

RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen

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



vorgelegt von

Nina Bolle

Kiel, 2008

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
1.1 Transkription in pflanzlichen Organellen	4
1.2 RNA-Prozessierung in den Organellen von Pflanzen	5
1.2.1 Spleißen von mitochondrialen und plastidären Transkripten .	5
1.2.2 RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien und in Plastiden	7
1.3 Problemstellung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Organismen	15
2.1.2 Oligonukleotide	15
2.1.3 Plasmide	18
2.1.4 Membranen und Filter	19
2.1.5 Chemikalien	19
2.1.6 Enzyme	19
2.1.7 Kits	20
2.1.8 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	20
2.1.9 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Kultur- und Anzuchtbedingungen	21
2.2.2 Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen . . .	22
2.2.3 Isolierung pflanzlicher Mitochondrien	22
2.2.4 Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.5 Elektroporation isolierter Mitochondrien	24
2.2.6 <i>In organello</i> Inkubation isolierter Mitochondrien	25
2.2.7 Isolierung von Nukleinsäuren	25

2.2.8	Extraktion mitochondrialen Proteins aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> und aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkulturen	27
2.2.9	Isolierung RNA-bindender Proteine durch Biotin-Streptavidin-Interaktion	27
2.2.10	Gelelektrophorese	29
2.2.11	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	30
2.2.12	Silber-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	30
2.2.13	Probenvorbereitung für MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie	31
2.2.14	Reinigung und Gelelution von DNA	32
2.2.15	Hydrolyse von DNA	32
2.2.16	Dephosphorylierung von DNA	32
2.2.17	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.18	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.2.19	<i>In vitro</i> Mutagenese von Plasmid-DNA	33
2.2.20	<i>In vitro</i> Transkription	34
2.2.21	Sequenzierung von DNA	34
2.2.22	Auswertung von Nukleotid- und Protein-Sequenzen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Etablierung des <i>in organello</i> Systems für <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> und für <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3.2	Analyse der RNA-Edierung von <i>cox2</i> Transkripten in heterologen Mitochondrien	37
3.2.1	RNA-Prozessierung des <i>Zea mays cox2</i> Transkriptes in Mitochondrien aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	37
3.2.2	RNA-Prozessierung des <i>Zea mays cox2</i> Transkriptes in Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
3.2.3	Analyse der RNA-Edierung des <i>Arabidopsis thaliana cox2</i> Transkriptes in Mitochondrien aus <i>Zea mays</i>	43
3.2.4	RNA-Edierungspositionen im <i>cox2</i> Transkript aus mono- und dikotylen Pflanzen	46
3.3	<i>In organello</i> RNA-Edierung von <i>in vitro</i> mutierten <i>cox2</i> Transkripten	47
3.4	Analyse der RNA-Edierung von <i>nad6</i> und <i>atpA</i> Transkripten in heterologen Mitochondrien	51
3.5	RNA-Prozessierung von plastidären Transkripten in Mitochondrien aus <i>Zea mays</i> und <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	52

3.5.1	Analyse der <i>in organello</i> RNA-Edierung des <i>ndhB</i> Transkriptes ohne Intron	56
3.5.2	Vergleich von <i>Zea mays ndhB</i> Edierungspositionen mit mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus <i>Zea mays</i> . . .	58
3.6	Isolierung und Identifizierung von mitochondrialen Proteinen die an RNA-Fragmente mit Edierungspositionen binden	60
3.6.1	Verwendete Proteinextrakte und RNA-Fragmente	60
3.6.2	Optimierung der Methode zur Isolierung von RNA-bindenden Proteinen	63
3.6.3	Keine spezifische Bindung von Proteinen an das 300 Nukleotid große RNA-Fragment	65
3.6.4	Isolierung von Proteinen verschiedener Größe mit Bindung an das RNA-Fragment von 40 Nukleotiden	66
3.6.5	Identifizierung der spezifischen Proteine	67
4	Diskussion	72
4.1	Für zwei dikotyle Pflanzen wurden <i>in organello</i> Systeme entwickelt	73
4.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Zea mays cox2</i> Transkripte werden in heterologen Mitochondrien effizient gespleißt und ediert	74
4.2.1	Der Vergleich von <i>cox2</i> RNA-Edierungspositionen weist auf Existenz spezifischer Positionen monokotyleyler und dikotyleyler Pflanzen hin	78
4.2.2	Vorstellung des „self-guiding-transcript“ Modells der RNA-Edierung	78
4.3	<i>In vitro</i> mutierte <i>cox2</i> Transkripte werden korrekt ediert	81
4.4	Keine Edierung von <i>Arabidopsis thaliana nad6</i> und <i>Triticum sativum nad6</i> und <i>atpA</i> Transkripten in heterologen Mitochondrien . . .	83
4.5	Plastidäre Transkripte werden in pflanzlichen Mitochondrien weder gespleißt noch ediert	83
4.5.1	Ähnlichkeiten in den potentiellen <i>cis</i> -Sequenzen zwischen <i>Zea mays ndhB</i> und mitochondrialen Edierungspositionen . .	86
4.6	Isolierung von Proteinen mit Beteiligung an der RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen	87
4.6.1	An RNA-Edierungsposition bindendes mitochondriales Protein ist wahrscheinlich ein PPR-Protein	89
4.7	Ausblick	93
5	Zusammenfassung	95

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	iv
Literaturverzeichnis	98
A Anhang	120

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriophosphat
as	Aminosäure
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA („complementary“ DNA)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
G	Guanin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mRNA	Boten-RNA (m für „messenger“)
MSMO	„Murashige and Skoog Basal Salts with minimal organics“
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer RNA
NTPs	Ribonukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen („open reading frame“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
T-DNA	Transfer-DNA

Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
XGal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galactopyranosid

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

Die heutigen Pflanzenzellen entstammen nach der Endosymbiontentheorie zwei Endocytose-Ereignissen, die vor ca. 1,5 und 1,2 Milliarden Jahren stattgefunden haben. Hierbei sind durch Aufnahme eines Vorläufers der heutigen α -Proteobakterien sowie der Cyanobakterien in eine Archaeobakterien-ähnliche Wirtszelle die heutigen Mitochondrien und Plastiden entstanden. Ob die Wirtszelle zu dem Zeitpunkt der Endosymbiose des α -Proteobakteriums schon einen Kern besaß oder nicht, ist bis heute unklar (Bogorad, 2008).

Aufgrund dieser eubakteriellen Abstammung besitzen sowohl die Mitochondrien als auch die Plastiden eigene Genome, die Chondriom bzw. Plastom genannt werden. Durch den Transfer eines Großteils der Gene aus den Plastiden in den Kern und in die Mitochondrien sowie aus den Mitochondrien in den Kern verloren die Endosymbionten im Laufe der Evolution ihre Unabhängigkeit. Mit der Fähigkeit zur Expression der organellenkodierten Gene erhielten sie sich allerdings einen Teil ihrer Autonomie (Bogorad, 2008).

Die Plastome bestehen aus zirkulären oder linearen DNA-Molekülen (Bendich, 2004) und weisen eine Größe von 120 bis 217 kbp auf (Palmer, 1990; Raubeson et al., 2007). Insgesamt befinden sich 50-200 Gene und somit 5-10% der Gene, die in heutigen Cyanobakterien vorhanden sind (Martin et al., 2002), noch in den Plastiden. Diese Gene kodieren für Proteine, ribosomale RNAs (rRNAs) und Transfer RNAs (tRNAs), welche an der Photosynthese und der plastidären Transkription und Translation beteiligt sind (Sugiura, 1992).

Die Chondriome der verschiedenen Organismengruppen unterscheiden sich dagegen stark in ihrer Struktur, ihrer Größe und der Kodierungskapazität. Die mitochondrialen Genome der Pflanzen variieren sogar innerhalb ihrer Gruppe stark in der Größe. So weist die Alge *Chaetosphaeridium globosum* mit 56 kbp ein vergleichsweise kleines Chondriom auf. Unter den Landpflanzen dagegen reichen die Chondriomgrößen von 186 kbp bei *Marchantia polymorpha* bis knapp 570 kbp bei *Zea mays* (Turmel et al., 2002; Oda et al., 1992; Clifton et al., 2004) und in der

Tabelle 1.1: Übersicht über bisher sequenzierte mitochondriale Genome von Angiospermen

Pflanzenart (Sorte)	Genomgröße [Nukleotide]	Anzahl der Gene ¹	Anzahl der RNA- Edierungspositionen in offenen Leserahmen
<i>Arabidopsis thaliana</i> ²	366924	50	441 ³
<i>Beta vulgaris</i> (TK81-0) ⁴	368801	51	357 ⁵
<i>Beta vulgaris</i> (TK81-MS) ⁶	501020	52	nb
<i>Oryza sativa</i> L. ⁷	490520	55	491
<i>Brassica napus</i> L. ⁸	221853	54	427
<i>Zea mays</i> NB ⁹	569630	52	nb
<i>Triticum aestivum</i> ¹⁰	452528	52	nb
<i>Nicotiana tabacum</i> ¹¹	430597	60	nb

¹ nach (Kubo und Mikami, 2007) ohne Berücksichtigung der Kopiezahl; ² Unseld et al., 1997;

³ Giege und Brennicke, 1999; ⁴ Kubo et al., 2000; ⁵ Mower und Palmer, 2006; ⁶ Satoh et al., 2004;

⁷ Notsu et al., 2002; ⁸ Handa, 2003; ⁹ Clifton et al., 2004; ¹⁰ Ogihara et al., 2005; ¹¹ Sugiyama et al., 2005; nb= nicht bestimmt.

Familie der Cucurbitaceen werden sogar Größen bis über 2000 kbp erreicht (Ward et al., 1981). Die Größe der pflanzlichen Chondriome und die Variationen in den Größen sind auf die intergenischen Regionen zurückzuführen, welche 69-87% des mitochondrialen Genoms bei angiospermen Pflanzen ausmachen (Kubo und Mikami, 2007). Sequenzwiederholungen in diesen Regionen führen zu inter- und intramolekularen Rekombinationen und zu strukturell heterogenen, komplexen Chondriomen, welche aus mehreren subgenomischen zirkulären, linearen und linear verzweigten Molekülen bestehen (Fauron et al., 1995; Sugiyama et al., 2005; Bendich, 1996; Backert und Börner, 2000). Die Charakteristika der bisher sequenzierten mitochondrialen Genome von angiospermen Pflanzen sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Mit einer Anzahl von 50-60 Genen bei den angiospermen Pflanzen und bis zu 72 bei den nicht-angiospermen Pflanzen werden vor allem Untereinheiten der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, ribosomale Proteine, sowie rRNAs und tRNAs kodiert (Knoop, 2004; Kubo und Mikami, 2007).

Die mitochondriale Kodierungskapazität des Protisten *Reclinomonas americana* ist trotz seines vergleichsweise kleinen Genoms von 69 kbp mit einer Anzahl von 97 Genen, welche für Proteine und nichtkodierende strukturelle RNAs kodieren,

größer als die der Pflanzen (Lang et al., 1997).

Bei tierischen Chondriomen handelt es sich um relativ kleine zirkuläre Moleküle von 15-20 kbp, welche für bis zu 37 Gene kodieren. Hierbei handelt es sich um proteinkodierende Gene, tRNAs und rRNAs. Im Gegensatz zu den pflanzlichen mitochondrialen Genomen, gibt es in Chondriomen von Tieren, mit Ausnahme der Actiniaria keine Introns (Boore, 1999).

Eine sehr unübliche Struktur der mitochondrialen DNA findet man bei den Kinetoplastida, welche ein Netzwerk aus tausenden von Mini-(0,5-10 kbp) und Maxizirkeln (20-40 kbp) aufweisen. Die einzige Funktion der Minizirkel ist die Kodierung von sogenannten „guide“-RNAs, welche für die RNA-Edierung benötigt werden (siehe Abschnitt 1.2.2). Nur die Maxizirkel kodieren für mitochondriale Strukturgene (Lukeš et al., 2005).

Ein Großteil der in den Plastiden und in den Mitochondrien vorliegenden Proteine werden aus dem Kern importiert (Martin et al., 2002; Dolezal et al., 2006). So wird etwa 2900 bzw. 3500 kernkodierten Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* aufgrund von ermittelten Transitpeptiden eine mitochondriale bzw. plastidäre Lokalisierung zugeordnet. Von den Proteinen mit vorhergesagter mitochondrialer Lokalisierung haben einige einen α -proteobakteriellen Ursprung und stammen somit aus dem Transfer von Genen aus den Mitochondrien in den Kern. Andere Proteine, welche in den freilebenden Vorfahren der α -Proteobakterien nicht notwendig waren, wie z.B. Komponenten des Proteinimports, sind eukaryotischen Ursprungs (genome initiative, 2000).

Die komplexe Umstrukturierung der drei Genome der Pflanzen im Verlauf der Evolution war mit dem Erwerb von regulatorischen Elementen der transferierten Gene für die Transkription im Kern und die Translation im Cytoplasma, sowie mit der Aneignung von Transitpeptiden und einer Proteinimportmaschinerie für die anschließende Translokation der Proteine in die Organellen verbunden (Palmer et al., 2000; Dyall et al., 2004). Der Transfer von Genen aus den Organellen in den Kern scheint bis heute nicht abgeschlossen zu sein (Adams et al., 2000; Millen et al., 2001). So können für *cox2* Gene in Leguminosen Zwischenstufen des Transferprozesses aus den Mitochondrien in den Kern beobachtet werden (Nugent und Palmer, 1991; Adams et al., 1999).

1.1 Transkription in pflanzlichen Organellen

Die Transkription einiger Gene in den Plastiden erfolgt mittels einer plastidär kodierten RNA-Polymerase, der „plastid-encoded RNA polymerase“, kurz PEP genannt (Little und Hallick, 1988). Mit Ausnahme des Protisten *Reclinomonas americana*, dessen Chondriom ebenfalls für Untereinheiten einer eubakteriellen-ähnlichen RNA-Polymerase kodiert (Lang et al., 1997), liegen im Gegensatz zu den Plastiden in mitochondrialen Genomen keine Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu RNA-Polymerase-Genen vor (Binder und Brennicke, 2003). Die Transkription mitochondrialer und auch vieler plastidärer Gene erfolgt mittels Phagen-ähnlicher kernkodierter RNA-Polymerasen. Dies ist die mitochondrial lokalisierte RpoTm, die plastidär lokalisierte RpoTp sowie die RpoTmp. Letztere wurde bisher nur in dikotylen Pflanzen gefunden und eine Lokalisierung sowohl in Mitochondrien, als auch in Plastiden beschrieben (für Übersichtsartikel siehe Liere und Börner, 2006; Gagliardi und Binder, 2007). Bisher konnte für RpoTmp in Plastiden aus *A. thaliana* eine spezifische Funktion bei der Transkriptionsinitiierung an bestimmten Promotoren nachgewiesen werden (Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008), die Funktion in Mitochondrien ist allerdings noch unbekannt.

Für mitochondrial lokalisierte Phagen-ähnliche RNA-Polymerasen aus einigen Organismen sind Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, bis heute aber keine aus pflanzlichen Mitochondrien (Gagliardi und Binder, 2007). Allerdings wurde in biochemischen Analysen ein DNA-bindendes kernkodiertes Protein aus Weizen identifiziert, welches *in vitro* die Transkription von einem *cox2* Promotor aus stimuliert und somit ein Kandidat für einen Transkriptionsfaktor ist (Ikeda und Gray, 1999). Für die Transkription in Plastiden sind hingegen, zusätzlich zu mit PEP interagierenden Sigma-Faktoren (für einen Übersichtsartikel siehe Lysenko, 2007), mehrere Proteine beschrieben worden, die an der Promotorerkennung beteiligt sind (Liere und Börner, 2006).

Sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden sind multiple Promotoren sehr häufig. Viele der Promotoren enthalten das Konsensus-Motiv 5' YRTA 3' (Y= T oder C; R= A oder G), welches in mitochondrialen Promotoren aus dikotylen Pflanzen meist eingebettet in das Nonanukleotid-Motiv 5' CRTAAGAGA 3' vorliegt. In Kühn et al. (2005) wurden allerdings für *A. thaliana* auch abweichende Promotormotive beschrieben. Die mitochondrialen Promotoren monokotyler Pflanzen sind insgesamt weniger konserviert als die dikotyler Pflanzen und weichen häufig von dem oben genannten Konsensus-Motiv ab (Binder und Brennicke, 2003; Liere und Börner, 2006; Gagliardi und Binder, 2007).

1.2 RNA-Prozessierung in den Organellen von Pflanzen

Die mono-, bi- und polycistronischen Transkripte in Mitochondrien und Plastiden unterliegen einer Reihe von Prozessierungsschritten wie der RNA-Edierung, dem Spleißen von Introns und der Erzeugung von sekundären 5' und 3' Enden durch Exo- und Endonukleasen. Posttranskriptionelle Prozesse und RNA-Stabilität scheinen auch bei der Regulation der Genexpression in den Organellen eine wichtige Rolle zu spielen (für Übersichtsartikel siehe Gagliardi und Binder, 2007; Marchfelder und Binder, 2004).

1.2.1 Spleißen von mitochondrialen und plastidären Transkripten

Die Introns in pflanzlichen Mitochondrien und Plastiden werden aufgrund ihrer Sequenz, ihrer Struktur und ihres Spleißmechanismus in Gruppe I und Gruppe II Introns unterteilt (Saldanha et al., 1993). Die Gruppe I Introns weisen eine Sekundärstruktur auf die aus den Elementen P1 bis P10 besteht, viele der Introns sind allerdings strukturell reduziert, so dass nicht alle der Elemente vorhanden sind. Die Größe von Gruppe I Introns reicht von 142 bis über 3000 Basen (Lang et al., 2007). An dem Spleißmechanismus ist ein freies Guanosin beteiligt, das einen nukleophilen Angriff an der 5' Spleißstelle durchführt, der gefolgt ist von einem nukleophilen Angriff der freigesetzten 3' OH-Gruppe des ersten Exons an der 3' Spleißstelle (Saldanha et al., 1993). Im Gegensatz zu den zahlreichen Gruppe II Introns kommen Introns der Gruppe I in Höheren Pflanzen nur selten vor. So ist innerhalb der angiospermen Chondriome nur ein Gruppe I Intron bekannt, welches bei den betreffenden Pflanzen im *coxI* Gen vorliegt (Cho et al., 1998).

Hingegen kommen in den Mitochondrien und Plastiden Höherer Pflanzen jeweils ca. 20 Gruppe II Introns vor, die in den Mitochondrien bis auf die in einigen Spezies vorkommende Ausnahme des *trnA* Gens (Ohtani et al., 2002; Ogihara et al., 2005), alle in proteinkodierenden Regionen liegen (Gagliardi und Binder, 2007). In den Plastiden kommen Gruppe II Introns sowohl in tRNA Genen als auch in proteinkodierenden Genen vor (Barkan, 2004).

Die meisten Gruppe II Introns liegen in den Organellen in der *cis*-Konfiguration vor, das heißt Intron und flankierende Exonsequenzen bilden ein primäres RNA-Molekül. In einigen Fällen hingegen liegen Gene mit den dazugehörigen Introns

fragmentiert in zwei oder mehreren Teilen im Genom vor und werden unabhängig voneinander transkribiert. Bei dem dann durchgeführten *trans*-Spleißen entsteht die funktionelle RNA erst durch die Zusammenfügung der Teil-Introns zu einer funktionellen Intronstruktur, welche zu einem Spleißen der Introns und somit zu miteinander verbundenen Exonsequenzen führt (Lehmann und Schmidt, 2003).

Die Gruppe II Introns weisen nur wenige konservierte Nukleotide, aber eine aus sechs Domänen bestehende komplexe, konservierte Sekundärstruktur auf, die innerhalb des Introns und zwischen Intron- und Exonbereichen Tertiärstrukturen ausbildet. Aufgrund von Unterschieden in der Sekundär- und Tertiärstruktur und von Sequenzunterschieden werden die Gruppe II Introns noch in die zwei Untergruppen IIA und IIB unterteilt. Dabei werden in diesen Untergruppen noch jeweils zwei weitere Unterfamilien unterschieden (A1, A2, B1 und B2). Die Größe dieser Introns variiert zwischen einigen hundert Nukleotiden und mehreren Kilobasen (Lehmann und Schmidt, 2003; Gagliardi und Binder, 2007).

Bei dem konventionellen Spleißmechanismus der Gruppe II Introns sind zwei Transester-Reaktionen involviert. Bei der ersten Transesterreaktion erfolgt durch die 2' OH-Gruppe eines ungebundenen Adenosins ein nukleophiler Angriff an der 5' Spleißstelle im Intron, und bei der zweiten greift dann die freigesetzte 3' OH-Gruppe des ersten Exons an der 3' Spleißstelle an. Bei diesem Spleißmechanismus wird das Intron in Form eines Lariats freigesetzt. Einige mitochondriale Gruppe II Introns in Pflanzen weichen allerdings von der konservierten Struktur ab, so dass sie z.B. kein ungebundenes Adenosin besitzen. Diese Introns unterliegen einem alternativen Spleißmechanismus, bei welchem der erste nukleophile Angriff durch Wasser erfolgt und der zweite unverändert abläuft. Das freigesetzte Intron liegt in diesem Fall linear oder zirkularisiert vor (Li-Pook-Than und Bonen, 2006).

Auch wenn einige Gruppe II Introns *in vitro* zum Selbst-Spleißen befähigt sind, wurde dies bisher nicht für die Introns in den Organellen von Landpflanzen nachgewiesen. Für ein effizientes *in vivo* Spleißen werden in den Organellen Proteinfaktoren benötigt. Hierbei handelt es sich um Intron-kodierte Maturasen sowie um kernkodierte Proteine. Solche Intron-kodierten Proteine sind in Chloroplasten und pflanzlichen Mitochondrien allerdings selten, hier ist nur die *matK* Maturase kodiert im *trnK* Gen in Plastiden sowie die *matR* Maturase in Mitochondrien bekannt (Gagliardi und Binder, 2007). Hinweise auf die Funktionalität der *matK* Maturase als Spleißfaktor wurden in Ribosomen-freien Gerste- und Mais-Plastiden erhalten. In diesen Mutanten lagen mehrere Transkripte, unter anderem das *trnK-matK* Transkript, ungespleißt vor (Hess et al., 1994; Hübschmann et al., 1996; Vogel et al., 1997; Jenkins et al., 1997; Vogel et al., 1999).

Weiterhin konnten in den letzten Jahren mehrere kernkodierte Faktoren, die für das Spleißen von Gruppe II Introns in Chloroplasten Höherer Pflanzen essentiell sind, identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein Protein der „pentatricopeptide repeat“(PPR)-Familie, welches ein *rps12 trans*-spleißender Faktor in Mais ist (Schmitz-Linneweber et al., 2006). Ein weiteres PPR-Protein scheint bei einem Spleißvorgang in *A. thaliana* Chloroplasten involviert zu sein (Meierhoff et al., 2003; Nakamura et al., 2003). Außerdem wurden in Mais-Chloroplasten mehrere Proteine, z.T. Untereinheiten desselben Proteinkomplexes, die für das Spleißen eines oder mehrerer Gruppe II Introns benötigt werden, identifiziert (Jenkins et al., 1997; Till et al., 2001; Jenkins und Barkan, 2001; Ostheimer et al., 2003; Osterseher et al., 2005; Watkins et al., 2007; Asakura und Barkan, 2007). Für vier dieser Spleißfaktoren sind außerdem für *A. thaliana* orthologe Faktoren mit ähnlichen Spleiß-Funktionen in den Chloroplasten beschrieben (Asakura und Barkan, 2006, 2007).

In *A. thaliana* wurden zu plastidären Spleißfaktoren orthologe Gene identifiziert, für deren Genprodukte eine mitochondriale Lokalisierung vorhergesagt wird (Ostheimer et al., 2003). Eine funktionelle Charakterisierung der entsprechenden Proteine steht allerdings noch aus. Des Weiteren wurden im Kerngenom von *A. thaliana* und *O. sativa* jeweils vier zu *matR* homologe Gene identifiziert. Für die Genprodukte aus *A. thaliana* und für eines aus *O. sativa* wurde auch eine mitochondriale Lokalisierung vorhergesagt (Mohr und Lambowitz, 2003). Für eines dieser Genprodukte, das At-nMat1a, wurde kürzlich eine *A. thaliana* Mutante beschrieben mit einem Spleiß-Defekt des mitochondrialen *nad4* Transkriptes (Nakagawa und Sakurai, 2006). In Übereinstimmung hierzu führte eine Mutation im Kerngenom in Tabak ebenfalls zu einem defektem Spleißen des mitochondrialen *nad4* Transkriptes (Brangeon et al., 2000).

1.2.2 RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien und in Plastiden

Die RNA-Edierung ist ein Prozess, der den Informationsgehalt der RNA verändert, so dass dieser sich von der auf DNA-Ebene vorliegenden Information unterscheidet. Bei der RNA-Edierung können zwei Haupttypen unterschieden werden: Die Nukleotidinsertion und -deletion sowie eine Änderung der Nukleotididentität durch Nukleotidumwandlung. Erstmals entdeckt wurde die RNA-Edierung von Benne et al. (1986) in mitochondrialen Transkripten aus Trypanosomen. Die inzwischen gut untersuchte RNA-Edierung in den Kinetoplastida besteht aus zahlreichen

Insertionen und Deletionen von Uridin in der mitochondrialen RNA. Die Positionsspezifität und die Information über die Art der Edierung wird hierbei durch kleine *trans*-agierende RNA-Moleküle, sogenannte „guide“-RNAs gewährleistet (Simpson et al., 2003).

RNA-Edierung ist weitverbreitet und wurde unter anderem in *Physarum* als Insertionen von Cytidin aber auch von anderen Nukleotiden und Dinukleotiden in die mitochondriale RNA (Mahendran et al., 1991) sowie in Paramyxoviren durch Insertionen von Guanodin in die mRNA beschrieben (Vidal et al., 1990). Beispiele für die RNA-Edierung durch Nukleotidumwandlung sind die Cytidin nach Uridin Edierung der *apoB* mRNA im Kern von Säugetieren (Powell et al., 1987; Chen et al., 1987) und die Adenosin nach Inosin Edierung im *GluR-B* Transkript in Vertebraten (Sommer et al., 1991; Übersichtsartikel über RNA-Edierung siehe Smith, 2006).

Auch bei der RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien (Covello und Gray, 1989; Gualberto et al., 1989; Hiesel et al., 1989) und in Plastiden (Hoch et al., 1991) handelt es sich um eine Nukleotidumwandlung. Meist ist dies eine Umwandlung der Base Cytosin nach Uracil (siehe Abb. 1.1a). Es gibt aber auch die Umwandlung von Uracil nach Cytosin, welche in den Mitochondrien und Plastiden aus Samenpflanzen nur sehr selten bzw. gar nicht vorkommt. Dagegen ist sie in den Organellen aus Nicht-Samenpflanzen wie z.B. dem Hornmoos sehr häufig (Bock, 2000; Takenaka et al., 2008). Die Anzahl der RNA-Edierungspositionen in den Organellen Höherer Pflanzen unterscheidet sich stark. So gibt es ungefähr 30 Edierungspositionen in den Plastiden (Maier et al., 1995; Wakasugi et al., 1996; Hirose et al., 1999; Corneille et al., 2000; Lutz und Maliga, 2001; Schmitz-Linneweber et al., 2002; Sasaki et al., 2003; Inada et al., 2004; Junior et al., 2004; Tillich et al., 2005; Kahlau et al., 2006; Zeng et al., 2007; Funk et al., 2007) und bis zu 500 RNA-Edierungspositionen in den Mitochondrien (siehe Tabelle 1.1).

Da RNA-Edierung in allen Abteilungen der Landpflanzen beobachtet, in Grünalgen aber bisher vergeblich gesucht wurde, wird inzwischen angenommen, dass es in einem frühem Vertreter der Landpflanzen zur Entstehung der RNA-Edierung gekommen ist (Hiesel et al., 1994; Malek et al., 1996; Freyer et al., 1997; Steinhäuser et al., 1999; Tillich et al., 2006a). Auch bei dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* scheint keine RNA-Edierung statt zu finden (Oda et al., 1992; Ohshima et al., 1993), allerdings wird hier ein sekundärer Verlust der RNA-Edierung vermutet (Groth-Malonek et al., 2007).

Es wurde gezeigt, dass das Zucker-Phosphat-Rückgrat des RNA-Moleküls bei der Edierung intakt bleibt, so dass es sich bei der RNA-Edierungsreaktion in den Organellen tatsächlich um eine Umwandlung und nicht um einen Austausch des

Nukleotids handelt (Rajasekhar und Mulligan, 1993; Yu und Schuster, 1995; Hirose und Sugiura, 2001). Die daran beteiligten Enzyme sind bis heute nicht identifiziert. Die Umwandlungsreaktion von Cytosin nach Uracil könnte ähnlich wie bei der Edierung der *apoB* mRNA in Säugetieren von einer Cytidin-Deaminase katalysiert werden (Greeve et al., 1991; Navaratnam et al., 1995). Faivre-Nitschke et al. (1999) identifizierten eine aus neun Cytidin-Deaminasen bestehende Genfamilie im Kern-Genom von *A. thaliana*. Für das einzige bisher charakterisierte Protein dieser Familie erscheint aber eine Beteiligung an der Edierungsreaktion in den Organellen unwahrscheinlich. In Übereinstimmung damit, dass klassische Deaminasen an das Reaktionszentrum gebundenes Zink benötigen, zeigten *in vitro* Analysen der RNA-Edierung mit plastidären Extrakten, dass die Zugabe von Zink-Chelatoren die Reaktion inhibiert (Hegemann et al., 2005). Eine ähnliche Analyse mit mitochondrialen Extrakten hingegen ergab keine Reduktion der Edierung nach Zugabe eines Zink-Chelators (Takenaka und Brennicke, 2003).

Weiterhin besteht die Möglichkeit der Beteiligung einer Transaminase an der Edierungsreaktion (siehe Abb. 1.1b), diese wäre auch in der Lage die umgekehrte Reaktion der Edierung von Uracil nach Cytosin zu katalysieren. Allerdings konnte auch hier mit mitochondrialen Extrakten kein Effekt von potentiellen Aminogruppen-Akzeptor-Molekülen auf die RNA-Edierungsreaktion beobachtet werden (Takenaka et al., 2008). Der strikte Bedarf von *in vitro* Edierungssystemen an NTPs weist des Weiteren auf die Beteiligung von RNA-Helikasen bei der RNA-Edierung hin (Takenaka und Brennicke, 2003; Hegemann et al., 2005). Diese könnten den Proteinen der RNA-Edierung durch die Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen und durch die Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen den Zugriff zur Edierungsposition erleichtern. So wurde in Takenaka et al. (2007) gezeigt, dass die Zugabe der NTPs zu dem *in vitro* Edierungssystem nicht notwendig ist für die RNA-Edierungsreaktion, sondern benötigt wird für die Entfernung des RNA-bindenden Enzyms Glutamat-Dehydrogenase.

Da die meisten der RNA-Edierungspositionen sich in proteinkodierenden Regionen befinden, führt ein Großteil der Edierungen zu einer Änderung der kodierten Aminosäuresequenz, so dass erst hierdurch das konservierte und somit funktionell aktive Protein gebildet werden kann. Aus diesem Grund ist die RNA-Edierung ein notwendiger Bestandteil der Genexpression in den Organellen von Pflanzen (Takenaka et al., 2008). So wurde in Kempken et al. (1998) die cytoplasmatisch männlich Sterilität von Hirse-Pflanzen auf einen Verlust der RNA-Edierung der mitochondrialen *atp6* mRNA in den Antheren zurückgeführt. Da durch die fehlende RNA-Edierung konservierte Aminosäuren des ATP6-Proteins nicht vorhanden waren, war

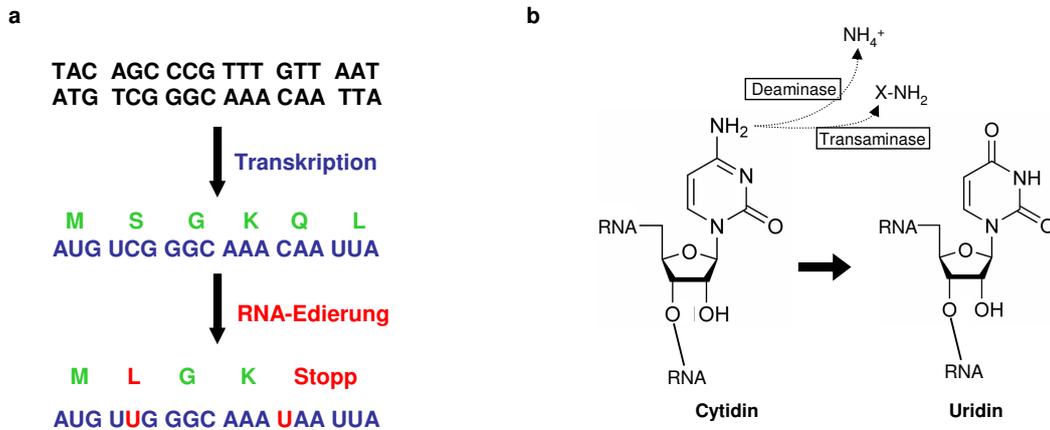


Abbildung 1.1: RNA-Edierung in Organellen von Pflanzen

a Die von der DNA-Sequenz kodierte RNA wird durch RNA-Edierung an zwei Positionen posttranskriptionell verändert. Hierdurch verändert sich die Aminosäuresequenz und ein vorzeitiges Stopp-Kodon entsteht. **b** Die biochemische Reaktion der RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien und Plastiden wird wahrscheinlich durch eine Deaminase oder eine Transaminase katalysiert. Abbildung **b** nach Takenaka et al. (2008).

wahrscheinlich die Funktionalität der ATP-Synthase beeinträchtigt, und es wurde weniger ATP produziert. Des Weiteren entsteht in einigen mRNAs erst durch die Edierung aus einem ACG Kodon das AUG Translationsstart-Kodon (Chapdelaine und Bonen, 1991; Hoch et al., 1991), oder in anderen Fällen wird erst durch die RNA-Edierung das Stopp-Kodon (siehe Abb. 1.1a) und dadurch der konservierte C-Terminus des Proteins gebildet (Kempken et al., 1991; Wintz und Hanson, 1991; Kugita et al., 2003). Des Weiteren befinden sich RNA-Edierungspositionen in tRNAs, in Introns und in 5' und 3' nichtkodierenden Regionen von Transkripten der Organellen sowie in pflanzlichen Mitochondrien auch in rRNAs (Maier et al., 1996; Kugita et al., 2003; Zeng et al., 2007).

Die Edierungseffizienz verschiedener Transkripte kann stark variieren. Während für einige Transkripte eine vollständige Edierung beschrieben worden ist, so z.B. für das *atp9* Transkript und für das gespleißte *cox2* Transkript aus Mais (Grosskopf und Mulligan, 1996), liegen andere Transkripte nur partiell ediert vor (Salazar et al., 1991; Grosskopf und Mulligan, 1996; Hirose et al., 1999). In Mitochondrien konnte auch für solche partiell edierten Transkripte im Falle des *rps12* aus verschiedenen Spezies eine Translation nachgewiesen werden und in *Petunia* wurden diese Proteine von unedierten und partiell edierten Transkripten sogar in Ribosomenfraktionen detektiert (Phreaner et al., 1996; Lu et al., 1996). Von dem RPS13 aus *Zea*

mays und dem NAD9 aus *Solanum tuberosum* hingegen konnten in den Mitochondrien und in den ribosomalen Fraktionen nur Proteine nachgewiesen werden, die von vollständig edierten Transkripten abstammen (Grohmann et al., 1994; Williams et al., 1998). Es wird angenommen, dass die Proteine von unvollständig edierten Transkripten nicht funktionell sind und deshalb die Proteine z.T. zwar gebildet aber dann als defekt erkannt und abgebaut werden (Takenaka et al., 2008).

In den letzten Jahren wurden *in vitro*-Analysen, sowie im Falle der Mitochondrien *in organello*-Analysen und für Plastiden *in vivo*-Analysen durch Plastidentransformation etabliert, um die Erkennung und Edierung von RNA-Edierungspositionen zu analysieren. Mittels dieser Analysen konnte die Größe und die Lokalisation der Bereiche identifiziert werden, welche für die Erkennung und RNA-Edierung einzelner Positionen essentiell sind. Es wurden *in organello* Systeme für Mitochondrien aus *Triticum aestivum* (Farré und Araya, 2001), aus *Solanum tuberosum* (Choury et al., 2005) und aus *Zea mays* und *Sorghum bicolor* (Staudinger und Kempken, 2003) etabliert. Es konnte hierdurch für die Weizen *cox2* Edierungspositionen C259 und C77 jeweils ein für die Edierung essentieller Bereich von 16 Nukleotiden stromaufwärts der Edierungsposition und sechs Nukleotide stromabwärts der Edierungsposition ermittelt werden (Farré et al., 2001; Choury et al., 2004). Hingegen konnte von Staudinger et al. (2005) für das Hirse *atp6* Transkript gezeigt werden, dass eine Edierung aller 19 im Transkript vorhandenen Edierungspositionen in Mais-Mitochondrien nur stattfindet, wenn der 5' untranslatierte Bereich und der 5' Bereich der kodierenden Sequenz von dem Mais *atp6* Transkript stammen. Da hierbei alle Edierungspositionen des Transkriptes gleichermaßen betroffen waren, scheint es in diesem Bereich des *atp6* Transkriptes eine Region zu geben, die essentiell für die Erkennung des Transkriptes durch die Edierungsmaschinerie ist.

In einem *in vitro* System mit mitochondrialen Proteinextrakten wurde weiterhin für die erste Edierungsposition des *Pisum sativum atp9* Transkriptes eine für die Edierung essentielle Region von 20 Nukleotiden stromaufwärts identifiziert, für eine effiziente Edierung allerdings war ein 5' Bereich von 40 Nukleotiden notwendig (Takenaka et al., 2004). In einem *Brassica oleracea var. botrytis in vitro* System konnte diese Beobachtung bestätigt werden, allerdings wurde hier auch das Nukleotid 3' der *atp9* Edierungsposition als essentiell beobachtet (Neuwirt et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der 5' Bereich einer Edierungsposition wichtig ist für die Edierung einer weiteren Position 50-70 Nukleotide stromabwärts (van der Merwe et al., 2006).

Für mehrere plastidäre RNA-Edierungspositionen wurde eine ähnliche Größe und Lokalisation der *cis*-Elemente identifiziert. In transgenen Tabakpflanzen wurde

gezeigt, dass ein Bereich von insgesamt 22 Nukleotiden, 16 Nukleotide stromaufwärts und fünf Nukleotide stromabwärts einer Edierungsposition im *psbL* Transkript ausreichend für die Edierung der Position ist (Chaudhuri und Maliga, 1996). In einem ähnlichem Ansatz wurde von Bock et al. (1996) ein Bereich von 12 Nukleotiden stromaufwärts und zwei Nukleotiden stromabwärts von zwei nebeneinander liegenden Edierungspositionen im *ndhB* Transkript als ausreichend für zumindest eine partielle Edierung nachgewiesen. Diese Ergebnisse für die *ndhB* und *psbL* Edierungspositionen wurden kurz darauf in einem *in vitro* System von Tabak bestätigt (Hirose und Sugiura, 2001). Weiterhin wurde *in vitro* für eine Edierungsposition des Tabak *rpoB* Transkriptes eine Region von -20 bis +6 um die Edierungsposition (Reed et al., 2001) und für die *ndhF* Edierungsposition ein Bereich von -15 bis +5 als ausreichend identifiziert (Sasaki et al., 2006).

Auch wenn somit in den Organellen für einige RNA-Edierungspositionen funktionell wichtige Sequenzen identifiziert wurden, bleibt zumindest in den Mitochondrien bis heute unbekannt, wie das Edierungsenzym die zu edierenden Positionen erkennt bzw. welche Faktoren diese Erkennung vermitteln. In den Plastiden hingegen wurden durch *in vitro* Analysen Proteinfaktoren isoliert, die spezifisch an bestimmte plastidäre Edierungspositionen binden. Hierbei handelte es sich um Proteine mit Molekulargewichten von 25, 56, 70 und 95 kDa, die durch Bindung an die *cis*-Elemente von RNA-Edierungspositionen aus *psbL*, *psbE*, *petB*, sowie *ndhB* und *ndhF* im Falle des 95 kDa-Proteins, isoliert wurden (Hirose und Sugiura, 2001; Miyamoto et al., 2002; Kobayashi et al., 2008).

Weiterhin ist es mittels eines genetischen Ansatzes, in welchem *A. thaliana* Mutanten mit einer Beeinträchtigung der NDH-Aktivität gesucht wurden, gelungen, zwei plastidäre *trans*-Faktoren der RNA-Edierung zu identifizieren. Diese kernkodierten Proteine CRR4 und CRR21 sind essentielle Faktoren für die RNA-Edierung der Edierungspositionen 1 und 2 des *ndhD* Transkriptes und gehören beide der „pentatricopeptide repeat“ (PPR)-Proteinfamilie an (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2006, 2007). Die PPR-Proteinfamilie aus *A. thaliana* zählt mehr als 450 Mitglieder, die durch 2-26 35-Aminosäure-Wiederholungen charakterisiert sind, welche die Anordnung einer sogenannten „tandem array“ Struktur aufweisen (Delannoy et al., 2007). Für das CRR4 konnte eine spezifische Bindung an die direkte Sequenzumgebung der RNA-Edierungsposition *ndhD*-1 im Bereich von 25 Nukleotiden stromaufwärts und zehn Nukleotiden stromabwärts gezeigt werden (Okuda et al., 2006). Die hier identifizierten PPR-Proteine scheinen keine enzymatische Aktivität zu haben, sondern eine Funktion bei der Heranführung der beteiligten Enzyme an die korrekten Positionen in dem Transkript.

