeit für einen erfolgreichen funktionellen Gentransfer von den Organellen zum Zellkern erhöhen.

5.3 Erzeugung künstlicher männlicher Sterilität bei Pflanzen

Das hier analysierte chimäre Gen *orf107* ist mit CMS, einer mitochondrial vererbten Unfähigkeit, funktionsfähigen Pollen zu bilden, assoziiert. Bei vielen Kulturpflanzen konnten im Cytoplasma von CMS-Linien offene Leserahmen identifiziert werden, die mit CMS in Verbindung gebracht werden (Dewey et al. 1986; Young und Hanson 1987; Mackenzie et al. 1994; Kempken und Pring 1999). Diese sind größtenteils durch Rekombination entstanden und enthalten daher häufig chimäre Sequenzen mehrerer Gene (siehe Tab. 2). CMS (siehe Kap. 1.4) ist hilfreich, um die Interaktion zwischen nukleären und mitochondrialen Genomen zu analysieren. Auch für die Landwirtschaft sind männlich sterile Pflanzen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wird die männliche Sterilität bei Pflanzen heutzutage oft künstlich erzeugt (Übersicht in Stockmeyer und Kempken 2006).

Wegen des Heterosiseffekts zeichnen sich Hybride durch eine gesteigerte Resistenz gegenüber Pflanzenkrankheiten und eine verbesserte Leistungsfähigkeit in verschiedenen Umgebungen im direkten Vergleich mit den Elternlinien aus (Lefort-Buson et al. 1987). Für die Erzeugung von Hybridsaatgut durch die Kreuzung optimaler Elternlinien ist es aber wichtig, dass eine Selbstbefruchtung der Saatgut-produzierenden Pflanze ausgeschlossen werden kann. In manchen Fällen treten natürliche Mutanten auf, die männlich steril sind und keinen fertilen Pollen bilden können, wie z.B. bei einigen Mais- oder Reislinien (Laughnan und Gabay-Laughnan 1983; Kadowaki et al. 1988). Bei vielen Getreidearten ist es jedoch notwendig, die Antheren zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen manuell zu entfernen, was die Produktion von Samen teuer und sehr arbeitsintensiv macht. Auch durch die Anwendung männlich spezifischer Gametozide, wie Mitomycin und Streptomycin (Jan und Rutger 1988) oder einiger inter- und intraspezifische Kreuzungen (Hanson und Conde 1985) kann Selbstbefruchtung verhindert werden.

In dem letzten Jahrzehnt wurden auf der Basis männlicher Sterilität anwendbare und kosten-effektive Kontrollsysteme über die Befruchtung entwickelt. Im Wesentlichen wird die gewebespezifische Expression cytotoxischer Proteine durch Fusion mit einem Pollenspezifischen Promotor erreicht. Worrall et al. (1992) gelang es beim Tabak, durch spezifische Expression einer endo- β -1,3-Glucanase unter der Kontrolle des OSG6B Promotors aus Reis im Tapetum, dem Pollennährgewebe, die Anzahl fertiler Pollen stark zu reduzieren. Auch durch eine Antheren-spezifische Expression von Ribonukleasen kann die Pollenbildung verhindert werden. Mariani et al. (1990) konnten durch Tapetum-spezifische Expression der Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Paddon et al. 1989) männlich sterile Tabakpflanzen herstellen.

Durch die Einführung eines zweiten Konstruktes mit Barstar, einem Inhibitor der Barnase, wurde dagegen die Pollenbildung nicht verhindert. Die Fertilität konnte somit restauriert werden (Mariani et al. 1992; Burgess et al. 2002). Das Genprodukt führt zur Degradation der RNA im Tapetum und verhindert somit die Pollenbildung. In einigen dieser Systeme kann Sterilität oder Fertilität chemisch reguliert werden. Durch das Einführen von unedierten Proteinen in pflanzliche Mitochondrien konnte ebenfalls männliche Sterilität induziert werden (Hernould et al. 1993). Einen ähnlichen Ansatz verfolgte diese Arbeit, da der hier in *A. thaliana* oder *N. tabacum* als Wirtspflanze eingebrachte *orf107* in der

Spenderpflanze *S. bicolor* ebenfalls in sterilen Linien mit der CMS assoziiert ist und demnach auch im heterologen Wirt zu CMS führen könnte.

Induzierbare männliche Sterilität kann zum Beispiel durch die Expression eines Gens erreicht werden, welches ein Protein zur Katalyse der Umwandlung eines Pro-Herbizids in ein toxisches Herbizid ausschließlich in männlich reproduktiven Geweben kodiert. Kriete et al. (1996) fusionierten die N-Acetyl-L-Ornithin-Deacetylase aus *E. coli* mit dem Tapetum-spezifischen Promotor TA29 und transformierten damit Tabak. Extern appliziertes, nicht giftiges N-Acetyl-L-Phosphinothricin wurde durch die Deacetylierung in das aktive cytotoxische Herbizid L-Phosphinothricin umgewandelt, was dazu führte, dass die Antheren keinen Pollen enthielten. Bei diesem System kann der Einsatz von Restorer-Linien vermieden werden, da die männliche Sterilität ausschließlich in Anwesenheit von N-Acetyl-L-Phosphinothricin induziert wird.

Jedes der genannten Systeme hat jedoch seine Nachteile, wie z.B. das Eingreifen in die allgemeine Pflanzenentwicklung oder den Stoffwechsel und die Beschränkung auf bestimmte Pflanzenarten. Daher würde die Existenz eines universellen und dominanten Systems zur Erzeugung männlicher Sterilität, welches auch die Möglichkeit zur effizienten Wiederherstellung der Fertilität anbietet, die Produktion von Hybridpflanzen enorm unterstützen. Die Fertilität kann z.B. durch chemische Kontrolle der Expression von Restorer-genen induziert werden (Cigan und Albertsen 2000). Luo et al. (2000) untersuchten eine alternative Methode zur Produktion von Hybrid-Samen. Sie verwendeten das „site-specific“ Rekombinationssystem FLP/FRT aus der Hefe, um bei Arabidopsis-Pflanzen, die durch Antisense-Expression des Pollen- und Tapetum-spezifischen Gens *bcp1* männlich steril geworden sind, die Fertilität wiederherzustellen.

Ein weiteres Beispiel für die Regulation männlicher Fertilität ist das Eingreifen in den Hormonhaushalt. Huang et al. (2003) induzierten männlich sterile Pflanzen durch gewebespezifische Expression von *CKX1* und *gai* Genen, die an dem oxidativen Abbau von Cytokinin und der Gibberellin-Signaltransduktion beteiligt sind. Dabei tritt der männlich sterile Phenotyp in transgenen Pflanzen auf, die für das Transgen homozygot sind, und ist durch exogene Zugabe der Hormone reversibel.

Ein bedeutender Aspekt für die erfolgreiche Anwendung der genannten Systeme bei der Produktion von Hybrid-Samen in großem Maßstab, ist die effektive Vermehrung der männlich sterilen weiblichen Elternlinie (Perez-Prat und van Lookeren Campagne 2002).

Eine Strategie zur Vermehrung männlich steriler Pflanzen ist die Kombination des Gens, das zu dominanter männlicher Sterilität führt, mit einem Herbizidresistenz-Gen (Denis et al. 1993). Nach Kreuzung der männlich sterilen Pflanzen mit einer Wildtyp-Linie mit gleichem genetischen Hintergrund kann die männlich sterile Nachkommenschaft durch die Anwendung des Herbizids selektiert werden. Eine weitere Strategie ist die Produktion von Pflanzen, die konditionell fertil sind. Während der Vermehrung des weiblichen Elter werden die männlich sterilen Pflanzen mit einer chemischen Substanz behandelt, die die Fertilität wiederherstellt, und können sich selbst. Für die Produktion von Hybrid-Samen ist keine chemische Behandlung notwendig und die Pflanzen bleiben männlich steril. Dieses System hat einige Vorteile gegenüber der Selektion männlich steriler Pflanzen durch die Anwendung eines Herbizids. So muss z.B. die chemische Substanz während der Vermehrung des weiblichen Elter eingesetzt werden und nicht während der Produktion von Hybridsamen, und die Anwendung kann auf kleinerer Fläche erfolgen. Alternativ kann Fertilität auch durch die Umgebungsbedingungen induziert werden. Es gibt Reismutanten, bei denen die männliche Sterilität durch die Temperatur und die Länge der Photoperiode beeinflusst wird (He et al. 1999; Dong et al. 2000). In diesem System können männlich sterile weibliche Linien vermehrt werden, indem sie unter Umgebungsbedingungen wachsen, welche die Fertilität wiederherstellen. Dieser Ansatz hat zum Vorteil, dass keine Restorerlinien und keine chemische Behandlung notwendig sind.

5.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das mitochondriale Gen *orf107* aus *S. bicolor*, das mit CMS assoziiert ist, in seiner ursprünglichen oder veränderten Form unter Anwendung verschiedener Expressionsstrategien heterolog in *A. thaliana* und *N. tabacum* exprimiert.

Bei den *A. thaliana*- und *N. tabacum*-Transformanten der F₀-Generation bewirkte die *orf107*-Expression keinen schädigenden Effekt auf die Pollenentwicklung. Auch die F₁-Generation von *A. thaliana*-Transformanten, die *orf107* mit mitochondrialer *coxIV* Signalsequenz unter Kontrolle des A9 Promotors exprimierten, zeigte keinerlei Auffälligkeiten. Zur weiteren Analyse sollten auch die F₁-Generationen der transgenen Pflanzen, die aus Transformationen mit den anderen *orf107*-Vektorkonstrukten hervorgingen, untersucht werden.

Es ist möglich, dass das ORF107 Protein nach dem Import in die Mitochondrien nicht korrekt in die innere mitochondriale Membran inseriert wurde. Um einen genaueren Einblick in die Lokalisation des heterologen ORF107 Proteins zu bekommen, könnten Fraktionierungen der mitochondrialen Membranen durchgeführt werden. Zum immunologischen Nachweis des ORF107 Proteins könnte versucht werden, einen Antikörper gegen das hydrophile, zum *orf79* aus Reis homologe Ende herzustellen.

Es gibt die Theorie, dass das ORF107 Protein in den Antheren der Hirse eventuell die RNA-Edierung des *atp6* Transkriptes negativ beeinflusst. Dieser Aspekt könnte durch *in organello* Experimente mit isolierten Mitochondrien weiter verfolgt werden.

6. Zusammenfassung

Cytoplasmatisch männliche Sterilität bei Pflanzen ist ein mütterlich vererbtes Merkmal, das die Produktion funktionsfähiger Pollenkörner unterdrückt. In dieser Arbeit wurde der chimäre mitochondriale offene Leserahmen *orf107* aus *S. bicolor*, der mit CMS assoziiert ist, untersucht. Zur Analyse eines Effektes des ORF107 Proteins auf die mitochondriale Genexpression und die Pollenentwicklung wurden 13 Vektorkonstrukte zur Einführung von *orf107* oder eines modifizierten *orf107* (mit ausgetauschtem *A. thaliana atp9* Aminoterminus) unter der Kontrolle von fünf verschiedenen konstitutiven bzw. Blüten- oder Antheren-spezifischen Promotoren und zwei mitochondrialen Signalsequenzen in das nukleäre *A. thaliana* und *N. tabacum* Genom erstellt.

Die Funktionalität und Gewebe-Spezifität der verwendeten Promotoren konnte durch histochemische GUS-Färbung nachgewiesen werden.

Die Expression von ORF107 wurde auf transkriptionaler und translationaler Ebene durch RT-PCR-Experimente und Biotinylierung gezeigt. Die Tatsache, dass eine effiziente Isolation des ORF107-Biotag Proteins nur nach Zugabe des Detergenz SDS möglich war, unterstützt die Annahme, dass ORF107 ein Membranprotein darstellt.

Der Import von ORF107 in die Mitochondrien konnte durch Experimente mit GFP-Fusionsproteinen und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Die Analyse transgener Protoplasten mit *orf107* und einer mitochondrialen Signalsequenz verdeutlichte GFP-Fluoreszenz in typisch mitochondrialen Strukturen, was darauf hinweist, dass die ORF107-GFP-Fusionproteine effizient in die Mitochondrien importiert werden. Tabak BY2-Protoplasten sowie Zwiebel-Epidermiszellen, die mit *orf107* ohne eine mitochondriale Signalsequenz transient transformiert worden waren, zeigten die gleiche GFP-Fluoreszenz.

Weder die konstitutive, noch die Blüten-spezifische Expression von *orf107* oder des veränderten *orf107* mit der Signalsequenz für die innere Mitochondrienmembran *coxIV* aus der Hefe oder der Matrix-Signalsequenz *atp2-1* aus *N. plumbaginifolia* konnte einen schädigenden Effekt auf die Pollenentwicklung bewirken. Das könnte daran liegen, dass ORF107 aus *S. bicolor* ein mitochondrial kodierte Protein ist, während in dieser Studie *orf107* in das nukleäre Genom von *A. thaliana* und *N. tabacum* eingeführt wurde. Möglicherweise wurde das ORF107 Protein nach dem Import in die Mitochondrien nicht

korrekt in die innere mitochondriale Membran inseriert. Alternativ könnte in *A. thaliana* und *N. tabacum* ein antherenspezifischer Faktor fehlen, der evtl. mit dem ORF107 Protein interagieren müßte, um einen negativen Effekt auf die Pollenbildung auszuüben. Möglich ist zudem, dass *orf107* auch in dem nativen System *S. bicolor* nicht der Auslöser für CMS ist.

Summary

Cytoplasmic male sterility in plants is a maternally inherited trait that suppresses the production of viable pollen grains. In this study the chimeric mitochondrial open reading frame *orf107* from *S. bicolor*, which is associated with CMS, was analysed. To investigate the effect of the ORF107 protein on mitochondrial gene expression and pollen development, thirteen plasmids were constructed to introduce *orf107* and an altered *orf107* gene (with an exchanged *A. thaliana atp9* amino terminus) under the control of five different constitutive and flower- or anther-specific promoters and two mitochondrial targeting sequences into the *A. thaliana* and *N. tabacum* nuclear genome.

The functionality and tissue-specificity of the employed promoters was proved through histochemical GUS-staining.

Expression of ORF107 at the transcriptional and translational level was detected by RT-PCR-experiments and biotinylation. The fact, that an efficient isolation of the ORF107-biotag protein was only possible with the addition of the detergent SDS supports the theory that ORF107 might be a membrane protein.

Mitochondrial import was confirmed employing GFP-fusion protein experiments and fluorescence microscopy. Analysis of transgenic *A. thaliana* protoplasts with *orf107* and a mitochondrial targeting signal revealed GFP-fluorescence in typical mitochondrial structures indicating that the ORF107-GFP fusion proteins were efficiently delivered into mitochondria. Transiently transformed tobacco BY2-protoplasts as well as onion epidermal cells with *orf107* bearing a mitochondrial targeting sequence showed the same GFP-fluorescence.

Neither constitutive nor flower-specific expression of *orf107* or the altered *orf107* fused to the yeast *coxIV* mitochondrial inner membrane targeting presequence or the *N. plumbaginifolia atp2-1* matrix targeting signal revealed any deleterious effect on pollen development. This may be due to the fact, that the *S. bicolor* ORF107 is a mitochondrially-encoded protein, whereas in this study it was introduced *orf107* into the *A. thaliana* and *N. tabacum* nuclear genome. It is possible that after import into mitochondria the ORF107 protein wasn't inserted correctly into the inner mitochondrial membrane. Alternatively an antherspecific substance, that is supposed to interact with the ORF107 protein to damage

pollen development, could be missing in *A. thaliana* und *N. tabacum*. Even in the native system *S. bicolor orf107* is probably not the causal agent for CMS.