1.3 Problemstellung

Der Prozess der RNA-Edierung in den Mitochondrien Höherer Pflanzen ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten Jahren wurden mittels *in vitro*- und *in organello*-Analysen für einige RNA-Edierungspositionen die für die Edierung notwendigen Nukleotide in der direkten Sequenzumgebung der Edierungsposition identifiziert (Takenaka et al., 2008). Dass auch weiter entfernt liegende 5' Bereiche Einfluss auf die Edierung aller im Transkript vorhandenen Edierungspositionen haben kann, wurde in Staudinger, Bolle und Kempken (2005) gezeigt. Bislang sind allerdings keine an der RNA-Edierung beteiligten Proteine in den Mitochondrien von Pflanzen identifiziert worden.

Durch die Etablierung von *in organello* Systemen für isolierte Mitochondrien aus den monokotylen Pflanzen Mais und Hirse durch Staudinger und Kempken (2003, 2004) wurde die Analyse der Prozessierung von fremden Transkripten in den Mitochondrien ermöglicht. Mit dieser Methode wird Fremd-DNA in isolierte Mitochondrien eingebracht, und während einer anschließenden *in organello* Inkubation werden die fremden Transkripte synthetisiert und prozessiert. Um die Prozessierung von Transkripten verschiedener Pflanzen in Mitochondrien sowohl aus mono- als auch aus dikotylen Pflanzen untersuchen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit *in organello* Systeme für Mitochondrien aus den dikotylen Pflanzen *Brassica oleracea* var. *botrytis* und *Arabidopsis thaliana* etabliert werden. Mittels dieser Systeme sollte das Spleißen und die Edierung von Transkripten verschiedener mono- und dikotyler Pflanzen analysiert werden. Weiterhin sollten die Transkripte von *in vitro* mutierten Genen mit eingeführten, fremden Edierungspositionen *in organello* auf Edierung analysiert werden. Durch die Analyse der RNA-Edierung dieser *in organello* synthetisierten fremden, z.T. chimären oder modifizierten Transkripte sollte es möglich sein, Rückschlüsse auf den Mechanismus der Erkennung von Edierungspositionen zu ziehen.

Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit plastidäre Sequenzen mit darin enthaltenen RNA-Edierungspositionen und Introns in pflanzliche Mitochondrien eingebracht und die Transkripte nach der *in organello* Inkubation auf RNA-Edierung und Spleißen analysiert werden. Hierdurch sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Plastiden und pflanzliche Mitochondrien ähnliche oder sogar gemeinsame Komponenten der RNA-Edierung und des Spleißens besitzen.

Ein sehr wichtiger Teil der Aufklärung des Prozesses der RNA-Edierung in den Mitochondrien Höherer Pflanzen ist die Identifizierung der beteiligten Proteinfaktoren. Hierbei handelt es sich um das (oder die) Enzym(e) der RNA-Edierung, sowie

eventuell um an der Erkennung der Edierungspositionen beteiligte *trans*-Faktoren, um transkriptspezifische Faktoren und um weitere beteiligte Enzyme wie möglicherweise RNA-Helikasen. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine Methode zur Isolierung von spezifisch an RNA-Fragmente mit Edierungspositionen bindenden mitochondrialen Proteinen etabliert werden. So isolierte Proteine sollten nachfolgend mittels einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Bakterien:

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

Pflanzen:

Zea mays Linie Kampala, Nickerson SA (Paris,
Frankreich)
Arabidopsis thaliana Linie Columbia 0, Lehle Seeds (Texas,
USA)
Arabidopsis thaliana Zellkultur Linie MM1
Brassica oleracea var. botrytis aus örtlichen Supermärkten

2.1.2 Oligonukleotide

Zur Amplifikation von Transkripten in der reversen Transkription und von DNA in der Polymerasekettenreaktion (PCR), sowie für die ortsgerichteten Mutagenese und die Sequenzierung wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten DNA-Oligonukleotide von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die für die Isolierung von RNA-bindenden Proteinen (2.2.9) verwendeten RNA-Oligonukleotide wurden von

der Firma Biomers.net (Ulm) bezogen.

Tabelle 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Spezifität (Position*)
FK351	GGGGGGGCGGCCGCGCCTTACCAC ACCAACCACC	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ , 3' UTR (43199-43182)
FK357	GATTAATTGATTGGATACCCGAGAAC	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ (40523- 40548)
FK416	CTGACGAGCTGTCTACTAAACG	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ , 3' UTR (40394-40415)
FK483	AATGCAATCCCGCAAAGGATTG	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ (42424- 42403), <i>Z. mays cox2</i> ³ (542174-542191)
FK550	CTGACTATAACAGTTCCGATGAGCA	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ (42234- 42210)
FK638	GCGCTTTATGGCATTTCCTACTATA	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ (42453- 42430)
FK639	<u>GATATCTTTCAAAGCAAAGGTTCTTC</u>	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ , 5'UTR (42629-42649)
FK640	<u>GATATCGCGGAAATTTAAGAGTAA</u> GGTG	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ , 3' UTR (40501-40480)
FK641	<u>CCCGGGCCTGAGGCAAAGGCGAATC</u>	<i>A. thaliana cox2</i> ¹ , 3' UTR (39978-39995)
FK664	GCTACACCTAATTCCAGACC	<i>Z. mays atp6</i> ³ , 3' UTR (563843-563824)
FK688	<u>CCCGGGATGATTCTTCGTTTCATTA</u> GAATG	<i>Z. mays cox2</i> ³ (541960- 541982)
FK689	<u>CCCGGGTTAGTTGGTTTGGAGGAT</u> TAATTG	<i>Z. mays cox2</i> ³ (543536- 543513)
FK694	CCCGGGATGCCTAGATCC	<i>Z. mays ycf3</i> ⁴ (46192-46181)
FK713	<u>CCGATATCTTAGTAGATCGTGAGT</u> GGGTC	<i>A. thaliana nad6</i> ¹ (76642- 76662)
FK718	CCTGCTTTGGTCTCTGGTTTG	<i>T. sativum</i> ⁵ <i>nad6</i> (281214- 281194), <i>A. thaliana</i> ¹ <i>nad6</i> (77235-77235), <i>B. oleracea</i> <i>var. botrytis</i> ² (380-400) <i>nad6</i>
FK719	GGCTCAAGGAATGCAAGAAGTC	<i>T. sativum nad6</i> ⁵ , 3' UTR (280481-280502)

FK721	GCGAGCGAGTTAAGCCTCTA	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , 3' UTR (40425-40425)
FK722	CGCCTTGGGAGTACCTATTG	<i>T. sativum</i> <i>atpA</i> ⁵ (7164-7183)
FK723	GCCTTCTCCTACATCTGCG	<i>T. sativum</i> <i>atpA</i> ⁵ , 3' UTR (8407-8388)
FK725	GATTCCAGAAGAAGATCCAGAATTGG GTCAATCACG	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , <i>in vitro</i> Mutagenese an Position +461 des orfs (42185-42150)
FK726	CGTGATTGACCCAATTCTGGATCTTC TTCTGGAATC	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , <i>in vitro</i> Mutagenese an Position +461 des orfs (42150-42185)
FK770	CCAGCCATTTCCGTCTTCCTT	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , 5' UTR (42720-42700)
FK789	CCAATCCGCATAATCTTTCAAAGTC	<i>Z. mays</i> <i>cox2</i> ³ (543503-543479)
FK794	GGAAATTTCAATTGATAAGACCTC	<i>Z. mays</i> <i>ycf3</i> ⁴ (46171-46149)
NB852	CGCTTTATGGCATTCAACGAGC	<i>Z. mays</i> <i>cox2</i> ³ (542142-542164)
NB856	CCGATATCACTTAAACAGGGGGATTAC	<i>A. thaliana</i> <i>nad6</i> ¹ , 5' UTR (77850-77831)
FK860	ACTTTTGACAGTTATACGATTCCAGAAG AAGAT	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , <i>in vitro</i> Mutagenese an Position +443 des orfs (42202-42170)
FK861	ATCATCTTCTGGAATCGTATAACTGTCA AAAGT	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , <i>in vitro</i> Mutagenese an Position +443 des orfs (42170-42202)
NB875	CTCGTTGTACCAAGATGGAGGTAA	<i>Z. mays</i> <i>cox2</i> ³ (543402-543379)
NB878	CTTGCATTATAGGTGTAGCTGCG	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ (42529-42551)
NB889	GCTGTACCTGGTCGTTCAAATCAAATCT CTATTTTGG	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , <i>in vitro</i> Mutagenese an Position +614 des orfs (42031-41995)
NB890	CCAAAATAGAGATTTGATTTGAACGACC AGGTACAGC	<i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> ¹ , <i>in vitro</i> Mutagenese an Position +614 des orfs (41995-42031)
NB904	CAACTTTATGTATTCCTCTATCCGTAG	<i>Z. mays</i> <i>ndhB</i> ⁴ (131587-131613)
NB923	TCCTTCGTAGACGTCAGGAGTC	<i>Z. mays</i> <i>ndhB</i> ⁴ (132041-132020)

NB924	TCCCCCACTCCAGTCGTTG	<i>Z. mays ndhB</i> ⁴ (132746-132764)
NB956	GTAATACGACTCACTATAGGGCTGCTTT TAGGAGAGTGATCTG	T7-Promotorsequenz + <i>A. thaliana cox2</i> ¹ (42828-42807)

Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Die Sequenzen stammen aus Einträgen des NCBI mit folgenden „accession no.“: ¹*Arabidopsis thaliana* Mitochondrion Y08501, ²*Brassica oleracea var. botrytis nad6* DQ257687, ³*Zea mays* Mitochondrion AY506529, ⁴*Zea mays* Chloroplast X86563, ⁵*Triticum aestivum* Mitochondrion AP008982. * Die Positionen der Oligonukleotide sind den Sequenzeinträgen des NCBI entnommen. orf= offener Leserahmen; UTR= untranslatierte Region.

2.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang dargestellt.

Tabelle 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Charakteristika	Referenz
pBluescriptII SK+	Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pCW396	kodierende Sequenz des <i>ndhB</i> Gens aus <i>Z. mays</i> mit Intron	Wehling, 2004
pCW399	kodierende Sequenz des <i>ndhB</i> Gens aus <i>Z. mays</i> mit Intron, 5' und 3' UTR des <i>atp6</i> Gens aus <i>Z. mays</i>	Wehling, 2004
pCW407	kodierende Sequenz des <i>ycf3</i> Gens aus <i>Z. mays</i> mit Introns, 5' und 3' UTR des <i>atp6</i> Gens aus <i>Z. mays</i>	Wehling, 2004
pHS559	<i>in vitro</i> Mutagenese von pTJ246 an Position 443 des offenen Leserahmens von <i>A. thaliana cox2</i> (T→C)	diese Arbeit
pHS587	kodierende Sequenz des <i>ndhB</i> Gens aus <i>Z. mays</i> ohne Intron, 5' und 3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
pMon	Derivat des pBluescript, T-Klonierungsvektor	Borovkov und Rivkin, 1997
pMS403	3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	Staudinger, 2004
pMS413	5' und 3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	Staudinger, 2004
pNB455	<i>in vitro</i> Mutagenese von pTJ246 an Position 461 des offenen Leserahmens von <i>A. thaliana cox2</i> (T→C)	diese Arbeit
pNB554	5' UTR und kodierende Sequenz des <i>nad6</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit

pNB555	5' UTR und kodierende Sequenz des <i>nad6</i> Gens aus <i>A. thaliana</i> , 3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
pNB569	kodierende Sequenz des <i>ndhB</i> Gens aus <i>Z. mays</i> mit Intron, 5' und 3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
pNB475	kodierende Sequenz des <i>cox2</i> Gens aus <i>Z. mays</i> mit Intron, 5' und 3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
pNB598	<i>in vitro</i> Mutagenese von pTJ246 an Position 614 des offenen Leserahmens von <i>A. thaliana cox2</i> (T→C)	diese Arbeit
pSW449	<i>nad6</i> Gen aus <i>T. sativum</i>	Wulff, 2005
pSW450	kodierende Sequenz des <i>nad6</i> Gens aus <i>A. thaliana</i> , 5' und 3' UTR des <i>cox2</i> Gens aus <i>A. thaliana</i>	Wulff, 2005
pSW453	<i>atpA</i> Gen aus <i>T. sativum</i>	Wulff, 2005
pTJ246	<i>cox2</i> Gen aus <i>A. thaliana</i>	Staudinger, 2004

2.1.4 Membranen und Filter

Cellulose-Membran Filter 0,025 μ m
Miracloth

Millipore (Schwalbach)
Calbiochem (La Jolla, USA)

2.1.5 Chemikalien

NAA (1-Naphtalen-Essigsäure) Duchefa (Haarlem, Niederlande)

Alle sonstigen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen soweit nicht anders angegeben von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), Qiagen (Hilden), BioRad (München), Fluka (München) und Merck (Darmstadt).

2.1.6 Enzyme

In der Tabelle 2.3 sind die Enzyme aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DNaseI (RNase-frei)	Fermentas (Leon-Rot)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene (Heidelberg, USA)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
Restriktionsendonukleasen	QBiogene (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Reverse Transkriptase (im „OneStep“ RT-PCR Kit)	Qiagen (Hilden)
RNaseA	Roth (Karlsruhe)
RNase-Inhibitor	Fermentas (Leon-Rot)
Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T7-RNA-Polymerase	Fermentas (Leon-Rot)
Trypsin	Promega (Mannheim)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eppendorf (Hamburg), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Molzym (Bremen)

2.1.7 Kits

NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond PC 100	Macherey-Nagel (Düren)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.8 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TBE (10 ×)	1 M Borsäure, 20 mM EDTA, 1 M Tris-HCl, pH 8,3
MOPS (10 ×)	200 mM MOPS, 50 mM Natrium-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0
SDS-Laufpuffer (5 ×)	0,25 M Tris, 1,73 M Glycin, 0,5% (w/v) SDS

2.1.9 Nährmedien für *Escherichia coli*

Für die Anzucht von *E. coli* wurde Luria-Bertani (LB)-Medium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,2-7,5) verwendet (Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung von Festmedium wurde dieses zusätzlich mit 2% (w/v) Agar-Agar versetzt. Für die Selektion von Transformanten wurde dem Medium Ampicillin (50 mg/l) zugegeben. Um eine „Blau-Weiss-Selektion“ von Transformanten auf LB-Agar-Platten durchführen zu können, wurde dem Medium der Farbstoff X-Gal (40 mg/l) und der Induktor IPTG (0,2 M) zugegeben.

2.2 Methoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen gentechnischen Arbeiten sind nach der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) des Gentechnikgesetzes und der Gentechnik-sicherheitsverordnung vom 01.07.1990 durchgeführt worden.

2.2.1 Kultur- und Anzuchsbedingungen

Escherichia coli

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37°C in LB-Flüssigmedium unter Schütteln (bei 280 rpm, Minitron HT Infors Schüttler) oder auf LB-Festmedium.

Zea mays

Für die Anzucht von etiolierten Maiskeimlingen wurden die Samen zunächst für ca. 4 Stunden in Wasser vorgequollen und anschließend auf Isoself (Baustoffhandel Max Bahr oder Baumarkt, Kiel) ausgesät. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 9-12 Tage im Dunkeln bei 25°C.

Arabidopsis thaliana Zellkulturen

Die Anzucht der *A. thaliana* Zellkulturen erfolgte in MSMO-Flüssigmedium (0,44% (w/v) MSMO, 3% (w/v) Saccharose, 0,5 mg/l NAA, 0,05 mg/l Kinetin, pH 5,7) in 2 l-, 1 l- oder 500 ml-Erlenmeyerkolben. Zu dem Medium wurde ca. 1/10 Volumen einer 7 Tage alten *A. thaliana*-Vorkultur zugegeben und unter Schütteln (130 rpm) bei 25°C und im Dunkeln für 7 Tage inkubiert.

2.2.2 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die selektive Anzucht des *E. coli* (K12) XL1-Blue Stammes wurde 1 l LB-Medium (2.1.9) mit Tetracyclin (12,5 mg/l) versetzt und 1%ig mit einer über-Nacht-Vorkultur angeimpft. Unter Schütteln (220 rpm) bei 37°C wurde die *E. coli*-Kultur inkubiert bis eine optische Dichte von OD₅₉₅ 0,5 - 0,6 erreicht war. Die Kultur wurde dann für 15 bis 30 min auf 4°C abgekühlt und bei 4500 rpm (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 4°C kaltem, sterilem Wasser gewaschen. Der Zentrifugations- und der Waschschrift wurden wiederholt und das Sediment anschließend in 20 ml kaltem 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation bei 5500 rpm (JA25.50-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 15 min bei 4°C. Das Sediment wurde in 10%igem (v/v) Glycerin bis zu einem Endvolumen von 2-3 ml resuspendiert und anschließend aliquotiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.3 Isolierung pflanzlicher Mitochondrien

Zea mays

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte aus 9-12 Tage alten etiolierten Maiskeimlingen in abgewandelter Form nach Newton (1994). Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde das Frischgewicht der Maiskeimlinge bestimmt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß mit 2-3 ml Puffer A (0,5 M Saccharose, 0,05 M Tris, 0,005 M EDTA, 0,1% (w/v) BSA, 0,0175% (v/v) β -Mercaptoethanol, pH 7,5) pro g Maiskeimlinge im Mixer (Kenwood electronics). Hierbei wurde drei- bis viermal für ca. 10 s bei maximaler Stufe gemixt und anschließend die groben Bestandteile in einer Filtration durch vier Lagen Mull abgetrennt. Zur Anreicherung der Mitochondrien erfolgte eine differentielle Zentrifugation. Hierbei wurde zunächst für 10 min bei $1000 \times g$ (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) zentrifugiert um Zellkerne und Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen. Durch eine erneute Zentrifugation des Überstandes für 20 min bei $15750 \times g$ (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) wurden dann die Mitochondrien sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig mit Hilfe eines Pinsels in Puffer A resuspendiert und auf diskontinuierliche Saccharosegradienten (je Gradient: 8 ml 52%, 10 ml 40%, 10 ml 36% und 4 ml 20% (w/v) Saccharose in Puffer A ohne β -Mercaptoethanol) aufgetragen. In der darauf folgenden Ultrazentrifugation in einem Ausschwingrotor (Rotor TST28.38, Centrikon T-1065, Kontron) bei 24000 rpm für

eine Stunde konnten die Mitochondrien aufgereinigt werden. Die Mitochondrienbande befand sich nach der Ultrazentrifugation an der Grenze zwischen der 52%igen und der 40%igen Saccharoselösung. Die Mitochondrienbande wurde vorsichtig entnommen und anschließend mit Puffer A (ohne β -Mercaptoethanol) verdünnt. Es folgte eine Zentrifugation bei $15750 \times g$ (JA25.50-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 20 min. Das so erhaltene Sediment aus Mitochondrien wurde in Puffer A (ohne β -Mercaptoethanol) vorsichtig mit einem Pinsel resuspendiert. Es erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) mit dem Reagenz „Biorad Protein Assay“ (Biorad, München). Sofern die Mitochondrien nicht sofort verwendet wurden, wurde die Suspension mit Glycerin (10% Endkonzentration) versetzt und bei -80°C gelagert.

Brassica oleracea var. botrytis

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nur aus dem nicht-grünen Material der Blumenkohl-Infloreszenzen. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Durchführung wie bei der Isolierung von Mitochondrien aus *Zea mays* beschrieben. Im Unterschied zu der Mitochondrienisolierung aus Maiskeimlingen wurden die Mitochondrien aus Blumenkohl-Infloreszenzen im zweiten Zentrifugationsschritt der differentiellen Zentrifugation bei $11000 \times g$ sedimentiert. Die Sedimentation der Mitochondrien nach der Ultrazentrifugation und der anschließenden Verdünnung mit Puffer A fand ebenfalls bei $11000 \times g$ statt.

Bei anschließender Extraktion von Proteinen aus den Mitochondrien (siehe 2.2.8) wurde die Anzahl der Schritte der differentiellen Zentrifugation erhöht um Kernkontaminationen zu verringern. Hierfür wurde für jeweils 10 min zunächst bei $600 \times g$, danach bei $1300 \times g$ und zuletzt bei $2100 \times g$ (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) zentrifugiert und jeweils mit dem Überstand weitergearbeitet. Anschließend erfolgte die schon erwähnte Sedimentation der Mitochondrien bei $11000 \times g$. Weiterhin wurde die aufgereinigte Mitochondriensuspension bei einer nachfolgenden Proteinextraktion ohne Zugabe von Glycerin bei -80°C gelagert.

***Arabidopsis thaliana* Zellkulturen**

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Isolierung von Mitochondrien aus *A. thaliana* Zellkulturen wie bei der Isolierung von Mitochondrien aus *Z. mays* beschrieben. Die *A. thaliana*-Zellen wurden zunächst für 10 min bei $5000 \times g$ (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) abzentrifugiert und anschließend ausgewogen. Für den Zellaufschluß wurden die Zellen drei- bis viermal für je 15 s mit

Puffer A gemixt. Nach der Filtration durch 4 Lagen Mull erfolgte eine weitere Filtration durch 2 Lagen Miracloth. Bei der anschließenden differentiellen Zentrifugation wurde zunächst für 10 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert, anschließend für 10 min bei $5500 \times g$, und zur Sedimentation der Mitochondrien bei $14300 \times g$ (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 20 min. Die Sedimentation der Mitochondrien nach der Ultrazentrifugation und der anschließenden Verdünnung mit Puffer A fand ebenfalls bei $14300 \times g$ statt. Bei einer nachfolgenden Proteinextraktion aus den Mitochondrien wurden diese ohne Zugabe von Glycerin bei -80°C gelagert.

2.2.4 Elektroporation von *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E.coli*-Zellen wurden elektrokompetente Zellen (siehe 2.2.2) verwendet und mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad, München) in Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 2 mm (BioRad, München) elektroporiert. Bei den Elektroporationsbedingungen handelte es sich um einen Widerstand von 200Ω , $25 \mu\text{F}$ Kapazität und einer Feldstärke von $2,5 \text{ kV/cm}$. Es wurde 50-200 ng Plasmid-DNA oder $3 \mu\text{l}$ eines zuvor aufgereinigten Ligationsansatzes transformiert. Sofort im Anschluß an die Transformation erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO_4 , 10 mM Laktose, pH 7,5). Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde der Transformationsansatz auf Selektionsmedium (siehe 2.1.9) ausgestrichen.

2.2.5 Elektroporation isolierter Mitochondrien

Die Elektroporation isolierter, pflanzlicher Mitochondrien erfolgte in Anlehnung an das Protokoll für die Elektroporation tierischer Mitochondrien (Collombet et al., 1997). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die isolierten Mitochondrien wurden zunächst dreimal mit 0,6 M Saccharoselösung gewaschen und jeweils durch eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) sedimentiert. Das Sediment aus dem letzten Waschschrift wurde in ca. $30\text{-}40 \mu\text{l}$ 0,6 M Saccharoselösung resuspendiert. Je Transformationsansatz wurden $3 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA eingesetzt, sowie eine Mitochondrienmenge die $1200 \mu\text{g}$ mitochondrialem Protein entsprach. Nach Zugabe der DNA erfolgte die Elektroporation durch den „Gene Pulser II“ (BioRad, München) in Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 1 mm (BioRad, München). Die Elektroporati-

on wurde durchgeführt mit einem Widerstand von 400 Ω , einer Kapazität von 25 μF und einer Feldstärke von 1,8 kV. Anschließend wurden die Mitochondrien in 0,6 M Saccharoselösung aufgenommen und durch eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) sedimentiert.

2.2.6 *In organello* Inkubation isolierter Mitochondrien

Die *in organello* Inkubation der elektroporierten Mitochondrien erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Enríquez et al. (1996). Die Mitochondrien wurden zunächst in *in organello*-Puffer (25 mM Saccharose, 75 mM Sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4 , 0,05 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 10 mM L-Glutamat, 2,5 mM L-Malat, 10 mM Tris, 0,1 % (w/v) BSA, 1 mM ADP, pH 7,4) gewaschen und danach durch eine Zentrifugation bei 10000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 10 min bei 4°C sedimentiert. Anschließend erfolgte eine dreistündige Inkubation der Mitochondrien im *in organello*-Puffer bei 25°C. Durch eine Zentrifugation bei 10000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 10 min bei 4°C wurden die Organellen nach der Inkubation sedimentiert.

2.2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab erfolgte mit dem „NucleoSpin Plasmid Quick Pure“-Kit von Macherey-Nagel (Düren) ausgehend von 2,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers. Für die Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das „NucleoBond PC 100“-Kit von Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Hierbei wurde eine 30 ml *E. coli*-Übernachtskultur für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet und ebenfalls nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt-DNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll für DNA-Isolierung aus Pilzmycel von Lecellier und Silar (1994). Zunächst wurde das Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Dieses wurde mit Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% (w/v) SDS, pH 8,0) versetzt, und zur Denaturierung der Proteine wurde sofort anschließend das gleiche Volumen an Phenol zugegeben. Es wurde gemischt und bei

14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Abtrennung der Proteine mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 5 min. Im Folgenden wurden diese beiden Schritte wiederholt bis keine denaturierten Proteine mehr in der Interphase zu sehen waren. Durch eine nachfolgende Zugabe des Enzyms RNase A (Roth, Karlsruhe), sowie eine Inkubation bei 37°C für 30 min, sollte die vorhandene RNA abgebaut werden. Zur Inaktivierung und Entfernung des Enzyms wurde anschließend erneut mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 5 min zentrifugiert. Um den Überstand von Phenolresten zu befreien wurde dieser mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 5 min zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M NH₄-Acetat für mindestens 30 min bei -80°C. Durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 15 min (bei 4°C) wurde die ausgefällte DNA präzipitiert. Im Anschluß wurde das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser oder 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte abgewandelt nach Hoge et al. (1982). Das Pflanzenmaterial wurde in einem Mörser mit Stickstoff zerrieben und die Pflanzenzellen durch Zugabe von kochendem Lysepuffer (0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 9,0) aufgeschlossen. Anschließend wurde das gleiche Volumen 60°C warmen Phenols zugegeben und für 10 min bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und durch eine Phenolysierung wurden die Proteine entfernt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M NH₄-Acetat und einer Inkubation von mindestens 30 min bei -80°C. Durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 15 min (bei 4°C) wurden die Nukleinsäuren präzipitiert. Es folgte ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol und nach Resuspension des Präzipitats in Wasser eine selektive Fällung der RNA mit 2 M LiCl bei 4°C über Nacht. Die ausgefällte RNA wurde bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 15 min (bei 4°C) abzentrifugiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und in Wasser resuspendiert.

Isolierung von Nukleinsäuren aus Mitochondrien

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Mitochondrien wurden die sedimentierten Mitochondrien (siehe 2.2.6) mit 200 μ l kochendem RNA-Lysepuffer (0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 9,0) lysiert. Anschließend wurde zur Entfernung der Proteine eine Phenolysierung durchgeführt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M NH_4 -Acetat für mindestens 30 min bei -80°C . Die ausgefällten Nukleinsäuren wurden bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 15 min (bei 4°C) abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die so erhaltene DNA wurde in Wasser resuspendiert. Zur Isolierung von RNA wurde eine selektive Fällung mit 2 M LiCl bei 4°C über Nacht angeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) für 15 min (bei 4°C) wurde die präzipitierte RNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

2.2.8 Extraktion mitochondrialen Proteins aus *Brassica oleracea* var. *botrytis* und aus *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen

Die Proteinextraktion aus isolierten Mitochondrien erfolgte in abgewandelter Form nach Takenaka und Brennicke (2007). Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Lyse der Mitochondrien wurde 1/2 Volumen kalten Extraktionspuffers (30 mM HEPES-KOH, 3 mM Mg-Acetat, 2 M KCl, 0,2 % Triton X-100, 1 mM DTT, pH 7,7) zugegeben und 30 min inkubiert. Im Anschluß wurde für 30 min bei $60000 \times g$ (Rotor TFT70.38, Centrikon T-1065, Kontron) zentrifugiert und der Überstand gegen 300 ml Dialysepuffer (30 mM HEPES-KOH, 3 mM Mg-Acetat, 45 mM Kalium-Acetat, 30 mM Ammonium-Acetat, 1 mM DTT, pH 7,7) für insgesamt fünf Stunden dialysiert. Der Dialysepuffer wurde hierbei stündlich durch frischen ersetzt. In einer anschließenden Lyophilisierung wurde der Proteinextrakt konzentriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976).

2.2.9 Isolierung RNA-bindender Proteine durch Biotin-Streptavidin-Interaktion

Diese Methode beruht auf der spezifischen Affinität von Biotin für Streptavidin. Es wurden Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel („Streptavidin Magne-

sphere[®] Paramagnetic Particles” von Promega GmbH, Mannheim) verwendet um Proteine zu isolieren, die spezifisch mit einem Biotin-markierten RNA-Fragment interagieren. Hierfür wurden 2-3 mg mitochondrialen lyophilisierten Proteinextrakts (siehe 2.2.8) in einem möglichst geringen Volumen (100-200 μ l) Inkubationspuffer (30 mM HEPES-KOH, 3 mM Mg-Acetat, 45 mM K-Acetat, 30 mM NH₄-Acetat, 2 mM DTT, 1% (v/v) Polyethylenglycol 6000, 2,5% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Triton X-100, 15 mM ATP, 120 U RNase-Inhibitor, 1 \times Proteinase-Inhibitor, pH 7,7) aufgenommen. Im Folgenden sollten zunächst im Proteinextrakt vorhandene *in vivo* biotinylierte Proteine, sowie andere Proteine die an die paramagnetischen Partikel direkt binden, entfernt werden. Hierfür wurden in 50 μ l Inkubationspuffer vorliegende paramagnetischen Partikel (0,6 mg, vorbereitet nach Angaben des Herstellers) zu dem Proteinextrakt zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle 1-2 min wurde vorsichtig durch Invertieren gemischt und anschließend wurde das Reagenzgefäß in einen magnetischen Stand gestellt, so dass der mitochondriale Proteinextrakt von den paramagnetischen Partikeln und den daran bindenden Proteinen getrennt werden konnte.

Zur Reduzierung von unspezifisch an RNA bindenden Proteinen wurde im Folgenden Hefe-RNA (100 μ g Hefe-RNA/ml Proteinextrakt) zu dem Proteinextrakt gegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden erneut vorbereitete paramagnetische Partikel mit dem Proteinextrakt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einem magnetischen Stand wieder abgetrennt. Nach einer Renaturierung der Biotin-markierten RNA-Fragmente zur Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur (3 min bei 65°C, 10 min bei 37°C) wurden 500 pmol der Biotin-markierten RNA dem vorbereiteten Proteinextrakt zugegeben. Während der folgenden einstündigen Inkubation bei 4°C wurden die RNA-Protein-Komplexe gebildet. Im Anschluß wurde Heparin zu dem Extrakt zugegeben (2 μ g Heparin/ μ l Proteinextrakt) und es wurde weitere 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von vorbereiteten paramagnetischen Partikeln und einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Abtrennung der Partikel und der daran bindenden RNA-Protein-Komplexe in einem magnetischem Stand. Die paramagnetischen Partikel wurden im Folgenden insgesamt sechsmal mit Inkubationspuffer gewaschen. Hierbei wurden die Partikel für jeden Waschschrift in 500 μ l Inkubationspuffer verteilt und nach einer kurzen Inkubationsphase wieder in einem magnetischem Stand gesammelt.

Die Elution der Proteine erfolgte durch zunächst eine 20-minütige Inkubation der paramagnetischen Partikel in SDS-Elutionspuffer (2% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol oder 50 mM DTT, 10% (v/v) Glycerin, pH 6,8) bei 60°C, sowie daran anschließend einer 2-minütigen Inkubation der Partikel mit

SDS-Elutionspuffer in einem kochendem Wasserbad. Nach Abtrennung der magnetischen Partikel wurden die gesammelten Überstände aus beiden Elutionsschritten für 5-10 min bei $12000 \times g$ (F2402-Rotor, GS-15R, Beckman Coulter) und 4°C zentrifugiert um letzte Partikel zu entfernen. Das Eluat wurde bis zur denaturierenden Gelelektrophorese bei -80°C gelagert.

2.2.10 Gelelektrophorese

Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen in $1 \times$ TBE-Puffer (siehe 2.1.8). Hierfür wurde die DNA zu 20% mit Ladepuffer (40% (w/v) Saccharose oder 30% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,001% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Zur Anfärbung der DNA wurde das Gel mit 0,3 mg Ethidiumbromid/ml versetzt. Als Größenstandard diente ein 100-5000 bp-Marker (MBBL, Bielefeld) oder mit *Hind*III hydrolysierte λ -DNA (MBBL, Bielefeld).

Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegelen mit $1 \times$ MOPS-Puffer (siehe 2.1.8). Vor dem Auftrag auf das Gel wurde die RNA mit Ladepuffer (50% (v/v) Formamid, 3% (v/v) Glycerin, 16% (v/v) Formaldehyd, 4,5% (v/v) $10 \times$ MOPS, 0,7% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert um Sekundärstrukturen aufzulösen.

Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen leicht abgewandelt nach Lämmli (1970). Die Gele waren wie in Tabelle 2.4 angegeben zusammengesetzt. Die Proteinproben wurden vor dem Gelauftrag mit SDS-Probenpuffer (entweder $2 \times$ oder $8 \times$ Probenpuffer, Endkonzentration: 6,7% (w/v) SDS, 16,7% (v/v) Glycerin, 9,2 mM Tris-HCl, 3,3% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proben hingegen, mit denen im Anschluß eine MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie durchgeführt werden sollte, wurden vor dem Auftrag auf das Gel nach Zugabe des Probenpuffers für 15 min bei 70°C inkubiert, anschließend wurde 1 M Iodacetamid zugegeben (Endkonzentration: 150 mM), und es wurde für 20 min bei 45°C inkubiert.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	P8DS-Elektrophorese-Kammer, Emperor Penguin, Portsmouth, England		Protean® II xi Cell-Elektrophorese-Kammer, Biorad, München	
	Sammelgel	Trenngel	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	1,1 ml	5,0 ml	1,65 ml	7,5 ml
1,875 M Tris-HCl pH 8,8	-	3,75 ml	-	5,63 ml
0,6 M Tris-HCl pH 6,8	1 ml	-	1,5 ml	-
10% (w/v) SDS	100 µl	150 µl	150 µl	225 µl
10% (v/v) APS	50 µl	75 µl	75 µl	112,5 µl
TEMED	7,5 µl	20 µl	11,25 µl	30 µl
Wasser	7,82 ml	6,25 ml	11,73 ml	9,38 ml

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 5%igem Sammelgel und einem 10%igem Trenngel in vertikalen Elektrophoresekammern in 1 × SDS-Laufpuffer (2.1.8). Als Größenstandard wurde der „DALTON MARK VII-L“ (Sigma, München) verwendet.

2.2.11 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden für eine Stunde in der Coomassie-Färbelösung (45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) Coomassie Brillant-Blue R-250 oder G-250) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit Entfärbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) für mehrere Stunden oder über Nacht, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

2.2.12 Silber-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden für 30 min bis über Nacht in Lösung 1 (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0,019% (v/v) Formaldehyd) fixiert. Im Anschluss wurden die Gele zunächst dreimal für 10-20 min in 50% (v/v) Methanol und anschließend für 1 min in einer 0,013%igen (w/v) Thiosulfat-Lösung geschwenkt. Es folgten drei Waschschrte in Wasser für jeweils 20 s. Die Gele wurden nun für 20 min in der Färbelösung (0,2% (w/v) AgNO₃, 0,075% (v/v) Formaldehyd) inkubiert und anschließend erneut zweimal für jeweils 20 s in Wasser gewaschen. In

dem darauf folgenden Entwicklungsschritt wurde das Gel solange in der Entwicklerlösung (6% (w/v) Na₂CO₃, 0,05% (v/v) Formaldehyd, 0,002% (w/v) Thiosulfat) inkubiert, bis die gewünschte Bandenstärke erreicht war. Die Reaktion wurde durch zwei Waschschrirte mit Wasser und eine anschließende Inkubation in 50% (v/v) Methanol und 12% (v/v) Essigsäure für 10-15 min gestoppt.

2.2.13 Probenvorbereitung für MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Bei der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie wurde bei allen Schritten darauf geachtet die Kontamination mit Fremdproteinen wie Keratin und Kollagen so gering wie möglich zu halten. Aus diesem Grund wurden alle Arbeitsschritte mit Laborhandschuhen und zum Teil auch mit Haarschutz durchgeführt. Die zu analysierenden Proteine wurden reduziert und alkyliert und in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.10). Die mit Coomassie- oder Silberfärbung sichtbar gemachten Proteine wurden ausgeschnitten und die Gelstücke dreimal in Wasser gewaschen. Anschließend wurde zunächst 100 µl einer 1:1-Mischung aus Acetonitril und 0,025 M NH₄HCO₃, dann nach Entfernung des Überstandes 100 µl Acetonitril zugegeben und erneut der Überstand abgenommen. Es folgte die proteolytische Spaltung der Proteine im Gel durch Zugabe von 20 µl einer Trypsin-Verdünnung (0,03125 µg Trypsin/µl 5 mM NH₄HCO₃, pH 7,9) und einer Inkubation über Nacht bei 37°C. Durch Zugabe von 20 µl einer Mischung aus 0,3% Trifluoressigsäure und Acetonitril wurde die proteolytische Spaltung gestoppt und die Peptide aus den Gelstücken eluiert. Die Gelstücke wurden für 10 min im Ultraschall-Wasserbad behandelt und anschließend für 10 min bei 1500 rpm geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und durch eine Zugabe von 20 µl Acetonitril zu den Gelstücken erfolgte ein zweiter Elutionsschritt. Die Überstände wurden vereinigt und das Volumen im Vakuumkonzentrator (Savant SpeedVac, ThermoScientific, Langenselbold) reduziert. Anschließend wurden die Peptide in einer Mischung aus 0,1% Trifluoressigsäure und 5% Acetonitril gelöst und erneut eine Ultraschallbehandlung für 10 min durchgeführt. Zur Entsalzung der Peptide wurden diese dreimal in PerfectPure™ C-18 Tips (Eppendorf, Hamburg) mit 0,1%iger Trifluoressigsäure gewaschen. Im Anschluß wurden die Peptide mit 0,5 µl Matrixlösung (8 mg/ml α-Cyanohydroxymizinsäure in Acetonitril und 0,3% Trifluoressigsäure im Verhältnis 65:35) aus den PerfectPure™ C-18 Tips eluiert und mit der Matrixlösung direkt auf die MALDI-Platte aufgetropft.

2.2.14 Reinigung und Geelution von DNA

Die Reinigung von PCR-Produkten und Ligationen, sowie die Elution von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.2.15 Hydrolyse von DNA

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

2.2.16 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von hydrolysiertem Vektor-DNA vor Ligationen (ausgenommen bei Klonierungen von PCR-Fragmenten) wurde unter Verwendung des Enzyms Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) von Roche (Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Eine Dephosphorylierung erfolgte um Religationen der Vektor-DNA zu verhindern.

2.2.17 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers. Bei Klonierung von *Taq*-PCR-Fragmenten wurde der mit der Restriktionsendonuklease *XcmI* hydrolysierte Klonierungsvektor pMon (Borovkov und Rivkin, 1997) verwendet, für alle anderen Klonierungen der pBluescriptII SK+ (Stratagene, Heidelberg) Klonierungsvektor.

2.2.18 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde verändert nach Saiki et al. (1988) und Kawasaki und Wang (1989) durchgeführt. Zur Amplifikation von Gesamt-DNA oder Plasmid-DNA wurden jeweils 10-1000 ng oder 0,1-15 ng DNA eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt 1 × PCR-Puffer (mit 1,5-2 mM MgCl₂ oder MgSO₄ als Endkonzentration), 100 mM je dNTP, 5 pmol je Oligonukleotid, 1-1,25 Units *Taq*-

Polymerase (siehe 2.3), im Falle der MolTaq zusätzlich 0,5 μl vom Hersteller gestellter Enhancer (Information über Zusammensetzung liegt nicht vor) und Wasser in einem Endvolumen von 50 μl . Bei der Verwendung der *Pfu*- oder *Pwo*-DNA-Polymerase (siehe 2.3) mit 3' 5' Exonuklease-Aktivität („proofreading“-Funktion), wurden abweichend davon insgesamt 100-750 ng Gesamt-DNA oder 0,1-30 ng Plasmid-DNA, 50-100 mM je dNTP, 25-50 pmol je Oligonukleotid und 2-2,5 Units Enzym eingesetzt. Bei den verwendeten PCR-Geräten handelte es sich um den „PTC-100TM“ (MJ Research, Inc., Hess, Oldendorf), den „Minicycler“ (MJ Research, Inc., Hess, Oldendorf) und den „Mastercycler gradient“ (Eppendorf, Hamburg). Das Standard-PCR-Programm begann mit einer Anfangs-Denaturierung von 2 min bei 94°C. Es schlossen sich 40-45 Zyklen von 1 min 94°C Denaturierung, 1 min 55-65°C (Temperatur variierte in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide) Anlagerung der Oligonukleotide und der Elongation bei 72°C (1 min/1000 bp bei Verwendung einer *Taq*-Polymerase, ansonsten nach Angaben des Herstellers) an. Im Folgenden wurde ein anschließender Elongationsschritt für 5 min bei 72°C durchgeführt. Bei Verwendung der *Pfu*- oder *Pwo*-Polymerase wurde eine Elongationstemperatur von 68°C gewählt. Wenn Oligonukleotide verwendet wurden, die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen beinhalteten, wurden zunächst drei bis sechs Zyklen mit einer für die Oligonukleotide ohne Erkennungssequenz optimalen Anlagerungstemperatur durchgeführt und anschließend 30-40 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur optimal für die Oligonukleotide mit Erkennungssequenz.