7. Literatur

- Abad AR, Mehrtens BJ, Mackenzie SA (1995) Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell* 7:271-285
- Ackerman SH, Martin J, Tzagoloff A (1992) Characterization of ATP11 and detection of the encoded protein in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267:7386-7394
- Adams KL, Daley DO, Qiu Y-L, Whelan J, Palmer JD (2000) Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature* 408:354-357
- Adrian GS, McCammon MT, Montgomery DL, Douglas MG (1986) Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol* 6:626-634
- Akagi H, Sakamoto M, Shinjyo C, Shimada H, Fujimura T (1994) A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr Genet* 25:52-58
- Akashi K, Grandjean O, Small I (1998) Potential dual targeting of an Arabidopsis archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Lett* 431:39-44
- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* 44:117-122
- Alexander MP (1980) A versatile stain for pollen, fungi, yeast, and bacteria. *Stain Technol* 55:13-18
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Altschul SF et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402

- Araya A, Domec C, Begu D, Litvak S (1992) An *in vitro* system for the editing of ATP synthase subunit 9 mRNA using wheat mitochondrial extracts. Proc Natl Acad Sci USA 89:1040-1044
- Backert S, Kunnimalaiyaan M, Börner T, Nielsen BL (1998) *In vitro* replication of mitochondrial plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.): A remnant of bacterial rolling circle and conjugative plasmids? J Mol Biol 284:1005-1015
- Backert S, Lurz R, Oyarzabal OA, Börner T (1997a) High content, size and distribution of single-stranded DNA in the mitochondria of *Chenopodium album* (L.). Plant Mol Biol 33:1037-1050
- Backert S, Meißer K, Börner T (1997b) Unique features of the mitochondrial rolling circle-plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.). Nucleic Acid Res 25:582-589
- Bailey-Serres J, Hanson DK, Fox TD, Leaver CJ (1986) Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome c oxidase subunit I gene in Sorghum. Cell 47:567-576
- Basra AS (ed) (2000) Hybrid seed production in vegetables: rationale and methods in selected crops. Food Products Press, Binghamton, New York
- Bauer M, Behrens M, Esser K, Michaelis G, Pratje E (1994) *PET1402*, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. Mol Gen Genet 245:272-278
- Belliard G, Vedel F, Quetier F (1978) Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. Mol Gen Genet 165:231-237
- Benne R, van den Burg J, Brakenhoff JPJ, Sloof P, van Boom JH, Tromp MC (1986) Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. Cell 46:819-826
- Benore-Parsons M, Anderson L (1995) Purification of DNA fragments from lyophilized agarose gels. Nucleic Acids Res 23:4926-4927

- Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR (2002) A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10887-10892
- Berthold J et al. (1995) The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell* 81:1085-1093
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12:8711-8721
- Binder S, Marchfelder A, Brennicke A, Wissinger B (1996) Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol Biol* 32:303-314
- Blanc V, Litvak S, Araya A (1995) RNA editing in wheat mitochondria proceeds by a deamination mechanism. *FEBS Lett* 373:56-60
- Bock R, Kössel H, Maliga P (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J* 13:4623-4628
- Bolle N, Kempken F (2006) Mono- and dicotyledonous plant-specific RNA editing sites are correctly edited in both in organello systems. *FEBS Lett* 580:4443-4448
- Bonen L, Brown GG (1993) Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organization and expression in plant mitochondria. *Can J Bot* 71:645-660
- Bonen L, Vogel J (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet* 17:322-331
- Bonhomme S, Budar F, Lancelin D, Small I, Defrance MC, Pelletier G (1992) Sequence and transcript analysis of the *Nco2.5* Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica cybrids*. *Mol Gen Genet* 235:340-348
- Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slominski PP, Dujardin G (1994) *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol* 239:201-212

- Borovkov AY, Rivkin MI (1997) *XcmI*-containing vector for direct cloning of PCR products. *BioTechniques* 22:812-814
- Boutry M, Chua NH (1985) A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J* 4:2159-2165
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Braun CJ, Siedow JN, Levings CS, III (1990) Fungal toxins bind to the URF-13 protein in maize mitochondria and *Escherichia coli*. *Plant Cell* 2:153-161
- Brennicke A, Grohmann L, Hiesel R, Knoop V, 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 et al. (1996) Molecular biology of plant mitochondria. *Naturwissenschaften* 83:339-346
- Brettell RIS, Thomas E, Ingram DS (1980) Reversion of Texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants. *Theor Appl Genet* 58:55-58
- Brewbaker JL, Kwack BH (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am J Bot* 50:747-858
- Brix J, Rüdiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, Pfanner N (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a pre-sequence-carrying pre-protein and a non-cleavable pre-protein. *J Biol Chem* 274:16522-16530
- Brown GG et al. (2003) The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J* 35:262-272
- Bullock W, Fernandez J, Short J (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5:376-378

- Burgess DG et al. (2002) A novel, two-component system for cell lethality and its use in engineering nuclear male-sterility in plants. *Plant J* 31:113-125
- Carpousis JA, Vanzo NF, Raynal LC (1999) mRNA degradation. A tale of poly(a) and multiprotein machines. *Trends Genet* 15:24-28
- Cech TR, Bass BL (1986) Biological catalysis by RNA. *Annu Rev Biochem* 55:599-629
- Chalfie MY, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-804
- Chase CD, Ortega VM (1992) Organization of *ATPA* coding and 3' flanking sequences associated with cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr Genet* 22:147-153
- Chaumont F, Bernier B, Buxant R, Williams ME, Levings CS, III, Boutry M (1995) Targeting the maize T-*urf13* product into tobacco mitochondria confers methomyl sensitivity to mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1167-1171
- Cheng SWC, Lynch EC, Leason KR, Court DL, Shapiro BA, Friedmann DI (1991) Functional significance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science* 254:1205-1207
- Chilton MD et al. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263-271
- Cho Y, Qiu YL, Kuhlmann P, Palmer JD (1998) Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14244-14249
- Choquet Y, Goldschmidt-Clermont M, Girard-Bascou J, Kück U, Bennoun P, 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
- Cigan AM, Albertsen MC (2000) Reversible nuclear genetic system for male sterility in transgenic plants. US patent number 6072102
- Clark EM, Izhar S, Hanson MR (1985) Independent segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in *Petunia* somatic hybrids. *Mol Gen Genet* 199:440-445

- Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779-786
- Clayton DA (1984) Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem* 53:573-594
- Clifton SW et al. (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol* 136:3486-3503
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743
- Cohen SN (1995) Surprise at the end of procaryotic RNA. *Cell* 80:829-832
- Collins RA, 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
- Conklin PL, Hanson MR (1993) A truncated recombination repeat in the mitochondrial genome of a *Petunia* CMS line. *Curr Genet* 23:477-482
- Covello PS, Gray MW (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Nature* 341:662-666
- Covello PS, Gray MW (1993) On the evolution of RNA-editing. *Trends Genet* 9:265-268
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biol Sci* 20:448-455
- Cui X, Wise RP, Schnable PS (1996) The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* 272:1334-1336
- Davis AJ, Ryan KR, Jensen RE (1998) Tim23p contains separate and distinct signals for targeting to mitochondria and insertion into the inner membrane. *Mol Biol Cell* 9:2577-2593
- Dekker PJ, Ryan MT, Brix J, Müller H, Hönlinger A, Pfanner N (1998) Pre-protein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol* 18:6515-6524
- Denis M, Delourme R, Gourret JP, Mariani C, Renard M (1993) Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 101:1295-1304

- Dewey RE, Levings CS, III, Timothy DH (1986) Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44:439-449
- Dewey RE, Timothy DH, Levings CS, III (1987a) A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5374-5378
- Dewey RE, Timothy DH, Levings CS, III (1987b) A unique mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5374-5378
- Dewey RE, Timothy DH, Levings CS, III (1991) Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Curr Genet* 20:475-482
- Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11752-11757
- Dombrowski S, Brennicke A, Binder S (1997) 3'-inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators. *EMBO J* 16:5069-5076
- Dong NV et al. (2000) Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor Appl Genet* 100:727-734
- Duchene AM et al. (2005) Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16484-16489
- Duvick DN (1965) Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Advances Genet* 13:1-56
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304:253-257
- Eyal Y, Curie C, McCormick S (1995) Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. *Plant Cell* 7:373-384

- Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH (2001) *In vitro* Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in arabidopsis pollen grain protoplasts. *J Exp Bot* 52:1603-1614
- Fauron CMR, Havlik M, Brettell RIS (1990) The mitochondrial genome organization of a maize fertile *cmsT* revertant line is generated through recombination between two sets of repeats. *Genetics* 124:423-428
- Fauron CMR, Havlik M, Casper M (1991) Organization and evolution of the maize mitochondrial genome. In: Herrmann RG, Larkins BA (eds) *Plant Molecular Biology*. Plenum Press, New York, pp 345-364
- Ferat JL, Michel F (1993) Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* 364:358-361
- Flavell R (1974) A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize. *Plant Sci Lett* 3:259-263
- Folkerts OF, Hanson MR (1989) Three copies of a single recombination repeat occur on the 443 kb mastercircle of the *Petunia hybrida* 3704 mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 17:7345-7357
- Folsch H, Guiard B, Neupert W, Stuart RA (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J* 15: 479-487
- Fox TD (1996) Genetics of mitochondrial translation. In: Hershey J, Mathews M, Sonnenberg N (eds) *Translation control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 733-758
- Fraley R, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4803-4807
- Gagliardi D, Perrin R, Marèchal-Drouard L, Grienberger JM, 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

- Gärtner F, Börner U, Guiard B, Pfanner N (1995) The sorting signal of cytochrome b_2 promotes early divergence from the general mitochondrial import pathway and restricts the unfoldase activity of matrix Hsp70. *Embo J* 14:6043-6057
- Geissler A et al. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* 111:507-518
- Gengenbach BG, Green CE (1975) Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin. *Crop Sci* 15:645-649
- Giegé P, Brennicke A (2001) From gene to protein in higher plant mitochondria. *Life Sciences* 324:209-217
- Glerum DM, Muroff I, Jin C, Tzagoloff A (1997) *COX15* codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *JBC* 272:19088-19094
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Müller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) Cytochromes c_1 and b_2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69:809-822
- Gomez-Casati D, Busi MV, Gonzalez-Schain N, Mouras A, Zabaleta EJ, Araya A (2002) A mitochondrial dysfunction induces the expression of nuclear-encoded complex I genes in engineered male sterile *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 532:70-74
- Gordon PM, Sontheimer EJ, 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 MW (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 5:25-30
- Gray MW (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* 141:233-257
- Gray MW (1998) Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature* 396:109-110
- Gray MW, Covello PS (1993) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *FASEB J* 7:64-71

- Gray MW, Doolittle WF (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* 46:1-42
- Gray MW, Hanic-Joyce PJ, Covello PS (1992) Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:145-175
- Grelon M, Budar F, Bonhomme S, Pelletier G (1994) Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica cybrids*. *Mol Gen Genet* 243:540-547
- Grohmann L, Rasmusson AG, Heiser V, Thieck O, 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
- Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH, Grienenberger JM (1989) RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 341:660-662
- 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
- Handa H, Itani K, Sato H (2002) Structural features and expression analysis of a linear mitochondrial plasmid in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Mol Genet Genomics* 267:797-805
- Hanson M (1991) Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu Rev Genet* 25:461-486
- Hanson MR, Conde MF (1985) Function and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male sterility in plants. *Int Rev Cytol* 94:213-267
- Haseloff J, Amos B (1995) GFP in plants. *Trends Genet* 11:328-329
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2122-2127

- Hauke V, Schatz G (1997) Import of proteins into mitochondria and chloroplasts. Trends in Cell Biol 7:103-106
- He S, Abad AR, Gelvin SB, Mackenzie SA (1996) A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. Proc Natl Acad Sci USA 93:11763-11768
- He YQ, Yang J, Xu CG, Zhang ZG, Zhang Q (1999) Genetic bases of instability of male sterility and fertility reversibility in photoperiod-sensitive genic male-sterile rice. Theor Appl Genet 99:683-693
- Heery DM, Gannon F, Powell R (1990) A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. Trends Genet 6:173
- Heiser V, Brennicke A, 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
- Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 95:2250-2255
- Hell K, Neupert W, Stuart RA (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. EMBO J 20:1281-1288
- Hernould M et al. (1998) Impairment of tapetum and mitochondria in engineered male-sterile tobacco plants. Plant Mol Biol 36:499-508
- Hernould M, Suharsono S, Litvak S, Araya A, Mouras A (1993) Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat. Proc Natl Acad Sci USA 90:2370-2374
- Herrmann JM, Koll H, Cook RA, Neupert W, Stuart RA (1995) Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II: mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. J Biol Chem 270:27079-27086
- Herrmann JM, Neupert W (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. IUBMB Life 55:219-225

- Herrmann JM, Neupert W, Stuart RA (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J* 16:2217-2226
- Hess WR, Hoch B, Zeltz P, Hübschmann T, Kössel H, Börner T (1994) Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* 6:1455-1465
- Hiesel R, Combettes B, Brennicke A (1994) Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the Bryophyta. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:629-633
- Hiesel R, Wissinger B, Schuster W, Brennicke A (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Science* 246:1632-1634
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)* 8:189-191
- Higgins DG, Sharp PM (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Genes Dev* 73:237-244
- Hoch B, Maier RM, Appel K, Igloi GL, Kössel H (1991) Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* 353:178-180
- Hoge JHC, Springer J, Zantige B, Wessels JGH (1982) Absence of differences in polysomal RNAs from vegetative monokaryotic and dikaryotic cells of the fungus *Schizophyllum commune*. *Exp Mycol* 6:225-232
- Holländer V, Kück U (1999) Group II intron splicing in chloroplasts: identification of mutations determining intron stability and fate of exon RNA. *Nucleic Acid Res* 27:2345-2353
- Horsch R, Fry J, Hoffmann N, Eichholtz D, Rogers S, Fraley R (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
- Howad W, Kempken F (1997a) Cell-type specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11090-11095

- Howad W, Kempken F (1997b) Sequence analysis and transcript processing of the mitochondrial *nad3-rps12* genes from *Sorghum bicolor*. *Plant Sci* 129:65-68
- Howad W, Tang HV, Pring DR, Kempken F (1999) Nuclear genes from Tx CMS maintainer lines are unable to maintain *atp6* RNA editing in any anther cell-type in the *Sorghum bicolor* A3 cytoplasm. *Curr Genet* 36:62-68
- Hsu-Ching C, Stern DB (1991) Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *J Biol Chem* 266:24205-24211
- Huang J, Matzinger DF, Levings CSI (1994) Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number. *Plant Cell* 6:439-448
- Huang S et al. (2003) Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiol* 131:1270-1282
- Hunt M, Newton KJ (1991) The *NC53* mutation: genetic evidence for the expression of ribosomal protein genes in *Zea mays* mitochondria. *EMBO J* 10:1045-1052
- Iwabuchi M, Kyojuka J, Shimamoto K (1993) Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J* 12:1437-1446
- Jack T, Brockman EM, Meyerowitz EM (1992) The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68:683-697
- Jan CC, Rutger JN (1988) Mitomycin C- and streptomycin-induced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Science Madison: Crop Science Society of America* 28:792-795
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8447-8451
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907

- Jenkins BD, Kulhanek DJ, Barkan A (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
- Jensen RE, Johnson A (2001) Opening the door to mitochondrial protein import. *Nature* 8:1008-1010
- Jia L, Dienhart M, Schramp M, McCauley M, Hell K, Stuart RA (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: The importance of the C-terminal hydrophilic region of Oxa1. *Embo J* 22:6438-6447
- Johns C, Lu M, Lyznik A, Mackenzie S (1992) A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell* 4:435-449
- Joyce PBM, Gray MW (1989) Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 17:5461-5476
- Kadowaki K, Osumi T, Nemoto H, Harada K, Shinjyo C (1988) Mitochondrial DNA polymorphism in male-sterile cytoplasm of rice. *Theor Appl Genet* 75:234-236
- Kadowaki KI, Suzuki T, Kazama S (1990) A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *Mol Gen Genet* 224:10-16
- Kaul MLH (1988) Male sterility in higher plants. In: Frankel R, Grossman M, Maliga P (eds) *Monographs. Theoretical and Applied Genetics*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Kawasaki ES, Wang AM (1989) Detection of gene expression. In: Ehrlich HA (ed) *PCR Technology, principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, pp 89-97
- Kazama T, Toriyama K (2003) A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett* 544:99-102