Reverse-Transkription-PCR („OneStep“ RT-PCR)

Die cDNA-Amplifikation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem „OneStep“ RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zuvor wurde die RNA mit einer RNase-freien DNase I (Fermentas, Leon-Rot) behandelt um DNA-Rückstände zu entfernen. Der vollständige Abbau der DNA wurde in einer PCR mit spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

2.2.19 *In vitro* Mutagenese von Plasmid-DNA

Die Erzeugung von Punktmutationen durch ortsgerichtete Mutagenese wurde in einer PCR mit einer DNA-Polymerase mit „proofreading“-Funktion (*Pfu*- oder *Pwo*-DNA-Polymerase, siehe 2.3) durchgeführt. Mit spezifischen Oligonukleotiden, welche an der entsprechenden Position die Punktmutation aufwiesen, wurden von Plasmid-DNA DNA-Fragmente mit der gewünschten Punktmutation erzeugt. Durch Zu-

gabe der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *DpnI* (QBiogene, Heidelberg) wurde die Plasmid-DNA anschließend hydrolysiert und die DNA-Fragmente mit erzeugter Punktmutation nach einer Aufreinigung über einen Membran-Filter (2.1.4) in *E. coli*-Zellen transformiert (2.2.4).

2.2.20 *In vitro* Transkription

Die Synthese von RNA in einer *in vitro* Transkription erfolgte mit dem „T7 Transcription Kit“ (Fermentas, Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Für die Markierung von *in vitro* Transkripten mit Biotin wurde der „Biotin RNA labeling Mix“ von Roche (Mannheim) verwendet.

2.2.21 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde von der Firma MWG Biotech (Martinsried) nach der Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977) durchgeführt.

2.2.22 Auswertung von Nukleotid- und Protein-Sequenzen

Sequenzvergleiche von DNA, RNA und Proteinen erfolgten mit dem Programm „BioEdit Version 7.0.1“ (Hall, 1999) oder mit dem Programm Clustal W (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007) auf der Internetseite des EBI (European Bioinformatics Institut: www.ebi.ac.uk/clustalw/).

3 Ergebnisse

Mittels des von Staudinger und Kempken (2003) entwickelten *in organello* Systems ist es möglich, die Prozessierung von Transkripten in heterologen Mitochondrien zu analysieren. Durch Elektroporation wird hierbei fremde DNA in die Matrix von isolierten Mitochondrien eingebracht. Die Mitochondrien werden anschließend in einem physiologischem Puffer inkubiert, der die Transkriptionsaktivität bis zu sieben Stunden aufrechterhält. Durch die Analyse der RNA-Edierung der *in organello* synthetisierten fremden oder auch modifizierten Transkripte ist es möglich, Rückschlüsse auf den Mechanismus der Erkennung von Edierungspositionen zu ziehen.

Hierfür wurden im Folgenden Gene von unterschiedlichen Pflanzen ausgewählt und deren Transkriptprozessierung in heterologen Mitochondrien analysiert. In vorangegangenen Arbeiten war es bisher gelungen *in organello* Systeme für die monokotylen Pflanzen *Zea mays* und *Sorghum bicolor* zu etablieren (Staudinger und Kempken, 2003). Unter anderem wurde hier die Prozessierung der Transkripte des *cox2* Gens der dikotylen Pflanze *Arabidopsis thaliana* in Mitochondrien aus *Zea mays* analysiert und gezeigt, dass diese korrekt und effizient gespleißt und ediert werden. Um die Prozessierung der Transkripte von mitochondrialen Genen aus monokotylen aber auch aus dikotylen Pflanzen in Mitochondrien aus dikotylen Pflanzen analysieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit *in organello* Systeme für *Brassica oleracea var. botrytis* und für *Arabidopsis thaliana* etabliert.

Mittels dieser etablierten *in organello* Systeme war es außerdem möglich zu analysieren, ob Transkripte aus Plastiden in Mitochondrien gespleißt und ediert werden. Hierdurch konnte der Frage nachgegangen werden inwieweit pflanzliche Mitochondrien und Plastiden ähnliche oder sogar gemeinsame Komponenten des RNA-Spleißens und der RNA-Edierung aufweisen. Des Weiteren wurden Proteinextrakte aus isolierten Mitochondrien von *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana* verwendet um Proteine zu isolieren, die spezifisch an RNA-Fragmente mit Edierungspositionen binden.

3.1 Etablierung des *in organello* Systems für *Brassica oleracea* var. *botrytis* und für *Arabidopsis thaliana*

Der Vorteil von Blumenkohl für das *in organello* System ist die gute Verfügbarkeit von Blumenkohl-Infloreszenzen als Material. Obwohl in der Datenbank des NCBI wenig Sequenzinformationen zu mitochondrialen Genen aus Blumenkohl vorliegen, ermöglicht die enge Verwandtschaft zu *A. thaliana*, dessen Chondriom (Unseld et al., 1997) und Kerngenom (genome initiative, 2000) vollständig sequenziert vorliegen, eine Verwendung der Mitochondrien aus Blumenkohl im *in organello* System. Es ist, zumindest im Bereich der kodierenden Sequenzen, von einer sehr hohen Sequenzhomologie zwischen *A. thaliana* und *B. oleracea* var. *botrytis* auszugehen. So ergab die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms von *Brassica napus* L., einer weiteren Pflanze aus der Familie der Brassicaceae, im Vergleich mit dem mitochondrialen Genom von *A. thaliana* eine starke Konservierung der Gensequenzen und Intronstrukturen (Handa, 2003).

Da *A. thaliana* als Modellpflanze für verschiedenste biologische Fragestellungen eine große Bedeutung zukommt und deshalb auch in vielen Bereichen bereits gut untersucht und charakterisiert ist, war es weiterhin von besonderem Interesse, ein *in organello* System für *A. thaliana* zu etablieren. Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte aus im Dunkeln angezogenen *A. thaliana* Zellkulturen.

Für die *in organello* Systeme aus *Brassica oleracea* var. *botrytis* und *Arabidopsis thaliana* wurde das von Staudinger und Kempken (2003) entwickelte Protokoll zur Isolierung von Mitochondrien leicht abgewandelt (siehe Abschnitt 2.2.3). Hierdurch konnten aktive Mitochondrien isoliert werden, die nachweislich in der Lage waren, eingebrachte Gene zu transkribieren und die entsprechenden Transkripte zu prozessieren. Diese Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 dargestellt.

3.2 Analyse der RNA-Edierung von *cox2* Transkripten in heterologen Mitochondrien

3.2.1 RNA-Prozessierung des *Zea mays cox2* Transkriptes in Mitochondrien aus *Brassica oleracea var. botrytis*

Das mitochondrial lokalisierte *cox2* Gen kodiert für die Untereinheit II der Cytochrom C Oxidase der mitochondrialen Atmungskette. Da in früheren Analysen gezeigt werden konnte, dass das *cox2* Gen aus der dikotylen Pflanze *A. thaliana* in Mitochondrien aus *Z. mays* sehr effizient gespleißt und an allen untersuchten RNA-Edierungspositionen ediert wurde (Staudinger und Kempken, 2003, 2004), sollte im Folgenden die Prozessierung des *cox2* Transkriptes aus der monokotylen Pflanze *Z. mays* in isolierten Mitochondrien des dikotylen *B. oleracea var. botrytis* analysiert werden. Von besonderem Interesse war hierbei, ob im *in organello* System eine Erkennung und Edierung der RNA-Edierungspositionen, die sich zwischen dem *cox2* Gen aus *Z. mays* und dem aus *A. thaliana* bzw. *B. oleracea var. botrytis* unterscheiden, im heterologen Transkript erfolgt. Insgesamt liegen im *cox2* Transkript aus *Z. mays* 22 und aus *A. thaliana* 15 in der Datenbank beschriebene RNA-Edierungspositionen vor (NCBI „accession no.“: AY973492 und NC 001284; Giege und Brennicke, 1999). Sowohl im *cox2* Gen aus *A. thaliana* als auch in dem aus *Z. mays* liegt ein Gruppe II Intron vor. Hierbei handelt es sich allerdings um nicht-homologe Introns mit unterschiedlichen Insertionspositionen in den kodierenden *cox2* Sequenzen. Bei *Z. mays* befindet sich das Intron im 3' Bereich und bei *A. thaliana* im 5' Bereich der kodierenden Sequenz.

Um zu überprüfen, ob die *cox2*-Sequenz und die im Transkript vorhandenen RNA-Edierungspositionen zwischen *A. thaliana* und *B. oleracea var. botrytis* übereinstimmend sind und um eine korrekte Auswertung der Ergebnisse aus den *in organello* Analysen zu ermöglichen, wurde die *cox2* DNA- und cDNA-Sequenz aus *B. oleracea var. botrytis* bestimmt (siehe Anhang: Abb. A.2). Die *cox2* DNA-Sequenzen der Exonbereiche von *A. thaliana* und *B. oleracea var. botrytis* sind bis auf einen Nukleotidaustausch bei +379 (*A. thaliana* C → T bei *B. oleracea var. botrytis*) identisch. An der Position +379 (relativ zum Start-Kodon) liegt im *A. thaliana cox2* Transkript eine RNA-Edierungsposition vor, welche im Blumenkohl Transkript durch das schon auf genomischer Ebene vorhandene Desoxythmidin entfällt.

Die Position des Introns zwischen *cox2* aus *A. thaliana* und *B. oleracea var. botrytis* ist ebenfalls identisch, allerdings liegen im Intronbereich einige Sequenz-

unterschiede vor. Durch einen Vergleich der *cox2* DNA und cDNA Sequenzen aus Blumenkohl wurden die RNA-Edierungspositionen identifiziert. Abgesehen von der entfallenen RNA-Edierungsposition bei +379 durch die sogenannte Präädierung auf genomischer Ebene werden zwei weitere der bei *A. thaliana* beschriebenen RNA-Edierungspositionen im Blumenkohl Transkript trotz vorhandener Cytidine an entsprechenden Positionen nicht ediert. Hierbei handelt es sich um die Positionen +24 und +261 relativ zum Start-Kodon. Insgesamt liegen somit im Blumenkohl *cox2* Transkript zwölf RNA-Edierungspositionen vor, die mit *A. thaliana cox2* RNA-Edierungspositionen identisch sind.

Für die Klonierung der *Z. mays cox2* Sequenz wurden, ausgehend von der Sequenz des mitochondrialen Genoms von *Z. mays* (Linie NB; NCBI „accession no.“ AY506529), die Oligonukleotide FK688 und FK689 abgeleitet und in einer PCR mit mitochondrialer DNA aus *Z. mays* die kodierende Region von 783 bp sowie das Intron mit einer Größe von 794 bp des *cox2* Gens amplifiziert. Dieses Fragment wurde in den Vektor pMS413 (Staudinger, 2004; siehe Anhang) zwischen den dort enthaltenen Promotorbereich und 3' untranslatierten Bereich des *A. thaliana cox2* Gens kloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde pNB475 genannt (siehe Abb. 3.1a und Anhang). Obwohl für das *Z. mays cox2* Gen mehrere Promotoren beschrieben worden sind (Lupold et al., 1999), wurden die 5' und 3' regulatorischen Bereiche des *A. thaliana cox2* Gens verwendet und nicht die nativen Bereiche aus dem *Z. mays cox2* Gen. Diese Entscheidung beruhte darauf, dass eine Transkriptinitiierung von dem *A. thaliana* Promotor in den Mitochondrien aus dem ebenfalls dikotylen *B. oleracea var botrytis* als gesichert erschien.

Zur Analyse der *in organello* Prozessierung des *Z. mays cox2* Transkriptes wurde das Plasmid pNB475 mittels Elektroporation in isolierte Mitochondrien aus Blumenkohl eingebracht. Nach der anschließenden *in organello* Inkubation wurde die Gesamt-RNA aus den Mitochondrien isoliert und zur Entfernung der vorhandenen DNA eine Inkubation mit dem Enzym DNase I angeschlossen. Der Nachweis der vollständigen Entfernung der DNA wurde durch eine PCR erbracht (nicht gezeigt). In dieser PCR sowie in der darauffolgenden RT-PCR wurden die *Z. mays cox2* spezifischen Oligonukleotide NB852 und FK789 eingesetzt. Die Lage der Oligonukleotide sowie deren Sequenz im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz des endogenen Blumenkohl *cox2* Gens ist in Abb. 3.1a und b dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die ansonsten sehr ähnlichen *cox2* Sequenzen aus Mais und Blumenkohl im Bereich der verwendeten Oligonukleotide signifikante Unterschiede aufweisen, die eine spezifische Amplifikation der fremden Transkripte in den Mitochondrien aus Blumenkohl gewährleisten. Der Nachweis der Spezifität der Oligonukleotide

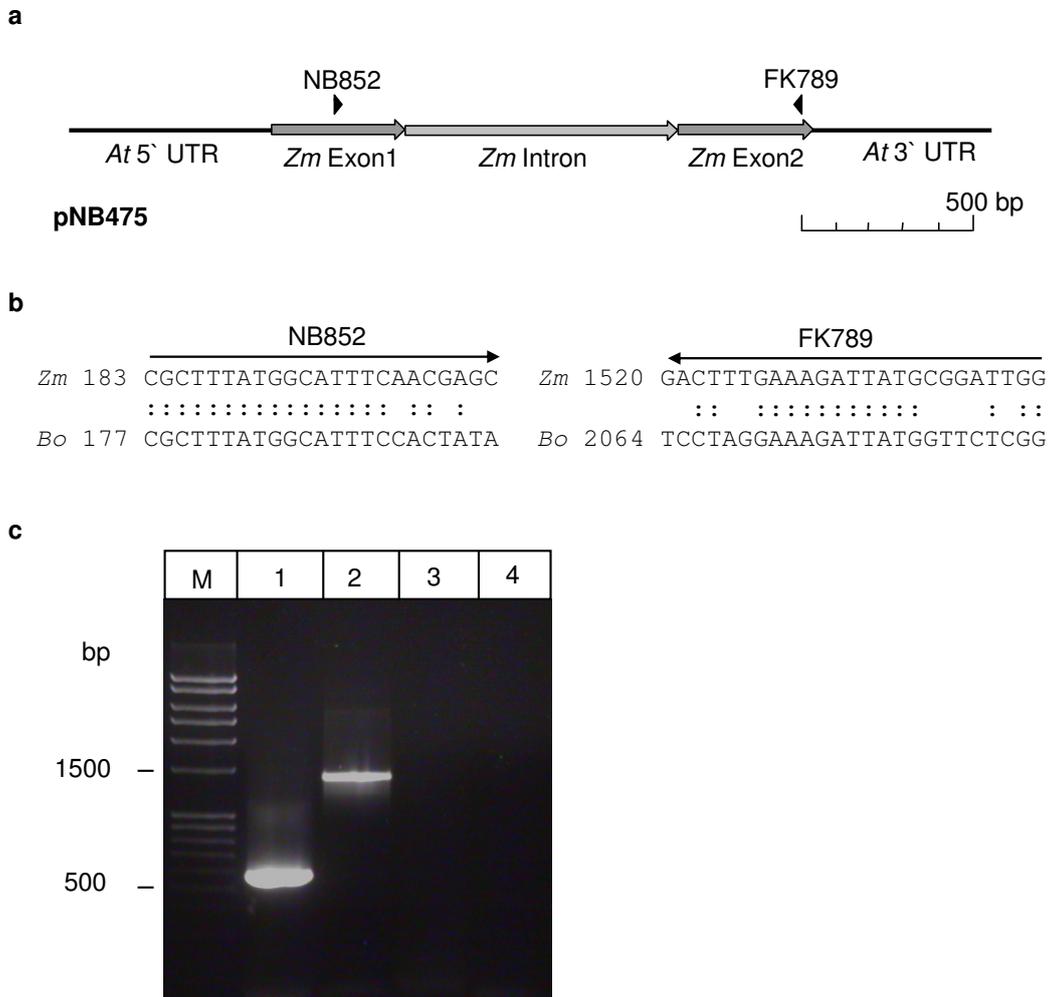


Abbildung 3.1: Prozessierung des *Z. mays* *cox2* Transkriptes nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis*

a Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz mit Intron von *Z. mays* (*Zm*) *cox2* und der 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTR) des *A. thaliana* (*At*) *cox2* Gens im Plasmid pNB475. Die Lokalisation der zur Amplifikation von cDNA verwendeten Oligonukleotide NB852 und FK789 ist mit Dreiecken eingezeichnet. **b** Zur Verdeutlichung der Spezifität ist ein Vergleich der *cox2* Sequenz von *Z. mays* und *B. oleracea* var. *botrytis* (*Bo*) im Bereich der Oligonukleotide NB852 und FK789 gezeigt. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Position im offenen Leserahmen (mit Intron). **c** Das Plasmid pNB475 mit der *cox2* Sequenz aus *Z. mays* wurde durch Elektroporation in Blumenkohlmitochondrien eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden NB852 und FK789 durchgeführt. Hier zu sehen ist die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA (1) und der Wasser-Kontrolle der RT-PCR (3) sowie das entsprechende *cox2* DNA-Fragment (2) aus einer PCR mit der dazugehörigen Wasser-Kontrolle (4). M= Größenmarker.

für das *Z. mays* *cox2* Transkript wurde in einer RT-PCR erbracht, in der RNA aus unbehandelten Blumenkohl-Mitochondrien eingesetzt wurde. Hierbei wurde trotz einer parallel durchgeführten Amplifikation des endogenen *cox2* Transkriptes aus der verwendeten RNA mit entsprechenden Oligonukleotiden, mit der Oligonukleotidkombination NB852 und FK789 kein Produkt amplifiziert (nicht gezeigt).

Abb. 3.1c zeigt das Ergebnis der RT-PCR mit der aus den mit pNB475 transformierten Mitochondrien aus Blumenkohl stammenden RNA. Die amplifizierte cDNA ist im Vergleich mit einem PCR-Produkt von *cox2*-DNA abgebildet. Das DNA-Fragment mit einer erwarteten Größe von 1362 bp beinhaltet das Intron, wohingegen die Größe der hier amplifizierten cDNA mit der bei erfolgtem Spleißen des Introns erwarteten Größe von 567 bp übereinstimmt. Eine anschließende Sequenzierung der cDNA bestätigte zum einen anhand von Sequenzunterschieden zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* *cox2* (für *cox2* Sequenzvergleich siehe Anhang: Abb. A.3) die spezifische Amplifikation des *Z. mays* *cox2* Transkriptes und des Weiteren das korrekte Spleißen des Introns. Da in der RT-PCR nur cDNA dieser Größe amplifiziert werden konnte, die RT-PCR Bedingungen aber auch die Amplifikation größerer Fragmente erlaubten, scheint die Spleißreaktion der fremden *cox2* Transkripte mit großer Effizienz in den heterologen Mitochondrien abzulaufen.

Wie die Sequenzierung der *Z. mays* *cox2* cDNA weiterhin zeigte, wurden mit einer Ausnahme alle bekannten RNA-Edierungspositionen im untersuchten Bereich

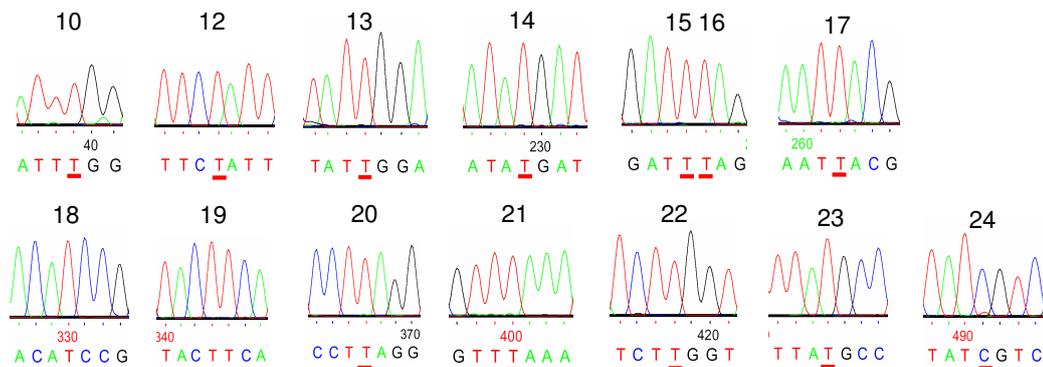


Abbildung 3.2: RNA-Edierung des *cox2* Transkriptes aus Mais nach *in organello* Inkubation in Blumenkohl-Mitochondrien

Sequenzierung der Mais *cox2* cDNA-Fragmente aus der Transformation von pNB475 in Mitochondrien aus Blumenkohl. Die Ausschnitte des Chromatogramms zeigen 14 der 22 bekannten RNA-Edierungspositionen. An 13 dieser Positionen ist eine vollständige RNA-Edierung zu beobachten, an der Position 24 ist hingegen keine RNA-Edierung feststellbar. Die Nummerierung der Positionen erfolgte nach Tabelle 3.1 und die RNA-Edierungspositionen sind rot unterstrichen.

vollständig ediert (siehe Abb. 3.2). Hierbei handelt es sich um 14 von insgesamt 22 RNA-Edierungspositionen. Sieben der ediert vorliegenden Positionen kommen im endogenen Blumenkohl *cox2* Transkript nicht vor. Die nicht ediert vorliegende Position 24 (Nummerierung siehe Tabelle 3.1, Seite 45) ist in der Datenbank unter dem NCBI-Eintrag „accession no.“ AY973492 allerdings auch nur als partiell ediert beschrieben und in einem anderen NCBI-Eintrag („accession no.“ AY506529) nicht als RNA-Edierungsposition angegeben.

3.2.2 RNA-Prozessierung des *Zea mays cox2* Transkriptes in Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*

Nachdem gezeigt wurde, dass die isolierten Mitochondrien aus Blumenkohl aktiv sind und fremde *cox2* Transkripte spleißen und edieren (siehe vorherigen Abschnitt), wurde im Folgenden getestet, inwieweit isolierte Mitochondrien aus *A. thaliana* Zellkulturen Prozessierungsaktivität aufweisen und fremde *cox2* Edierungspositionen erkennen.

Die isolierten Mitochondrien aus *A. thaliana* Zellkulturen wurden mit dem Plasmid pNB475 (siehe Anhang), das die kodierende *cox2* Sequenz aus *Z. mays* sowie Promotor- und Terminatorbereiche des *A. thaliana cox2* Gens enthält (siehe Abb. 3.1a), elektroporiert. Nach der *in organello* Inkubation und der anschließenden RNA-Isolierung folgte eine DNase I-Behandlung der RNA und die Vollständigkeit des DNA-Abbaus wurde in einer PCR überprüft (nicht gezeigt). Der Nachweis der Spezifität der hier verwendeten Oligonukleotidkombination NB852 und FK789 für die *cox2* Transkripte aus *Z. mays* erfolgte im vorhergehenden Abschnitt 3.2.1. Zur Analyse der *in organello* Prozessierung des *Z. mays cox2* Transkriptes wurde die nachweislich DNA-freie RNA in einer RT-PCR als Matrize eingesetzt. Wie in Abb. 3.3a zu sehen ist, wurde cDNA in Form einer starken Bande bei ca. 1400 bp und zwei schwächeren Banden bei ca. 950 bp und 570 bp amplifiziert. Bei der Bande von ca. 1400 bp handelt es sich wahrscheinlich um cDNA Fragmente von ungespleißten *Z. mays cox2* Transkripten, hierbei wurde eine Größe von 1362 bp erwartet. Wie bei Staudinger und Kempken (2004) gezeigt, ist bei ungespleißten *cox2* Transkripten auch eine unvollständige RNA-Edierung zu erwarten. Da nur bei vollständig edierten Transkripten eine Auswertung in Bezug auf die Erkennung von fremden RNA-Edierungspositionen erfolgen kann, wurde im Folgenden nur die Bande bei ca. 570 bp weiter analysiert, da dies der erwarteten cDNA Fragmentgröße bei gespleißten *Z. mays cox2* Transkripten von 567 bp entsprach. Um eine Sequenzierung durchführen zu können, wurde die Bande in einer PCR reamplifiziert (siehe Abb. 3.3b).

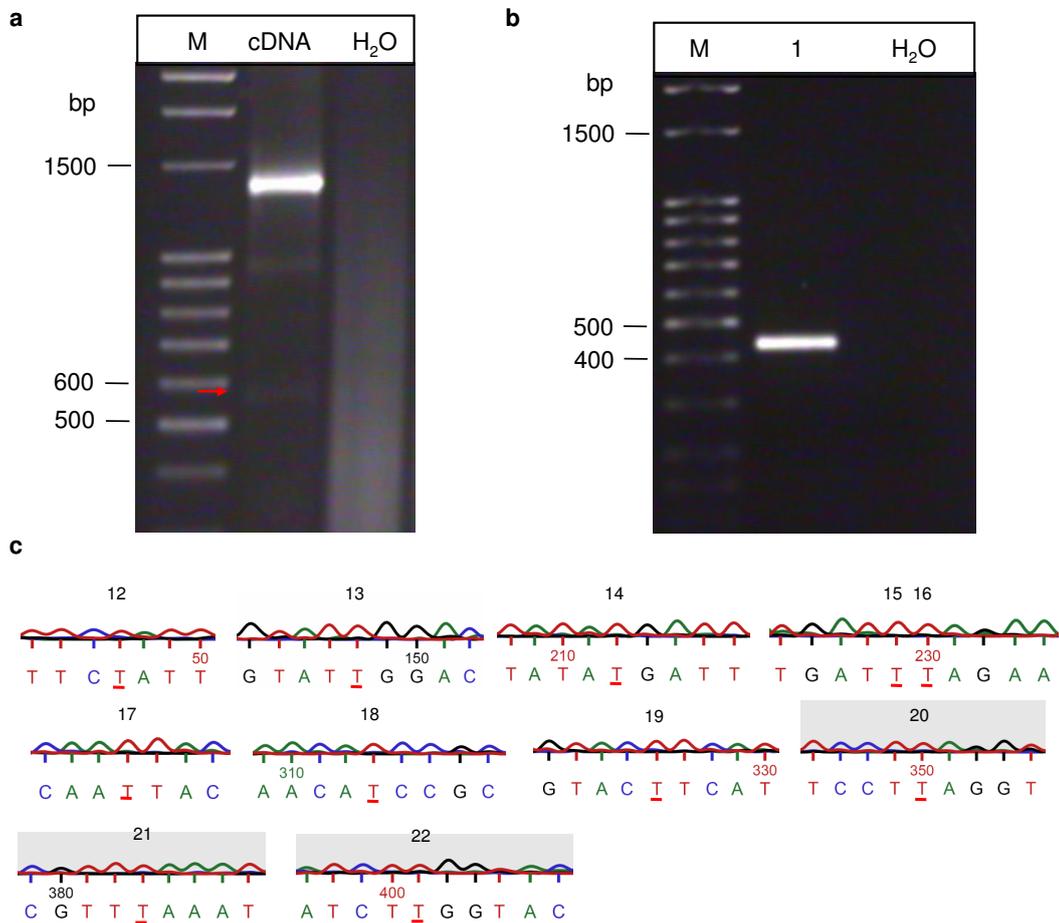


Abbildung 3.3: RNA-Prozessierung des *cox2* Transkriptes aus *Z. mays* nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus *A. thaliana*

a Das Plasmid pNB475 mit der *cox2* Sequenz aus *Z. mays* wurde durch Elektroporation in Mitochondrien aus *A. thaliana* eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden NB852 und FK789 durchgeführt. Hier zu sehen ist die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA und der Wasser-Kontrolle der RT-PCR. Es ist eine starke Bande bei ca. 1400 bp zu erkennen und eine Bande schwächerer Intensität bei ca. 570 bp, welche mit einem roten Pfeil gekennzeichnet ist. Dies entspricht den erwarteten Größen von cDNA-Fragmenten von ungespleißten und gespleißten *cox2* Transkripten. Um eine ausreichende DNA-Menge für eine Sequenzierung zu erhalten wurde die 570 bp-cDNA mit den Oligonukleotiden FK483 und NB875 in einer PCR reamplifiziert (**b**, Spur 1). Die erwartete Fragmentgröße entsprach 429 bp. **c** Sequenzierung der Mais *cox2* cDNA Fragmente aus Transformation von pNB475 in Mitochondrien aus *A. thaliana*. Die Ausschnitte des Chromatogramms zeigen elf der 22 bekannten RNA-Edierungspositionen. An allen Positionen ist eine vollständige RNA-Edierung zu beobachten. Die RNA-Edierungspositionen sind rot unterstrichen und die Nummerierung der Positionen erfolgte nach Tabelle 3.1.

Eine anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes zeigte durch entsprechende Nukleotidunterschiede (siehe Sequenzvergleich zwischen *A. thaliana* und *Z. mays* *cox2* im Anhang: Abb. A.3) die spezifische Amplifikation von *cox2* Transkripten aus Mais. Wie in Abb. 3.3c gezeigt ist ergab die Sequenzierung außerdem eine vollständige Edierung des *Z. mays* *cox2* Transkriptes an allen der elf analysierten Edierungspositionen (Positionen 12-22, die Nummerierung erfolgte nach Tabelle 3.1).

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass *cox2* Transkripte aus *Z. mays* in Mitochondrien aus *A. thaliana* korrekt gespleißt und ediert werden. Die Effizienz der Prozessierung müsste bei weiterer Verwendung von Mitochondrien aus *A. thaliana* im *in organello* System optimiert werden. Obwohl damit die grundsätzliche Prozessierungsaktivität der Mitochondrien gezeigt wurde, wurden aufgrund der guten Verfügbarkeit von Blumenkohl in den folgenden *in organello* Analysen für Mitochondrien einer dikotylen Pflanzen die aus Blumenkohl verwendet. Die nachweislich edierungsaktiven Mitochondrien aus *A. thaliana* wurden für die Proteinextraktion und für die Isolierung von an der RNA-Edierung beteiligten Proteinen in Abschnitt 3.6.4 verwendet.

3.2.3 Analyse der RNA-Edierung des *Arabidopsis thaliana* *cox2* Transkriptes in Mitochondrien aus *Zea mays*

Schon in früheren Arbeiten (Staudinger und Kempken, 2003, 2004) wurde die Prozessierung des *A. thaliana* *cox2* Transkriptes in Mitochondrien aus *Z. mays* analysiert und festgestellt, dass die fremden Transkripte in den heterologen Mitochondrien effizient gespleißt und ediert werden. Hierbei wurden allerdings nur sechs von den insgesamt 15 bekannten RNA-Edierungspositionen des *A. thaliana* *cox2* Transkriptes (NCBI „accession no.“ NC 001284; Giege und Brennicke, 1999) untersucht. Um einen vollständigen Überblick über die Erkennung der *A. thaliana* RNA-Edierungspositionen im *in organello* System zu erhalten, wurden die verbleibenden neun RNA-Edierungspositionen analysiert. Darunter befanden sich drei RNA-Edierungspositionen, welche im *Z. mays* Transkript nicht vorkommen.

Für diese Analyse wurde das Plasmid pTJ246 (Staudinger, 2004; siehe Abb. 3.4a) in Mais-Mitochondrien eingebracht. Die nach der *in organello* Inkubation isolierte RNA wurde nachweislich vollständig von DNA befreit und in einer RT-PCR eingesetzt. Mittels der vorher auf Spezifität überprüften Oligonukleotide FK770 und FK416 wurde cDNA der erwarteten Größe gespleißter *A. thaliana* *cox2* Transkripte amplifiziert (nicht gezeigt).

Eine Sequenzierung bestätigte die spezifische Amplifikation von *A. thaliana*

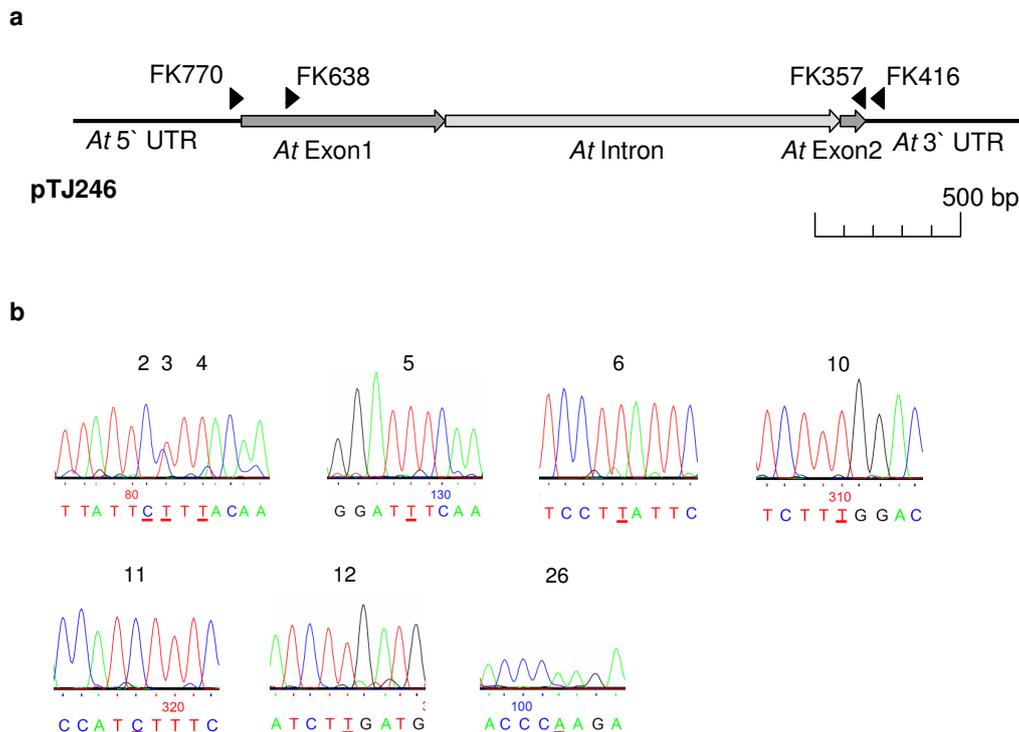


Abbildung 3.4: RNA-Edierung des *A. thaliana cox2* Transkriptes nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus *Z. mays*

a Schematische Darstellung des *A. thaliana cox2* Gens im Plasmid pTJ246. Die Lokalisation der zur Amplifikation von cDNA verwendeten Oligonukleotide FK770/FK416 und FK638/FK357 (verwendet in Abschnitt 3.3) ist mit Dreiecken eingezeichnet. **b** Sequenzierung der *cox2* cDNA Fragmente aus der Transformation von pTJ246 in Mitochondrien aus Mais. Die Ausschnitte des Chromatogramms zeigen die neun bisher im *in organello* System noch nicht analysierten RNA-Edierungspositionen der insgesamt 15 Edierungspositionen. An sechs der neun Positionen ist eine vollständige RNA-Edierung zu erkennen, die Position 3 ist nur partiell und die Positionen 2 und 11 sind gar nicht ediert. Bei dem Ausschnitt der Position 26 handelt es sich um die revers komplementäre Sequenz. Die RNA-Edierungspositionen sind rot unterstrichen und die Nummerierung der Positionen erfolgte nach Tabelle 3.1.

cox2 Transkripten und wies eine partielle Edierung von einer und eine vollständige Edierung von sechs der erstmals im *in organello* System untersuchten RNA-Edierungspositionen nach (siehe Abb. 3.4b). Die Edierungspositionen 2 und 11 hingegen (Nummerierung entsprechend Tabelle 3.1) lagen nicht ediert vor. Diese Positionen entsprechen den im endogenen Blumenkohl *cox2* Transkript ebenfalls nicht ediert vorliegenden Positionen (siehe Abschnitt 3.2.1).

In Tabelle 3.1 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *in organello* Analysen mit *cox2* Transkripten aus *Z. mays* und *A. thaliana* in Mitochondrien

Tabelle 3.1: Edierung von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* *cox2* Edierungspositionen in heterologen Systemen

Nummer der Edierungsposition	Position in <i>A. thaliana</i> <i>cox2</i> Sequenz ¹	<i>A. thaliana</i> Edierungspositionen untersucht in <i>organello</i> in Mitochondrien aus Mais	Position in <i>Z. mays</i> <i>cox2</i> Sequenz ²	<i>Z. mays</i> Edierungspositionen untersucht in <i>organello</i> in Mitochondrien aus Blumenkohl	Position in <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> <i>cox2</i> Sequenz ³
1	/	/	14	na	/
2	24	-	30(+)	na	/(C)
3	25	(+)	31(+)	na	25(+)
4	27	+	/(C)	na	27
5	71	+	77	na	71
6	138	+	144	na	138
7	/(C)	/(C)	162(+)	na	/(C)
8	/(T)	/(T)	167	na	/(T)
9	/(T)	/(T)	169	na	/(T)
10	253	+	259	+	253
11	261	-	/(T)	/(T)	/(C)
12	278	+	284	+	278
13	379	+	385	+	/(T)
14	/(T)	/(T)	449	+	/(T)
15	/(C)	/(C)	466	+	/(C)
16	/(T)	/(T)	467	+	/(T)
17	476	+	482	+	476
18	/(T)	/(T)	550	+	/(T)
19	557	+	563	+	557
20	581	+	587	+	581
21	/(T)	/(T)	620	+	/(T)
22	/(T)	/(T)	638	+	/(T)
23	698	+	704	+	698
24	/(C)	/(C)	711(+)	-	/(C)
25	721	+	/(A)	/(A)	721
26	742	+	/(T)	/(T)	742

¹ NCBI „accession no.“: NC 001284² NCBI „accession no.“: AY973492³ diese Arbeit

/= keine RNA-Edierungsposition (wenn vorhanden mit Angabe des Nukleotides an entsprechender Position); + = vollständige RNA-Edierung; (+) = partielle RNA-Edierung; - = keine RNA-Edierung, na = nicht analysiert. Positionsangaben beziehen sich auf die Position im offenen Leserahmen.

aus Blumenkohl und Mais dargestellt. Interessanterweise werden mit den untersuchten RNA-Edierungspositionen 14, 15, 16, 18, 21 und 22 des *Z. mays* Transkriptes, Edierungspositionen die nicht im endogenen Blumenkohl *cox2* Transkript vorhanden sind im Blumenkohl *in organello* System erkannt und ediert. Ebenso werden im Mais *in organello* System die drei RNA-Edierungspositionen 4, 25 und 26 im *A. thaliana* Transkript ediert, welche in dem endogenen Mais *cox2* Transkript nicht vorkommen.

3.2.4 RNA-Edierungspositionen im *cox2* Transkript aus mono- und dikotylen Pflanzen

Wie im Abschnitt 3.2.1 gezeigt wurde, werden *Z. mays*-spezifische *cox2* RNA-Edierungspositionen in Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis* erkannt und ediert. Umgekehrt werden auch die *A. thaliana*-spezifischen *cox2* RNA-Edierungspositionen in Mitochondrien aus *Z. mays* ediert (siehe Abschnitt 3.2.3). Um das Vorkommen dieser RNA-Edierungspositionen in *cox2* Transkripten anderer Höherer Pflanzen näher zu untersuchen, sollte im Folgenden eine Analyse der RNA-Edierungspositionen im *cox2* Transkript von mono- und dikotylen Pflanzen durchgeführt werden.

Hierfür wurde die Datenbank des NCBI nach *cox2* DNA- und cDNA-Sequenzen von mono- und dikotylen Pflanzen durchsucht. Insgesamt wurden *cox2* DNA- und cDNA-Sequenzen von fünf monokotylen und von elf dikotylen Pflanzen erhalten. Von weiteren neun dikotylen Pflanzen lagen, zum Teil partielle, *cox2* DNA-Sequenzen vor.

Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt, dass die RNA-Edierungspositionen 15 und 21 nur in monokotylen Pflanzen vorhanden waren, wohingegen die RNA-Edierungsposition 25 nur bei dikotylen Pflanzen zu finden war. In Abb. 3.5 sind die RNA-Edierungspositionen 15, 21 und 25 in Ausschnitten des Sequenzvergleichs zwischen drei mono- und drei dikotylen Pflanzen gezeigt. Entsprechende Ausschnitte des Sequenzvergleichs mit allen aus der NCBI-Datenbank erhaltenen *cox2* Sequenzen sind im Anhang zu finden. Hierbei ist zu erkennen, dass an Position 15 in allen vorhandenen Sequenzen aus dikotylen Pflanzen die Base Cytosin vorliegt, die aber nicht ediert wird. Die Position 21 hingegen liegt in allen 20 analysierten DNA Sequenzen von dikotylen Pflanzen prädiert vor, d.h. es ist die Base Thymin an entsprechender Stelle in der DNA zu finden.

Die in den Abschnitten 3.2.1, 3.2.3 und 3.2.4 vorgestellten Ergebnisse sind in Bolle und Kempken (2006) publiziert.