- Kempken F, Howad W, Pring DR (1998) Mutations at specific *atp6* codons which cause human mitochondrial diseases also lead to male sterility in a plant. FEBS Lett 441:159-160
- Kempken F, Pring DR (1999) Male sterility in higher plants - fundamentals and applications. Prog Bot 60:139-166
- Kennell JC, Pring DR (1989) Initiation and processing of *atp6*, *T-urf13* and *orf221* transcripts from mitochondria of T cytoplasm maize. Mol Gen Genet 216:16-24
- Klein M et al. (1994) Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones. Plant J 6:447-455
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327:70-73
- Knoop V, Brennicke A (1999) RNA-editing 1999. Biologie in unserer Zeit 29:336-345
- Koch JL, Boulanger SC, Dib-Hajj SD, Hebbar SK, Perlman PS (1992) Group II introns deleted for multiple substructures retain self-splicing activity. Mol Cell Biol 12:1950-1958
- Köhler RH, Horn R, Lössl A, Zetsche K (1991) Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. Mol Gen Genet 227:369-376
- Koizuka N et al. (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile kosen radish. Plant J 34:407-415
- Koncz C, Schell J (1986) The promotor of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Mol Gen Genet 204:383-396
- Korth KL, Kaspi CI, Siedow JN, Levings CS, III (1991) URF13, a maize mitochondrial pore-forming protein, is oligomeric and has a mixed orientation in *Escherichia coli* plasma membranes. Proc Natl Acad Sci USA 88:10865-10869

- Kotera E, Tasaka M, Shikanai T (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433:326-330
- Kouranov A, Schnell DJ (1996) Protein translocation at the envelope and thylakoid membranes of chloroplasts. *J Biol Chem* 271:31009-31012
- Kriete G, Niehaus K, Perlick AM, Pühler A, Broer I (1996) Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *Plant J* 9:809-818
- Krishnasamy S, Grant RA, Makaroff CA (1994) Subunit 6 of the F₀-ATP synthase complex from cytoplasmic male-sterile radish: RNA editing and NH₂-terminal protein sequencing. *Plant Mol Biol* 24:129-141
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, Ichihara N, Estiati N, Mikami T (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA (Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res* 28:2571-2576
- Kudla J, Hayes R, Grussem W (1996) Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *EMBO J* 15:7137-7146
- Kuhnel MG, Strickland R, Palmer JD (1990) An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* 250:1570-1573
- Kulikauskas R, McCormick S (1997) Identification of the tobacco and Arabidopsis homologues of the pollen-expressed *LAT59* gene of tomato. *Plant Mol Biol* 34:809-814
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
- Lamb RS, Hill TA, Tan QK, Irish VF (2002) Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 129:2079-2086
- Lämmler UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

- Landgren M, Zetterstrand M, Sundberg E, Glimelius K (1996) Alloplasmic male-sterility Brassica lines containing *B.tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDA protein. *Plant Mol Biol* 32:879-890
- Lang BF et al. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling an eubacterial genome in miniature. *Nature* 387:493-497
- Laser KD, Lersten NR (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot Rev* 38:425-454
- Laughnan JR, Gabay-Laughnan S (1983) Cytoplasmic male sterility in maize. *Annu Rev Genet* 17:27-48
- Lecellier G, Silar P (1994) Rapid methods for nucleic acids extraction from petri dish grown mycelia. *Curr Genet* 25:122-123
- Lefort-Buson M, Guillot-Lemoine B, Datté Y (1987) Heterosis and genetic distance in rapeseed (*Brassica napus* L): crosses between European and Asiatic selfed lines. *Genome* 29:413-418
- Leon P, Arroyo A, Mackenzie S (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:453-480
- Levings CS, III (1990) The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. *Science* 250:942-947
- Levings CS, III, Brown GG (1989) Molecular biology of plant mitochondria. *Cell* 56:171-179
- Levings CS, III, Siedow JN (1992) Molecular basis of disease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize. *Plant Mol Biol* 19:135-147
- Levings CS, III, Vasil IK (1995) *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*. Kluwer Academic Publishers, Boston
- L'Homme Y, Brown GG (1993) Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile Brassica mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. *Nucleic Acids Res* 21:1903-1909

- Lim SM, Hooker AL (1972) Disease determinant of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* 62:968-971
- Linke B, Börner T (2005) Mitochondrial effects on flower and pollen development. *Mitochondrion* 5/6:389-402
- Liu F, Cui X, Horner HT, Weiner H, Schnable PS (2001) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13:1063-1078
- Lonsdale DM (1989) The plant mitochondrial genome. In: Stumpf PK, Conn EE (eds) *The biochemistry of plant: a comprehensive treatise*. Academic Press, New York, pp 229-295
- Lonsdale DM (1984) A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants. *Plant Mol Biol* 3:201-206
- Lonsdale DM (1989) The plant mitochondrial genome. In: Stumpf PK, Conn EE (eds) *The biochemistry of plant: a comprehensive treatise*. Academic Press, New York, pp 229-295
- Lu B, 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
- Luirink J, Samuelsson T, de Gier JW (2001) Yid/Oxa1p/Alb3: evolutionary conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett* 501:1-5
- Luo H, Lyznik LA, Gidoni D, Hodges TK (2000) FLP-mediated recombination for use in hybrid plant production. *Plant J* 23:423-430
- Lurin C (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089-2103
- Maarse AC, Van Loon AP, Riezman H, Gregor I, Schatz G, Grivell LA (1984) Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein. *EMBO J* 3:2831-2837
- Mackenzie S, He S, Lyznik A (1994) The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol* 105:775-780

- Mackenzie SA, Chase CD (1990) Fertility restoration is associated with loss of a portion of the mitochondrial genome in cytoplasmic male-sterile common bean. *Plant Cell* 2:905-912
- Maier RM, Neckermann K, Igloi GL, 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, Grienenberger JM (1996) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* 32:343-365
- Makaroff CA, Apel IJ, Palmer JD (1989) The *atp6* coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male-sterile radish. *J Biol Chem* 264:11706-11713
- Makaroff CA, Apel IJ, Palmer JD (1990) Characterization of radish mitochondrial *atpA*: influence of nuclear background on transcription of *atpA*-associate sequences and relationship with male sterility. *Plant Mol Biol* 15:735-746
- Mariani C, de Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
- Mariani C et al. (1992) A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357:384-387.
- Marienfeld J, Unsel M, Brennicke A (1999) The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and imigrant information. *Trends Plant Science* 4:495-502
- Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118:9-17
- Mayfield SP, Yohn CB, Cohen A, Danon A (1995) Regulation of chloroplast gene expression. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:147-166
- McCormick S (1991) Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet* 7:298-303
- McCormick S (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* 5:1265-1275

- Michel F, Dujon B (1983) Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear encoded members. *EMBO J* 2:33-38
- Michel F, Ferat JL (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem Biophys Acta* 64:435-461
- Michel F, Umesono K, Ozeki H (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns- a review. *Genes Dev* 82:5-30
- Moffatt B, Somerville C (1988) Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyl transferase activity. *Plant Physiol* 86:1150-1154
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murcha MW, Rudhe C, Elhafez D, Adams KL, Daley DO, Whelan J (2005) Adaptations required for mitochondrial import following mitochondrial to nucleus gene transfer of ribosomal protein S10. *Plant Physiol* 138:2134-2144
- Murtif VL, Bahler CR, Samols D (1985) Cloning and expression of the 1.3S biotin-containing subunit of transcarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5617-5621
- Myers AM, Tzagoloff A, Kinney DM, Lusty CJ (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* 45:299-310
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cyt* 132:1-30
- Neuhaus JM, Boevink P (2001) The green fluorescent protein (GFP) as reporter gene in plant cells. In: Haves CR, Satiat-Jeunemaitre B (eds) *Plant Cell Biology*. Oxford University Press, Oxford, pp 127-142
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66:863-917
- Newton KJ, Knudsen C, Gabay-Laughnan S, Laughnan JR (1990) An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell* 2:107-113