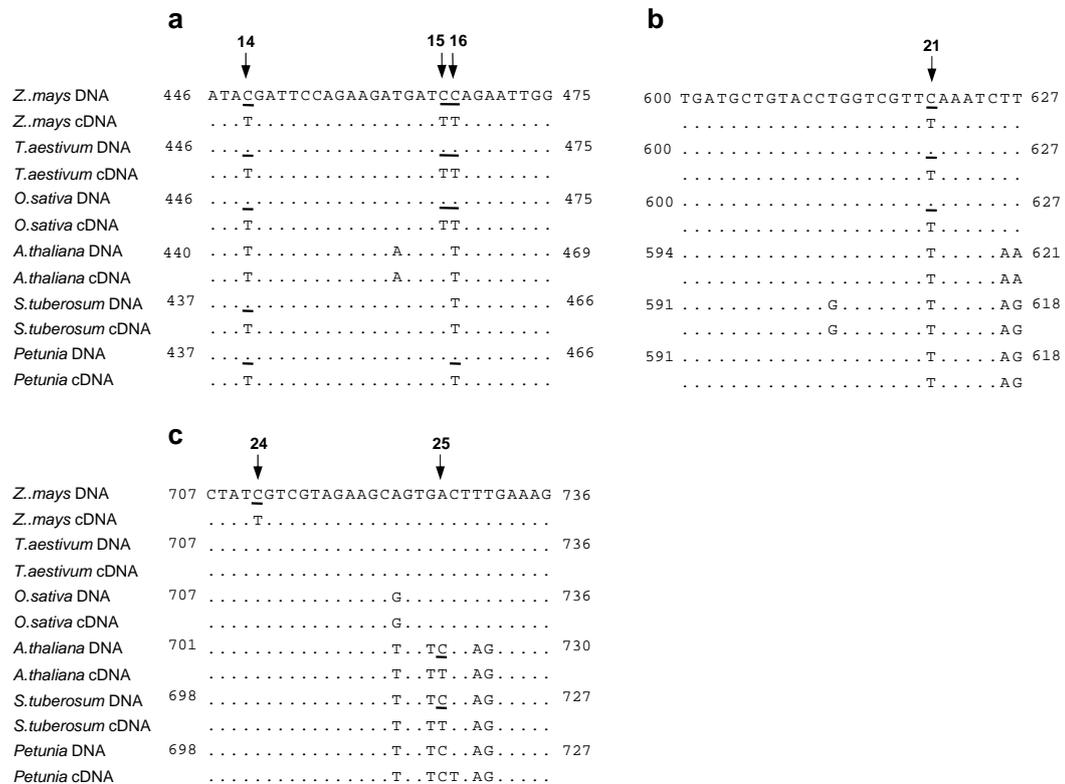


Abbildung 3.5: Vergleich von *cox2* RNA-Edierungspositionen zwischen mono- und dikotylen Pflanzen

Für den Sequenzvergleich wurden die *cox2* Sequenzen von cDNA (NCBI „accession no.“ AY973492) und genomischer DNA (NCBI „accession no.“ AY506529) von *Zea mays*, cDNA (NCBI „accession no.“ X52867) und genomischer DNA (NCBI „accession no.“ NC 007579) von *Triticum aestivum*, cDNA und genomischer DNA von *Oryza sativa* (NCBI „accession no.“ BA000029), cDNA und genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* (NCBI „accession no.“ NC 001284), cDNA und genomischer DNA von *Petunia x hybrida* (NCBI „accession no.“ X17395) und cDNA und genomischer DNA von *Solanum tuberosum* (NCBI „accession no.“ DQ185064) verwendet. Dargestellt sind die Sequenzvergleiche um Mais *cox2* RNA-Edierungspositionen (a) 14, 15 und 16, (b) 21, (c) 24, sowie *A. thaliana* *cox2* RNA-Edierungsposition 25. Die zu der Mais *cox2* Sequenz identischen Nukleotide sind mit Punkten dargestellt, die abweichenden Nukleotide sind angegeben. Die Nummerierung entspricht der Position im offenen Leserahmen und die RNA-Edierungspositionen sind in der genomischen Sequenz unterstrichen.

3.3 *In organello* RNA-Edierung von *in vitro* mutierten *cox2* Transkripten

Wie im vorherigen Abschnitt (3.2) gezeigt wurde, sind Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl in der Lage, RNA-Edierungspositionen fremder *cox2* Transkripte zu erkennen und effizient zu edieren. Hierzu gehören auch Edierungspositionen,

die nicht nur im entsprechenden endogenen Transkript sondern auch in der entsprechenden mono- oder dikotylen Pflanzengruppe nicht vorkommen (siehe Abschnitt 3.2.4). Der Prozess der Erkennung von RNA-Edierungspositionen ist noch nicht aufgeklärt bzw. die dafür notwendigen Bereiche im Transkript sind noch nicht vollständig bekannt. Durch *in vitro* und *in organello* Analysen konnten in den letzten Jahren für einige RNA-Edierungspositionen essentielle Elemente von ca. 20 Nukleotiden stromaufwärts der Edierungsposition und in einigen Fällen auch einigen Nukleotiden stromabwärts, identifiziert werden (Farré et al., 2001; Choury et al., 2004; Takenaka et al., 2004; Neuwirt et al., 2005; van der Merwe et al., 2006; Verbitskiy et al., 2006). Aber nicht immer ist die direkte Sequenzumgebung ausreichend für eine Erkennung der Edierungsposition, so erfolgt eine Edierung des *S. bicolor atp6* Transkriptes in Mitochondrien aus Mais nur dann, wenn der 5' untranslatierte Bereich, sowie der 5' Bereich der kodierenden Region von dem nativen *Z. mays atp6* Transkript stammt (Staudinger et al., 2005).

Im Folgenden sollte daher analysiert werden ob Edierungspositionen, die im endogenen, aber nicht im fremden *cox2* Transkript vorkommen im Kontext des fremden Transkriptes von den Mitochondrien erkannt und ediert werden. Hierfür wurden mittels ortsgerechter Mutagenese in das im Plasmid pTJ246 vorliegende *A. thaliana cox2* Gen, Desoxycytidine an Positionen eingeführt, an denen im *Z. mays cox2* Transkript RNA-Edierungspositionen vorliegen. Durch die Einführung der Desoxycytidine wurden im *A. thaliana cox2* Gen Desoxythymidine, und somit eine Präedierung auf DNA-Ebene, ersetzt. Insgesamt drei verschiedene *Z. mays* RNA-Edierungspositionen wurden durch *in vitro* Mutagenese in das *A. thaliana* Gen eingebracht, so dass drei Konstrukte mit jeweils einer Punktmutation entstanden. Unter Verwendung der Oligonukleotide FK860 und FK861 wurde in einer PCR ein Desoxycytidin an der *Z. mays* RNA-Edierungsposition 14 (Nummerierung entsprechend der Tabelle 3.1) in das im Plasmid pTJ246 vorliegende *A. thaliana cox2* Gen (Position +443 relativ zum Start-Kodon) eingebracht. Hierdurch entstand das Plasmid pHS559. Mit den Oligonukleotiden FK725 und FK726, sowie mit der Oligonukleotidkombination NB889 und NB890 wurden zwei weitere Desoxycytidine an den *Z. mays* RNA-Edierungspositionen 16 und 21 (+461 und +614 relativ zum Start-Kodon) in das *A. thaliana cox2* Gen eingebracht. In Abb. 3.6a sind die entsprechenden Sequenzbereiche mit den eingeführten Desoxycytidinen der so entstandenen Plasmide pHS559, pNB455 und pNB598 (siehe Anhang) sowie ein Sequenzvergleich der entsprechenden Bereiche zwischen *Z. mays* und *A. thaliana cox2* abgebildet. Hierbei ist zu erkennen, dass der Bereich von -20 bis +10 um die eingeführte *Z. mays* RNA-Edierungsposition 14 zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* übereinstimmend ist. Bei der eingeführten Edierungsposition 16 hingegen finden sich in dem

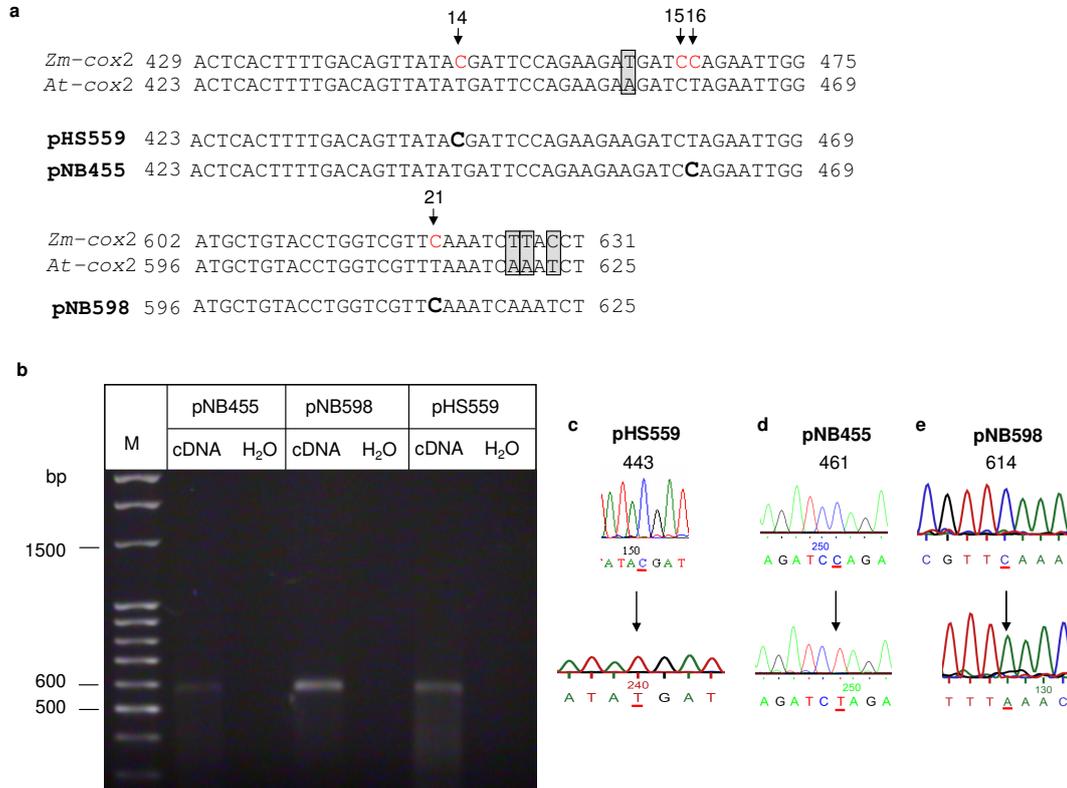


Abbildung 3.6: RNA-Edierung von *in vitro* mutierten *A. thaliana cox2* Transkripten

Durch ortsgerechte *in vitro* Mutagenese wurden im *A. thaliana* (*At*) *cox2* Gen im Plasmid pTJ246 *Z. mays* (*Zm*) *cox2* RNA-Edierungspositionen eingeführt. Die dadurch erzeugten Plasmide pHS559, pNB455 und pNB598 tragen jeweils die Mais RNA-Edierungsposition 14, 16 und 21 (Nummerierung nach Tabelle 3.1). Die entsprechenden Sequenzbereiche sind in **a** gezeigt. Die Positionsangaben der Sequenzen beziehen sich auf die Position im offenen Leserahmen; die RNA-Edierungspositionen sind rot, die durch *in vitro* Mutagenese eingeführten Desoxycytidine in fett dargestellt. Sequenzunterschiede zwischen *A. thaliana* und *Z. mays* sind grau unterlegt. **b** Die Plasmide pNB455, pNB598 und pHS559 wurden durch Elektroporation in Mitochondrien aus *Z. mays* eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK638 und FK357 durchgeführt (siehe Abb. 3.4a für die Lage der Oligonukleotide). Hier zu sehen ist die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNAs und der H₂O-Kontrollen der RT-PCRs. M= Größenmarker. Sequenzierung der Plasmide pHS559 (**c**), pNB455 (**d**) und pNB598 (**e**) und der entsprechenden cDNAs aus den *in organello* Analysen. Gezeigt sind hier nur die Ausschnitte aus den Chromatogrammen mit den eingeführten Punktmutationen. Es ist zu erkennen, dass in allen Fällen die eingeführten RNA-Edierungspositionen *in organello* ediert wurden. In **e** ist die cDNA-Sequenzierung der revers komplementären Sequenz gezeigt. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Position im offenen Leserahmen.

entsprechenden Bereich Sequenzunterschiede zwischen der DNA Sequenz von Mais und *A. thaliana* an den Positionen -5 und -18, wobei eine Edierung der RNA an der Position -18 (*Z. mays* RNA-Edierungsposition 14) diesen Sequenzunterschied wieder aufheben würde.

Bei der Position 21 handelt es sich um eine der Positionen, welche in der Datenbank des NCBI nur in *cox2* Transkripten von monokotylen Pflanzen gefunden wurde (siehe Abschnitt 3.2.4). Eine Analyse der Erkennung dieser in einem *cox2* Transkript einer dikotylen Pflanze vorliegenden Position in Mitochondrien aus Mais ist somit von besonderem Interesse. Die direkte Sequenzumgebung dieser Position ist im stromaufwärts liegenden Bereich von 20 Nukleotiden zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* identisch, die Nukleotide +6, +7 und +9 im Bereich von zehn Nukleotiden stromabwärts der Edierungsposition unterscheiden sich hingegen.

Zur Analyse der *in organello* RNA-Edierung der mutierten *A. thaliana cox2* Transkripte wurden die Plasmide pHS559, pNB455 und pNB598 durch Elektroporation in Mitochondrien aus Mais eingebracht. Anschließend fand eine Inkubation im *in organello* Puffer statt, und die RNA wurde aus den Mitochondrien isoliert. Durch eine der Behandlung mit DNase I nachfolgenden PCR wurde sichergestellt, dass die RNA frei von DNA-Rückständen war (nicht gezeigt). Die Lokalisation der in der PCR und der RT-PCR verwendeten Oligonukleotide FK638 und FK357, deren Spezifität für das *A. thaliana cox2* Transkript in früheren Analysen gezeigt wurde, ist in Abb. 3.4a dargestellt. Die RT-PCR ergab in allen drei Ansätzen Banden, welche der bei erfolgtem Spleißen des Introns erwarteten cDNA-Fragmentgröße von 567 bp entsprachen (siehe Abb. 3.6b). Es konnten keine Fragmente entsprechend der Größe ungespleißter RNA von 1362 bp amplifiziert werden. Durch eine Sequenzierung der cDNA-Fragmente konnte aufgrund der an einigen Positionen vorhandenen Unterschiede zwischen der *A. thaliana* und *Z. mays cox2* Sequenz (für Sequenzvergleich siehe Anhang) eindeutig eine Amplifikation der fremden Transkripte nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte die Sequenz eine vollständige Edierung der *A. thaliana* RNA-Edierungspositionen im untersuchten Bereich (nicht gezeigt), mit Ausnahme der Position 11, die erwartungsgemäß nicht ediert vorlag (siehe Abschnitt 3.2.3). Die Sequenzanalyse an den *Z. mays* RNA-Edierungspositionen 14, 16 und 21 im *A. thaliana* Transkript zeigte eine vollständige Umwandlung der eingeführten Cytidine in Thyminidine. In Abb. 3.6c, d und e sind die entsprechenden Ausschnitte der Chromatogramme aus der Sequenzierung der Plasmid-DNAs und der cDNA-Fragmente aus der *in organello* Analyse gezeigt. Wie in Abb. 3.6d außerdem zu sehen ist, hat die Edierung der Position 16 (bei Position +461) nicht dazu geführt, dass das Cytidin der *Z. mays* spezifischen Edierungsposition 15 (bei Position +460)

im Transkript von *A. thaliana* ediert wurde. Es fand somit in den Mitochondrien aus *Z. mays* eine RNA-Edierung statt, die eine korrekte Version des edierten *A. thaliana* *cox2* Transkriptes erzeugte.

3.4 Analyse der RNA-Edierung von *nad6* und *atpA* Transkripten in heterologen Mitochondrien

Das *atpA* Gen aus *Triticum sativum* wurde in der Diplomarbeit von Wulff (2005) für die *in organello* Analyse der RNA-Edierung ausgewählt und kloniert. Weiterhin wurde von Wulff (2005) die kodierende Region des *nad6* Gens aus *A. thaliana* mit dem Promotor- und dem Terminator-Bereich des *cox2* Gens aus *A. thaliana* kloniert. Alternativ hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit der native Promotor des *A. thaliana* *nad6* zusammen mit der kodierenden *nad6* Region kloniert, um einen potentiellen Einfluss der 5' nicht-kodierenden Bereiche auf die RNA-Edierung *in organello* zu analysieren. Des Weiteren wurde das *nad6* Gen aus *T. sativum* für die *in organello* Analyse der RNA-Edierung kloniert (Wulff, 2005). Weder das *atpA* Gen, noch das *nad6* Gen enthalten Introns. Hingegen weisen die *nad6* Transkripte in *A. thaliana* zehn RNA-Edierungspositionen und in *T. sativum* 15 potentielle RNA-Edierungspositionen auf, welche abgeleitet sind von den 15 in Haouazine et al. (1992) beschriebenen *nad6* RNA-Edierungspositionen des nahe verwandten *T. aestivum*. Das *T. sativum* *atpA* Transkript weist sieben potentielle RNA-Edierungspositionen auf, welche von den aus Triticale (*x Triticosecale*) bekannten abgeleitet sind (Laser et al., 1995).

Eine Analyse des *atpA*- und der *nad6*-Konstrukte im Mais- und Blumenkohl-*in organello* System erbrachte allerdings den Nachweis, dass in keinem Fall eine Edierung der fremden Transkripte in den isolierten Mitochondrien erfolgte. Die entsprechenden Abbildungen sowie die Tabellen mit einem Überblick über die analysierten RNA-Edierungspositionen sind im Anhang zu finden (Abb. A.5, A.6 und A.7a, b; Tab. A.1 und A.2).

3.5 RNA-Prozessierung von plastidären Transkripten in Mitochondrien aus *Zea mays* und *Brassica oleracea var. botrytis*

Die RNA-Edierung in den Plastiden Höherer Pflanzen zeigt in einigen Punkten Ähnlichkeiten zu der mitochondrialen RNA-Edierung (Maier et al., 1996; Tillich et al., 2006a). Dies führte zu der Frage, inwiefern der mitochondrialen und der plastidären RNA-Edierung ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt oder ob es ähnliche oder sogar gemeinsame Komponenten der RNA-Edierung gibt. Trotz dieser Ähnlichkeiten wurde ein Fragment des mitochondrialen *Petunia hybrida cox2* Transkriptes in transgenen Chloroplasten aus Tabak nicht ediert (Sutton et al., 1995). Zeltz et al. (1996) analysierte die RNA-Edierung des plastidären *rpoB* Transkriptes in Mitochondrien aus Reis und zeigte, dass keine der Edierungspositionen ediert vorlag. Die Grundlage dieser Analyse war der Transfer eines plastidären Fragmentes aus den Chloroplasten in die Mitochondrien, wie es im Verlauf der Evolution mehrfach geschehen ist (Stern und Lonsdale, 1982; Nakazono und Hirai, 1993).

Mittels des *in organello* Systems ist es nun erstmals möglich in einem direktem Ansatz zu analysieren, ob pflanzliche Mitochondrien in der Lage sind, plastidäre Transkripte zu erkennen und zu edieren und darin enthaltene Introns zu spleißen. Für diese Analyse wurden das *ycf3* und das *ndhB* Gen aus *Z. mays* ausgewählt. Das *ycf3* Gen kodiert für ein Protein, welches für den Zusammenbau des Photosystem I-Komplexes notwendig ist (Ruf et al., 1994; Boudreau et al., 1997) und das *ndhB* Gen für eine Untereinheit der plastidären NAD(P)H Dehydrogenase (Shikanai et al., 1998).

Das *ycf3* Transkript enthält zwei (Ruf et al., 1994) und das *ndhB* Transkript sechs (Maier et al., 1992) RNA-Edierungspositionen. Für alle RNA-Edierungspositionen des *ndhB* und des *ycf3* Transkriptes ist in jungen Blättern aus etiolierten Maispflanzen eine vollständige Edierung in den Plastiden nachgewiesen worden (Peeters und Hanson, 2002). Eine andere Studie zeigte eine vollständige Edierung aller bis auf die dritte RNA-Edierungsposition des *ndhB* Transkriptes in etiolierten Maiskeimlingen (Karcher und Bock, 2002). Weiterhin sind in den plastidären Genen Gruppe II Introns vorhanden: Eines in dem *ndhB* Gen und zwei in dem *ycf3* Gen (Untergruppe der IIb Introns, Klassifizierung nach Michel et al., 1989).

Um eine Transkription der plastidären Sequenzen in den pflanzlichen Mitochondrien zu gewährleisten, wurden diese mit mitochondrialen Promotor- und Terminatorbereichen kloniert. Die kodierenden Bereiche mit Introns beider Gene wur-

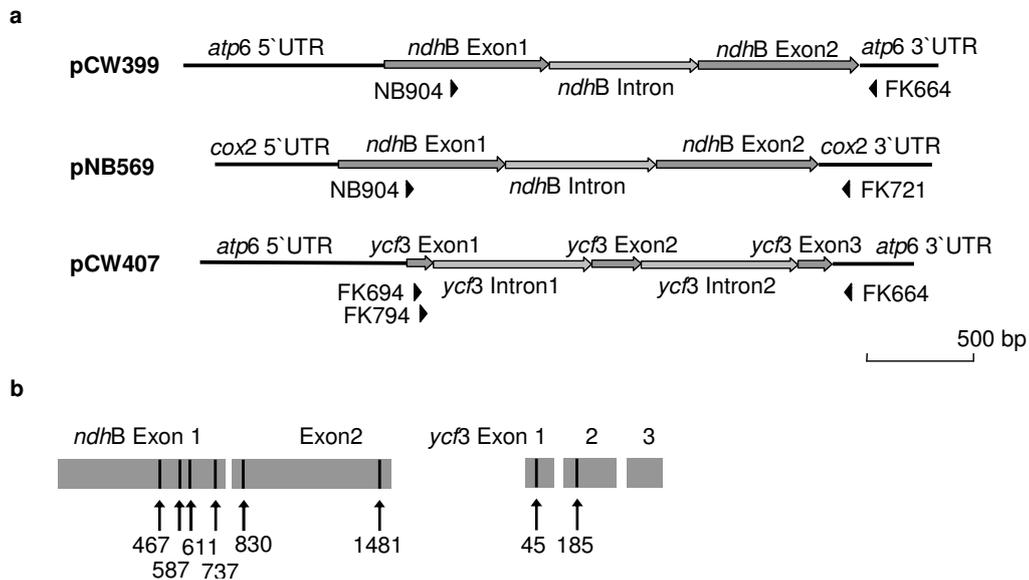


Abbildung 3.7: Verwendete Konstrukte für *in organello* Analysen der RNA-Edierung von plastidären Sequenzen

a Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des *Z. mays ndhB* mit Intron in den Plasmiden pCW399 und pNB569 und der kodierenden Sequenz des *Z. mays ycf3* mit Introns in pCW407. Die untranslatierten Regionen der Plasmide pCW399 und pCW407 stammen aus dem *Z. mays atp6* Gen, die des Plasmides pNB569 aus dem *A. thaliana cox2* Gen. Die Lokalisation der zur spezifischen Amplifikation von cDNA verwendeten Oligonukleotide sind mit Dreiecken eingezeichnet. **b** Schematische Darstellung der Exonsequenzen der *Z. mays ndhB* und *ycf3* Gene mit der durch schwarze Linien eingezeichneten Lage der Edierungspositionen. Die Positionsangaben der Edierungspositionen beziehen sich auf die Position im offenen Leserahmen.

den hierfür in einer früheren Arbeit mit den 5' und 3' untranslatierten Bereichen des *Z. mays atp6* Gens fusioniert (Wehling, 2004). Diese in den Plasmiden pCW399 und pCW407 vorliegenden chimären Gene sind in Abb. 3.7a dargestellt (Plasmidkarten siehe Anhang). Im Plasmid pCW407 ist die kodierende Region des *ycf3* Gens im 3' Bereich um 116 bp verkürzt enthalten und durch die entsprechende Region des *Z. mays atp6* Gens ersetzt.

Um einen potentiellen Einfluss der nicht-kodierenden Bereiche auf die RNA-Edierung und auf das Spleißen zu analysieren wurde im Rahmen dieser Arbeit die kodierende Sequenz mit Intron des *Z. mays ndhB* Gens zusätzlich mit den 5' und 3' untranslatierten Bereichen des *A. thaliana cox2* Gens kloniert. Hierfür wurde die kodierende *ndhB* Sequenz mit Intron aus dem Plasmid pCW396 (Wehling, 2004) durch eine Hydrolyse mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen entnommen und zwischen den im Plasmid pMS413 (Staudinger, 2004) enthaltenen Promotor-

und Terminatorbereich des *A. thaliana cox2* kloniert. Das so entstandene chimäre Gen im Plasmid pNB569 ist in Abb. 3.7a dargestellt (Plasmidkarte siehe Anhang).

In Abb. 3.7b sind die insgesamt jeweils 1533 bp und 513 bp großen Exonbereiche des *ndhB* und des *ycf3* Gens aus *Z. mays* mit den Lokalisationen der darin enthaltenen RNA-Edierungspositionen schematisch dargestellt. Die Intronbereiche des *ndhB* und *ycf3* Gens sind jeweils 704 bp und 1467 bp groß.

Für die Analyse der Prozessierung der plastidären Transkripte wurden die etablierten *in organello* Systeme mit Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl verwendet. Um die Aktivität der hier verwendeten Mitochondrien zu analysieren, wurde die Prozessierung der *cox2* Transkripte aus *A. thaliana* und *Z. mays* in den heterologen Mais- und Blumenkohl-Mitochondrien untersucht. Durch den Nachweis von vollständig gespleißten (siehe Abb. 3.8a) und edierten (nicht gezeigt) *cox2* Transkripten wurde die Prozessierungsaktivität der verwendeten Mitochondrien gezeigt.

Die Plasmide pCW399, pNB569 und pCW407 wurden durch Elektroporation in die Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl eingebracht. Die aus den Mitochondrien nach der *in organello* Inkubation isolierte RNA wurde vollständig von DNA-Rückständen befreit (siehe Abb. 3.8c: exemplarisch für drei Proben gezeigt). Die zur Amplifikation der chimären Sequenzen in der PCR und in der anschließenden RT-PCR verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind in Abb. 3.7a eingezeichnet. Da in mitochondrialen Genomen auch Sequenzen plastidären Ursprungs vorhanden sein können, wie es z.B. für das *ndhB* Gen in *Z. mays* bekannt ist (Stern und Lonsdale, 1982; Clifton et al., 2004), wurde eine spezifische Amplifikation der chimären Sequenzen nachgewiesen. Hierfür wurden RT-PCRs mit RNAs aus unbehandelten Blumenkohl- und Mais-Mitochondrien durchgeführt. Wie in Abb. 3.8b gezeigt ist, wurden mit den Oligonukleotiden keine unspezifischen Produkte amplifiziert. Das Ergebnis der RT-PCR mit der RNA aus den transformierten Mitochondrien ist in Abb. 3.8d dargestellt. Für alle drei Konstrukte wurden Amplifikate erhalten, die den erwarteten Größen für ungespleißte Transkripte von 1884 bp bei pCW399, 2000 bp bei pNB569 und 1902 bp, bzw. 1878 bp bei pCW407 in Mais- bzw. Blumenkohl-Mitochondrien entsprachen. Eine anschließende Sequenzierung der cDNAs bestätigte eine spezifische Amplifikation der chimären Transkripte und zeigte, dass diese tatsächlich noch die Intronsequenzen enthielten (nicht gezeigt). Wie in Abb. 3.9a und b exemplarisch gezeigt, ergab eine Analyse der RNA-Edierung, dass die plastidären *ndhB* und *ycf3* Transkripte an keiner der bekannten RNA-Edierungspositionen, sowie an keiner weiteren Position ediert vorlagen.

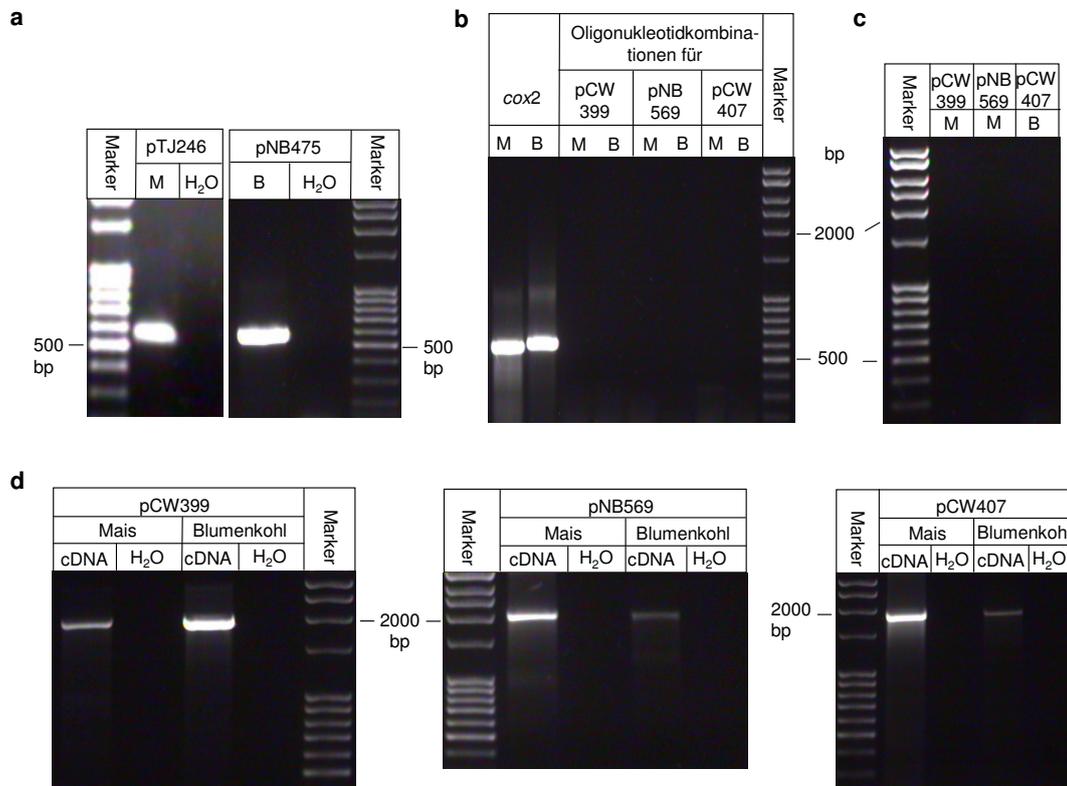


Abbildung 3.8: Analyse der RNA-Prozessierung von plastidären Sequenzen nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien

a Gelelektrophoretische Auftrennung von cDNA und entsprechenden H₂O-Kontrollen aus einer RT-PCR von RNA aus Mais(M)- und Blumenkohl(B)-Mitochondrien elektroporiert mit den Plasmiden pTJ246 und pNB475. Hierbei handelt es sich um eine Aktivitätskontrolle der in **d** verwendeten Mitochondrien. **b** Spezifitätstest der verwendeten Oligonukleotidkombinationen mit RNA aus untransformierten Mitochondrien und Integritätstest der verwendeten RNAs durch Amplifikation eines Fragmentes aus dem jeweiligen endogenen *cox2* Transkript mit den Oligonukleotidkombinationen NB852/FK789 für Mais-RNA und FK638/FK357 für Blumenkohl-RNA. **c** Mit der RNA aus den transformierten Mitochondrien wurde eine DNaseI-Behandlung durchgeführt und anschließend mittels einer PCR mit den entsprechenden spezifischen Oligonukleotidkombinationen (siehe 3.7a) auf DNA-Kontaminationen getestet. In keiner der PCRs konnten hierbei DNA-Kontaminationen nachgewiesen werden. Hier ist exemplarisch für drei PCR-Proben die Gelelektrophorese gezeigt. **d** Die Plasmide pCW399, pNB569 und pCW407 wurden durch Elektroporation in Mitochondrien aus *Z. mays* und *B. oleracea var. botrytis* eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden NB904 und FK664 bzw. FK721 bei Elektroporation mit pCW399 bzw. pNB569, und FK694 bzw. FK794 und FK664 bei Elektroporation von Mais-Mitochondrien bzw. Blumenkohl-Mitochondrien mit pCW407, durchgeführt. Hier zu sehen ist die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNAs und der H₂O-Kontrollen der RT-PCRs. Bei Verwendung aller drei plastidären Konstrukte konnten nur cDNA-Fragmente amplifiziert werden, die der Größe von ungespleißten Transkripten entsprachen.

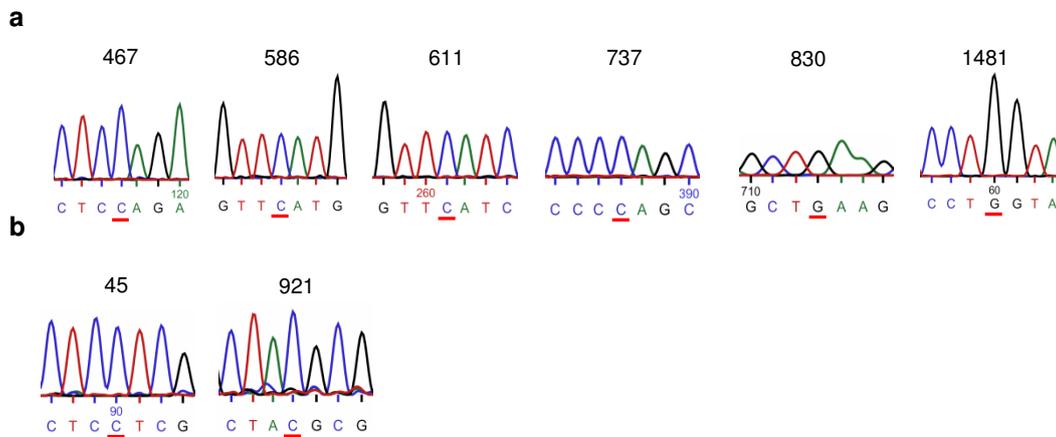


Abbildung 3.9: Analyse der Edierung von plastidären Transkripten nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl

Sequenzierung der *Z. mays ndhB* und *ycf3* cDNA Fragmente aus der Transformation von pCW399, pNB569 und pCW407 in Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl. Hier sind exemplarisch die Ausschnitte des Chromatogramms von (a) den sechs RNA-Edierungspositionen des *ndhB* Transkriptes aus pCW399 nach Transformation in Mitochondrien aus Mais (bei Positionen 830 und 1484 sind Sequenzierungen der revers komplementären Sequenz gezeigt) und (b) den zwei RNA-Edierungspositionen des *ycf3* Transkriptes aus Transformation von pCW407 in Mitochondrien aus Blumenkohl gezeigt. Im Falle der *ycf3* cDNA erfolgte eine Klonierung der Fragmente vor der Sequenzierung. Alle RNA-Edierungspositionen lagen hierbei unediert vor. In den Ausschnitten der Chromatogramme sind die RNA-Edierungspositionen rot unterstrichen und die entsprechenden Positionen im offenen Leserahmen sind angegeben.

3.5.1 Analyse der *in organello* RNA-Edierung des *ndhB* Transkriptes ohne Intron

Um auszuschließen, dass durch die Anwesenheit der Introns in den ungespleißten plastidären Transkripten die Interaktion mit der RNA-Edierungsmaschinerie und damit die Erkennung der RNA-Edierungspositionen in den Mitochondrien beeinträchtigt wird, wurde zusätzlich ein Plasmid mit der *Z. mays ndhB* Sequenz ohne Intron erzeugt. Dieses Plasmid basiert auf dem Plasmid pNB569, das die kodierende *ndhB* Sequenz mit Intron und die 5' und 3' untranslatierten Bereiche des *A. thaliana cox2* Gens trägt. In einer PCR mit den Oligonukleotiden NB923 und NB924 wurde das gesamte Plasmid pNB569 mit Ausnahme des *ndhB* Introns amplifiziert. Das Amplifikat wurde ligiert und das entstandene Plasmid pHS587 genannt (siehe Abb. 3.10a und Anhang).

Das Plasmid pHS587 wurde durch Elektroporation in Mitochondrien aus Mais eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondri-

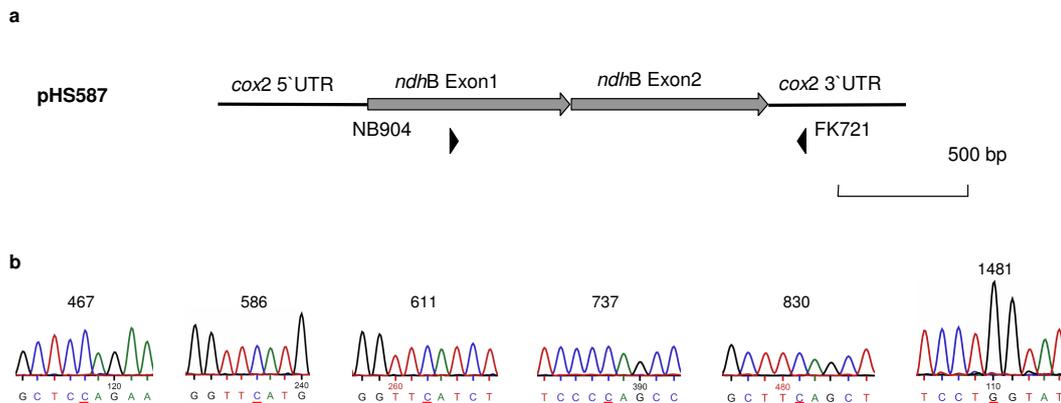


Abbildung 3.10: Analyse der RNA-Edierung des *Z. mays ndhB* Transkriptes ohne Intron nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus Mais

a Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des *Z. mays ndhB* Gens ohne Intron mit den 5' und 3' untranslatierten Regionen aus *A. thaliana cox2* im Plasmid pHS587. Die Lokalisation der zur spezifischen Amplifikation von cDNA verwendeten Oligonukleotide ist mit Dreiecken eingezeichnet. Das Plasmid pHS587 wurde durch Elektroporation in Mitochondrien aus *Z. mays* eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden NB904/FK721 durchgeführt. Die erwartete Größe des cDNA-Fragmentes entsprach 1296 bp. Das erhaltene cDNA Fragment (nicht gezeigt) wurde sequenziert (**b**) (bei Position 1481 Sequenzierung der revers komplementären Sequenz). Es konnte gezeigt werden, dass keine der RNA-Edierungspositionen ediert vorlag. In den Ausschnitten der Chromatogramme sind die RNA-Edierungspositionen rot unterstrichen und die entsprechenden Position im offenen Leserahmen sind angegeben.

en isoliert und nach der vollständigen DNA-Entfernung (nicht gezeigt) die RT-PCR durchgeführt. Das hierbei amplifizierte cDNA-Fragment von ca. 1300 bp stimmte mit der erwarteten Größe überein (nicht gezeigt). Mittels einer Sequenzierung der cDNA wurde die Identität des Transkriptes von pHS587 bestätigt. In Abb. 3.10b sind die Ausschnitte der Chromatogramme mit den sechs *ndhB* RNA-Edierungspositionen gezeigt. An keiner der bekannten RNA-Edierungspositionen und auch an keiner weiteren Position lag eine Edierung vor.

Da weiterhin die Möglichkeit besteht, dass die Transkripte in eine komplexe Prozessierungsmaschinerie eingebunden werden und somit die beiden Prozesse der RNA-Edierung und des Spleißens von Introns miteinander verbunden sind, wurde zusätzlich das Plasmid pHS588 hergestellt. Dieses Plasmid basiert ebenfalls auf dem Plasmid pNB569, allerdings wurde hier das *ndhB* Intron gegen das mitochondriale *cox2* Intron aus *Z. mays* ausgetauscht. Hierdurch sollte die Wahrscheinlichkeit des Spleißens der entsprechenden Transkripte in den Mitochondrien erhöht werden, um im Folgenden die RNA-Edierung des Transkriptes analysieren zu können. Das

Plasmid pHS588 wurde in der Diplomarbeit von Hinrichsen (2007) in Mais- und Blumenkohl-Mitochondrien transformiert, allerdings konnten in keinem Fall nach der *in organello* Inkubation Transkripte detektiert werden.

3.5.2 Vergleich von *Zea mays ndhB* Edierungspositionen mit mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus *Zea mays*

Die RNA-Edierungssysteme in Mitochondrien und Plastiden Höherer Pflanzen weisen viele Ähnlichkeiten auf (Maier et al., 1996; Tillich et al., 2006a). Eine dieser Ähnlichkeiten betrifft die Lokalisierung und die Größe der *cis*-Elemente von RNA-Edierungspositionen. Hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um einen Bereich von ca. -20 und +10 um die RNA-Edierungsposition herum, welcher essentiell für die Edierung der jeweiligen Position ist (Shikanai, 2006). Diese *cis*-Elemente werden als potentielle Bindestellen für *trans*-agierende Faktoren gehandelt, welche das Edierungsenzym an die jeweilige Position heranführen würden. In Maier et al. (1992) sind Sequenzähnlichkeiten zwischen den Edierungspositionen des *Z. mays ndhB* und *ndhA* Transkriptes und mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus *T. aestivum*, *Oenothera* und *P. x hybrida* beschrieben. Hierbei handelt es sich nicht nur um Edierungspositionen aus Transkripten der homologen Gene *ndhA* und *nad1* sowie *ndhB* und *nad2* sondern auch um Ähnlichkeiten zu Edierungspositionen anderer mitochondrialer Transkripte.

Wie in den vorherigen Abschnitten 3.5 und 3.5.1 gezeigt wurde, werden die plastidären *ycf3* und *ndhB* Transkripte aus *Z. mays* in pflanzlichen Mitochondrien weder gespleißt noch ediert, auch nicht in Mitochondrien des homologen Organismus *Z. mays*. Aus diesem Grund sollte im Folgenden ein Sequenzvergleich zwischen den sechs Edierungspositionen des *Z. mays ndhB* Transkriptes und den mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus *Z. mays* durchgeführt werden. Für *Z. mays* waren zum Zeitpunkt der Analyse (Juli 2007) in der Datenbank des NCBI insgesamt 271 Edierungspositionen in Transkripten von 16 mitochondrialen Genen angegeben (NCBI „accession no“: AY506529, AJ865075, AY973492, M16223.1, DQ645536, NC 008332, AY973491, AF273103). Es wurde ein Sequenzvergleich der potentiellen *cis*-Bereiche von 20 Nukleotiden stromaufwärts und zehn Nukleotiden stromabwärts der RNA-Edierungspositionen der mitochondrialen Transkripte mit dem entsprechenden Bereich von jeder einzelnen der sechs *ndhB* RNA-Edierungspositionen, durchgeführt.

In Abb. 3.11 sind Sequenzvergleiche gezeigt. Die im Folgenden angegebenen Nummerierungen der Edierungspositionen beziehen sich auf die Positionen relativ

<i>ndhB</i>	p586	CAAGCUCUUCUAUUCUGGUUC <u>CAUGGUUUUCUC</u>
<i>nad3</i>	p190	AUAUACGAUUUUUAUCUGGUUC <u>CUAUUUUAUU</u>
<i>nad3</i>	p137	GUCGGCCUACGAAUGUGGUUC <u>CGAUCCCUUC</u>
<i>nad5</i>	p1958	UUCUUGGGUAGAUUCUAGAU <u>CGUCUUUCAU</u>
<i>ndhB</i>	p611	<u>UUUCUCUUGGCUAUAUGGUUC</u> AUCUGGGGGG
<i>ndhB</i>	p586	CAAGCUCUUCUAUUCUGGUUC <u>CAUGGUUUUCUC</u>
<i>nad3</i>	p137	GUCGGCCUACGAAUGUGGUUC <u>CGAUCCCUCC</u>
<i>nad3</i>	p190	AUAUACGAUUUUUAUCUGGUUC <u>CUAUUUUAUU</u>
<i>nad3</i>	p265	<u>UAUCUCUUAACAAGAUUGAU</u> CUGUUUUGGAUC
<i>nad5</i>	p1895	CUUUGCAAUGUUACUUGGUUC <u>CAACUCCAUUU</u>
<i>nad6</i>	p159	GACUUCUUCGCUAUGAUCUU <u>CCUAGUAGUUC</u>
<i>atp4</i>	p530	<u>UACAACUUUGGUAGAAGCUU</u> CUACCGUAGAA
<i>cox2</i>	p77	GGAACCAUGGCAAUUAGGAU <u>CUCAAGACGCA</u>
<i>ndhB</i>	p830	<u>UACUUCGAAAGUAGCUGCUUC</u> AGCUUUAGCC
<i>nad3</i>	p344	<u>UGAAUGGAAAAGGGGUGCUUC</u> GGAUUGGGAG
<i>nad3</i>	p190	AUAUACGAUUUUUAUCUGGUUC <u>CUAUUUUAUU</u>
<i>nad5</i>	p1589	<u>GUUUAGUACUUUAGGUGCUUC</u> UCUAGCGUAU
<i>cox2</i>	p467	<u>UACGAUUC</u> CAGAGAUGAUUCAGAAUUGGU

Abbildung 3.11: Sequenzvergleich zwischen RNA-Edierungspositionen des *ndhB* Transkriptes und mitochondrialer Transkripte aus *Z. mays*

Die RNA-Edierungspositionen des *ndhB* Transkriptes aus Mais wurden von Maier et al. (1992) zuerst beschrieben und die hier gezeigten mitochondrialen RNA-Edierungspositionen stammen aus dem NCBI-Eintrag mit der „accession no.“ AY506529. Insgesamt wurden Sequenzvergleiche mit allen (Zeitpunkt der Recherche: Juli 2007) 271 in der Datenbank des NCBI eingetragenen mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus Mais durchgeführt. Die Sequenzen mit den meisten Übereinstimmungen mit *ndhB* RNA-Edierungspositionen in den Bereichen -20/+10 (relativ zur Edierungsposition) werden hier gezeigt. Die RNA-Edierungspositionen sind fett dargestellt und die zur *ndhB* Sequenz identischen Nukleotide sind grau unterlegt. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Position im offenen Leserahmen der jeweiligen Transkripte. In einigen Fällen wurden im Bereich -20/+10 vorhandene RNA-Edierungspositionen für eine bessere Übereinstimmung von C nach U verändert. Diese Positionen sind unterstrichen.

zum Start-Kodon (ohne Intronsequenz). Für insgesamt drei Edierungspositionen des *Z. mays ndhB* Transkriptes wurden Sequenzähnlichkeiten mit Edierungspositionen mitochondrialer Transkripte aus *Z. mays* identifiziert. In dem Sequenzvergleich der *ndhB* Edierungsposition 611 ist auch die *ndhB* Position 586 enthalten, da diese beiden wie schon in Maier et al. (1992) beschrieben, im Bereich von +5 bis -2 relativ zur Edierungsposition identische Nukleotide aufweisen. Die *ndhB* Edierungsposition 611 weist außerdem Sequenzähnlichkeiten zu mitochondrialen Edierungspositionen aus *nad3*, *nad5*, *nad6*, *atp4* und *cox2* Transkripten aus *Z. mays* auf. Die potentiellen *cis*-Sequenzen der beiden *nad3* Edierungspositionen 137 und 190 und

der *ndhB* Edierungsposition 611 sind im Bereich bis -5 und von -7 bis -8, bzw. von -7 bis -9 übereinstimmend. Im Vergleich mit den weiteren dargestellten mitochondrialen Edierungspositionen sind Blöcke aus bis zu sechs identischen Nukleotiden in verschiedenen Bereichen der potentiellen *cis*-Sequenzen vorhanden.

Für die Edierungsposition 568 des *ndhB* Transkriptes sind außer zu den beiden genannten Edierungspositionen des *nad3* Transkriptes (bei Position 137 und 190) Sequenzähnlichkeiten zu der Edierungsposition 1958 des *nad5* Transkriptes aufgezeigt. Weiterhin weist die *ndhB* Edierungsposition 830 Sequenzähnlichkeiten, in Form von mehreren identischen Blöcken von bis zu fünf Nukleotiden, mit Edierungspositionen aus *nad3*, *nad5* und *cox2* auf. In den meisten Fällen liegen die identischen Nukleotide direkt stromaufwärts der Edierungspositionen. Für das dem *ndhB* homologen mitochondrialen Gen *nad2* aus *Z. mays* liegen in der Datenbank des NCBI keine Informationen über RNA-Edierungspositionen vor, so dass der Sequenzvergleich mit *nad2* RNA-Edierungspositionen hier fehlt.

Die in den Abschnitten 3.5, 3.5.1 und 3.5.2 vorgestellten Ergebnisse wurden in Bolle et al. (2007) publiziert.

3.6 Isolierung und Identifizierung von mitochondrialen Proteinen die an RNA-Fragmente mit Edierungspositionen binden

3.6.1 Verwendete Proteinextrakte und RNA-Fragmente

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Proteine mit einer Beteiligung an der RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen isoliert und identifiziert werden. Hierfür sollten mitochondriale Proteine mit spezifischer Bindung an RNA-Fragmente mit RNA-Edierungspositionen analysiert werden. Um mitochondriale Proteinextrakte mit Edierungsaktivität zu erhalten, wurden isolierte Mitochondrien aus *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana* verwendet, die wie im Abschnitt 3.2 gezeigt eine Edierungsaktivität aufweisen. Die anschließende Isolierung des Proteinextraktes aus den Mitochondrien erfolgte in Anlehnung an das Protokoll aus Takenaka und Brennicke (2007). Die dort beschriebene Methode zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Mitochondrien wird für *in vitro* Analysen angewendet, in denen die RNA-Edierung von mitochondrialen Transkripten untersucht wird.

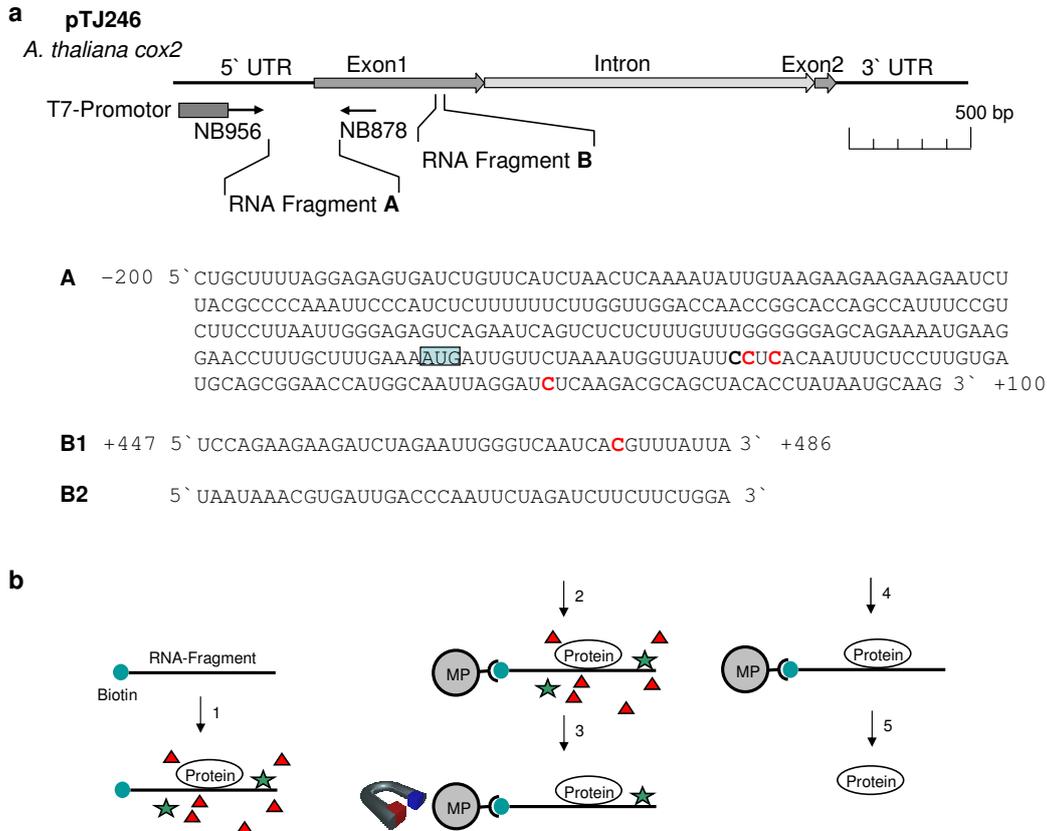


Abbildung 3.12: Isolierung von RNA-bindenden Proteinen: Verwendete RNA-Fragmente und Methode

a Schematische Abbildung des *A. thaliana cox2* Gens im Vektor pTJ246 und der Lokalisation der von der DNA-Sequenz abgeleiteten RNA Fragmente. Unter Verwendung der Oligonukleotide NB956 und NB878 wurde ein 321 bp großes PCR-Produkt erzeugt. Das Oligonukleotid NB 956 enthält zusätzlich zu der spezifischen *cox2*-Sequenz am 5' Ende die T7-Promotorsequenz, so dass von dem PCR-Fragment ausgehend eine *in vitro* Transkription durchgeführt werden konnte und das entsprechende RNA-Fragment erhalten wurde (A). Die RNA weist interne Biotin-16-UTP Markierungen auf. Das Start-Kodon des *cox2*-Transkriptes ist blau unterlegt und die Positionsangaben sind in Relation dazu angegeben. B1, B2: Von der Firma biomers.net synthetisch hergestellte 40 Nukleotid große RNA-Fragmente mit 5' Biotin Markierung. B1: Mit Edierungsposition. B2: Zu RNA-Fragment „B1“ revers komplementäres RNA-Fragment als Negativ-Kontrolle. RNA-Edierungspositionen sind in rot dargestellt. **b** Schematische Darstellung des Ablaufes der Isolierung von spezifisch an RNA-Fragmente mit Edierungspositionen bindenden Proteinen. Das dargestellte RNA-Fragment ist am 5' Ende mit Biotin markiert. Nach Zugabe des Proteinextraktes (1) findet die spezifische und unspezifische Bindung von Proteinen statt. Der Proteinextrakt mit unspezifisch bindenden Proteinen ist hier mit Sternen und Dreiecken dargestellt. Nach der Inkubation von RNA und Proteinen werden die Streptavidin-beschichteten Magnetpartikel (MP) zugegeben (2) und es findet eine Bindung des Biotins an das Streptavidin statt. Auf einem magnetischen Stand werden die Magnetpartikel mit daran bindenden RNA-Fragmenten von dem Überstand abgetrennt (3). Anschließend finden Waschschritte statt (4) um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die RNA-bindenden Proteine werden anschließend mit SDS-Elutionspuffer eluiert (5).

Als Ziel-RNAs wurden zwei Fragmente aus dem *cox2* Transkript aus *A. thaliana* ausgewählt. Die Lage der ausgewählten Fragmente in der *cox2* Sequenz ist in Abb. 3.12a dargestellt. Das Fragment „A“ beinhaltet 200 Nukleotide der 5′ untranslatierten Region, sowie die ersten 100 Nukleotide der kodierenden Region. In dem kodierenden Bereich liegen die RNA-Edierungspositionen 3, 4 und 5 vor (Numerierung entsprechend Tabelle 3.1). Die Position 3 wurde im Mais *in organello* System und im endogenen Transkript aus Blumenkohl partiell und die Positionen 4 und 5 vollständig ediert (siehe Tabelle 3.1). Dieses Fragment wurde ausgewählt, weil in früheren Arbeiten (Staudinger et al., 2005) gezeigt wurde, dass nicht nur in der direkten Sequenzumgebung der Edierungspositionen sondern auch in der 5′ untranslatierten Region und im 5′ Bereich der kodierenden Region für die Edierung des Transkriptes wichtige Bereiche liegen können.

Das RNA-Fragment „A“ wurde mittels einer *in vitro* Transkription hergestellt. Hierfür wurde zunächst mit den Oligonukleotiden NB956 und NB878 und dem im Plasmid pTJ246 enthaltenen *A. thaliana cox2* Gen eine PCR durchgeführt, um das entsprechende Fragment von 300 bp zu amplifizieren (nicht gezeigt). Da das Oligonukleotid NB956 am 5′ Ende die T7-Promotorsequenz enthält konnte in der *in vitro* Transkription das PCR-Fragment als Matrize dienen. Da im Folgenden die Isolierung der RNA-Fragmente und der daran bindenden Proteine mittels Streptavidin-beschichteter Magnetpartikel durchgeführt werden sollte (siehe Abb. 3.12b), wurde das 300 Nukleotid-Fragment durch die Verwendung von Biotin-16-UTP in der *in vitro* Transkription intern mit Biotin markiert. Zur Entfernung der DNA-Matrize wurde die *in vitro* Transkriptionsreaktion mit DNase I behandelt. Die Vollständigkeit des DNA-Abbaus wurde mittels einer PCR nachgewiesen (nicht gezeigt). Die korrekte Größe des *in vitro* Transkriptes wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel überprüft (nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu dem Fragment „A“ beinhaltet das Fragment „B1“ nur die RNA-Edierungsposition 17 sowie deren potentielle *cis*-Sequenz von 29 Nukleotiden stromaufwärts und zehn Nukleotiden stromabwärts. Mittels *in vitro* und *in organello* Analysen wurden entsprechende Sequenzen die essentiell für die Edierung der analysierten Positionen waren, in einem Bereich von ca. 20 Nukleotiden stromaufwärts und einigen Nukleotiden stromabwärts, identifiziert (Übersichtsartikel siehe: Shikanai, 2006). Die im Fragment „B1“ enthaltene RNA-Edierungsposition 17 wurde im Mais *in organello* System und in den endogenen *cox2* Transkripten aus Blumenkohl vollständig ediert (siehe Tabelle 3.1).

Das RNA-Fragment „B1“ wurde von der Firma biomers.net (Ulm) synthetisiert. Auch dieses Fragment wurde für die anschließende Isolierung der RNA und

der daran bindenden Proteine mit Biotin markiert, allerdings erfolgte hier eine Markierung des 5' Endes. Um in den folgenden Analysen der isolierten Proteine unspezifisch bindende Proteine von den spezifischen unterscheiden zu können, wurde zusätzlich das RNA-Fragment „B2“ synthetisiert, welches revers komplementär zu dem Fragment „B1“ ist. Das Fragment „B2“ war ebenfalls am 5' Ende Biotin-markiert und diente im Folgenden als Negativ-Kontrolle.

3.6.2 Optimierung der Methode zur Isolierung von RNA-bindenden Proteinen

Die Bindung der Proteine an die RNA-Fragmente erfolgte in einem Puffer, der auch für *in vitro* Analysen der RNA-Edierung genutzt wird (Takenaka und Brennicke, 2007) und somit eine Bindung der entsprechenden Proteine an die RNA-Substrate erlaubt (für Zusammensetzung des Puffers siehe Abschnitt 2.2.9). Zunächst wurde das RNA-Fragment „B1“ sowie das RNA-Fragment „B2“ (siehe Abschnitt 3.6.1 und Abb. 3.12a) mit einem mitochondrialen Proteinextrakt aus Blumenkohl inkubiert. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an die RNA-Fragmente zu reduzieren, wurden vor Zugabe der Biotin-markierten RNA-Fragmente 200 µg/ml Hefe-RNA zu dem Proteinextrakt zugegeben. Nach der Inkubation von RNA und Proteinen wurden die Biotin-markierten RNA-Proteinkomplexe anschließend unter Ausnutzung der Affinität des Biotins für Streptavidin mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln isoliert. Nach zwei Waschschrritten wurden die Magnetpartikel mit daran haftenden RNA-Proteinkomplexen mit einem SDS-haltigen Puffer mehrere Minuten gekocht und hierdurch die Proteine von der RNA eluiert. Die isolierten Proteine wurden anschließend auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Abb. 3.13 ist zu erkennen, dass sowohl mit dem RNA-Fragment „B1“, als auch mit dem RNA-Fragment „B2“ eine Reihe von Proteinen verschiedener Größe isoliert worden sind. Allerdings liegt kein erkennbarer Unterschied in dem Vorkommen von Proteinbanden zwischen den beiden Proben vor. Bei der spezifischen Bindung eines Proteins hätte dieses nur in der Spur 1 mit dem RNA-Fragment „B1“ zu sehen sein dürfen.

Um die Anzahl der unspezifisch bindenden Proteine zu reduzieren, wurden im Folgenden eine Reihe von Änderungen im Protokoll vorgenommen. Da Biotin für eine Vielzahl der mitochondrialen Enzyme die prosthetische Gruppe ist, liegen diese Proteine *in vivo* biotinyliert vor und binden ebenfalls an die Streptavidin-beschichteten Magnetpartikel. Zur Verringerung dieser Bindungen wurden in den folgenden Analysen Proteinextrakte verwendet, welche vor der Inkubation mit der

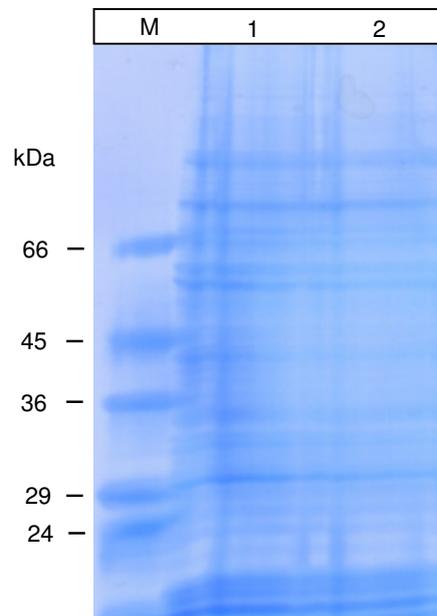


Abbildung 3.13: Bindung von mitochondrialen Proteinen an das 40 Nukleotid-RNA-Fragment

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von mitochondrialen Proteinen mit Bindeaffinität an das 40 Nukleotid große *cox2*-RNA-Fragment „B1“ (1) bzw. an das Kontroll-RNA-Fragment „B2“ (2). Es wurden mitochondriale Proteine aus *B. oleracea* var. *botrytis* verwendet. Das 10%ige Polyacrylamid-Gele wurde mit Coomassie gefärbt um die Proteinbanden sichtbar zu machen. In den Spuren 1 und 2 ist kein Unterschied im Bandenmuster zu erkennen. M= Größenmarker.

RNA zweimal mit Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln inkubiert wurden. Des Weiteren wurde der Proteinextrakt vor Zugabe der Biotin-markierten RNA mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Hefe-RNA versetzt und mit dieser für 15 Minuten inkubiert. Die Biotin-markierte RNA wurde außerdem einer Inkubation für drei Minuten bei 65°C und anschließend für zehn Minuten bei 37°C unterzogen um die Bildung der korrekten Sekundärstruktur zu initiieren. Außerdem wurde die Anzahl der Waschschrte von den Magnetpartikeln und den daran haftenden RNA-Proteinkomplexen von zwei auf sechs erhöht. Für eine gleichzeitig schonendere und effizientere Elution wurde zunächst für 20 Minuten bei 60°C mit dem SDS-Elutionspuffer inkubiert, der Puffer dann abgenommen und die Magnetpartikel für zwei Minuten mit SDS-Elutionspuffer in einem kochendem Wasserbad erhitzt. Die Eluate wurden vereinigt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit den vorgenommenen Änderungen im Protokoll wurde eine deutliche Verringerung der unspezifischen Bindungen an die RNA-Fragmente erreicht, so dass im Folgenden nach diesem Protokoll verfahren wurde. Die entsprechenden Abbildungen sind in den folgenden Ab-

schnitten gezeigt. Die hier dargestellte Optimierung des Protokolls erforderte die mehrfache Durchführung der aufwändigen Experimente zur Isolierung von RNA-bindenden Proteinen. Eine vereinfachte Darstellung der Methode ist in Abb. 3.12b zu sehen.

3.6.3 Keine spezifische Bindung von Proteinen an das 300 Nukleotid große RNA-Fragment

Um bei der Verwendung des RNA-Fragmentes „A“ als Ziel-RNA für die Isolierung spezifischer Proteine die spezifisch-bindenden Proteine von den unspezifisch an das Streptavidin auf den Magnetpartikeln bindenden unterscheiden zu können, wurde im Folgenden parallel ein Ansatz ohne Zusatz von Biotin-markierter RNA durch-

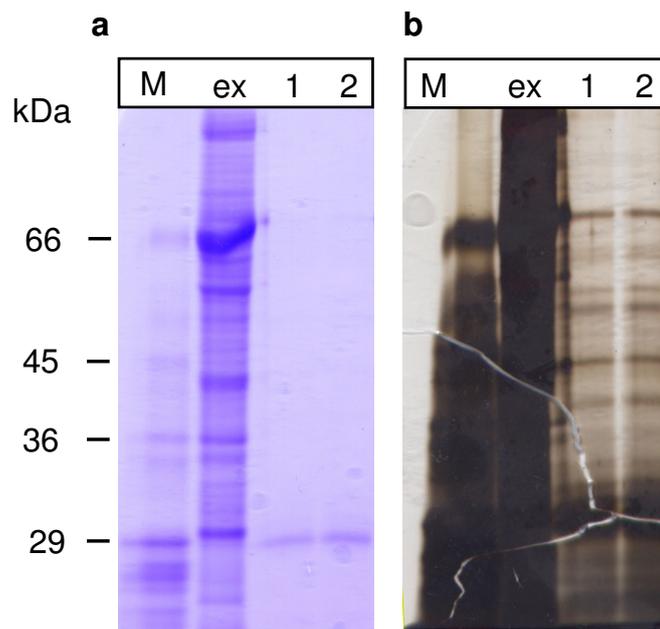


Abbildung 3.14: Bindung von mitochondrialen Proteinen an das 300 Nukleotid-RNA-Fragment

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eines 10%igen Gels von mitochondrialen Proteinen aus *B. oleracea* var. *botrytis* mit Bindeaffinität an das 300 Nukleotid große *cox2*-RNA-Fragment „A“ (1). In der Spur 2 ist die Kontrolle zu sehen, hier wurde keine Biotin-markierte RNA zu den mitochondrialen Proteinen zugegeben. ex= mitochondrialer Gesamtproteinextrakt; M= Größenmarker. In **a** ist eine Coomassie-Färbung des Gels zu sehen, anschließend wurde eine Silber-Färbung durchgeführt (**b**). Weder in dem Coomassie- noch in dem Silber-gefärbten Gel ist ein Unterschied im Bandenmuster zu erkennen.

geführt. Mittels des optimierten Protokolls (siehe vorherigen Abschnitt) wurden an das RNA-Fragment „A“ bindende Proteine aus einem mitochondrialen Proteinextrakt aus Blumenkohl isoliert. Die Auftrennung der Proteine auf einem Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel ist in Abb. 3.14a zu sehen. Auf dem Gel sind sowohl in der Spur des Ansatzes mit dem RNA-Fragment „A“ (Spur 1), als auch in der Spur des Kontroll-Ansatzes ohne Zugabe von Biotin-markierter RNA (Spur 2) nur jeweils 2 Banden zu erkennen, eine bei ca. 29 kDa, die andere etwas höher als die 66 kDa-Bande des Größenmarkers. Um auch in geringerer Konzentration vorliegende Proteine sichtbar zu machen wurde das Gel im Anschluss einer Silber-Färbung unterzogen (siehe Abb. 3.14b). Hier wurden zwar eine Reihe von zusätzlichen Proteinbanden sichtbar gemacht, allerdings konnte auch hier keine ausschließlich in der Spur 1 vorliegende Proteinbande detektiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass die hier isolierten Proteine unspezifisch an die mit Streptavidin beschichteten Magnetpartikel gebunden haben. Da keine spezifische Bindung von Proteinen erzielt wurde, wurden mit dem RNA-Fragment „A“ keine weiteren Experimente durchgeführt.

3.6.4 Isolierung von Proteinen verschiedener Größe mit Bindung an das RNA-Fragment von 40 Nukleotiden

Die Isolierung von spezifisch an das 40 Nukleotid große RNA-Fragment „B1“ bindenden Proteinen erfolgte zunächst unter Verwendung eines mitochondrialen Proteinextraktes aus *B. oleracea var. botrytis*. Zur Unterscheidung der spezifisch und der unspezifisch bindenden Proteine wurde parallel ein Kontroll-Ansatz mit dem RNA-Fragment „B2“ durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.1). Unter Anwendung des optimierten Protokolls (siehe Abschnitt 3.6.2) wurden die Proteine isoliert und auf dem in Abb. 3.15a dargestellten mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel aufgetrennt. Wie auch im Falle des RNA-Fragmentes „A“ wurden hier sowohl in dem Ansatz mit dem RNA-Fragment „B2“, als auch in dem Ansatz mit dem RNA-Fragment „B1“ ein Protein mit der Größe von ca. 29 kDa isoliert. Weiterhin wurden unter Verwendung des RNA-Fragmentes „B1“ drei Proteinbanden erhalten, welche in der Negativ-Kontrolle mit dem RNA-Fragment „B2“ nicht, oder nur sehr schwach nachweisbar sind. Es handelt sich hierbei um eine Bande höherer Intensität von ca. 66 kDa und zwei Banden geringerer Intensität, eine direkt unterhalb von 66 kDa und eine etwas unterhalb von 36 kDa. Die drei Banden sind in Abb. 3.15a mit roten Pfeilen markiert.

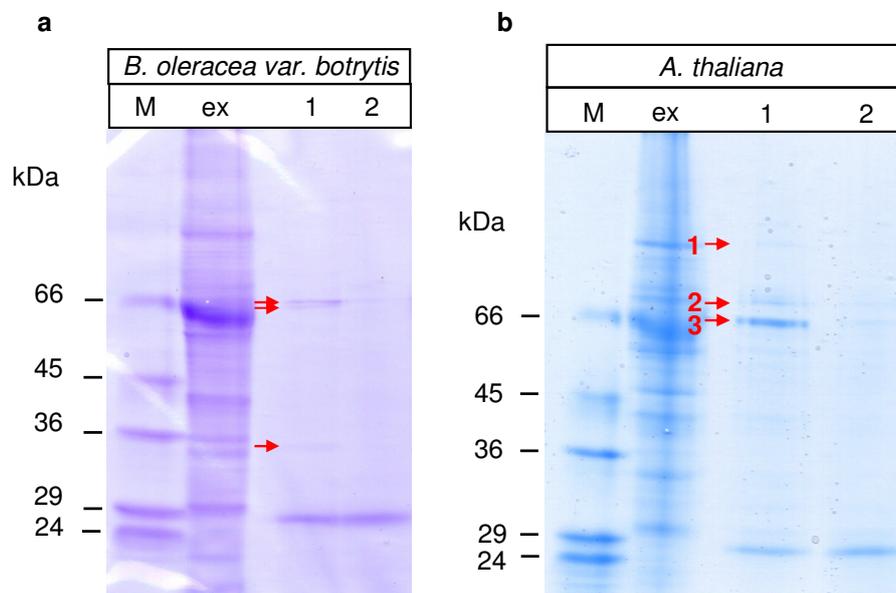


Abbildung 3.15: Spezifische Bindung von mitochondrialen Proteinen an das 40 Nukleotid-RNA-Fragment

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von mitochondrialen Proteinen aus (a) *B. oleracea var. botrytis* und (b) *A. thaliana* Zellkulturen mit Bindeaffinität an das 40 Nukleotid große *cox2*-RNA-Fragment „B1“ (1) und an das RNA-Fragment „B2“ (2). Es handelt sich um 10%ige Gele, welche mit Coomassie gefärbt wurden. Sowohl bei der Verwendung von mitochondrialen Proteinen aus *B. oleracea var. botrytis* als auch aus *A. thaliana* wurden Proteine mit spezifischer Bindung an das *cox2*-RNA-Fragment mit Edierungsposition 17 angereichert. In der Spur 1 ist jeweils auf der Höhe von ca. 66 kDa eine stärkere Bande zu erkennen. Des Weiteren sind spezifische Proteine in geringerer Konzentration in der Spur 1 in a und b zu sehen. Die spezifischen oder zumindest stark angereicherten Proteine sind mit roten Pfeilen markiert und in b nummeriert. ex= verwendeter mitochondrialer Gesamtproteinextrakt. M= Größenmarker.

3.6.5 Identifizierung der spezifischen Proteine

Die Identifizierung der spezifisch an das RNA-Fragment „B1“ bindenden Proteine sollte mittels einer MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrischen Analyse erfolgen. Bei der „Matrix-assisted-laser-desorption-ionisation“ (MALDI) werden durch eine vorherige Spaltung des Proteins mit Trypsin Peptide erzeugt, die in UV-absorbierende, saure Matrixkristalle eingelagert und dadurch ionisiert werden. Durch Bestrahlung mit einem UV-Laserimpuls werden die Peptidionen freigesetzt und gehen in die Gasphase über. In einem elektrischen Feld werden die Ionen anschließend beschleunigt und treten durch einen Schlitz in den Analysator ein. Da durch das elektrische Feld auf alle Ionen die gleiche Energie übertragen wird, hängt die Ge-

schwindigkeit, mit der die Ionen durch das feldfreie Flugrohr fliegen (Flugzeitanalysator: TOF steht für „time of flight“) und den Detektor erreichen, von ihrem Masse/Ladungsverhältnis ab. Bei bekannter Ladung kann so das Molekulargewicht der Peptide ermittelt werden. Bei der hier angewendeten Tandem-Massenspektrometrie werden ausgewählte Peptidionen weiter fragmentiert und in einem zweitem TOF-Analysator wird das Molekulargewicht der Fragmente bestimmt, so dass der Informationsgehalt für die Proteinidentifikation zunimmt. Durch einen anschließenden Vergleich der erhaltenen Daten mit den in Datenbanken vorliegenden Proteinen mittels des Programms Mascot (Perkins et al., 1999) können dann die Proteine identifiziert werden.

Die Probenvorbereitung für die MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie (MS) ist in Abschnitt 2.2.13 beschrieben. Die anschließende massenspektrometrische Analyse erfolgte im Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und wurde von Dr. Cristoph Gelhaus durchgeführt.

Die MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrische Analyse der in Abb. 3.15a markierten Banden erbrachte aufgrund einer zu geringen Proteinkonzentration in den zwei Banden niedriger Intensität nur bei der Analyse der Bande von 66 kDa ein Ergebnis. Identifiziert wurde aber ein Protein aus *A. thaliana*, das in seinen physiochemischen Eigenschaften nicht zu der Bande passt und das soweit charakterisiert vorliegt, dass eine Funktion in den Mitochondrien und bei der RNA-Edierung als sehr unwahrscheinlich erscheint. Da die Identifizierung der Proteine durch einen Abgleich der erhaltenen Ergebnisse aus den MS/MS-Analysen mit den in den Datenbanken vorliegenden Proteinen abläuft, und für Blumenkohl kaum Sequenzinformationen vorliegen, ist davon auszugehen, dass das Protein der Bande nicht korrekt zugeordnet wurde.

In Abschnitt 3.2.2 wurde gezeigt, dass Mitochondrien aus *A. thaliana* Zellkulturen aktiv sind und RNA edieren. Aus diesem Grund wurde das Experiment unter Verwendung eines mitochondrialen Proteinextraktes aus *A. thaliana* Zellkulturen wiederholt. Da das Genom von *A. thaliana* vollständig sequenziert vorliegt (genome initiative, 2000), sollte eine Identifizierung der spezifisch bindenden Proteine in einer MS/MS-Analyse zu erreichen sein. In Abb. 3.15b sind die durch Bindung an das 40 Nukleotid RNA-Fragment isolierten Proteine dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anreicherung des spezifisch bindenden Proteins von ca. 66 kDa (Pfeil 3) bei Verwendung von mitochondrialen Proteinen aus *A. thaliana* reproduziert werden konnte. Auch die sowohl in der Spur 1 als auch in der Spur 2 vorliegende Bande von ca. 29 kDa ist hier zu erkennen. Des Weiteren wurden spezifische Proteine geringerer Konzentration erhalten, die in der Abb. 3.15b mit 1 und 2 nummeriert sind.

```

1 MFALSKVLRR TQRLRLGACS AVFSKDIQLG GERSFDSNSI ASTKREAVPR
51 FYEISSLSNR ALSSSAGTKS DQEDDLEDG FSELEGSKSG QGSTSSDEDE
101 GKLSADEEEE EELDLIETDV SRKTVEKKQS ELFKTIVSAP GLSIGSALDK
151 WVEEGNEITR VEIAKAMLQL RRRRMYGRAL QMSEWLEANK KIEMTERDYA
201 SRLDLTVKIR GLEKGEACMQ KIPKSFKGEV LYRTLLANCV AAGNVKKSEL
251 VFNKMKDLGF PLSGFTCDQM LLLHKRIDRK KIADVLLLME KENIKPSLLT
301 YKILIDVKG A TNDISGMEQI LETMKDEGVE LDFQTQALTA RHYSGAGLKD
351 KAEKVLKEME GESLEANRRA FKDLLSIYAS LGREDEVKRI WKICESKPYF
401 EESLAAIQAF GKLNKVQEA E AIFEKIVKMD RRASSSTYSV LLRVYVDHKM
451 LSKGKDLVKA MAESGCRIEA TTWDALIKLY VEAGEVEKAD SLLDKASKQS
501 HTKIMMNSFM YIMDEYSKRG DVHNTEKIFL KMREAGYTSR LRQFQALMQA
551 YINAKSPAYG MRDRLKADNI FPNKSMAAOL AOGDPFKKTA TSDILD

```

Abbildung 3.16: In MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie identifizierte Peptide des PPR-Proteins At1g80270.1

Hier dargestellt ist die Aminosäuresequenz des PPR-Proteins At1g80270.1 mit insgesamt 596 Aminosäuren. Die den MS-Spektren zugeordneten Peptide sind mit roten Buchstaben dargestellt, wobei mit diesen eine Aminosäuresequenzabdeckung von 25% erreicht wird. Die PPR-Domänen des Proteins sind blau umrandet.

Im Folgenden sollten die drei spezifisch an die Edierungsposition 17 des *A. thaliana* *cox2* Transkriptes bindenden Proteine identifiziert werden.

Das Protein der Bande 2 (siehe Abb. 3.15b) konnte eindeutig als Rinderserum-Albumin mit einem Molekulargewicht von 66,2 kDa identifiziert werden. Rinderserum-Albumin ist ein essentieller Bestandteil des für die Mitochondrien-Isolierung verwendeten Puffer A. Daher musste damit gerechnet werden, dass auch im Proteinolat Rinderserum-Albumin vorhanden ist. Das Protein der Bande 1 konnte in der MS/MS-Analyse nicht identifiziert werden.

Für die Bande 3 mit ca. 66 kDa wurde nach der MS/MS-Analyse eine Suche in der Datenbank des NCBI mittels des Programms Mascot durchgeführt. Die Suche in der Datenbank wurde auf die unter „viridiplantae“ zu findenden Einträge beschränkt, und führte zu dem *A. thaliana* Protein At1g80270.1, welchem ein Mascot-score von 63 zugewiesen wurde. Bei einem Score von 68 wäre das gewünschte Signifikanzniveau von 0,05 erreicht worden. Der Score von 63 entspricht einem p-Wert von 0,18, d.h. mit ungefähr 18% Wahrscheinlichkeit ist das Ergebnis ein Zufallstreffer. Die den MS-Spektren zugeordneten Peptide sind in Abb. 3.16 in rot in die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins eingezeichnet. Es ergibt sich hieraus eine Aminosäuresequenzabdeckung von 25%. Bei dem Protein At1g80270.1 handelt es sich um ein kernkodierte Protein der „pentatricopeptide repeat“ (PPR)-Familie, welches sechs PPR-Domänen enthält, die in der Abb. 3.16 durch blaue

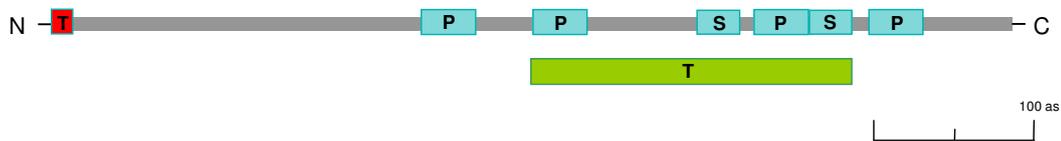


Abbildung 3.17: *A. thaliana* PPR-Protein At1g80270.1

Schematische Darstellung des PPR-Proteins At1g80270.1 aus *A. thaliana*. Eine MALDI-TOF/TOF-MS Analyse des in Abb. 3.15 in der Spur 1 vorhandenen spezifisch an das RNA-Fragment „B1“ bindenden Proteins bei ca. 66 kDa (Bande 3) und eines anschließenden Abgleichs der erhaltenen Daten mit in der NCBI Datenbank unter „viridiplantae“ vorliegenden Proteinen mittels Mascot ergab dieses PPR-Protein. Nach Lurin et al., 2004 enthält das Protein sechs PPR-Domänen (P), zwei davon sind sogenannte „PPR-like“ S Motive (S). Eingezeichnet ist außerdem eine TPR-ähnliche Domäne (T) (laut Superfamily-Datenbankeintrag: 48452) und die mittels des Programms „Mitoprot2“ ermittelte Transitsequenz, die nach Import des Proteins in die Mitochondrien abgespalten werden soll (S).

Umrandungen gekennzeichnet sind. Es wird deutlich, dass die durch MS-Spektren zugeordneten Peptide zum Teil innerhalb der PPR-Domänen liegen.

Das Protein At1g80270.1 wurde von Lurin et al. (2004) mit der Bezeichnung PPR 1 29782285 innerhalb der PPR-Proteinfamilie der P-Unterfamilie zugeordnet und enthält sechs PPR-Domänen, davon zwei sogenannte „PPR-like“ S Motive. Weiterhin wurde durch die Domänensuche „InterProScan“ (Zdobnov und Apweiler, 2001) auf der Internetseite des EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/) eine „tetratricopeptide repeat“ (TPR)-ähnliche Domäne identifiziert (Superfamily-Datenbankeintrag: 48452; Gough et al., 2001). TPR-Domänen liegen in Proteinen der TPR-Familie vor, welche hauptsächlich mit anderen Proteinen interagieren (Saha et al., 2007). Eine schematische Darstellung des Proteins und der Lokalisation der vorhandenen Domänen ist in Abb. 3.17 dargestellt.

Das At1g80270.1-Protein wurde von der „gene ontology“-Datenbank (Ashburner et al., 2000) als DNA-bindendes Protein annotiert. Diese Annotierung beruht nicht auf experimentellen Daten, sondern auf Vorhersagen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu DNA-bindenden Proteinen. Das kalkulierte Molekulargewicht des At1g80270.1-Proteins beträgt 67,382 kDa. Die in der „TAIR“-Datenbank (steht für „The Arabidopsis Information Resource“; zu finden auf: www.arabidopsis.org) vorhandenen Informationen weisen außerdem auf eine mitochondriale Lokalisierung des kernkodierten Proteins hin. Diese Informationen beruhen auf mehreren Programmen, welche subzelluläre Lokalisierungen von Proteinen vorhersagen. Hierbei handelt es sich unter anderem um „ipsort“ (Bannai et al., 2002), „TargetP“ (Ema-

nuelsson et al., 2000) und „Mitoprot2“ (Claros und Vincens, 1996). Das Programm „Mitoprot2“ hat außerdem eine N-terminale Sequenz von 16 Aminosäuren identifiziert, welche nach dem Import in die Mitochondrien abgespalten wird. Das kalkulierte Molekulargewicht des so prozessierten PPR-Proteins At1g80270.1 würde dann noch 65,32 kDa betragen. Dieses Molekulargewicht entspricht ungefähr dem des in der Abb. 3.15 beobachteten Proteins 3, welches hier analysiert wurde. Die Bande 3 hat ein etwas niedrigeres Molekulargewicht als das Rinderserum-Albumin der Bande 2 mit 66,2 kDa.

4 Diskussion

Der Prozess der RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen ist bislang in seinem Ablauf noch nicht vollständig aufgeklärt und daran beteiligte Faktoren wurden bislang nicht identifiziert. Für die Analyse des Prozesses wird die RNA-Edierung von fremden oder modifizierten mitochondrialen Transkripten analysiert. Im Gegensatz zu den Plastiden, bei denen eine Analyse der RNA-Edierung mittels transplastomischer Pflanzen erfolgen kann (Svab et al., 1990), ist die Transformation von Mitochondrien Höherer Pflanzen aufgrund fehlender Selektionsmarker noch nicht durchführbar.

Um die Erkennung und Edierung von RNA-Edierungspositionen näher zu analysieren, wurde in dieser Arbeit unter anderem das in einer vorhergehenden Arbeit (Staudinger, 2004) etablierte *in organello* System für Mitochondrien aus Mais verwendet. Der Vorteil eines *in organello* Systems gegenüber *in vitro* Systemen ist, dass in intakten Mitochondrien die Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation wesentlich größer ist als in mitochondrialen Extrakten. So ist auch die Effizienz der RNA-Edierung in *in vitro* Systemen mit Edierungsraten zwischen 1,5% und 7% relativ gering (Neuwirt et al., 2005), wohingegen im *in organello* System bei einigen Transkripten eine vollständige RNA-Edierung beobachtet wird (Staudinger und Kempken, 2003). Dies hängt möglicherweise mit einer geringeren Konzentration der für die Edierung benötigten Faktoren im *in vitro* System zusammen. Eine andere Erklärung für die geringe Edierungseffizienz *in vitro* wäre, dass die Prozessierungsreaktionen der Transkripte in den Mitochondrien an bestimmte Kompartimente gekoppelt sind. So scheinen zum Beispiel Transkriptions- und Translationskomplexe in Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* membranassoziiert zu sein (Rodeheffer und Shadel, 2003; Craig et al., 2003; Krause et al., 2004).