- Nivison HT, Hanson MR (1989) Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Plant Cell* 1:1121-1130
- Notsu Y et al. (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
- Oda K, Kohchi T, Ohyama K (1992) Mitochondrial DNA of *Marchantia polymorpha* as a single circular form with no incorporation of foreign DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* 56:132-135
- Ogihara Y et al. (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 33:6235-6250
- Ohta E, Oda K, Yamamoto K, Nakamura Y, Takemura M (1993) Group I Introns in the liverwort mitochondrial genome: the gene coding for subunit 1 of cytochrome oxidase shares five intron positions with its fungal counterparts. *Nucleic Acids Res* 21:1297-1305
- Oldenburg DJ, Bendich AJ (2001) Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5' protein. *J Mol Biol* 310:549-562
- Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, Funes S, Bonnefoy N, Herrmann JM (2006) Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *Embo J* 25:1603-1610
- Paddon CJ, Vasantha N, Hartley RW (1989) Translation and processing of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular RNase. *J Bacteriol* 171:1185-1187
- Palmer J (1990) Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet* 6:115-120
- Palmer JD (1992) Comparison of chloroplast and mitochondrial genome evolution in plants. In: *Plant gene research: cell organelles*. Herrmann RG (Hrsg.), Springer-Verlag, Wien, New York, pp 99-133
- Palmer JD (1993) Evolutionary biology: a genetic rainbow of plastids. *Nature* 364:762-763

- Palmer JD, Adams KL, Cho Y, Parkinson CL, Qiu Y-L, Song K (2000) Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6960-6966
- Palmer JD, Herbon LA (1987) Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr Genet* 11:565-570
- Palmer JD, Herbon LA (1988) Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *J Mol Evol* 28:87-97
- Palmer JD, Shields CR (1984) Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307:437-440
- Paul W, Hodge R, Smartt S, Draper J, Scott R (1992) The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Mol Biol* 19:611-622
- Pearson W (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* 183:63-98
- Peebles CL et al. (1986) A self-splicing RNA excises an intron lariat. *Cell* 44:213-223
- Peeters NM et al. (2000) Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J Mol Evol* 50:413-423
- Perez-Prat E, van Lookeren Campagne MM (2002) Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. *Trends Plant Science* 7:199-203
- Pfanner N, Hoeben P, Tropschug M, Neupert W (1987) The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J Biol Chem* 262:14851-14854
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233
- Preuss M, Leonhard K, Hell K, Stuart RA, Neupert W, Herrmann JM (2001) Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 153:1085-1095

- Pring DR, Brennicke A, Schuster W (1993) RNA editing gives a new meaning to the genetic information in mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* 21:1163-1170
- Pring DR, Chen W, Tang HV, Howad W, Kempken F (1998) Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male fertility in sorghum. *Curr Genet* 33:429-436
- Pring DR, Tang HV, Howad W, Kempken F (1999) A unique two-gene gametophytic male sterility system in sorghum involving a possible role of RNA editing in fertility restoration. *J Hered* 90:386-393
- Pring DR, Tang HV, Schertz KF (1995) Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. In: Levings CS, III, Vasil IK (eds) *The molecular biology of plant mitochondria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 461-495
- Rathburn HB, Hedgcoth C (1991) A chimeric open reading frame in the 5' flanking region of *cox1* mitochondrial DNA from cytoplasmic male-sterile wheat. *Plant Mol Biol* 16:909-912
- Reichel C et al. (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5888-5893
- Rezmer C, Schlichting R, Wächter R, Ullrich CI (1999) Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta* 209:399-405
- Rhoads DM, Levings CS, III, Siedow JN (1995) URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner mitochondrial membrane of cms-T mitochondria. *J Bioenerget Biomemb* 27:437-445
- Ritala A et al. (1994) Fertile transgenic barley to particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol Biol* 24:317-325
- Roe BA, Din-Pow M, Wilson RK, Wong JFH (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J Biol Chem* 260:9759-9774
- Rogers JS, Edwardson JR (1952) The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids. *Agron J* 44:8-13

- Rojiyaa EB, Robaato TF, Suteibun JR (1987) Protection of plant from virus infection. Patent: JP 1987201527-A/3
- Rojo EE, Stuart RA, Neupert W (1995) Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from the matrix requires ΔpH across the inner membrane and matrix ATP. *Embo J* 14:3445-3451
- Rottmann WH, Brears T, Hodge TP, Lonsdale DM (1987) A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility. *EMBO J* 6:1541-1546
- Saiki RK et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sakamoto W, Kondo H, Murata M, Motoyoshi F (1996) Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of Arabidopsis induced by chloroplast mutator. *Plant Cell* 8:1377-1390
- Salazar RA, Pring DR, Kempken F (1991) Editing of mitochondrial *atp9* transcripts from two Sorghum lines. *Curr Genet* 20:483-486
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM (1993) Group I and group II introns. *FASEB J* 7:15-24
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press
- Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends Biotechnol* 6:299-302
- Satoh M, Kubo T, Nishizawa S, Estiati A, Itchoda N, Mikami T (2004) The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. *Mol Gen Genomics* 272:247-256
- Schardl CL, Lonsdale DM, Pring DR, Rose KR (1984) Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. *Nature* 310:292-296

- Schardl CL, Pring DR, Fauron CMR, Lonsdale DM (1985) Mitochondrial DNA rearrangements resulting in fertile revertants of S-type male sterile maize. *Cell* 43:361-368
- Schatz G (1996) The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem* 271:31763-31766
- Schatz G, Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271:1519-1526
- Schlaman HR, Risseuw E, Franke-van Dijk ME, Hooykaas PJ (1994) Nucleotide sequence corrections of the *uidA* open reading frame encoding beta-glucuronidase. *Gene* 138:259-260
- Schmelzer C, 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
- Schmitz-Linneweber C, Regel R, Du TG, Hupfer H, Herrmann RG, Maier RM (2002) The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol* 19:1602-1612
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17:2791-2804
- Schnable PS, Wise RP (1994) Recovery of heritable, transposon-induced, mutant alleles of the *rf2* nuclear restorer of T-Cytoplasm maize. *Genetics* 136:1171-1185
- Schnable PS, Wise RP (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Science* 3:175-180
- Schneider G, Sjöling S, Wallin E, Wrede P, Glaser E, Von Heijne G (1998) Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins* 30:49-60

- Schreiber DN, Dresselhaus T (2003) *In vitro* pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. *Plant Mol Biol Reporter* 21:31-41
- Schuster W, Brennicke A (1988) Interorganellar sequence transfer: plant mitochondrial DNA is nuclear, is plastid, is mitochondrial. *Plant Sci* 54:1-10
- Schuster W, Brennicke A (1994) The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:61-78
- Schuster W, Hiesel R, Isaac PG, Leaver CJ, 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
- Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Müller M, Potrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotech* 3:1099-1103
- Shoffner JM (1996) Maternal inheritance and the evaluation of oxidative phosphorylation diseases. *Lancet* 9:1283-1288
- Short JM, Fernandez M, J.A. S, Huse WD (1988) lambdaZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vitro* excision properties. *Nucleic Acids Res* 16:7583-7600
- Siculella L, Palmer J (1988) Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atpA* gene. *Nucleic Acids Res* 16:3787-3799
- Singh M, Brown GG (1991) Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell* 3:1349-1362
- Sjöling S, Glaser E (1998) Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends Plant Science* 3:136-140

- Smagula C, Douglas MG (1988) Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequences required for receptor binding and membrane translocation. *J Biol Chem* 263:6783-6790
- Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif - A TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25:46-47
- Smart CJ, Moneger F, Leaver CJ (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell* 6:811-825
- Smith HC, Gott JM, Hanson MR (1997) A guide to RNA editing. *RNA* 3: 1105-1123
- Soll J, Schleiff E (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:198-208
- Sontheimer EJ, Sun S, Piccirilli JA (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, Bolle N, Kempken F (2005) Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric *atp6* transcripts. *Mol Genet Genom* 273:130-136
- Staudinger M, 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
- Staudinger M, Kempken F (2004) In organello editing of mitochondrial *atp9*, *cox2*, and *nad9* transcripts. *Endocytobiosis Cell Res* 15:551-560
- Stern DB, 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
- Stern DB, Palmer JD (1986) Tripartite mitochondrial genome of spinach: physical structure, mitochondrial gene mapping, and locations of transposed chloroplast DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 14:5651-5666