Im *in organello* System wird die Transkriptions- und Prozessierungsaktivität der isolierten Mitochondrien in einem Puffer aufrechterhalten, der ADP als anorganisches Phosphat und auch die oxidierbaren Substrate Glutamat und Malat enthält und somit eine Fortführung der oxidativen Phosphorylierung ermöglicht. In der

Arbeit von Staudinger (2004) wurde die Aufrechterhaltung der Respiration in isolierten Mitochondrien aus Mais mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes nachgewiesen. Durch Inkorporationsversuche von [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP und von Biotin-UTP wurde außerdem gezeigt, dass *in organello* eine RNA-Synthese stattfindet sowie dass die neu synthetisierten endogenen Transkripte ediert werden. In einer Zeitreihe konnten die Prozessierungsreaktionen des Spleißens und der Edierung der neu synthetisierten Transkripte bis zu sieben Stunden lang nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde mittels Elektroporation Plasmid-DNA in die isolierten Mais-Mitochondrien eingebracht und eine Lokalisierung der eingebrachten Fremd-DNA in der mitochondriale Matrix gezeigt.

4.1 Für zwei dikotyle Pflanzen wurden *in organello* Systeme entwickelt

Zu Beginn dieser Arbeit lagen *in organello* Systeme für die monokotylen Pflanzen *Zea mays* und *Sorghum bicolor* vor (Staudinger und Kempken, 2003), bzw. war ein *in organello* System für *Triticum aestivum* (Farré und Araya, 2001) beschrieben. Eine Etablierung von *in organello* Systemen für die dikotylen Pflanzen *Brassica oleracea* var. *botrytis* und *Arabidopsis thaliana* im Rahmen dieser Arbeit ermöglichte die erstmalige Analyse der Edierung von Transkripten aus monokotylen Pflanzen in dikotylen Mitochondrien (Bolle und Kempken, 2006). Von Choury et al. (2005) wurde ebenfalls ein *in organello* System für eine dikotyle Pflanze, *Solanum tuberosum*, entwickelt. Etwas später wurde dann von Choury und Araya (2006) auch die Edierung monokotyler Transkripte in dikotylen Mitochondrien analysiert.

Für mitochondriale Proteinextrakte aus Blumenkohl-Infloreszenzen wurde von Neuwirt et al. (2005) auch ein *in vitro* System entwickelt, welches eine für *in vitro* Systeme hohe Edierungsrate von maximal 7% aufweist. Im Falle des in dieser Arbeit entwickelten Blumenkohl *in organello* Systems lag eine effiziente Prozessierung der Transkripte vor, da nur vollständig gespleißte und edierte Transkripte nachzuweisen waren. Da Blumenkohl leicht in großen Mengen erhältlich ist, ist das Blumenkohl *in organello* System somit auch für umfangreiche Fragestellungen und Analysen geeignet.

Auch in den Mitochondrien aus *A. thaliana* lag eine vollständige Edierung an den untersuchten Positionen in den gespleißten Transkripten der Fremdgene vor. Da die cDNA der gespleißten Transkripte allerdings nur in geringer Konzentration vorlag und eine Bande höherer Konzentration im Agarosegel zu beobachten war, die der

bei ungespleißten Transkripten erwarteten Höhe entsprach, ist von einer geringen Prozessierungsaktivität der isolierten *A. thaliana* Mitochondrien auszugehen. Möglicherweise wäre eine schonendere Präparation der Mitochondrien vonnöten um eine höhere Aktivität zu erreichen. Eine Optimierung des Protokolls wurde allerdings nicht durchgeführt, da für weitere *in organello* Analysen Blumenkohl verwendet wurde. Zusätzlich zu dem vollständig sequenziert vorliegendem Kerngenom (genome initiative, 2000) und Chondriom (Unseld et al., 1997) von *A. thaliana* liegen in der Datenbank Informationen über putative und viele bereits charakterisierte Proteine aus *A. thaliana* vor. Dies war im Rahmen dieser Arbeit von großer Bedeutung und wird auch für kommende Analysen der RNA-Edierung wichtig sein.

4.2 *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* *cox2*

Transkripte werden in heterologen Mitochondrien effizient gespleißt und ediert

Schon Staudinger und Kempken (2003, 2004) zeigten, dass das *A. thaliana* *cox2* Gen in Mitochondrien aus *Z. mays* transkribiert wird und die Transkripte effizient gespleißt und an allen untersuchten RNA-Edierungspositionen ediert werden. Eine Transkription von dem *A. thaliana* *cox2* Promotor in den Mitochondrien des monokotylen *Z. mays* erfolgt wahrscheinlich mittels der zwei vorliegenden Promotormotive 5' CGTA 3' bei -210 und 5' ATTA 3' bei -481 relativ zum Start-Kodon. Von beiden Promotoren wurde eine Initiierung der Transkription in Mitochondrien aus *A. thaliana* beschrieben (Kühn et al., 2005). Durch eine Verwendung dieses Promotorbereiches im Plasmid pNB475 wurde in dieser Arbeit eine Transkription der *Z. mays* *cox2* Sequenz auch in Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis* und aus *A. thaliana* erreicht (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2).

Die *Z. mays* *cox2* Transkripte wurden des Weiteren sowohl in Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis* als auch in Mitochondrien aus *A. thaliana* korrekt gespleißt. In Übereinstimmung hiermit wurde das Spleißen von Introns fremder *cox2* Transkripte schon in isolierten Mitochondrien aus *T. aestivum*, *Z. mays* und *S. tuberosum* beobachtet (Farré und Araya, 2001; Staudinger und Kempken, 2003; Choury und Araya, 2006). Von Herdenberger et al. (1994) wurde des Weiteren gezeigt, dass ein mitochondriales Gruppe II Intron aus *Scenedesmus obliquus* sogar in Chloroplasten der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* korrekt gespleißt wird. Da Gruppe II Introns aus Mitochondrien Höherer Pflanzen *in vitro* nicht zum Selbst-Spleißen befähigt sind, wird angenommen, dass sie Spleißfaktoren benöti-

gen. Abgesehen von einer *A. thaliana* Kern-Mutante mit einem Spleißdefekt des *nad4* Transkriptes (Nakagawa und Sakurai, 2006), sind noch keine Spleißfaktoren für mitochondriale Gruppe II Introns aus Pflanzen identifiziert worden. In Chloroplasten Höherer Pflanzen hingegen wurden in *Z. mays* die kernkodierte Faktoren CRS2, CAF1, CAF2, CFM2 und RNC1 sowie in *A. thaliana* orthologe Faktoren für CAF1, CAF2 und CFM2 beschrieben, die jeweils für das Spleißen mehrerer plastidärer Gruppe II Introns notwendig sind (Jenkins et al., 1997; Ostheimer et al., 2003; Asakura und Barkan, 2006; Watkins et al., 2007; Asakura und Barkan, 2007). Da die Intronspezifitäten der Proteine dieser orthologen Gene zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* konserviert zu sein scheinen, weist dies auf eine Rekrutierung der Proteine als Spleißfaktoren vor der Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen hin (Asakura und Barkan, 2006, 2007).

Das in dieser Arbeit gezeigte Spleißen des *Z. mays* *cox2* Introns in den Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis* und *A. thaliana* deutet auch auf ähnliche oder sogar gleiche Spleißfaktoren der beteiligten Pflanzen hin. Da es sich in diesem Fall um ein nicht-homologes Intron handelt, sind hier eventuell Faktoren beteiligt, die ähnlich wie in den Plastiden für das Spleißen einer Gruppe von Introns notwendig sind und so auch in der Lage sind, das heterologe Intron zu erkennen und zu spleißen.

In den Mitochondrien aus *A. thaliana* lief das Spleißen des *Z. mays* *cox2* Introns nicht effizient ab, da in der RT-PCR cDNA der Größe von ungespleißten Transkripten amplifiziert wurde (siehe Abschnitt 3.2.2). Um die Identität der cDNA-Fragmente zu bestätigen, hätte eine Sequenzierung stattfinden müssen. Da allerdings in der Regel ungespleißte oder anderweitig unprozessierte Transkripte auch nicht vollständig ediert vorliegen (Yang und Mulligan, 1991; Iwabuchi et al., 1993; Staudinger und Kempken, 2004), wurde nur die cDNA der gespleißten Transkripte näher analysiert.

Gleichzeitig wird durch dieses RT-PCR-Produkt von ca. 1400 bp deutlich, dass die Bedingungen der RT-PCR auch die Amplifikation größerer cDNA-Fragmente erlauben. Da wiederum in den Blumenkohl-Mitochondrien nur cDNA gespleißter Transkripte amplifiziert wurde, ist davon auszugehen, dass dort die fremden *cox2* Transkripte effizient und vollständig gespleißt wurden (siehe Abschnitt 3.2.1).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einer Ausnahme alle untersuchten Edierungspositionen des Mais *cox2* Transkriptes in den Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis* und *A. thaliana* vollständig ediert vorlagen (Bolle und Kempken, 2006). Bei der Ausnahme handelte es sich um die nur in *B. oleracea* var. *botrytis*- und nicht in *A. thaliana*-Mitochondrien analysierte Position 24. Die Po-

sition 24 liegt allerdings nur in dem Datenbankeintrag „accession no.“ AY973492 des NCBI als partiell edierte Position beschrieben vor, in dem Eintrag „accession no.“ AY506529 handelt es sich hingegen nicht um eine RNA-Edierungsposition. Da diese Position somit auch *in vivo* wahrscheinlich nur partiell oder gar nicht ediert vorliegt, würde dies die nicht erfolgte Edierung im Blumenkohl *in organello* System erklären. Durch die Edierung an der Position 24 würde das für die Aminosäure Isoleucin stehende Kodon „AUC“ in das synonyme Kodon „AUU“ umgewandelt, so dass es sich um eine sogenannte stille Edierung handelt. Stille Edierungspositionen werden in mitochondrialen Transkripten aus Pflanzen häufig mit einer geringeren Effizienz ediert als Edierungspositionen, die eine Änderung der Aminosäuresequenz bewirken und somit wichtig für die Funktionalität des Proteins sind (Kempken et al., 1991; Schuster und Brennicke, 1991; Kempken et al., 1995; Mower und Palmer, 2006).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die bisher im *in organello* System noch nicht analysierten RNA-Edierungspositionen des *A. thaliana cox2* Transkriptes in Mitochondrien aus *Z. mays* bis auf zwei Positionen ediert werden (siehe Abschnitt 3.2.3; Bolle und Kempken, 2006). Bei den beiden nicht edierten Positionen 2 und 11 des *A. thaliana cox2* Transkriptes handelt es sich ebenso wie bei der Position 24 im *Z. mays cox2* Transkript um stille Edierungspositionen, welche wie bereits erwähnt mit einer geringeren Effizienz ediert werden. Außerdem weisen verschiedene Analysen aus Tabak- und Mais-Chloroplasten (Ruf und Kössel, 1997; Karcher und Bock, 2002; Peeters und Hanson, 2002; Chateigner-Boutin und Hanson, 2003), aber auch aus Mais-Mitochondrien (Grosskopf und Mulligan, 1996) auf gewebe- sowie z.T. auch auf entwicklungspezifische Unterschiede der RNA-Edierung einiger Transkripte hin. In Übereinstimmung hierzu werden in *A. thaliana* mehrere RNA-Edierungspositionen in Zellkulturen (NCBI „accession no.“ NC 001284; Giege und Brennicke, 1999) aber nicht in Rosetten-Blättern von *A. thaliana* (Bentolila et al., 2008) ediert, so auch die in dieser Arbeit mit 11 bezeichnete Edierungsposition des *cox2* Transkriptes. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Identifizierung der RNA-Edierungspositionen des *cox2* Transkriptes aus Blumenkohl (siehe Abschnitt 3.2.1 und Anhang) ergab außerdem, dass die beiden Positionen 2 und 11 hier keine Edierungspositionen sind. Aufgrund dieser Hinweise ist anzunehmen, dass die Positionen 2 und 11 nur in Mitochondrien aus *A. thaliana* Zellkulturen ediert werden, und eine Edierung im Mais *in organello* System nicht zu erwarten war.

Unter den vollständig edierten Positionen der fremden *cox2* Transkripte in den Mitochondrien befinden sich auch RNA-Edierungspositionen, die in den jeweiligen

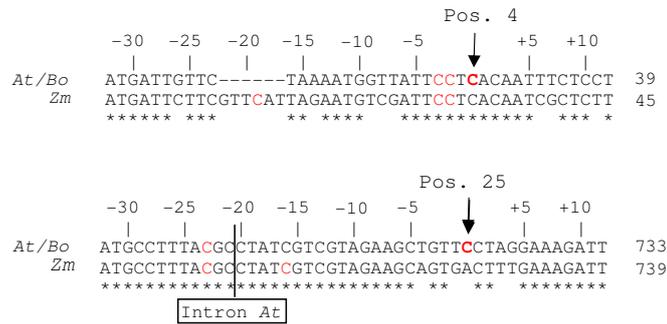


Abbildung 4.1: *cox2* Sequenzvergleich zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* bzw. *B. oleracea* var. *botrytis* um RNA-Edierungspositionen 4 und 25

In die *cox2* Sequenzen aus *Z. mays* (*Zm*), *A. thaliana* (*At*) bzw. *B. oleracea* var. *botrytis* (*Bo*) sind die RNA-Edierungspositionen rot eingezeichnet. Die Zahlen über der Sequenz sind in Relation zu den Positionen 4 und 25 angegeben. Die Zahlen rechts geben die Positionen im offenen Leserahmen an.

endogenen *cox2* Transkripten nicht vorkommen. Wie in Abb. 4.1 beispielhaft für zwei dieser heterologen RNA-Edierungspositionen gezeigt ist, unterscheidet sich z.T. die Sequenzumgebung dieser Positionen zwischen den Transkripten aus *Z. mays* und *A. thaliana* bzw. *B. oleracea* var. *botrytis*. Die Sequenzunterschiede liegen in den mittels *in vitro*- und *in organello*-Analysen identifizierten, für die RNA-Edierung einiger Positionen essentiellen, Bereichen von 20-30 Nukleotiden stromaufwärts und 10 Nukleotiden stromabwärts (Farré et al., 2001; Takenaka et al., 2004; Choury et al., 2004; Neuwirt et al., 2005). In einem ähnlichen Ansatz wie er hier durchgeführt wurde, wurden mit drei Ausnahmen ebenfalls mehrere heterologe *cox2* Edierungspositionen aus der monokotylen Pflanze *T. aestivum* in isolierten Mitochondrien aus *S. tuberosum* ediert (Choury und Araya, 2006). Umgekehrt wurden allerdings die heterologen *cox2* Edierungspositionen der dikotylen Pflanze *S. tuberosum* in Mitochondrien aus *T. aestivum* nicht ediert. Diese unterschiedlichen Ergebnisse aus dem Mais- und Blumenkohl-*in organello* System und dem Weizen- und Kartoffel-*in organello* System könnten auf Unterschiede in der Zusammensetzung der chimären *cox2* Gene zurückzuführen sein. So enthalten die Weizen- und Kartoffel-*cox2*-Konstrukte die 3' untranslatierte Region des apocytochrom b Gens und die *cox2* Promotorregionen entsprechend der zu transformierenden Mitochondrien mit einer Insertion von 23 bp bei -20. Es ist auch nicht ganz auszuschließen, dass die unterschiedliche Edierung fremder Transkripte zwischen isolierten Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl sowie Weizen und Kartoffel in minimalen Unterschieden bei der Präparation der Mitochondrien oder der Zusammensetzung des *in organello* Puffers, begründet ist (für Methodik von Weizen- und Kartoffel-*in*

organello Systemen siehe Farré und Araya, 2001; Choury und Araya, 2006).

4.2.1 Der Vergleich von *cox2* RNA-Edierungspositionen weist auf Existenz spezifischer Positionen monokotyler und dikotyler Pflanzen hin

Um den Hintergrund der Erkennung von heterologen *cox2* RNA-Edierungspositionen in isolierten Mitochondrien näher zu analysieren, wurde die Existenz dieser Edierungspositionen in verschiedenen mono- und dikotylen Pflanzen untersucht. Ein Sequenzvergleich aller in der Datenbank des NCBI vorliegenden DNA- und cDNA-Sequenzen mono- und dikotyler Pflanzen ergab, dass die RNA-Edierungspositionen 15 und 21 (Nummerierung nach Tabelle 3.1) ausschließlich in *cox2* Transkripten von monokotylen Pflanzen und die RNA-Edierungsposition 25 nur in *cox2* Transkripten dikotyler Pflanzen zu existieren scheinen (siehe Abschnitt 3.2.4 und Anhang).

Dies deutet darauf hin, dass die RNA-Edierungspositionen 15 und 21 erstmals in monokotylen Pflanzen entstanden sind. Im Gegensatz dazu weist der Sequenzvergleich an der Position 25 auf eine erstmalige Entstehung der RNA-Edierungsposition in den dikotylen Pflanzen hin, da hier in den monokotylen Pflanzen entweder die Base Adenin oder Thymin an entsprechender Stelle zu finden ist. Eine andere Erklärung für die hier beobachtete Verteilung der RNA-Edierungspositionen wäre ein Verlust der RNA-Edierungspositionen 15 und 21 in den dikotylen Pflanzen, bzw. ein Verlust der RNA-Edierungsposition 25 in den monokotylen Pflanzen, welcher erst nach der Trennung der beiden Gruppen erfolgte (Bolle und Kempken, 2006).

4.2.2 Vorstellung des „self-guiding-transcript“ Modells der RNA-Edierung

Der Ablauf der RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien ist bislang nicht aufgeklärt. Es ist bekannt, dass in Trypanosomen die RNA-Edierungspositionen mittels „guide“-RNAs erkannt werden, welche stromabwärts der Edierungsposition binden und die Edierungsinformation enthalten (Simpson et al., 2003). Die Beteiligung von vergleichbaren kleinen RNAs an der Erkennung der RNA-Edierungspositionen in pflanzlichen Mitochondrien konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, erscheint allerdings als unwahrscheinlich, da bisherige Bemühungen solche RNAs in Mitochondrien zu identifizieren erfolglos waren (Takenaka et al., 2008). In Plastiden

aus *A. thaliana* konnten bisher zwei kernkodierte Proteine identifiziert werden, die als positionsspezifische *trans*-Faktoren für die Erkennung und RNA-Edierung jeweils einer Edierungsposition essentiell sind (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2006, 2007). Anders als in den Plastiden mit ca. 30 RNA-Edierungspositionen liegen in den Mitochondrien Höherer Pflanzen mehrere hundert RNA-Edierungspositionen vor (für einen Übersichtsartikel siehe: Shikanai, 2006). Die Erkennung der RNA-Edierungspositionen in den pflanzlichen Mitochondrien könnte, ähnlich wie es in den Plastiden zu sein scheint, mit positionsspezifischen Proteinfaktoren erfolgen. Aufgrund der hohen Zahl an mitochondrialen RNA-Edierungspositionen müsste in diesem Fall aber eine entsprechende Anzahl von mehreren hundert Faktoren vorhanden sein, es sei denn mehrere Edierungspositionen werden von einem Protein erkannt.

Wie in den vorherigen Abschnitten 4.2 und 4.2.1 dargestellt, werden heterologe *cox2* RNA-Edierungspositionen im *in organello* System von isolierten Mitochondrien erkannt und ediert, obgleich diese Positionen nicht im endogenen Transkript vorhanden sind. Hierzu gehören auch Edierungspositionen, die ausschließlich in mono- oder in dikotylen Pflanzen zu finden sind. Sollten diese Edierungspositionen, ähnlich wie in Plastiden durch positionsspezifische *trans*-Faktoren erkannt werden, würde dies bedeuten, dass es vor der Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen ein *cox2* Transkript mit allen Edierungspositionen gegeben hat, und die entsprechenden Faktoren trotz des Verlustes einiger Edierungspositionen bis heute beibehalten wurden. Da die Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen vor ca. 140 bis 150 Millionen Jahren erfolgte (Chaw et al., 2004), würde dies eine Konservierung der entsprechenden Faktoren über einen sehr langen Zeitraum bedeuten. Selbst bei einer sekundären Funktion der Proteinfaktoren erscheint es unwahrscheinlich, dass ungenutzte Proteindomänen über eine so lange Zeit konserviert werden.

Es wurde gezeigt, dass eine mittels Plastiden-Transformation eingebrachte *Solanum lycopersicum rps12*- und eine *Spinacia oleracea ndhA*-Edierungsposition in *Nicotiana tabacum* bzw. im Falle der *ndhA* Position auch in *Nicotiana sylvestris* ediert werden, obwohl die Positionen nicht im jeweiligen endogenen Transkript vorkommen (Schmitz-Linneweber et al., 2001; Tillich et al., 2006b; Karcher et al., 2008). Ebenso wurden in einem *Atropa belladonna-Nicotiana tabacum* Cybrid, mit dem Kern aus Tabak, *Atropa*-spezifische plastidäre Edierungspositionen ediert (Herrmann et al., 2002). In diesen Fällen handelt es sich allerdings um Mitglieder einer Familie, der Solanaceen. Die einzige Ausnahme bildet *Spinacia oleracea*, allerdings ist dessen *ndhA* Edierungsposition auch in einem Mitglied der Solanaceen-Familie, *Nicotiana tomentosiformis*, vorhanden (Schmitz-Linneweber et al., 2001). So ist die

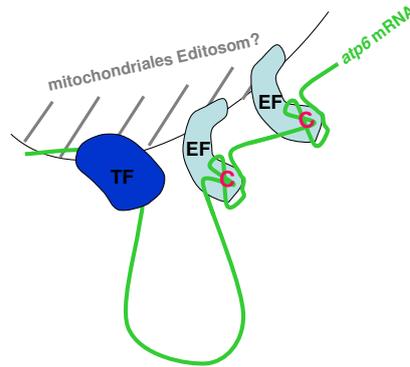


Abbildung 4.2: Modellvorstellung des Ablaufes der mitochondrialen RNA-Edierung für das *atp6* Transkript

Der transkriptspezifische Faktor (TF) interagiert mit der mRNA-Bindestelle im 5' untranslatierten Bereich und/oder im 5' Bereich der kodierenden Sequenz. Edierungsfaktoren (EF) interagieren mit der RNA-Struktur an den Edierungspositionen. Die Edierung erfolgt durch eines oder mehrere Enzyme und die Gesamtheit der an der Edierung beteiligten Faktoren wird hier als „Editosom“ bezeichnet.

evolutionäre Distanz deutlich geringer als zwischen mono- und dikotylen Pflanzen und eine Konservierung entsprechender *trans*-Faktoren erscheint hier nicht unwahrscheinlich. Des Weiteren gibt es Beispiele, bei denen heterologe Edierungspositionen in transformierten Plastiden nicht ediert wurden (Bock et al., 1994; Reed und Hanson, 1997).

Eine andere Erklärung für die Erkennung der heterologen RNA-Edierungspositionen in den isolierten Mitochondrien ist, dass die Edierungsinformation in dem Transkript selbst enthalten ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das sogenannte „self-guiding-transcript“ Modell entwickelt, welches besagt, dass das Edierungsenzym die Lage der Edierungspositionen mit Hilfe weiterer Edierungsfaktoren mittels der Sekundär- oder Tertiärstruktur der RNA erkennt (Bolle und Kempken, 2006). Im Gegensatz zu den positionsspezifischen *trans*-Faktoren könnten hier Faktoren beteiligt sein, die Gruppen von Edierungspositionen, evtl. an einer speziellen Sekundär- oder Tertiärstruktur erkennen. In der Abb. 4.2 ist dieses Modell am Beispiel des *atp6* Transkriptes dargestellt. Für das Hirse *atp6* Transkript wurde gezeigt, dass eine Edierung aller 19 Edierungspositionen in isolierten Mitochondrien aus Mais nur erfolgt, wenn der 5' untranslatierte Bereich und 432 bp des 5' Bereiches der kodierenden Sequenz mit den entsprechenden Bereichen aus Mais ausgetauscht werden (Staudinger et al., 2005). Ohne den Austausch dieser Bereiche wird keine der Edierungspositionen im *S. bicolor atp6* Transkript ediert. Nach dem Austausch hingegen werden alle 19 Edierungspositionen des *atp6* Transkriptes partiell ediert. Dies deu-

tet auf die Existenz einer Bindestelle eines transkriptspezifischen Faktors in diesem Bereich hin. In dem hier vorgestellten Modell wird das Transkript erst durch diese Bindung als zu edierend erkannt. Im Folgenden werden die einzelnen Edierungspositionen mittels der Struktur der RNA erkannt und ediert, wobei hier auch die direkte Sequenzumgebungen der Positionen eine entscheidende Rolle spielen. An der Erkennung und Edierung der Positionen sind das (oder die) Edierungsenzym(e) und weitere Edierungsfaktoren beteiligt. In dem Modell wird postuliert, dass alle Faktoren zusammen ein mitochondriales „Editosom“ bilden.

4.3 *In vitro* mutierte *cox2* Transkripte werden korrekt ediert

Durch das Einbringen von Punktmutationen in Gene wurden in vielen Studien essentielle Sequenzen von mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus Pflanzen analysiert (Farré et al., 2001; Choury et al., 2004; Neuwirt et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch T nach C Mutationen die fremden *Z. mays* spezifischen *cox2* Edierungspositionen 14, 16 und 21 in das *cox2* Gen aus *A. thaliana* eingeführt. An den drei Positionen liegt im *A. thaliana* Transkript eine Präedierung, d.h. schon auf genomischer Ebene ein Thymin vor. Wie in Abschnitt 3.3 gezeigt ist, wurden alle drei in das fremde Transkript eingeführten Edierungspositionen in isolierten Mitochondrien aus *Z. mays* ediert. Des Weiteren wurden die *A. thaliana cox2* Transkripte mit Ausnahme von Position 11, die erwartungsgemäß nicht ediert vorlag (siehe Abschnitt 4.2), an allen Edierungspositionen vollständig ediert.

Eine Erklärung für die Erkennung der *Z. mays cox2* Edierungspositionen 14, 16 und 21 in dem *A. thaliana* Transkript ist, dass in Übereinstimmung mit dem „self-guiding-transcript“ Modell (siehe Abschnitt 4.2.2) die Information über die Lage der Edierungspositionen in dem Transkript selbst enthalten ist. So würden durch Edierungsfaktoren entsprechende Sekundärstrukturen an den Positionen erkannt werden. Dies würde voraussetzen, dass die Positionen 14, 16 und 21 in einem Vorläufer des *A. thaliana cox2* Transkriptes vorhanden waren aber im Laufe der Evolution durch Präedierung auf genomischer Ebene verlorengegangen sind. In Übereinstimmung hiermit wurden die Edierungspositionen 14 und 16 auch in *cox2* Transkripten anderer dikotyler Pflanzen nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.2.1). Obwohl dies für die *cox2* Edierungsposition 21 nicht der Fall war, ist natürlich nicht auszuschließen, dass bei Sequenzierungen weiterer mitochondrialer Genome diese Position auch in dikotylen Pflanzen vorgefunden wird.

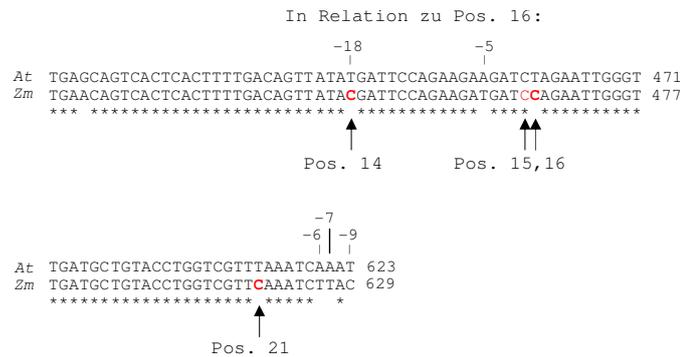


Abbildung 4.3: Cox2 Sequenzvergleich zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* um RNA-Edierungspositionen 14, 15, 16 und 21

In die *cox2* Sequenzen aus *Z. mays* (*Zm*) und *A. thaliana* (*At*) sind die RNA-Edierungspositionen rot eingezeichnet. Die Zahlen über der Sequenz sind in Relation zur Position 16 bzw. 21 angegeben. Die Zahlen rechts geben die Positionen im offenen Leserahmen an.

Möglich ist aber auch, dass im Rahmen des „self-guiding-transcript“ Modells eine Edierung der Positionen aufgrund der Ähnlichkeiten der Sequenzumgebungen der Positionen mit den entsprechenden *Z. mays* Positionen, welche zu einer annähernd identischen Sekundärstruktur führen, stattfand. Diese Ähnlichkeiten beinhalten bei den Positionen 14 und 21 identische und bei der Position 16 sehr ähnliche Sequenzen im Bereich von 20 Nukleotiden stromaufwärts und einigen Nukleotiden stromabwärts (siehe Abb. 4.3). An den Positionen +6, +7 und +9 relativ zur Position 21 und an der Position -5 relativ zur Position 16 liegen zwar Unterschiede zwischen den Sequenzen aus *Z. mays* und *A. thaliana* vor, eventuell sind diese aber unerheblich für die Bildung der korrekten Sekundärstruktur des Transkriptes und für die Erkennung der Positionen. Da das im *A. thaliana* Transkript vorliegende Cytosin an der *Z. mays* spezifischen Edierungsposition 15 in den Mais-Mitochondrien nicht ediert wird, könnte der Sequenzunterschied bei -4 in Relation zur Position 15 kritisch für die Edierung dieser Position sein, so dass hier nicht die korrekte Sekundär- oder Tertiärstruktur für die Erkennung der Position gebildet wird.

Alternativ zu dem „self-guiding-transcript“ Modell könnte die Erkennung der *Z. mays* spezifischen Edierungspositionen auch darin begründet sein, dass in den Mitochondrien aus *Z. mays* entsprechende positionsspezifische *trans*-Faktoren vorhanden sind, welche die Positionen sequenzspezifisch erkennen. Zwar wurden die Positionen nur durch eine Punktmutation, ohne umgebende Sequenzen, eingebracht, aber da die *cox2*-Sequenzen aus *A. thaliana* und *Z. mays* eine hohe Homologie aufweisen, könnten die *cis*-Sequenzen von entsprechenden sequenzspezifischen *Z. mays* *trans*-Faktoren erkannt werden.

4.4 Keine Edierung von *Arabidopsis thaliana nad6* und *Triticum sativum nad6* und *atpA* Transkripten in heterologen Mitochondrien

Zusätzlich zu den *cox2*-Transkripten wurden mitochondriale *nad6*- und *atpA*-Transkripte auf Edierung im Mais- und Blumenkohl-*in organello* System analysiert, um so weitere Hinweise auf den Mechanismus der Erkennung und Edierung von Edierungspositionen zu erhalten. Außer dem *nad6*- und dem *atpA*-Gen aus *T. sativum* wurden zwei *A. thaliana nad6* Konstrukte analysiert: Eines mit den 5' und 3' untranslatierten Bereichen des *A. thaliana cox2* Gens und ein weiteres mit dem nativen Promotor des *A. thaliana nad6* Gens und dem 3' untranslatierten Bereich des *A. thaliana cox2* Gens.

Die Analyse der Edierung der transgenen *nad6*- und *atpA*-Transkripte ergab, dass keine der untersuchten Edierungspositionen ediert vorlagen. Das Ergebnis war eher unerwartet da die kodierenden Sequenzen und z.T. auch auch die 5' untranslatierten Bereiche der verschiedenen Pflanzen stark konserviert sind (siehe Sequenzvergleiche im Anhang). Weiterhin sind einige der *atpA*- und *nad6*-RNA-Edierungspositionen der verschiedenen Pflanzen identisch. Mögliche Gründe für diese Ergebnisse sind zum einen, dass die minimalen Sequenzunterschiede im 5' untranslatierten Bereich die Bindung eines eventuell vorhandenen transkriptspezifischen Faktors nicht erlaubten, andererseits kann auch ein Einfluss der 3' untranslatierten Bereiche nicht ganz ausgeschlossen werden, auch wenn es hierfür bisher keine Hinweise in der Literatur gibt. Des Weiteren liegen die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Edierungspositionen des endogenen *nad6* Transkriptes aus Blumenkohl nur partiell ediert vor (siehe Anhang), so dass eventuell insgesamt die Edierungseffizienz des *nad6* Transkriptes in Mitochondrien aus Blumenkohl gering ausfällt.

4.5 Plastidäre Transkripte werden in pflanzlichen Mitochondrien weder gespleißt noch ediert

Die Ähnlichkeit von Prozessen der Genexpression in Plastiden und Mitochondrien aus Pflanzen ist schon häufiger Gegenstand verschiedener Analysen gewesen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass *in vitro* synthetisierte tRNA plastidärer Herkunft in mitochondrialen Lysaten von *Oenothera berteriana* korrekt prozessiert wird (Marchfelder et al., 1990). Mittels des *in organello* Systems wurden im Rahmen

dieser Arbeit zum ersten Mal plastidäre Sequenzen in isolierte Mitochondrien eingebracht und so das Spleißen und die Edierung der plastidären Transkripte in pflanzlichen Mitochondrien analysiert.

Um eine Transkription der plastidären *ndhB*- und *ycf3*-Sequenz in den pflanzlichen Mitochondrien zu gewährleisten, wurden mitochondriale Promotor- und Terminatorbereiche verwendet. Inzwischen wurden von Bohne et al. (2007) die Transkriptionsinitiation von einem mitochondrialen Promotor aus *O. berteriana* *in vitro* mittels der plastidären RNA-Polymerase RpoTp aus *A. thaliana* sowie *in vivo* in transgenen Tabak-Plastiden beschrieben. Die Transkriptionsinitiation erfolgt hier mittels des sowohl in pflanzlichen Mitochondrien als auch in Plastiden vorkommenden Promotorelementes 5' YRTA 3' (Y= T oder C; R= A oder G). Da für die Promotorerkennung *in vivo* wahrscheinlich Transkriptionsfaktoren benötigt werden (Liere und Börner, 2006; Gagliardi und Binder, 2007), weist dieses Ergebnis auf nicht nur evolutionär verwandte RNA-Polymerasen und Promotoren sondern auch auf eine Verwandtschaft der Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Mitochondrien und Plastiden hin (Bohne et al., 2007). RpoTm und RpoTp aus *A. thaliana* zeigen des Weiteren *in vitro* überlappende Promotorspezifitäten. So erkennt auch die mitochondriale RNA-Polymerase RpoTm den plastidären *ycf1-39* Promotor (Kühn et al., 2007). Für die *ndhB*- und *ycf3*-Gene aus *Z. mays* sind die Promotoren bisher noch nicht bekannt, aber eine Transkriptionsinitiation von den plastidären Promotoren im *in organello* System erscheint aufgrund der eben beschriebenen Ergebnisse als zumindest möglich.

Die chimären Gene mit den plastidären Exon- und Intron-Sequenzen wurden in den Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl transkribiert, aber die Transkripte wurden weder gespleißt noch ediert (siehe Abschnitt 3.5; Bolle et al., 2007). Da es sich bei diesen plastidären Introns um Gruppe IIb Introns (Klassifizierung nach Michel et al., 1989) handelt, welche sowohl in Plastiden als auch in Mitochondrien Höherer Pflanzen zu finden sind und größtenteils eine konservierte Sekundärstruktur aufweisen (Lehmann und Schmidt, 2003), erschien das Spleißen von plastidären Introns in Mitochondrien als nicht unwahrscheinlich. So konnte in einer Studie von Herdenberger et al. (1994) auch gezeigt werden, dass ein mitochondriales Intron in Chloroplasten der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* korrekt gespleißt wird.

An dem Spleißen von Gruppe II Introns in Plastiden und wahrscheinlich auch in pflanzlichen Mitochondrien sind Spleißfaktoren beteiligt (siehe Einleitung). Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse ist aber davon auszugehen, dass die mitochondrial lokalisierten Spleißfaktoren spezifisch für mitochondriale Introns sind und nicht genügend Ähnlichkeiten mit plastidären Spleißfaktoren aufweisen, um die *ycf3*- und

ndhB-Introns zu erkennen. So sind auch die bisher identifizierten Spleißfaktoren in Chloroplasten spezifisch für ein oder mehrere plastidäre Introns (siehe Einleitung). Auch für die *ndhB*- und *ycf3*-Introns aus *Z. mays* sind mehrere kernkodierte Spleißfaktoren identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um die plastidenlokalisierten Faktoren CRS2 (Jenkins et al., 1997) und CAF2 (Ostheimer et al., 2003) sowie für *ndhB* noch RNC1 (Watkins et al., 2007) und für *ycf3* noch CAF1 (Ostheimer et al., 2003) und CFM2 (Asakura und Barkan, 2007), welche als Teil größerer Spleißkomplexe vorliegen.

Obwohl die RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien ein relativ früher posttranskriptioneller Prozess ist, da viele ungespleißte Transkripte zumindest partiell ediert vorliegen (Sutton et al., 1991; Yang und Mulligan, 1991), gibt es auch intronnahe RNA-Edierungspositionen, die nur in gespleißten Transkripten ediert vorgefunden werden (Carrillo und Bonen, 1997; Li-Pook-Than et al., 2007). Dies könnte z.B. mit einer sterischen Behinderung von Edierungsfaktoren durch das Intron begründet sein oder dadurch, dass *cis*-Elemente von Edierungspositionen erst durch das Spleißen entstehen. Um die Möglichkeit einer Beeinträchtigung der Edierung der plastidären Transkripte durch die enthaltenen Introns auszuschließen, wurde ein *ndhB* Konstrukt ohne Intron auf Edierung in isolierten Mais-Mitochondrien analysiert. Da auch diese Transkripte unediert vorlagen (siehe Abschnitt 3.5.1), scheint das anwesende Intron die Interaktion der mitochondrialen Edierungsmaschinerie mit dem *ndhB* Transkript nicht zu stören.

Des Weiteren wurde die Möglichkeit berücksichtigt, dass, ähnlich wie von Choury et al. (2005) vorgeschlagen, die Edierung von Transkripten nur erfolgt, wenn diese in eine komplexe Prozessierungsmaschinerie eingebunden sind. Da dies voraussetzt, dass das im Transkript enthaltene Intron gespleißt wird, wurde das *ndhB* Intron im Konstrukt pNB569 durch das mitochondriale *cox2* Intron aus *Z. mays* ersetzt. Im Rahmen der Diplomarbeit von Hinrichsen (2007) konnten keine Transkripte dieses Konstruktes nach Transformation in isolierte Mais- und Blumenkohl-Mitochondrien detektiert werden. Möglicherweise war das *cox2* Intron aufgrund der chimären Exon/Intron-Struktur der Transkripte nicht in der Lage die benötigte komplexe Tertiärstruktur auszubilden. Diese besteht u.a. aus Interaktionen zwischen im Intron vorhandenen Bindestellen (EBS für „exon binding site“) und Bindestellen im 5' sowie z.T. auch im 3' gelegenen Exon (IBS für „intron binding site“). Holländer und Kück (1999) beobachteten ein ähnliches Resultat. Hier führte eine fehlerhafte Intron-Tertiärstruktur zum vollständigen Verlust der Exon-RNA.

In Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Ergebnissen wurde ein mitochondriales Exon des *Petunia cox2* Transkriptes in transformierten Tabak-Plastiden nicht

ediert (Sutton et al., 1995). Ebenso lag ein *rpoB* Fragment, welches aufgrund des während der Evolution erfolgten Transfers aus den Plastiden in Reis mitochondrial lokalisiert ist, nicht ediert vor (Zeltz et al., 1996). Im Unterschied zu dieser Analyse handelte es sich bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung um einen direkten Ansatz, aufgrund dessen Ergebnis davon auszugehen ist, dass potentiell vorhandene mitochondriale Edierungsfaktoren nicht in der Lage sind, die plastidären Edierungspositionen zu erkennen.

4.5.1 Ähnlichkeiten in den potentiellen *cis*-Sequenzen zwischen *Zea mays ndhB* und mitochondrialen Edierungspositionen

Wie bereits im Abschnitt 4.2.2 erwähnt, müssten bei einem ähnlichen Mechanismus der Edierung in Mitochondrien und Plastiden mehrere hundert positionsspezifische *trans*-Faktoren in den Mitochondrien vorhanden sein. Hierfür kommt die Familie der PPR-Proteine in Frage, aus welcher auch die identifizierten plastidären Edierungs-*trans*-Faktoren stammen (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2007). Die PPR-Proteinfamilie ist an vielen posttranskriptionellen Prozessen in den Organellen von Pflanzen beteiligt und umfasst in *A. thaliana* ca. 450 Proteine, von denen für ungefähr die Hälfte eine mitochondriale Lokalisierung vorhergesagt wird (Lurin et al., 2004). Für einige der Proteine wurde, wie bereits erwähnt, eine Funktion bei anderen posttranskriptionellen Prozessen als der RNA-Edierung festgestellt (zusammengefasst in Saha et al., 2007). Die Differenz in der Zahl der mitochondrialen RNA-Edierungspositionen und der in Mitochondrien verfügbaren PPR-Proteine könnte darin begründet sein, dass ein PPR-Protein an der Erkennung der *cis*-Elemente mehrerer Edierungspositionen beteiligt ist. Tatsächlich wurden von Choury et al. (2004) gezeigt, dass mitochondriale Edierungspositionen trotz Punktmutationen im *cis*-Element von 16 Nukleotiden stromaufwärts und sechs Nukleotiden stromabwärts ediert werden, wenn auch z.T. mit reduzierter Edierungseffizienz. Ebenso werden, wie in Abschnitt 4.2 diskutiert, heterologe *cox2* RNA-Edierungspositionen sowie *cox2* Edierungspositionen die auch in dem endogenen Transkript vorhanden sind, aber Unterschiede in den umgebenden Sequenzen aufweisen, in isolierten Mitochondrien ediert. Eine Toleranz gegenüber solchen Unterschieden im *cis*-Element von Edierungspositionen wäre bei einer Erkennung mehrerer Positionen durch einen Faktor notwendig.

Ein Vergleich der *Z. mays ndhB* Edierungspositionen und der mitochondrialen RNA-Edierungspositionen aus *Z. mays* ergab deutliche Sequenzähnlichkeiten zwischen den potentiellen *cis*-Sequenzen von drei plastidären *ndhB* Edierungspositio-

nen und von mehreren mitochondrialen Edierungspositionen, insbesondere bei den Nukleotiden direkt stromaufwärts der Edierungspositionen (siehe Abschnitt 3.5.2). Eine Erkennung dieser *ndhB* *cis*-Elemente durch mitochondriale *trans*-Faktoren, welche die Sequenzen mehrerer Edierungspositionen erkennen können, wäre zumindest vorstellbar gewesen. Dass aber keine der *ndhB* Edierungspositionen ediert vorlag, auch nicht partiell, weist auf einen unterschiedlichen Mechanismus der Erkennung von RNA-Edierungspositionen in Mitochondrien und in Plastiden hin. Die hier vorgelegten Daten sprechen daher eher für das im Abschnitt 4.2.2 vorgeschlagene „self-guiding-transcript“-Modell.

4.6 Isolierung von Proteinen mit Beteiligung an der RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen

Für die Aufklärung des Prozesses der RNA-Edierung in Pflanzen ist es notwendig, die beteiligten Proteinkomponenten zu identifizieren. In pflanzlichen Mitochondrien sind bisher noch keine Edierungsfaktoren bekannt. Aufgrund des RNA-Edierungsmechanismus, welcher auf der Umwandlung von Cytosin nach Uracil oder auf der seltener vorkommenden umgekehrten Umwandlung beruht, wird angenommen, dass es sich bei dem Edierungsenzym in den Organellen um eine De- oder Transaminase handelt. Außerdem wird angenommen, dass weitere Proteine an der Erkennung der Edierungspositionen beteiligt sind (Takenaka et al., 2008). Kandidaten hierfür sind Proteine der „pentatricopeptide repeat“(PPR)-Familie, welche eine in Pflanzen große Proteinfamilie darstellt, deren Mitglieder an verschiedenen posttranskriptionellen Prozessen in Mitochondrien und Plastiden beteiligt sind (Delannoy et al., 2007). Aus dieser Familie wurden kürzlich zwei PPR-Proteine identifiziert, die für die RNA-Edierung jeweils einer Edierungspositionen in den Plastiden notwendig sind (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2006, 2007).

Für die Identifizierung von an der RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien beteiligten Proteinfaktoren wurde die Interaktion von Biotin mit Streptavidinbeschichteten Magnetpartikeln genutzt. Mittels einer Biotinmarkierung der Ziel-RNA, können so RNA-bindende Proteine isoliert werden. Diese Methodik wurde schon mehrfach für die Isolierung spezifischer RNA-bindender Proteine genutzt, u.a. wurde so eine Isoform des „apobec-1 complementation factor“ (ACF), welcher die positionsspezifische Komponente der *apoB* RNA-Edierung in Säugetieren ist, isoliert (Mehta und Driscoll, 1998). Die Methode musste im Rahmen dieser Arbeit

in aufwändigen Vorversuchen für hier verwendete Proteinextrakte und RNAs angepasst und optimiert werden, auch um die unspezifische Bindung von Proteinen zu reduzieren (siehe Abschnitt 3.6.2). Da bei Neuwirt et al. (2005) gezeigt wurde, dass ein RNA-Fragment von 30 Nukleotiden stromaufwärts und zehn Nukleotiden stromabwärts einer Edierungsposition für zumindest eine partielle Edierung *in vitro* von bis zu 7% ausreichend ist, wurde hier ein RNA-Fragment entsprechender Größe verwendet (Fragmentgröße hier: -29/+10; siehe Abschnitt 3.6.1). Durch diese minimale Größe sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, ein Protein mit Funktion bei der RNA-Edierung und nicht mit Funktionen bei anderen posttranskriptionellen Prozessen zu isolieren. Das zweite RNA-Fragment beinhaltete 200 Nukleotide des 5' untranslatierten Bereichs sowie die ersten 100 Nukleotide der kodierenden Sequenz des *A. thaliana cox2* Transkriptes mit mehreren Edierungspositionen. Dieser Bereich wurde aufgrund von Ergebnissen, die auf die Bindung eines transkriptspezifischen Faktors mit Bedeutung für die RNA-Edierung in eben diesem Bereich des *Z. mays atp6*-Transkriptes hinweisen (Staudinger et al., 2005), ausgewählt.

Wie im Abschnitt 3.6.3 gezeigt ist, wurden mittels dieses RNA-Fragmentes von 300 Nukleotiden allerdings keine spezifisch bindenden Proteine aus einem mitochondrialen Blumenkohl-Proteinextrakt isoliert. Es besteht die Möglichkeit, dass die im hier verwendeten RNA-Fragment vorliegenden internen Biotin-Markierungen die Bindung von Proteinen gestört haben. Von Scaturro et al. (2003) wurde allerdings eine erfolgreiche Isolierung von spezifischen-bindenden Proteinen unter Verwendung einer mit internen Biotin-Markierungen versehenen RNA beschrieben. Weiterhin wurde in Staudinger und Kempken (2003) die Edierung einer intern mit Biotin markierten RNA nachgewiesen. Eventuell kommt es bei Vorliegen der internen Biotin-Markierungen aber nur zu einer schwachen Bindung der Edierungsfaktoren an die RNA, die ausreichend für eine Edierung, aber nicht stark genug für eine Isolierungsprozedur mit mehreren Waschschritten ist. Eine Wiederholung dieses Experimentes mit einer Quervernetzung der RNA-Proteinkomplexe durch UV-Licht könnte ein solches Problem beheben. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, ein entsprechendes RNA-Fragment mit einer 5' Biotin-Markierung herzustellen, um sterische Behinderungen der Edierungsfaktoren durch die Biotin-Markierungen auszuschließen.

Mittels des 40 Nukleotid großen *A. thaliana cox2* RNA-Fragmentes mit der Edierungsposition 17 konnte aus mitochondrialen Proteinextrakten von *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana* ein an das RNA-Fragment spezifisch-bindendes Protein von ca. 66 kDa isoliert werden (siehe Abschnitte 3.6.4 und 3.6.5). Die Spezifität des Proteins wurde durch die Negativ-Kontrolle, in der ein zum *cox2* RNA-Fragment

revers komplementäres RNA-Fragment eingesetzt wurde, gezeigt. Hier war zwar auch auf entsprechender Höhe eine Proteinbande zu sehen, diese war aber von sehr geringer Intensität, so dass, sofern es sich um das gleiche Protein handelt, dieses in der Probe des *cox2* RNA-Fragmentes zumindest stark angereichert vorlag. Diese stark angereicherte Proteinbande bei ca. 66 kDa wurde auch bei Wiederholungen des Experimentes beobachtet.

Eine Identifizierung des isolierten Blumenkohl-Proteins von ca. 66 kDa per MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrischer Analyse war trotz der engen Verwandtschaft von *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana*, dessen Kerngenom (genome initiative, 2000) und Chondriom (Unselde et al., 1997) vollständig sequenziert vorliegt, nicht möglich. Es ist bekannt, dass eine Identifizierung von Proteinen per MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrischer Analyse und dem Programm „Mascot“ fehlschlagen kann wenn die entsprechenden Proteine nicht in den Datenbanken vorliegen, bzw. wenn die Proteine modifiziert sind oder Sequenzabweichungen aufweisen (Pevzner et al., 2001; Tabb et al., 2003; Potthast et al., 2005).

4.6.1 An RNA-Edierungsposition bindendes mitochondriales Protein ist wahrscheinlich ein PPR-Protein

Das durch spezifische Bindung an das 40 Nukleotid große *cox2* RNA-Fragment mit Edierungsposition isolierte *A. thaliana* Protein der Bande 3 bei ca. 66 kDa wurde mittels der Maldit-TOF/TOF-massenspektrometrischen Analyse und dem Programm „Mascot“ dem Protein At1g80270.1 zugeordnet (siehe Abschnitt 3.6.5). Mit 18% Wahrscheinlichkeit ist der Score zufälligen Ursprungs und das Protein nicht korrekt identifiziert, so dass eine Bestätigung der Identität durch eine weitere unabhängige massenspektrometrische Analyse notwendig ist. Es erscheint allerdings als wahrscheinlich, dass das Protein korrekt identifiziert wurde, da zum einen dem Protein At1g80270.1 mittels mehrerer Programme eine mitochondriale Lokalisierung vorhergesagt wird. Weiterhin stimmt die beobachtete Größe von ca. 66 kDa des Proteins der Bande 3 (siehe Abschnitt 3.6.5) mit dem kalkulierten Molekulargewicht des Proteins At1g80270.1 von 67,382 kDa, bzw. von 65,32 kDa nach Abspaltung des Transitpeptides (laut des Programms „Mitoprot 2“: 16 Aminosäuren) überein. Allerdings wurde bei einer Analyse von Proteinen, die an der Hüllmembran von *A. thaliana* Chloroplasten lokalisiert sind, auch das Protein At1g80270 identifiziert (Froehlich et al., 2003). In dieser Studie lag aber eine Kontamination mit mitochondrialen Proteinen vor. Daher und aufgrund der vorhergesagten mitochondrialen Lokalisierung des Protein At1g80270 durch mehrere Programme erscheint es unwahrscheinlich,

dass es sich tatsächlich um ein plastidär lokalisiertes Protein handelt.

Das Protein At1g80270.1 gehört der PPR-Familie an, deren Proteine wie eingangs erwähnt Kandidaten für RNA-Edierungsfaktoren in pflanzlichen Mitochondrien darstellen. Es handelt sich hierbei um eine der größten Proteinfamilien in Pflanzen, welche in *A. thaliana* um die 450 Mitglieder umfasst. Die Proteine enthalten jeweils zwei bis 26 PPR-Motive oder Varianten davon. Die PPR-Proteine werden aufgrund der Art der PPR-Motive in die P- und die PLS-Unterfamilie unterteilt. Es gibt das kanonische PPR-Motiv (P-Motiv), welches in allen Eukaryoten vorkommt, und es gibt die beiden Pflanzen-spezifischen Varianten des PPR-ähnlichen L-Motivs (für „long“) und des PPR-ähnlichen S-Motivs (für „short“). Die PLS-Unterfamilie ist durch Wiederholungen des P-L-S-Triplett-Motivs charakterisiert und kann außerdem aufgrund der zusätzlichen C-terminalen Domänen E, E+ und DYW in weitere Untergruppen unterteilt werden (Lurin et al., 2004). In der Abb. 4.4 ist die Unterteilung der Proteinfamilie mit typischen Anordnungen der Motive dargestellt. Die Funktionen dieser C-terminalen Domänen sind bisher noch unbekannt (siehe unten). Es gibt die Hypothese, dass die DYW Domäne die katalytische Domäne der RNA-Edierung in den Organellen von Pflanzen sein könnte (Salone et al., 2007). Diese Hypothese beruht auf der Übereinstimmung einiger Aminosäuren der Domäne mit dem aktiven Zentrum von Cytidin-Deaminasen sowie darauf, dass das Vorkommen von Proteinen mit DYW Domänen in Pflanzen mit dem Vorkommen der RNA-Edierung in den Organellen korreliert.

Die PPR-Proteine CCR4 und CRR21, welche als essentielle Edierungsfaktoren für die Edierung der ersten bzw. der zweiten Edierungsposition des *ndhD* Transkriptes in *A. thaliana* Chloroplasten identifiziert wurden, gehören beide der E+ Untergruppe an (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2007). Obwohl CRR4 um einige Aminosäuren kürzer ist als CRR21, sind die verbleibenden E und E+ Motive der Proteine gut konserviert, insbesondere ein darin enthaltenes 15-Aminosäuremotiv. Es wurde gezeigt, dass diese konservierten Bereiche essentiell für die Edierung der entsprechenden Positionen sind, aber keine Funktion bei der Erkennung der Edierungsposition haben, da die E und E+ Domänen zwischen CRR4 und CRR21 ausgetauscht werden können, ohne dass es zu einem Verlust oder zu einer Änderung der Positionsspezifität kommt (Okuda et al., 2007). Deshalb wird eine Funktion dieses Bereiches bei der Interaktion mit dem Edierungsenzym oder mit anderen Faktoren der Edierungsmaschinerie diskutiert.

Abgesehen von CCR4, welches *in vitro* an den Bereich von 25 Nukleotiden stromaufwärts und 10 Nukleotiden stromabwärts der *ndhD*-1 Edierungsposition bindet (Okuda et al., 2006), konnte für einige weitere der bisher funktionell charakte-

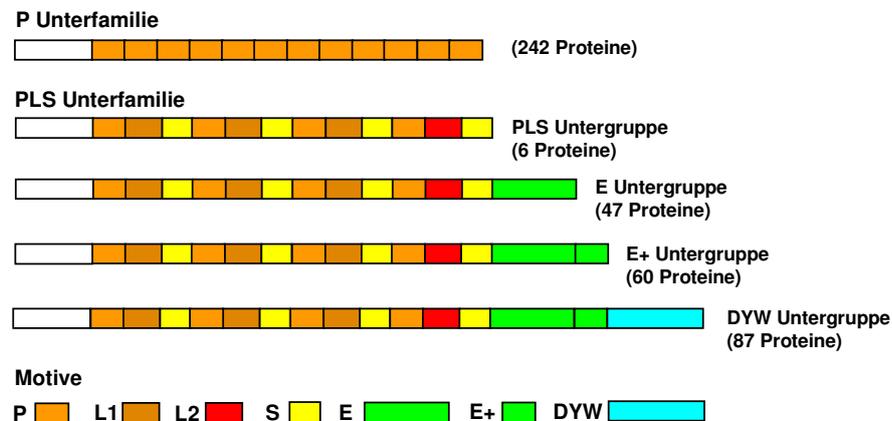


Abbildung 4.4: Struktur der PPR-Proteine aus *A. thaliana*

Typische Struktur und Anordnung von Motiven der PPR-Proteine aus *A. thaliana* und die daraus resultierende Unterteilung der Familie in Unterfamilien und Untergruppen. Die genaue Anzahl und z.T. auch Reihenfolge der Motive kann allerdings variieren. In Klammern ist die Anzahl der Mitglieder der einzelnen Gruppen angegeben. P=PPR; L= PPR-ähnlich L (für „long“); S= PPR-ähnlich S (für „short“). Abbildung nach Lurin et al. (2004).

risierten PPR-Proteine mittels *in vitro* Analysen (Nakamura et al., 2003; Mili und Pinol-Roma, 2003; Meierhoff et al., 2003; Lurin et al., 2004; Kobayashi et al., 2007) und durch Co-Immunopräzipitation (Schmitz-Linneweber et al., 2005) eine Assoziation mit RNA gezeigt werden. Aufgrund einiger der biochemischen Analysen ist davon auszugehen, dass die PPR Domänen die RNA-bindenden Motive der Proteine sind (Nakamura et al., 2003; Mili und Pinol-Roma, 2003).

Das PPR-Protein At1g80270.1 gehört im Gegensatz zu den plastidären Edierungsfaktoren CRR4 und CRR21 der P-Unterfamilie an, die keine zusätzlichen carboxyterminalen Domänen aufweist. Diese Einteilung wurde von Lurin et al. (2004) vorgenommen, ebenso wie die Identifizierung der PPR-Domänen des Proteins. Laut Lurin et al. (2004) weist das Protein sechs PPR Domänen auf, davon handelt es sich bei zweien um PPR-ähnliche S-Motive, die statt 35 nur 31 Aminosäuren lang sind. Da dieses Protein keine E und E+ Domäne besitzt kann vermutet werden, dass, sollte es tatsächlich an der RNA-Edierung der *cox2* Edierungsposition 17 beteiligt sein, hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegt als bei CRR4 und CRR21 in Plastiden.

Unter den bisher charakterisierten PPR-Proteinen, welche u.a. Funktionen bei der Transkription, der RNA-Stabilität, dem RNA-Spleißen, der RNA-Edierung, der RNA-Degradierung, endo- und exonukleolytischen Prozessen und der Translation in den Organellen von Pflanzen haben, konnte bisher allerdings kein Zusammenhang

zwischen der Struktur und der Funktion der Proteine ausgemacht werden (Andrés et al., 2007). So haben die sich sehr ähnlichen Proteine CRP1, welches für die Translation der *petA*- und *petD*-Transkripte wichtig ist (Barkan et al., 1994; Fisk et al., 1999; Schmitz-Linneweber et al., 2005) und das Protein Rfk, welches die Translation seiner Ziel-mRNA wahrscheinlich verhindert (Koizuka et al., 2003), eine gänzlich verschiedene Funktion.

Bei CRR4 und CRR21 wird eine Funktion der E und E+ Domänen bei der Interaktion mit weiteren Faktoren der Edierungsmaschinerie vermutet. Diese Interaktion könnte bei dem Protein At1g80270.1 über andere Bereiche laufen. So wurde hier eine TPR-ähnliche Domäne (Superfamily-Datenbankeintrag: 48452) identifiziert. Das dem PPR-Motiv stark ähnelnde TPR Motiv ist aus meist eukaryotischen Proteinen, hauptsächlich aus Hefe und *Drosophila* bekannt, und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (Saha et al., 2007). Es konnte auch mehrfach gezeigt werden, dass PPR-Proteine, auch aus der P-Unterfamilie, Komponenten von großen Proteinkomplexen sind (Fisk et al., 1999; Mili und Pinol-Roma, 2003; Williams und Barkan, 2003; Krause et al., 2004; Gillman et al., 2007), für das Protein GRP23 konnte auch eine direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase II nachgewiesen werden (Ding et al., 2006).

Die Annotierung des At1g80270.1-Proteins durch die „gene ontology“-Datenbank (Ashburner et al., 2000) als DNA-bindendes Protein beruht auf Sequenzähnlichkeiten zu DNA-bindenden Proteinen. So wurde bisher für ein PPR-Protein, P63, welches eine Funktion bei der Transkription des *cox2* Genes in *T. aestivum* zu haben scheint, eine Affinität für den *cox2* Promotor nachgewiesen (Ikeda und Gray, 1999). Sollte das hier identifizierte PPR-Protein tatsächlich DNA und nicht RNA binden, wäre eine Beteiligung bei der RNA-Edierung relativ unwahrscheinlich. Da dieses Protein aber mittels Bindung an ein RNA-Fragment isoliert wurde, erscheint eine RNA-bindende Funktion wahrscheinlicher. Eine andere Funktion des Proteins als bei der RNA-Edierung ist natürlich nicht auszuschließen, auch wenn das RNA-Fragment mit dem stark eingegrenzten Bereich von -29 und +10 um eine Edierungsposition herum die Wahrscheinlichkeit für die Isolierung eines Proteines mit anderer Funktion gering halten sollte. Außer der Bestätigung der Identität des an das RNA-Fragment bindenden Proteins steht somit eine funktionelle Charakterisierung des PPR-Proteins At1g80270.1 durch weitere Analysen an. Bei einer Beteiligung des At1g80270.1-Proteins an der RNA-Edierung der *cox2* Position 17 wäre des Weiteren von Interesse, zu untersuchen, ob das Protein auch an der RNA-Edierung anderer Positionen beteiligt ist.

Mittels der hier dargestellten und optimierten Methode war es somit möglich,

ein spezifisch an RNA bindendes mitochondriales Protein mit möglicher Beteiligung an der RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien zu isolieren.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass einerseits eine Edierung der heterologen *cox2* RNA-Edierungspositionen in isolierten Mitochondrien stattfindet, andererseits aber keine der Edierungspositionen der *atpA* und *nad6* Transkripte in fremden Mitochondrien ediert werden. Da die kodierende Sequenz und die Edierungspositionen des *nad6* Transkriptes zwischen *A. thaliana* und Blumenkohl identisch sind, könnten die geringfügigen Unterschiede in der 5' untranslatierten Region einen Einfluss haben. Um dies zu überprüfen könnte die Edierung der Transkripte des Konstruktes mit dem 5' untranslatierten Bereich und der kodierenden Region des *A. thaliana nad6* Gens und dem 3' untranslatierten Bereich des *A. thaliana cox2* Gens in isolierten Mitochondrien aus *A. thaliana* Zellkulturen analysiert werden. Hierfür müsste vorher das *A. thaliana in organello* System optimiert werden, um eine effiziente Prozessierung der Fremdgene zu ermöglichen.

Weiterhin wäre es interessant, die bisher unbekanntenen 5' untranslatierten Bereiche des *cox2* Gens aus Blumenkohl und aus der hier verwendeten Mais-Linie zu sequenzieren, um festzustellen ob es hier gemeinsame Bereiche gibt, die die Erkennung und vollständige RNA-Edierung der fremden *cox2* Transkripte aus Mais und *A. thaliana* in den Mitochondrien aus Blumenkohl und Mais erklären würden.

Außerdem könnten weitere mitochondriale Gene kloniert und die Edierung der Transkripte in den Mais und Blumenkohl *in organello* Systemen überprüft werden. Hierfür sollte ein Gen mit Edierungspositionen ausgewählt werden, die z.T. heterolog sind und z.T. im endogenen Transkript vorkommen. Durch die Herstellung verschiedener Konstrukte entweder mit dem nativen 5' untranslatierten Bereich oder dem 5' untranslatierten Bereich des entsprechenden Transkriptes der transformierten Mitochondrien könnte analysiert werden, ob in dieser Region wichtige Bereiche für die Transkriptererkennung und -edierung liegen, um so den Mechanismus der RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen näher zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde außerdem ein *A. thaliana* Protein isoliert, das spezifisch an die *cox2* RNA-Edierungsposition 17 und deren potentielle *cis*-Sequenz bindet. Die Identifizierung des Proteins als das PPR-Protein At1g80270.1 muss in einer Wiederholung des Experimentes bestätigt werden. Das PPR-Protein muss des Weiteren funktionell charakterisiert werden, um festzustellen ob es an der RNA-

Edierung der *cox2* Position 17 beteiligt ist. Dies kann durch eine Herunterregulierung oder das Ausschalten des Genes in *A. thaliana* Pflanzen ermittelt werden. Da keine entsprechende *A. thaliana* T-DNA Insertionslinie vorhanden ist, könnte die Expression des At1g80270.1 Genes in einem RNAi-Ansatz herunterreguliert werden. Der Phänotyp der Pflanzen müsste ermittelt werden, und die Edierung des *cox2* Transkriptes sowie eventuell weiterer Transkripte analysiert werden. Sollte das Protein an der Edierung der *cox2* Position 17, und vielleicht auch weiterer Positionen beteiligt sein, müsste die Ähnlichkeit dieser Positionen auf Sequenz- und Sekundärstrukturebene untersucht werden. Sollte die Edierung des *cox2* Transkriptes nicht beeinträchtigt sein, könnte überprüft werden, ob die *cox2* Transkripte anderweitig beeinflusst sind, z.B. in der Stabilität oder dem Spleißen.

Die hier optimierte Methode zur Isolierung von spezifisch an RNA bindenden mitochondrialen Proteinen scheint für die Identifizierung von Edierungsfaktoren geeignet zu sein. Somit könnte versucht werden, mit weiteren kleinen RNA-Fragmenten mit Edierungspositionen, eventuell auch für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Bindung mit zwei bis drei Positionen im Abstand von wenigen Nukleotiden, Edierungsfaktoren zu isolieren. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete 300 Nukleotid große *A. thaliana cox2* Fragment könnte neu hergestellt und die internen Biotin-Markierungen durch eine 5' Biotin-Markierung ersetzt werden, um es dann erneut einzusetzen für die Isolierung von transkriptspezifischen Faktoren oder Edierungsfaktoren.

5 Zusammenfassung

Zusätzlich zu den bereits bestehenden *in organello* Systemen für *Z. mays* und *S. bicolor* wurden in dieser Arbeit *in organello* Systeme für die dikotylen Pflanzen *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana* etabliert. Mittels der *in organello* Systeme wurde die Edierung und das Spleißen von fremden Transkripten in isolierten Mitochondrien analysiert. Es wurde gezeigt, dass Mitochondrien aus *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana* bzw. aus *Z. mays* in der Lage sind das *cox2* Transkript aus *Z. mays* bzw. aus *A. thaliana* korrekt zu Spleißen und effizient zu edieren. Unter den edierten Positionen der *cox2* Transkripte befinden sich auch Edierungspositionen, die im jeweiligen endogenen *cox2* Transkript nicht vorkommen.

In einer Datenbankanalyse der *cox2* RNA-Edierungspositionen mono- und dikotyler Pflanzen wurden zwei Positionen ausschließlich in monokotylen Pflanzen und eine Position nur in dikotylen Pflanzen gefunden. Die Edierung auch dieser Positionen in den heterologen isolierten Mitochondrien führte zu dem sogenannten „self-guiding-transcript“ Modell der RNA-Edierung in pflanzlichen Mitochondrien. Dieses Modell besagt, dass die Edierungspositionen im Transkript mittels der Sekundär- oder Tertiärstruktur der RNA von Edierungsfaktoren erkannt und ediert werden.

Z. mays cox2 Edierungspositionen wurden durch Punktmutationen in das *cox2* Transkript aus *A. thaliana* eingeführt. Diese Positionen wurden in Mitochondrien aus *Z. mays* ediert, ebenso wie eine erwartungsgemäße Edierung der *A. thaliana cox2* Edierungspositionen stattfand.

Mittels Elektroporation wurden außerdem plastidäre *Z. mays ndhB*- und *ycf3*-Sequenzen in isolierte Mitochondrien aus *B. oleracea var. botrytis* und *Z. mays* eingebracht. Eine Analyse der Transkripte ergab, dass diese in den Mitochondrien weder gespleißt noch ediert werden. Auch eine Entfernung des Introns aus dem *ndhB* Konstrukt führte nicht zur Edierung der Transkripte in den Mitochondrien. Somit scheinen die mitochondrial lokalisierten Spleiß- und Edierungsfaktoren nicht in der Lage zu sein die plastidären Introns und die plastidären Edierungspositionen zu erkennen.

Es erfolgte zudem die Entwicklung eines Protokolls zur Isolierung von Edierungsfaktoren mittels der Interaktion Streptavidin-beschichteter Magnetpartikel mit Biotin-markierter RNA bzw. RNA-Protein-Komplexen. Hiermit wurden durch spezifische Bindung an ein Fragment mit Edierungsposition aus dem *A. thaliana cox2*

Transkript, Proteine aus mitochondrialen *B. oleracea* var. *botrytis* und *A. thaliana* Extrakten isoliert. Die MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrische Analyse eines der isolierten *A. thaliana* Proteine führte zu einem PPR-Protein.

Summary

In organello systems for *Z. mays* and *S. bicolor* have been established prior to the begin of this study. In this study *in organello* systems for the dicotyledonous plants *B. oleracea* var. *botrytis* and *A. thaliana* were developed. The *in organello* systems were used to analyze splicing and editing of transcripts in heterologous mitochondria. It was shown that *Z. mays* *cox2* transcripts were correctly spliced and edited in the isolated mitochondria of *B. oleracea* var. *botrytis* and *A. thaliana*. Similarly, the *A. thaliana* *cox2* transcripts were efficiently spliced and edited in isolated maize mitochondria. Among the analyzed editing sites some sites are not present in the endogenous transcripts of the electroporated mitochondria.

In a database search two *cox2* RNA editing sites were found to be located exclusively in monocotyledonous plants, whereas one *cox2* RNA editing site was found only in dicotyledonous plants. Even these editing sites are edited in the heterologous mitochondria. Those results support a self-guiding-transcript model for RNA editing in plant mitochondria. In this model the editing information is contained in the transcript itself, as the transcript forms a complex secondary or tertiary structure, guiding the editing factors to the editing sites.

Z. mays *cox2* editing sites introduced into the *A. thaliana* *cox2* transcript by site-directed-mutagenesis were edited in isolated mitochondria from *Z. mays*. Furthermore the *A. thaliana* *cox2* editing sites were edited as expected.

Plastid *Z. mays* *ndhB* and *ycf3* sequences were introduced into isolated mitochondria of *B. oleracea* var. *botrytis* and *Z. mays* via electroporation. The transcripts of the plastid sequences were neither spliced nor edited in mitochondria. Removal of the intron of the *ndhB* construct did not induce editing of the transcript in the mitochondria. These results indicate that mitochondrial localized splicing and editing factors are not capable of recognizing plastid introns and plastid editing sites.

In addition a protocol for isolation of editing factors was developed, utilizing the interaction of streptavidin-coated magnetic particles and biotin-labeled RNA or RNA-protein complexes. Using this approach, proteins from mitochondrial *B. oleracea* var. *botrytis* and *A. thaliana* extracts were isolated via specific binding to an *A. thaliana* *cox2* RNA fragment containing an editing site. MALDI-TOF/TOF mass spectrometry of an *A. thaliana* protein resulted in a PPR protein.

Literaturverzeichnis

- Adams, K. L., Daley, D. O., Qiu, Y.-L., Whelan, J., und Palmer, J. D. (2000). Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature*, 408:354–357.
- Adams, K. L., Song, K., Roessler, P., Nugent, J. M., Doyle, J., und Palmer, J. (1999). Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:13863–13868.
- Andrés, C., Lurin, C., und Small, I. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol Plant*, 129:14–22.
- Asakura, Y. und Barkan, A. (2006). Arabidopsis orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol*, 142(4):1656–1663.
- Asakura, Y. und Barkan, A. (2007). A CRM Domain Protein Functions Dually in Group I and Group II Intron Splicing in Land Plant Chloroplasts. *Plant Cell*, 19(12):3864–3875.
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J., Davis, A., Dolinski, K., Dwight, S., Eppig, J., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25(1):25–9.
- Backert, S. und Börner, T. (2000). Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Curr Genet*, 37(5):304–314.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., und Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 18(2):298–305.
- Barkan, A. (2004). Intron splicing in plant organelles. In Daniell, H. und Chase, C., editors, *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, Seiten 281–308. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Barkan, A., Walker, M., Nolasco, M., und Johnson, D. (1994). A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J*, 13(13):3170–81.
- Bendich, A. (1996). Structural Analysis of Mitochondrial DNA Molecules from Fungi and Plants Using Moving Pictures and Pulsed-field Gel Electrophoresis. *J Mol Biol*, 255(4):564–588.
- Bendich, A. (2004). Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell*, 16(7):1661–6.
- Benne, R., van den Burg, J., Brakenhoff, J. P. J., Sloof, P., van Boom, J. H., und Tromp, M. C. (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.
- Bentolila, S., Elliott, L., und Hanson, M. (2008). Genetic Architecture of Mitochondrial Editing in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 178(3):1693.
- Binder, S. und Brennicke, A. (2003). Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 358(1429):181–9.
- Bock, R. (2000). Sense from nonsense: How the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, 82:549–557.
- Bock, R., Hermann, M., und Kössel, H. (1996). In vivo dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J*, 15:5052–5059.
- Bock, R., Kössel, H., und 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.
- Bogorad, L. (2008). Evolution of early eukaryotic cells: genomes, proteomes, and compartments. *Photosynth Res*, 95:11–21.
- Bohne, A., Ruf, S., Börner, T., und Bock, R. (2007). Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids. *Nucleic Acids Res*, 35(21):7256–66.

- Bolle, N., Hinrichsen, I., und Kempken, F. (2007). Plastid mRNAs are neither spliced nor edited in maize and cauliflower mitochondrial in organello systems. *RNA*, 13:2061–2065.
- Bolle, N. und Kempken, F. (2006). Mono- and dicotyledonous plant-specific RNA editing sites are correctly edited in both in organello systems. *FEBS Lett.*, 580:4443–4448.
- Boore, J. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 27(8):1767–1780.
- Borovkov, A. und Rivkin, M. (1997). XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques*, 22:812–814.
- Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M., und Rochaix, J. (1997). The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J*, 16:6095–6104.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Brangeon, J., Sabar, M., Gutierrez, S., Combettes, B., Bove, J., Gendy, C., Chetrit, P., des Francs-Small, C. C., Pla, M., Vedel, F., und De Paepe, R. (2000). Defective splicing of the first *nad4* intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS1 nuclear mutant. *Plant J*, 21(3):269–280.
- Bullock, W., Fernandez, J., und Short, J. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, 5:376–378.
- Carrillo, C. und Bonen, L. (1997). RNA editing status of *nad7* intron domains in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 25(2):403–409.
- Chapdelaine, Y. und Bonen, L. (1991). The wheat mitochondrial gene for subunit I of the NADH dehydrogenase complex: a trans-splicing model for this gene-in-pieces. *Cell*, 65:465–472.
- Chateigner-Boutin, A. und Hanson, M. (2003). Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res*, 31(10):2586–2594.

- Chaudhuri, S. und Maliga, P. (1996). Sequences directing C to U editing of the plastid *psbL* mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. *EMBO J*, 15:5958–5964.
- Chaw, S.-M., Chang, C.-C., Chen, H.-L., und Li, W.-H. (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using the whole chloroplast genomes. *J Mol Evol*, 58:424–441.
- Chen, S., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silbermann, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M., Gotto, A. M., Li, W. H., und Chan, L. (1987). Apolipoprotein b-48 is the product of messenger RNA with an organ-specific in-frame translation codon. *Science*, 328:363–366.
- Cho, Y., Qiu, Y., Kuhlmann, P., und Palmer, J. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:14244–14249.
- Choury, D. und Araya, A. (2006). RNA editing site recognition in heterologous plant mitochondria. *Curr Genet*, 50(6):405–16.
- Choury, D., Farre, J., Jordana, X., und Araya, A. (2004). Different patterns in the recognition of editing sites in plant mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 32:6397–406.
- Choury, D., Farré, J., Jordana, X., und Araya, A. (2005). Gene expression studies in isolated mitochondria: *Solanum tuberosum rps10* is recognized by cognate potato but not by the transcription, splicing and editing machinery of wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 33(22):7058–65.
- Claros, M. und Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, 241:779–786.
- Clifton, S. W., Minx, P., Fauron, C. M., Gibson, M., Allen, J. O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W. B., Kanuganti, S., Tayloe, C., Meyer, L., Wilson, R. K., und Newton, K. J. (2004). Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol*, 136:3486–3503.
- Collombet, J.-M., Wheeler, V. C., Vogel, F., und Coutelle, C. (1997). Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. *J Biol Chem*, 272:5342–5347.
- Corneille, S., Lutz, K., und Maliga, P. (2000). Conservation of RNA editing between rice and maize plastids: are most editing events dispensable? *Mol Gen Genet*, 264:419–424.

- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R., und Lerbs-Mache, S. (2007). Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 145(3):712–21.
- Covello, P. S. und Gray, M. W. (1989). RNA editing in plant mitochondria. *Nature*, 341:662–666.
- Craig, E., Naithani, S., Saracco, S., Butler, C., und Fox, T. (2003). Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 14(1):324–333.
- Delannoy, E., Stanley, W., Bond, C., und Small, I. (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 6):1643–7.
- Ding, Y., Liu, N., Tang, Z., Liu, J., und Yang, W. (2006). *Arabidopsis* GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 Is Essential for Early Embryogenesis and Encodes a Novel Nuclear PPR Motif Protein That Interacts with RNA Polymerase II Subunit III. *Plant Cell*, 18(4):815–830.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., und Lithgow, T. (2006). Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*, 313:314–318.
- Dyall, S., Brown, M., und Johnson, P. (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 304:253–257.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., und von Heijne, G. (2000). Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J Mol Biol*, 300(4):1005–1016.
- Enríquez, J. A., Fernández-Silva, P., Pérez-Martos, A., López-Pérez, M. J., und Montoya, J. (1996). The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP. *Eur J Biochem*, 237:601–610.
- Faivre-Nitschke, S. E., Grienberger, J. M., und Gualberto, J. M. (1999). A prokaryotic-type cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana*. Gene expression and functional characterization. *Eur J Biochem*, 263:896–903.

- Farré, J.-C. und Araya, A. (2001). Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles. *Nucleic Acids Res*, 29:2484–2491.
- Farré, J. C., Leon, G., Jordana, X., und Araya, A. (2001). *cis* recognition elements in plant mitochondrion RNA editing. *Mol Cell Biol*, 21:6731–6737.
- Fauron, C., Casper, M., Gao, Y., und Moore, B. (1995). The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional. *Trends Genet*, 11(6):228–235.
- Fisk, D., Walker, M., und Barkan, A. (1999). Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J*, 18(9):2621–2630.
- Freyer, R., Kiefer-Meyer, M.-C., und Kössel, H. (1997). Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:6285–6290.
- Froehlich, J., Wilkerson, C., Ray, W., McAndrew, R., Osteryoung, K., Gage, D., und Phinney, B. (2003). Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res*, 2(4):413–425.
- Funk, H., Berg, S., Krupinska, K., Maier, U., und Krause, K. (2007). Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *BMC Plant Biol*, 7(1):45.
- Gagliardi, D. und Binder, S. (2007). Expression of the plant mitochondrial genome. In Logan, D. C., editor, *Plant mitochondria*, Seiten 50–96. Blackwell, Oxford.
- genome initiative, T. A. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796–815.
- Giege, P. und Brennicke, A. (1999). RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:15324–15329.
- Gillman, J., Bentolila, S., und Hanson, M. (2007). The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. *Plant J*, 49(2):217–227.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., und Chothia, C. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol*, 313(4):903–919.

- Greeve, J., Navaratnam, N., und Scott, J. (1991). Characterization of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme: no similarity to the proposed mechanism of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Nucleic Acids Res*, 19(13):3569–3576.
- Grohmann, L., Thieck, O., Herz, U., Schröder, W., und Brennicke, A. (1994). Translation of *nad9* mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts. *Nucleic Acids Res*, 22:3304–3311.
- Grosskopf, D. und Mulligan, R. M. (1996). Developmental- and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings. *Curr Genet*, 29:556–563.
- Groth-Malonek, M., Wahrmund, U., Polsakiewicz, M., und Knoop, V. (2007). Evolution of a Pseudogene: Exclusive Survival of a Functional Mitochondrial *nad7* Gene Supports *Haplomitrium* as the Earliest Liverwort Lineage and Proposes a Secondary Loss of RNA Editing in Marchantiidae. *Mol Biol Evol*, 24(4):1068–74.
- Gualberto, J. M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J. H., und Grienemberger, J. M. (1989). RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature*, 341:660–662.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41:95–98.
- Handa, H. (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, 31:5907–5916.
- Haouazine, N., Pereira, A., Jubier, M., Lancelin, D., Delcher, E., und Lejeune, B. (1992). The wheat mitochondrial genome contains an ORF showing sequence homology to the gene encoding the subunit 6 of the NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Plant Mol Biol*, 20(3):395–404.
- Haouazine-Takvorian, N., Takvorian, A., Jubier, M. F., und Lejeune, B. (1997). Genes encoding subunit 6 of NADH dehydrogenase and subunit 6 of ATP synthase are co-transcribed in maize mitochondria. *Curr Genet*, 31:63–69.
- Hegemann, C., Hayes, M., und Hanson, M. (2005). Substrate and cofactor requirements for RNA editing of chloroplast transcripts in *Arabidopsis* *in vitro*. *Plant J*, 42:124–132.

- Herdenberger, F., Holländer, V., und Kück, U. (1994). Correct *in vivo* RNA splicing of a mitochondrial intron in algal chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 22:2869–2875.
- Herrmann, R., Maier, R., und Schmitz-Linneweber, C. (2002). Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. *Phil Trans R Soc Lond*, 358:87–97.
- Hess, W., Hoch, B., Zeltz, P., Hübschmann, T., Kössel, H., und Börner, T. (1994). Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell*, 6:1455–1465.
- Hiesel, R., Combettes, B., und Brennicke, A. (1994). Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the bryophyta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:629–633.
- Hiesel, R., Wissinger, B., Schuster, W., und Brennicke, A. (1989). RNA editing in plant mitochondria. *Science*, 246:1632–1634.
- Hinrichsen, I. (2007). In organello RNA-Edierung in Mitochondrien von ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Hirose, T., Kusumegi, T., Tsudzuki, T., und Sugiura, M. (1999). RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet*, 262:462–467.
- Hirose, T. und Sugiura, M. (2001). Involvement of a site-specific *trans*-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J*, 20:1144–1152.
- Hoch, B., Maier, R. M., Appel, K., Igloi, G. L., und Kössel, H. (1991). Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature*, 353:178–180.
- Hoge, J. H. C., Springer, J., Zantige, B., und Wessels, J. G. H. (1982). Absence of differences in polysomal RNA from vegetative monokaryotic and dikaryotic cells of the fungus *Schizophyllum commune*. *Exp Mycol*, 6:225–232.
- Holländer, V. und Kück, U. (1999). Group II intron splicing in chloroplasts: identification of mutations determining intron stability and fate of exon RNA. *Nucleic Acids Res*, 27:2345–2353.
- Hübschmann, T., Hess, W., und Börner, T. (1996). Impaired splicing of the *rps 12* transcript in ribosome-deficient plastids. *Plant Mol Biol*, 30(1):109–123.