- Stintzi A, Browse J (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 97:10625-10630
- Stockmeyer K (1999) Heterologe Expression und Funktionsanalyse des CMS-assoziierten offenen Leserahmens *orf107* aus *Sorghum bicolor* in Tabak. Diplomarbeit Ruhr-Universität Bochum
- Stockmeyer K, Kempken F (2006) Engineered male sterility in plant hybrid breeding. Prog Bot 67:178-185
- Stockmeyer K, Pring DR, Kempken F (2005) Nuclear localized CMS-associated ORF107 of mitochondrial origin is imported into mitochondria without a target signal. Endocytobiosis Cell Res 16:1-8
- Stuart RA, Neupert W (1996) Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria. Trends Biochem Sci 21:261-267
- Sugita M, Sugiura M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. Plant Mol Biol 32:315-326
- Sugiyama Y et al. (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. Mol Gen Genomics 272:603-615
- Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, Herrmann JM (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. Embo J 22:6448-6457
- Tang HV, Chang R, Pring DR (1998) Cosegregation of single genes associated with fertility restoration and transcript processing of Sorghum mitochondrial *orf107* and *urf209*. Genetics 150:383-391
- Tang HV, Pring DR, Muza FR, Yan B (1996a) Sorghum mitochondrial *orf25* and a related chimeric configuration of a male-sterile cytoplasm. Curr Genet 29:265-274
- Tang HV et al. (1996b) Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile Sorghum. Plant J 10:123-133

- Tatuch Y et al. (1992) Heteroplasmic mtDNA mutation (T->G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Human Genet* 50:852-858
- Taylor AB, Smith BS, Kitada S, Kojima K, Miyaura H, Otwinowski Z (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* 9:615-625
- Thompson JD, Higgins DG, 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
- Truscott KN, Brandner K, Pfanner N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13:326-337
- Tsudzuki T, Wakasugi T, Sugiura M (2001) Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. *J Mol Evol* 53:327-332
- Twell D, Yamaguchi J, McCormick S (1990) Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109:705-713
- Twell D, Yamaguchi J, Wing RA, Ushiba J, McCormick S (1991) Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev* 5:496-507
- Ullstrup AJ (1972) The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. *Annu Rev Phytopathol* 10:37-50
- Umbeck PF, Gengenbach BG (1983) Reversion of male-sterile T-cytoplasm maize to male fertility in tissue culture. *Crop Sci* 23:584-588
- Unsold M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15:57-61
- Valadkhan S, Manley JL (2001) Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* 413:701-707

- van der Veen R, Arnberg AC, van der Horst G, Bonen L, Tabak HF, 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
- Vasil IK, Ahuja MR, Vasil V (1979) Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv Genet* 20:127-215
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. *Biotech* 10:667-674
- von Allmen JM, Rottmann WH, Gengenbach BG, Harvey AJ, Lonsdale DM (1991) Transfer of methomyl and HmT-toxin sensitivity from T-cytoplasm maize to tobacco. *Mol Gen Genet* 229:405-412
- Wang Z et al. (2006) Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell*
- Ward GC, Levings CS, III (1991) The protein-encoding gene *T-urf13* is not edited in maize mitochondria. *Plant Mol Biol* 17:1083-1088
- Ward WW, Cody CW, Prasher DC, Prendergast FG (1989) Sequence of the chemical structure of the hexapeptide chromophore of Aequorea green-fluorescent protein. *Photochem Photobiol* 49:1-62
- Watson K (1972) The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 55:721-726
- Whitfield P, Bottomley W (1993) Organisation and structure of chloroplast genes. *Annu Rev Plant Physiol* 34:279-310
- Wilson RK, Hanson MR (1996) Preferential RNA editing at specific sites within transcripts of two plant mitochondrial genes does not depend on transcriptional context or nuclear genotype. *Curr Genet* 30:502-508
- Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, McCormick S (1990) Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol Biol* 14:17-28

- Wintz H et al. (1995) Expression of the CMS-associated *urfS* sequence in transgenic Petunia and tobacco. *Plant Mol Biol* 28:83-92
- Wise RP, Fliss AE, Jr., Pring DR, Gengenbach BG (1987a) *urf13-T* of T cytoplasm maize mitochondria encodes a 13,000 kD polypeptide. *Plant Mol Biol* 9:121-126
- Wise RP, Pring DR, Gengenbach BG (1987b) Mutation to male fertility and toxin insensitivity in T-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2858-2862
- Wolff G, Plante I, Lang F, Kück U, Burger G (1994) Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii*. Gene content and genome organization. *J Mol Biol* 237:75-86
- Worrall D, Hird DL, Hodge R, Wyatt P, Draper J, Scott R (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4:759-771
- Xu GW, Cui YX, Schertz KF, Hart GE (1995) Isolation of mitochondrial DNA sequences that distinguish male-sterility-inducing cytoplasms in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor Appl Genet* 90:1180-1187
- Young EG, Hanson MR (1987) A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50:41-49
- Yu W, 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
- Zabala G, Gabay-Laughnan S, Laughnan JR (1997) The nuclear gene *Rf3* affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R implicated in S-type male sterility in maize. *Genetics* 147:847-860
- Zabaleta E, Heiser V, Grohmann L, 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* 15:49-59

8. Anhang

```

                                (S)                                (S)
M S R L Y M L E G A K L I G A I A V V F A V A
ATGTCGCGACTCTACATGTTAGAAGGAGCTAAATTAAATAGGTGCTATAGCTGTAGTTTTCGCTGTAGC      68
                                T                GG      CTACAATT  T      atp9
M S R L Y M L E G A K L I G A G A A T I A L A
                                (S)

                                (S) (P)
G A S A G I W N G M K R K E T F S L H Q F M
GGGAGCTTCCGCCGGTATTTGGAATGGGATGAAAAGAAAGGAAACTTTCTCATTGCATCAATTCATGC      136
      G TGT  G  G A C]  atp9
G A A V G I G N

L F A A C P I I V A V L L F V V V L L Q Y R S
TATTTGCCGCTTGTCCCATCATAGTCGCGGTACTGCTTTTTGTTGTTGTCTTACTACAATACCGCTCG      204
                                [  T G  -----  CT  G  A G  T A G G  C  orf79
                                L  L  F                A  L  L  K  Y  Q  A

P L Y S H A I I E Q I I A H N I Q V G H P M E
CCGCTATACAGCCATGCGATAATCGAGCAAATCATAGCGCACAAACATTCAAGTTGGCCATCCAATGGA      272
T G  GA  CG  TT  G  AA                AT  T  T  AA  CC  G  C  T  A  orf79
P L Y D P A L M E K I I D H N I K A G H P I E

V D Y G W F G V K V S V I R P K *
GGTCGACTACGGATGGTTTGGCGTAAAAGTGAGCGTCATCCGTCCAAAGTAG      324
T  TTCG  GG  ACCTCTA TC T AG TT T  A  orf79
V D Y S W W G T S I R V V F P K

```

Abb. 31: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz der cDNA des *orf107* Transkriptes. Sequenz der vollständig edierten cDNA des 324 Bp großen *orf107* aus der Hirselinie A3Tx398 verändert nach Tang et al. (1996b). RNA-Edierungen sind fett gedruckt und unterstrichen, die dadurch ausgetauschten Aminosäuren sind in Klammern angegeben. Die zu *atp9*- und *orf79* aus Reis homologen Sequenzen sind eingezeichnet. Dazwischen befindet sich ein Sequenzbereich unbekannter Herkunft. Die Nummerierung der Nukleotid-Positionen bezieht sich auf den Translationsstart. Das Stopp-Kodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

(A)	MSRLYMLEGAKLIGAIIVVFAVAGASAGIWN	31
(B)	MLEGAKLIGAGAATIALAGAAIGIGNMKRKETFSLHQFM	40
	LFAACPIIVAVLLFVVLLQYRSPLYSHAIIEQIIAHNIQ	80
	VGHPMEVDYGWFGVKVSVIRPK	102

Abb. 32: Vergleich des N-Terminus zwischen ORF107 und modifiziertem ORF107.

Der zum *S. bicolor atp9* homologe Anfang (A) des *orf107* Gens wurde gegen die Sequenz des *atp9* aus *A. thaliana* ausgetauscht. Dadurch wurde die N-terminale, fünf Aminosäuren lange Extension des ORF107 entfernt. (B) Aminosäuresequenz des modifizierten OFR107.

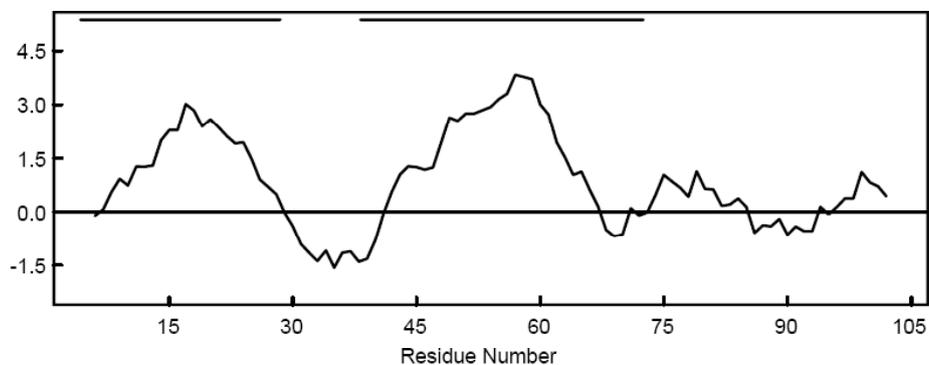


Abb. 33: Hydropathieprofil des ORF107.

Auf der x-Achse sind die Nummern der Aminosäuren aufgetragen, die y-Achse gibt den Hydropathie-Index nach Kyte und Doolittle (1982) an. Es sind zwei stark hydrophobe Domänen des ORF107 Proteins (NCBI „accession“-Nummer gi: 16205457) zu erkennen. Das Profil wurde mit dem Computerprogramm WIN PEP erstellt.

Eigene Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Stockmeyer K, Pring DR, Kempken F (2005) Nuclear localized CMS-associated ORF107 of mitochondrial origin is imported into mitochondria without a target signal. *Endocytobiosis Cell Res* 16:1-8

Stockmeyer K, Kempken F (2006) Engineered male sterility in plant hybrid breeding. *Prog Bot* 67:178-185

Stockmeyer K., Pring DR, Kempken F (2006/2007) Heterologous expression of the cytoplasmic male sterility-associated *orf107* from *Sorghum bicolor* in *Arabidopsis thaliana*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Tagungsbeiträge

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

Stockmeyer K, Hauser M, Kempken F (2001) Pollen-specific expression of the cytoplasmic male sterility-associated *orf107* from *Sorghum bicolor* in tobacco. Abstract of the 188th Conference of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Bochum, *Biol Chem* 382:157

Stockmeyer K, Kempken F (2002) Herstellung von heterologen Proteinen in Pflanzen (GVC/Dechema-Jahrestagung, Wiesbaden). *Chemie - Ingenieur - Technik* 74:700

Stockmeyer K, Kempken F (2003) Expression des CMS-assoziierten *orf107* aus *Sorghum bicolor* in Tabak. 16. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

- Stockmeyer K, Kempken F (2003) Production of heterologous proteins in plants. In: "Abstracts of the 51st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research", Kiel, p 168
- Kempken F, Stockmeyer K, Staudinger M (2004) RNA-Prozessierung in pflanzlichen Mitochondrien. "17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen", Wermelskirchen-Dabringhausen
- Stockmeyer K, Kempken F (2004) Heterologous expression of a CMS-associated chimeric ORF from *Sorghum bicolor*. In: "Abstracts der Vorträge und Poster der Botanikertagung", Braunschweig, p 68
- Stockmeyer K, Kempken F (2005) Nuclear localized CMS-associated ORF107 of mitochondrial origin is imported into mitochondria without a target signal. "18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen", Wermelskirchen-Dabringhausen
- Stockmeyer K, Pring DR, Kempken F (2006) Nuclear localized CMS-associated ORF107 of mitochondrial origin is imported into mitochondria without a target signal. Plant Genetics Conference, Kiel

Weitere Veröffentlichungen

- Stockmeyer K, Kempken F (2003) Production of proteins for biopharmaceutical and industrial uses in transgenic plants. *Prog Bot* 65:179-192
- Kempken F, Kempken R, unter Mitarbeit von Stockmeyer K (2004) Gentechnik bei Pflanzen - Chancen und Risiken. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Kempken, meinem akademischen Lehrer und Doktorvater, gilt mein besonderer Dank für sein Vertrauen, das er mir mit der Überlassung des Themas entgegengebracht hat. Weiterhin möchte ich mich für die interessante Themenstellung, die materielle Unterstützung und die vielen hilfreichen Anregungen, sowie für sein fortdauerndes Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Kempken (Bochum) und der Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie (Kiel) für jegliche Unterstützung.

Hanna Schmidt danke ich zudem für die Anzucht der F₁-Pflanzen und Christine Desel für die Einweisung in das CLSM-Mikroskop.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Matthias Staudinger, der mir durch vielfältige Hilfe und auch aufmunternde Worte beiseite stand.

Herrn Prof. Dr. U. Kück (Bochum) möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und die exzellenten Arbeitsmöglichkeiten an seinem Lehrstuhl danken.

Dem Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. E.W. Weiler, Ruhr-Universität Bochum möchte ich für die Bereitstellung der Tabakpflanzen, Agrobakterien und des Plasmids pBI121 danken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die in jeder Lebenslage voll hinter mir steht und mich unterstützt.

Diese Arbeit wurde zum Teil durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Nordrhein-Westfalen und durch die Max-Buchner-Stiftung (Frankfurt) gefördert.

Lebenslauf

Kerstin Stockmeyer

Persönliche Daten:

Geburtsdatum 22.10.1971
Geburtsort Essen
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung:

1978 – 1982 Grundschule in Essen
1982 – 1991 Gymnasium Borbeck in Essen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1991 – 1992 Studium des Bauingenieurwesens an der Universität
Gesamthochschule Essen
1992 – 1999 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum unter
Betreuung von Hdoz. Dr. F. Kempken am Lehrstuhl für
Allgemeine und Molekulare Botanik; Ruhr-Universität Bochum

Dissertation:

01.2000 – 09.2001 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter Betreuung von
Hdoz. Dr. F. Kempken am Lehrstuhl für Allgemeine und
Molekulare Botanik; Ruhr-Universität Bochum
10.2001 – 12.2006 Fortführung der experimentellen Arbeiten bei Prof. Dr. F.
Kempken in der Abteilung Botanische Genetik und
Molekularbiologie des Botanischen Instituts der Christian-
Albrechts-Universität Kiel

Arbeitsverhältnis:

01. - 09.2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Hdoz. Dr. F. Kempken,
Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik; Ruhr-
Universität Bochum
10.2001 - 09.2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung von Prof. Dr.
F. Kempken in Kiel
10.2004 - 03.2005 Lehrauftrag (Praktikum) an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
09.2005 – 09.2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. U. P. Hansen,
Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Sonstiges:

05.2000 Aufenthalt im Labor von Prof. Pring (Gainesville, USA) im
Rahmen eines DAAD-NSF-Programms

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meinen 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:

Stockmeyer K, Pring DR, Kempken F (2005) Nuclear localized CMS-associated ORF107 of mitochondrial origin is imported into mitochondria without a target signal. *Endocytobiosis Cell Res* 16:1-8

Stockmeyer K, Kempken F (2006) Engineered male sterility in plant hybrid breeding. *Prog Bot* 67:178-185

Stockmeyer K., Pring DR, Kempken F (2006/2007) Heterologous expression of the cytoplasmic male sterility-associated *orf107* from *Sorghum bicolor* in *Arabidopsis thaliana*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

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

Kiel, den

Kerstin Stockmeyer