- Ikeda, T. M. und Gray, M. W. (1999). Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol*, 19:8113–8122.
- Inada, M., Sasaki, T., Yukawa, M., Tsudzuki, T., und Sugiura, M. (2004). A systematic search for RNA editing sites in pea chloroplasts: an editing event causes diversification from the evolutionarily conserved amino acid sequence. *Plant Cell Physiol*, 45(11):1615–1622.
- Iwabuchi, M., Kyojuka, J., und 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.
- Jenkins, B. und Barkan, A. (2001). Recruitment of a peptidyl-tRNA hydrolase as a facilitator of group II intron splicing in chloroplasts. *EMBO J*, 20(4):872–9.
- Jenkins, B., Kulhanek, D., und 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.
- Junior, T. C., Carraro, D. M., Benatti, M. R., Barbosa, A. C., Kitajima, J. P., und Carrer, H. (2004). Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome. *Curr Genet*, 46(6):366–373.
- Kahlau, S., Aspinall, S., Gray, J. C., und Bock, R. (2006). Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *J Mol Evol*, 63(2):194–207.
- Karcher, B. und Bock, R. (2002). The amino acid sequence of a plastid protein in developmentally regulated by RNA editing. *J Biol Chem*, 277(7):5570–4.
- Karcher, D., Kahlau, S., und Bock, R. (2008). Faithful editing of a tomato-specific mRNA editing site in transgenic tobacco chloroplasts. *RNA*, 14(2):217.
- Kawasaki, E. und Wang, A. (1989). Detection of gene expression. In Ehrlich, H., editor, *PCR Technology, principles and applications for DNA amplification.*, Seiten 89–97. Stockton Press, New York.
- Kempken, F., Höfken, G., und Pring, D. R. (1995). Analysis of silent RNA editing sites in *atp6* transcripts of *Sorghum bicolor*. *Curr Genet*, 27:555–558.
- Kempken, F., Howad, W., und Pring, D. R. (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., Mullen, J. A., Pring, D. R., und Tang, H. V. (1991). RNA editing of sorghum mitochondrial *atp6* transcripts changes 15 amino acids and generates a carboxyterminus identical to yeast. *Curr Genet*, 20:417–422.
- Knoop, V. (2004). The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Curr Genet*, 46:123–139.
- Kobayashi, K., Suzuki, M., Tang, J., Nagata, N., Ohyama, K., Seki, H., Kiuchi, R., Kaneko, Y., Nakazawa, M., Matsui, M., et al. (2007). Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 48(2):322–31.
- Kobayashi, Y., Matsuo, M., Sakamoto, K., Wakasugi, T., Yamada, K., und Obokata, J. (2008). Two RNA editing sites with *cis*-acting elements of moderate sequence identity are recognized by an identical site-recognition protein in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 36(1):311.
- Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T., Kawasaki, S., und Imamura, J. (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.
- Kotera, E., Tasaka, M., und Shikanai, T. (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature*, 433:326–330.
- Krause, K., Lopes de Souza, R., Roberts, D., und Dieckmann, C. (2004). The Mitochondrial Message-specific mRNA Protectors Cbp1 and Pet309 Are Associated in a High-Molecular Weight Complex. *Mol Biol Cell*, 15(6):2674–2683.
- Kubo, T. und Mikami, T. (2007). Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. *Physiol Plant*, 129(1):6–13.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, N., und 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.
- Kugita, M., Yamamoto, Y., Fujikawa, T., Matsumoto, T., Yoshinaga, K., und Journals, O. (2003). RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res*, 31(9):2417–2423.

- Kühn, K., Bohne, A., Liere, K., Weihe, A., und Börner, T. (2007). *Arabidopsis* Phage-Type RNA Polymerases: Accurate in Vitro Transcription of Organellar Genes. *Plant Cell*, 19(3):959–71.
- Kühn, K., Weihe, A., und Börner, T. (2005). Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 33:337–346.
- Lämmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Lang, B., Laforest, M., und Burger, G. (2007). Mitochondrial introns: a critical view. *Trends Genet*, 23(3):119–125.
- Lang, B. F., Burger, G., O’Kelly, C., Cedergren, R., Golding, G., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., und Gray, M. W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling an eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387:493–497.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–8.
- Laser, B., Oettler, G., und Kück, U. (1995). RNA editing of the mitochondrial *atpA/atp9* co-transcript of triticale, carrying the timopheevi cytoplasmic male sterility cytoplasm from wheat. *Plant Physiol*, 107:663–664.
- Lecellier, G. und Silar, P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from petri dish grown mycelia. *Curr Genet*, 25:122–123.
- Lehmann, K. und Schmidt, U. (2003). Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 38(3):249–303.
- Li-Pook-Than, J. und Bonen, L. (2006). Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 34(9):2782–2790.
- Li-Pook-Than, J., Carrillo, C., Niknejad, N., Calixte, S., Crosthwait, J., und Bonen, L. (2007). Relationship between RNA splicing and exon editing near intron junctions in wheat mitochondria. *Physiol Plant*, 129(1):23–33.
- Liere, K. und Börner, T. (2006). Transcription of plastid genes. In Grasser, K., editor, *Regulation of transcription in plants*, Seiten 184–224. Blackwell, Oxford.

- Little, M. und Hallick, R. (1988). Chloroplast *rpoA*, *rpoB*, and *rpoC* genes specify at least three components of a chloroplast DNA-dependent RNA polymerase active in tRNA and mRNA transcription. *J Biol Chem*, 263(28):14302–14307.
- Lu, B., Wilson, R. K., Phreaner, C. G., Mulligan, R. M., und Hanson, M. R. (1996). Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene. *Mol Cell Biol*, 16:1543–1549.
- Lukeš, J., Hashimi, H., und Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*, 48(5):277–299.
- Lupold, D. S., Caoile, A. G., und Stern, D. B. (1999). The maize mitochondrial *cox2* gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units. *J Biol Chem*, 274:3897–3903.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., et al. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, 16:2089–2103.
- Lutz, K. A. und Maliga, P. (2001). Lack of conservation of editing sites in mRNAs that encode subunits of the NAD(P)H dehydrogenase complex in plastids and mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Genet*, 40:214–219.
- Lysenko, E. (2007). Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Rep*, 26:845–859.
- Mahendran, R., Spottswood, M. S., und Miller, D. L. (1991). RNA editing by cytidine insertion in mitochondria of *Physarum polycephalum*. *Nature*, 349:434–438.
- Maier, R., Neckermann, K., Hoch, B., Akhmedov, N. B., und Kössel, H. (1992). Identification of editing in the *ndhB* transcript from maize chloroplasts reveals sequence similarities between editing sites of chloroplasts and plant mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 20:6189–6194.
- Maier, R. M., Neckermann, K., Igloi, G. L., und Kössel, H. (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol*, 251:614–628.
- Maier, R. M., Zeltz, P., Kössel, H., Bonnard, G., Gualberto, J. M., und Grienemberger, J. M. (1996). RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 32:343–365.

- Malek, O., Lättig, K., Hiesel, R., Brennicke, A., und Knoop, V. (1996). RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J*, 15:1403–1411.
- Marchfelder, A. und Binder, S. (2004). Plastid and plant mitochondrial RNA processing and RNA stability. In Daniell, H. und Chase, C., editors, *Molecular biology and biotechnology of plant organelles*, Seiten 261–294. Springer, Dordrecht.
- Marchfelder, A., Schuster, W., und Brennicke, A. (1990). In vitro processing of mitochondrial and plastid derived tRNA precursors in a plant mitochondrial extract. *Nucleic Acids Res*, 18:1401–1406.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., und Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:12246–12251.
- Mehta, A. und Driscoll, D. (1998). A Sequence-Specific RNA-Binding Protein Complements Apobec-1 To Edit Apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol*, 18(8):4426–4432.
- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N., und Schuster, G. (2003). HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell*, 15(6):1480–1495.
- Michel, F., Umesono, K., und Ozeki, H. (1989). Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns- a review. *Genes Dev*, 82:5–30.
- Mili, S. und Pinol-Roma, S. (2003). LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol*, 23(14):4972–82.
- Millen, R., Olmstead, R., Adams, K., Palmer, J., Lao, N., Heggie, L., Kavanagh, T., Hibberd, J., Gray, J., Morden, C., et al. (2001). Many Parallel Losses of *infA* from Chloroplast DNA during Angiosperm Evolution with Multiple Independent Transfers to the Nucleus. *Plant Cell*, 13:645–658.
- Miyamoto, T., Obokata, J., und Sugiura, M. (2002). Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. *Mol Cell Biol*, 22:6726–6734.

- Mohr, G. und Lambowitz, A. (2003). Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants. *Nucleic Acids Research*, 31(2):647–652.
- Mower, J. und Palmer, J. (2006). Patterns of partial RNA editing in mitochondrial genes of *Beta vulgaris*. *Mol Genet Genomics*, 276:285–93.
- Nakagawa, N. und Sakurai, N. (2006). A mutation in At-nMat1a, which encodes a nuclear gene having high similarity to group II intron maturase, causes impaired splicing of mitochondrial NAD4 transcript and altered carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 47(6):772–783.
- Nakamura, T., Meierhoff, K., Westhoff, P., und Schuster, G. (2003). RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur J Biochem*, 270(20):4070–4081.
- Nakazono, M. und Hirai, A. (1993). Identification of the entire set of transferred chloroplast DNA sequences in the mitochondrial genome of rice. *Mol Gen Genet*, 236:341–346.
- Navaratnam, N., Bhattacharya, S., Fujino, T., Patel, D., Jarmuz, A., und Scott, J. (1995). Evolutionary origins of *apoB* mRNA editing: Catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell*, 81(6):187–195.
- Neuwirt, J., Takenaka, M., van der Merwe, J. A., und Brennicke, A. (2005). An in vitro RNA editing system from cauliflower mitochondria: editing site recognition parameters can vary in different plant species. *RNA*, 11:1563–1570.
- Newton, K. J. (1994). Procedures for isolating mitochondria and mitochondrial DNA and RNA. In Freeling, M. und Walbot, V., editors, *The maize handbook*, Seiten 549–556. Springer, New York.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A., und Kadowaki, K. (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics*, 268:434–445.
- Nugent, J. M. und Palmer, J. D. (1991). RNA-mediated transfer of *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during lowering plant evolution. *Cell*, 66:473–481.

- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohochi, T., und Ohyama, K. (1992). Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. a primitive form of plant mitochondrial genome. *J Mol Biol*, 223:1–7.
- Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai, K., Kanno, A., Terachi, T., Shiina, T., Miyashita, N., Nasuda, S., Nakamura, C., Mori, N., Takumi, S., Murata, M., Futo, S., und Tsunewaki, K. (2005). Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*, 33:6235–6250.
- Ohtani, K., Yamamoto, H., und Akimitsu, K. (2002). Sensitivity to *Alternaria alternata* toxin in citrus because of altered mitochondrial RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):2439.
- Ohyama, K., Oda, K., Ohta, E., und Takemura, M. (1993). Gene organization and evolution of introns of a liverwort, *Marchantia polymorpha*, mitochondrial genome. In Brennicke, A. und Kück, U., editors, *Plant mitochondria*, Seiten 115–129. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., und Shikanai, T. (2007). Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19):8178–83.
- Okuda, K., Nakamura, T., Sugita, M., Shimizu, T., und Shikanai, T. (2006). A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem*, 281(49):37661–37667.
- Ostersetzer, O., Cooke, A. M., Watkins, K. P., und Barkan, A. (2005). CRS1, a chloroplast group II intron splicing factor, promotes intron folding through specific interactions with two intron domains. *Plant Cell*, 17(1):241–255.
- Ostheimer, G. J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J., und Barkan, A. (2003). Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *Embo J*, 22(15):3919–3929.
- Palmer, J. (1990). Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet*, 6:115–120.
- Palmer, J., Adams, K., Cho, Y., Parkinson, C., Qiu, Y.-L., und Song, K. (2000). Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:6960–6966.

- Peeters, N. und Hanson, M. (2002). Transcript abundance supercedes editing efficiency as a factor in developmental variation of chloroplast gene expression. *RNA*, 8(4):497–511.
- Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D., und Cottrell, J. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–67.
- Pevzner, P., Mulyukov, Z., Dancik, V., und Tang, C. (2001). Efficiency of Database Search for Identification of Mutated and Modified Proteins via Mass Spectrometry. *Genome Res*, 11(2):290.
- Phreaner, C. G., Williams, M. A., und Mulligan, R. M. (1996). Incomplete editing of *rps12* transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria. *Plant Cell*, 8:107–117.
- Potthast, F., Ocenasek, J., Rutishauser, D., Pelikan, M., und Schlapbach, R. (2005). Database independent detection of isotopically labeled MS/MS spectrum peptide pairs. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 817(2):225–230.
- Powell, L. M., Willis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J., und Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-b48 in intestine. *Cell*, 50:831–840.
- Raczynska, K., Le Ret, M., Rurek, M., Bonnard, G., Augustyniak, H., und Gualberto, J. (2006). Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett*, 580(24):5641–5646.
- Rajasekhar, V. K. und Mulligan, R. M. (1993). RNA editing in plant mitochondria: a-phosphate is retained during C-to-U conversion in mRNAs. *Plant Cell*, 5:1843–1852.
- Raubeson, L., Peery, R., Chumley, T., Dziubek, C., Fourcade, H., Boore, J., und Jansen, R. (2007). Comparative chloroplast genomics: analyses including new sequences from the angiosperms *Nuphar advena* and *Ranunculus macranthus*. *BMC Genomics*, 8(1):174.
- Reed, M. L. und Hanson, M. (1997). A heterologous maize *rpoB* editing site is recognized by transgenic tobacco chloroplasts. *Mol Cell Biol*, 17(12):6948–6952.
- Reed, M. L., Peeters, N. M., und Hanson, M. R. (2001). A single alteration 20 nt 5' to an editing target inhibits chloroplast RNA editing *in vivo*. *Nucleic Acid Res*, 29:1507–1513.

- Rodeheffer, M. und Shadel, G. (2003). Multiple interactions involving the amino-terminal domain of yeast mtRNA polymerase determine the efficiency of mitochondrial protein synthesis. *J Biol Chem*, 278:18695–18701.
- Ruf, S. und Kössel, H. (1997). Tissue-specific and differential editing of the two *ycf3* editing sites in maize plastids. *Curr Genet*, 32:19–23.
- Ruf, S., Zeltz, P., und Kössel, H. (1994). Complete RNA editing of unspliced and dicistronic transcripts of the intron-containing reading frame IRF170 from maize chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:2295–2299.
- Saha, D., Prasad, A., und Srinivasan, R. (2007). Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Biochem*, 45(8):521–534.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., und Ehrlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491.
- Salazar, R. A., Pring, D. R., und Kempken, F. (1991). Editing of mitochondrial *atp9* transcripts from two sorghum lines. *Curr Genet*, 20:483–486.
- Saldanha, R., Mohr, G., Belfort, M., und Lambowitz, A. M. (1993). Group I and group II introns. *FASEB J*, 7:15–24.
- Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V., und Lurin, C. (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett*, 581(22):4132–4138.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463–5467.
- Sasaki, T., Yukawa, Y., Miyamoto, T., Obokata, J., und Sugiura, M. (2003). Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts from the maternal and paternal progenitors of tobacco (*Nicotiana tabacum*): Comparative analysis shows the involvement of distinct trans-factors for *ndhb* editing. *Mol Biol Evol*, 20(7):1028–1035.
- Sasaki, T., Yukawa, Y., Wakasugi, T., Yamada, K., und Sugiura, M. (2006). A simple *in vitro* RNA editing assay for chloroplast transcripts using fluorescent di-deoxynucleotides: distinct types of sequence elements required for editing of *ndh* transcripts. *Plant J*, 47(5):802–810.

- Satoh, M., Kubo, T., Nishizawa, S., Estiati, A., Itchoda, N., und 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 Genet Genomics*, 272:247–256.
- Scaturro, M., Sala, A., Cutrona, G., Raimondi, L., Cannino, G., Fontana, S., Pucci-Minafra, I., und Di Liegro, I. (2003). Purification by affinity chromatography of H1^o RNA-binding proteins from rat brain. *Int J Mol Med*, 11(4):509–13.
- Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T., Hupfer, H., Herrmann, R., und Maier, R. (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., Tilich, M., Herrmann, R. G., und Maier, R. M. (2001). Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplast allotetraploidy provides trans-factors. *Embo J*, 20:4874–4883.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., und 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.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. E., Williams-Voelker, P. M., Kroeger, T. S., Vichas, A., und Barkan, A. (2006). A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell*, 18(10):2650–2663.
- Schuster, W. und Brennicke, A. (1991). RNA editing makes mistakes in plant mitochondria: editing loses sence in transcripts of a *rps19* pseudogene and in creating stop codons in *coxI* and *rps3* mRNAs of *Oenothera*. *Nucleic Acids Res*, 19:6923–6928.
- Shikanai, T. (2006). RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell Mol Life Sci*, 63:698–708.
- Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K., und Yokota, A. (1998). Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:9705–9709.
- Simpson, L., Sbicego, S., und Aphasizhev, R. (2003). Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA*, 9(3):265–76.

- Smith, H. (2006). Editing informational content of expressed DNA sequences and their transcripts. In Caporale, L., editor, *The implicit genome*. Oxford Univ. Press, New York, NY.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., und Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*, 67:11–19.
- Staudinger, M. (2004). In organello Elektroporation von Mitochondrien und Analyse der RNA-Prozessierung. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität.
- Staudinger, M., Bolle, N., und Kempken, F. (2005). Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric *atp6* transcripts. *Mol Genet Genomics*, 273:130–136.
- Staudinger, M. und Kempken, F. (2003). Electroporation of 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. und Kempken, F. (2004). In organello editing of mitochondrial *atp9*, *cox2*, and *nad9* transcripts. *Endocytobiosis Cell Res*, 15:551–560.
- Steinhauser, S., Beckert, S., Capesius, I., Malek, O., und Knoop, V. (1999). Plant mitochondrial RNA editing. *J Mol Evol*, 48:303–312.
- Stern, D. B. und Lonsdale, D. M. (1982). Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12-kilobase DNA sequence in common. *Nature*, 229:698–702.
- Sugiura, M. (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol Biol*, 19(1):149–168.
- Sugiyama, Y., Watase, Y., Nagase, M., Makita, N., Yagura, S., Hirai, A., und Sugiura, M. (2005). The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol Genet Genomics*, 272:603–615.
- Sutton, C., Conklin, P., Pruitt, K., und Hanson, M. (1991). Editing of pre-mRNAs can occur before *cis*- and *trans*-splicing in *Petunia* mitochondria. *Mol Cell Biol*, 11(8):4274–4277.
- Sutton, C. A., Zoubenko, O. V., Hanson, M. R., und Maliga, P. (1995). A plant mitochondrial sequence transcribed in transgenic tobacco chloroplasts is not edited. *Mol Cell Biol*, 15:1377–1381.

- Svab, Z., Hajdukiewicz, P., und Maliga, P. (1990). Stable Transformation of Plastids in Higher Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21):8526–8530.
- Swiatecka-Hagenbruch, M., Emanuel, C., Hedtke, B., Liere, K., und Börner, T. (2008). Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 36(3):785–792.
- Tabb, D., Saraf, A., und Yates, J. (2003). GutenTag: high-throughput sequence tagging via an empirically derived fragmentation model. *Anal Chem*, 75(23):6415–6421.
- Takenaka, M. und Brennicke, A. (2003). *In vitro* RNA editing in pea mitochondria requires NTP or dNTP, suggesting involvement of an RNA helicase. *J Biol Chem*, 278:47526–47533.
- Takenaka, M. und Brennicke, A. (2007). RNA editing in plant mitochondria: Assays and biochemical approaches. In *RNA Editing*, volume 424 of *Methods in Enzymology*, Seiten 439–458.
- Takenaka, M., Neuwirt, J., und Brennicke, A. (2004). Complex *cis*-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 32:4137–4144.
- Takenaka, M., Verbitskiy, D., van der Merwe, J., Zehrmann, A., und Brennicke, A. (2008). The process of RNA editing in plant mitochondria. *Mitochondrion*, 8(1):35–46.
- Takenaka, M., Verbitskiy, D., van der Merwe, J., Zehrmann, A., Plessmann, U., Urlaub, H., und Brennicke, A. (2007). *In vitro* RNA editing in plant mitochondria does not require added energy. *FEBS Lett*, 581(14):2743–2747.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., et al. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22):4673–4680.
- Till, B., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., und Barkan, A. (2001). CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA*, 7(9):1227–1238.
- Tillich, M., Funk, H., Schmitz-Linneweber, C., Poltnigg, P., Sabater, B., Martin, M., und Maier, R. (2005). Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J*, 43:708–15.

- Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B., und Maier, U. (2006a). The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol*, 23(10):1912–21.
- Tillich, M., Poltnigg, P., Kushnir, S., und Schmitz-Linneweber, C. (2006b). Maintenance of plastid RNA editing activities independently of their target sites. *EMBO Rep*, 7:308–13.
- Turmel, M., Otis, C., und Lemieux, C. (2002). The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: Insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17):11275–11280.
- Unsel, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P., und Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet*, 15:57–61.
- van der Merwe, J., Takenaka, M., Neuwirt, J., Verbitskiy, D., und Brennicke, A. (2006). RNA editing sites in plant mitochondria can share *cis*-elements. *FEBS Lett*, 580:268–72.
- Verbitskiy, D., Takenaka, M., Neuwirt, J., van der Merwe, J., und Brennicke, A. (2006). Partially edited RNAs are intermediates of RNA editing in plant mitochondria. *Plant J*, 47:408–16.
- Vidal, S., Curran, J., und Kolakofsky, D. (1990). A stuttering model for paramyxovirus P mRNA editing. *EMBO J*, 9(6):2017–22.
- Vogel, J., Börner, T., und Hess, W. (1999). Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants. *Nucleic Acids Res*, 27(19):3866–3874.
- Vogel, J., Hübschmann, T., Börner, T., und Hess, W. (1997). Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: support for MatK as an essential splice factor. *J Mol Biol*, 270(2):179–187.
- Wakasugi, T., Hirose, T., Horihata, M., Tsudzuki, T., Kossel, H., und Sugiura, M. (1996). Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:8766–70.
- Ward, B. L., Anderson, R. S., und Bendich, A. J. (1981). The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants curcubitaceae. *Cell*, 25:792–803.

- Watkins, K., Kroeger, T., Cooke, A., Williams-Carrier, R., Friso, G., Belcher, S., van Wijk, K., und Barkan, A. (2007). A Ribonuclease III Domain Protein Functions in Group II Intron Splicing in Maize Chloroplasts. *Plant Cell*, 19(8):2606–2623.
- Wehling, C. (2004). In organello prozessierung mitochondrialer transkripte höherer pflanzen. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Williams, M. A., Tallakson, W. A., Phreaner, C. G., und Mulligan, R. M. (1998). Editing and translation of ribosomal protein S13 transcripts: unedited translation products are not detectable in maize mitochondria. *Curr Genet*, 34:221–226.
- Williams, P. und Barkan, A. (2003). A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J*, 36(5):675–686.
- Wintz, H. und Hanson, M. R. (1991). A termination codon is created by RNA editing in the petunia mitochondrial *atp9* gene transcript. *Curr Genet*, 19:61–64.
- Wulff, S. (2005). Prozessierung von Transkripten in Mitochondrien Höherer Pflanzen. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Yang, A. J. und Mulligan, R. M. (1991). RNA editing intermediates of *cox2* transcripts in maize mitochondria. *Mol Cell Biol*, 11:4278–4281.
- Yu, W. und Schuster, W. (1995). Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C-to-U RNA editing of plant mitochondria. *J Biol Chem*, 270:18227–18233.
- Zdobnov, E. und Apweiler, R. (2001). InterProScan-an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17(9):847–848.
- Zeltz, P., Kadowaki, K. I., Kubo, N., Maier, R. M., Hirai, A., und Kössel, H. (1996). A promiscuous chloroplast DNA fragment is transcribed in plant mitochondria but the encoded RNA is not edited. *Plant Mol Biol*, 31:647–656.
- Zeng, W., Liao, S., und Chang, C. (2007). Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts of *Phalaenopsis aphrodite* and comparative analysis with those of other seed plants. *Plant Cell Physiol*, 48(2):362–8.

A Anhang

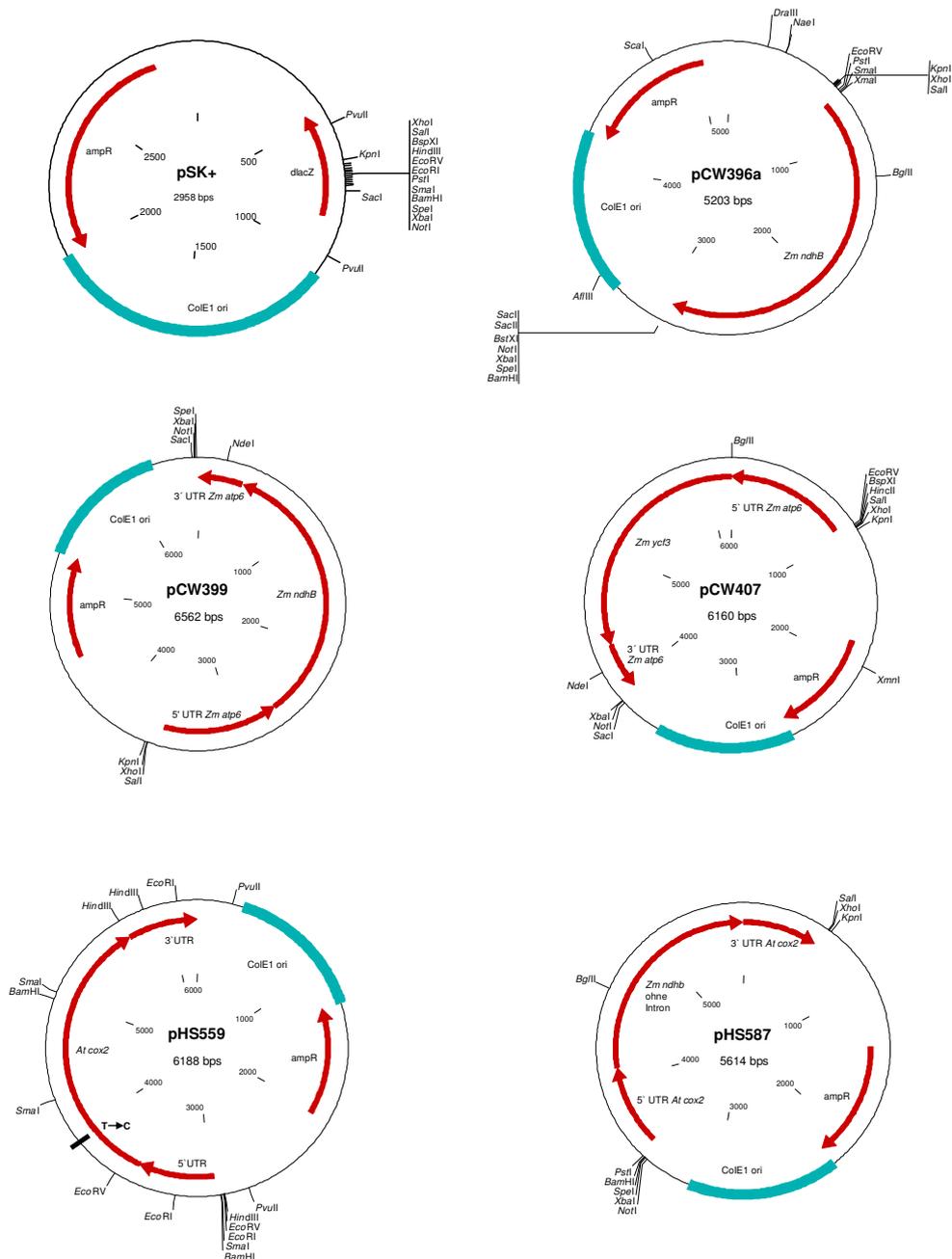
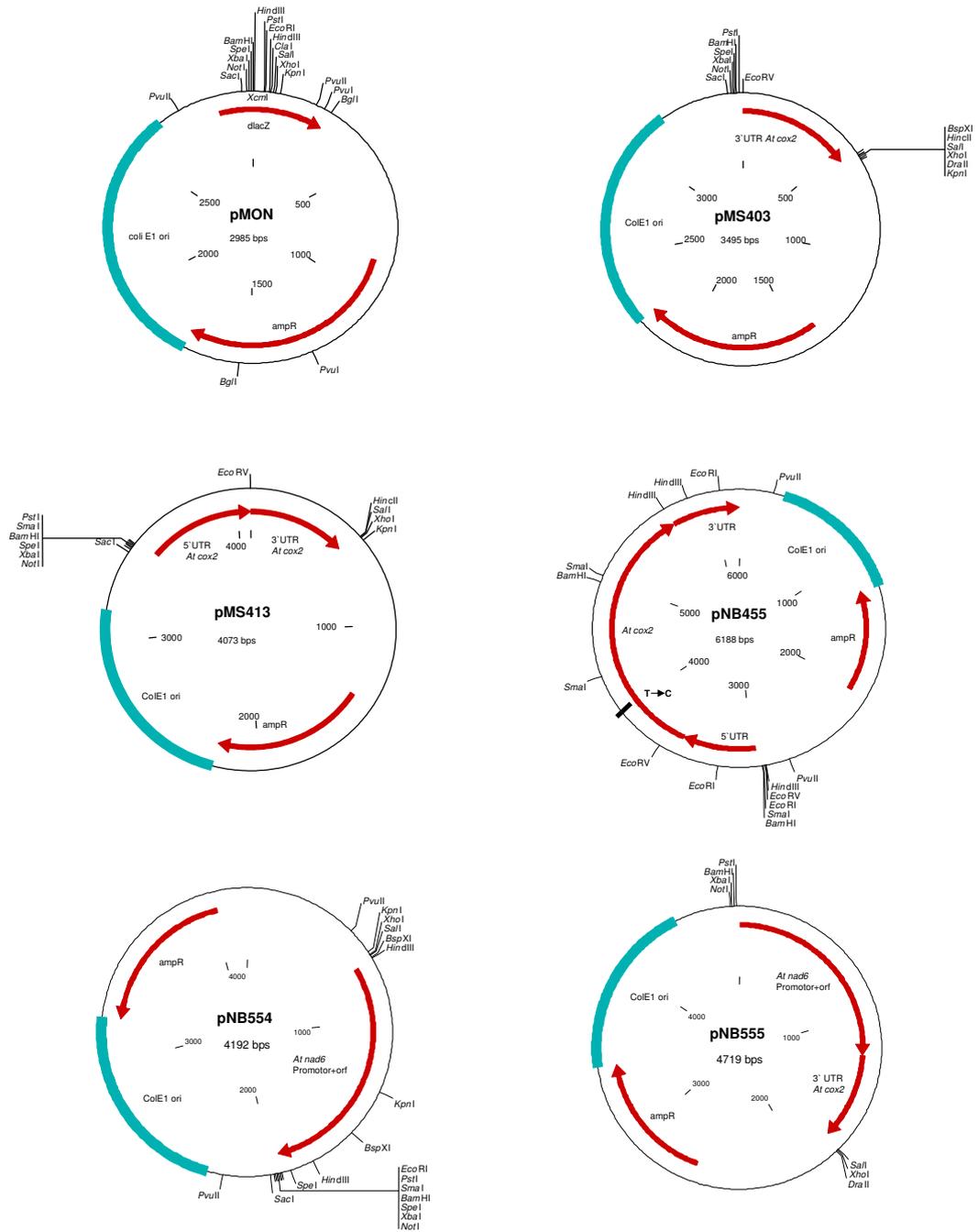
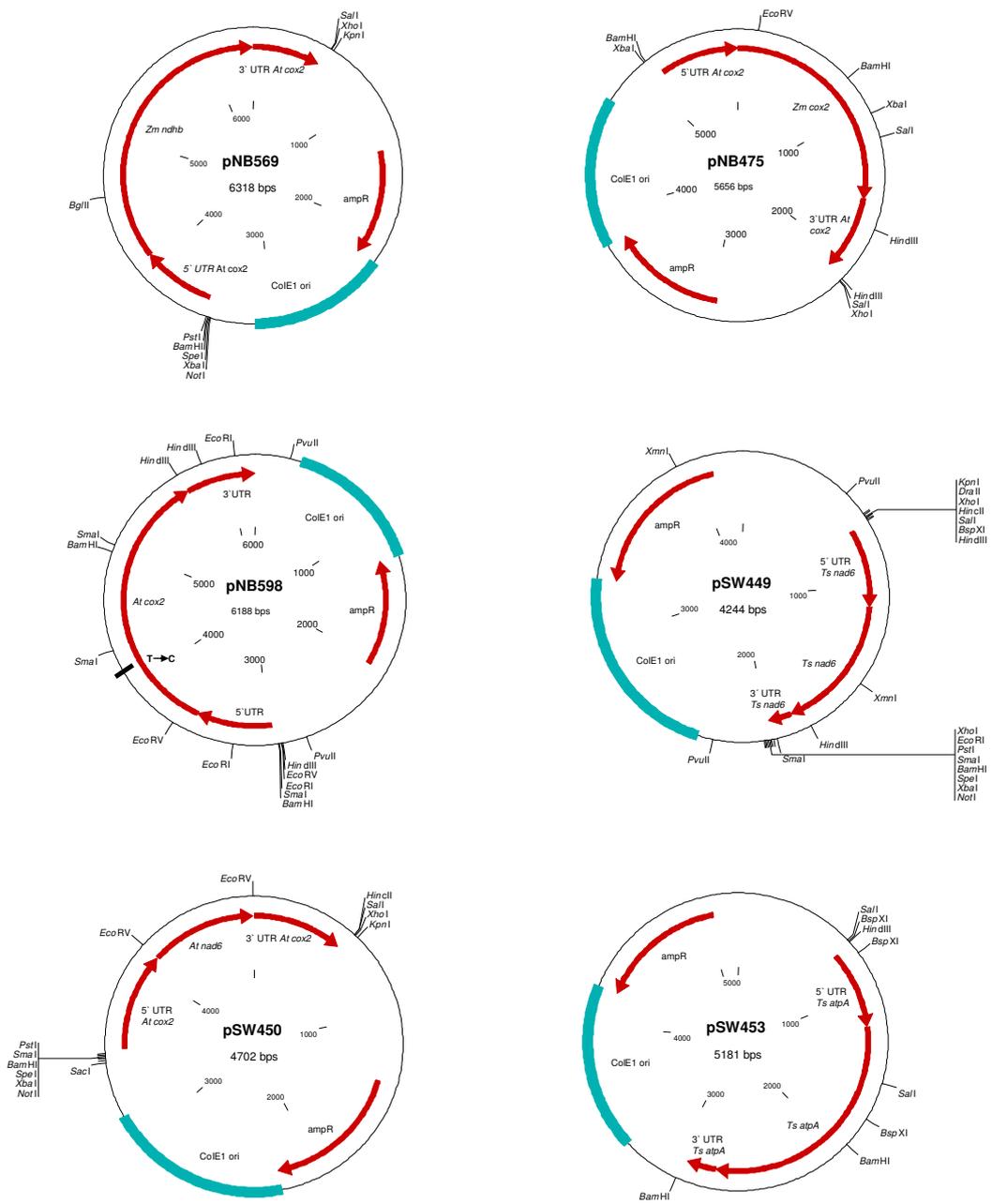


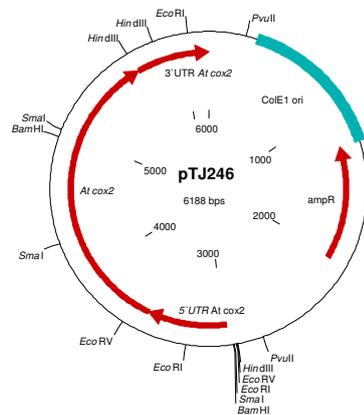
Abbildung A.1: Plasmidkarten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren



Fortsetzung zu Abbildung A.1



Fortsetzung zu Abbildung A.1



Fortsetzung zu Abbildung A.1

Schematische Darstellung der Plasmidkarten im Rahmen dieser Arbeit verwendeter und erstellter Plasmide. Genbereiche sind durch rote Pfeile dargestellt und Regionen durch blaue Balken. *At*= *A. thaliana*; *Zm*= *Z. mays*; *Ts*= *T. sativum*.

```

ATGATTGTTT TAAAATGGTT ATTCCTCACA ATTTCTCCTT GTGATGCAGC GGAACCATGG CAATTAGGAT 70
CTCAAGACGC AGCTACACCT ATAATGCAAG GAATAATAGA CTACATCAC GATATCTTTT TCTTCCTCAT 140
TCTGATTTTG GTTTTCGTAT TATGGATCTT GGTTCGCGCT TTATGGCATT TCCACTATAA AGAAAATGCA 210
ATCCCGCAAA GGATTGTTCA TGGAACTACT ATCGAGATTC TTGGACCAT CTTTCCTAGT CTCATCTCGA 280
TGTTCAATGC TATACCATCA TTTGCTCTCT TATACTCAAT GGACGAGGTA GTAGTAGATC CAGCCATTAC 350
TATCAAAGCT ATTGGACATC AATGGTATTG GACTTATGAG TATTCTGACT ATAACAGTTC CGATGAGCAG 420
TCACTCACTT TTGACAGTTA TATGATTCCA GAAGAAGATC TAGAATTGGG TCAATACGT TTATTAGAAG 490
TGGACAATAG AGTGTTGTA CCAGCCAAAA CTCATCTACG TATTATTGTA ACATCTGCTG ATGTACCTCA 560
TAGTTGGGCT GTACCTTCCT CAGGTGTCAA ATGTGATGCT GTACCTGGTC GTTTAAATCA AATCTCTATT 630
TTGGTACAAC GAGAAGGAGT TTACTATGGT CAGTGCAGTG AGATTTGTGG AACTAATCAT GCCTTTACGC 700
CTATCGTCGT AGAAGCTGTT CTAGGAAAG ATTATGGTTC TGGGTATCC AATCAATTA TCCCCAAAC 770
CGGGGAAGCT TAA 783

```

Abbildung A.2: Kodierende Sequenz des *B. oleracea var. botrytis cox2* ohne Intron

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Blumenkohl *cox2* DNA- und cDNA-Sequenz des kodierenden Bereiches bestimmt. Die Position des Introns ist hier als schwarze Linie dargestellt (bei 700 bp), die Intronsequenz ist nicht angegeben. Die RNA-Edierungspositionen sind rot unterlegt. Die kodierende Sequenz des Blumenkohl *cox2* weicht in Übereinstimmung mit der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten *A. thaliana cox2* Sequenz an zwei Positionen von der publizierten *A. thaliana cox2* Sequenz (NCBI „accession no.“ NC 001284) ab: An den Positionen +202 und +271 (relativ zum Start-Kodon) liegen jeweils die Basen Guanin und Cytosin vor. In der publizierten Sequenz hingegen sind an den entsprechenden Positionen jeweils Adenine vorhanden. Weiterhin weichen die *B. oleracea var. botrytis* und *A. thaliana cox2* Sequenzen an der Position +379 voneinander ab: In *B. oleracea var. botrytis* befindet sich hier die Base Thymin, bei *A. thaliana* ein Cytosin, welches eine RNA-Edierungsposition darstellt.

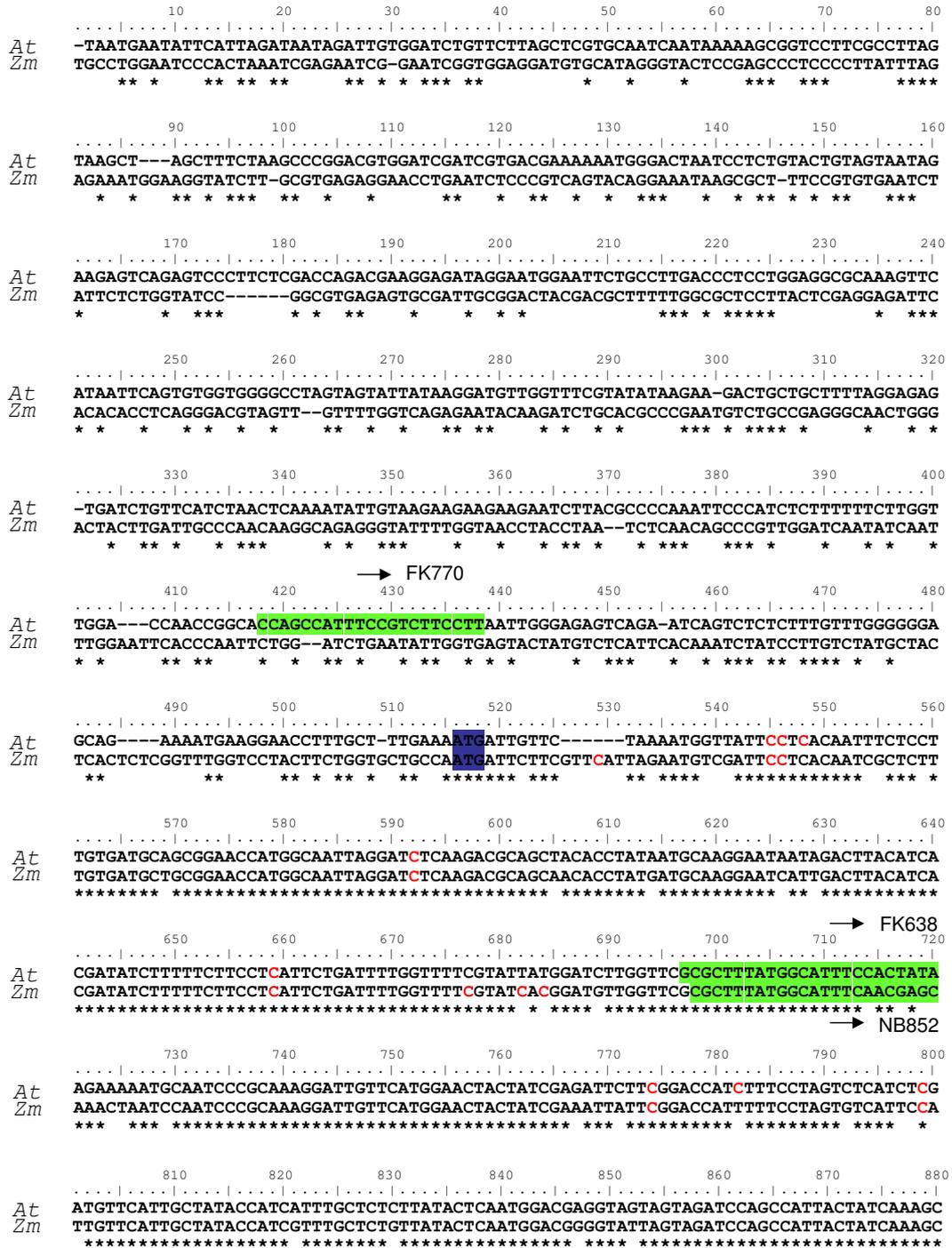
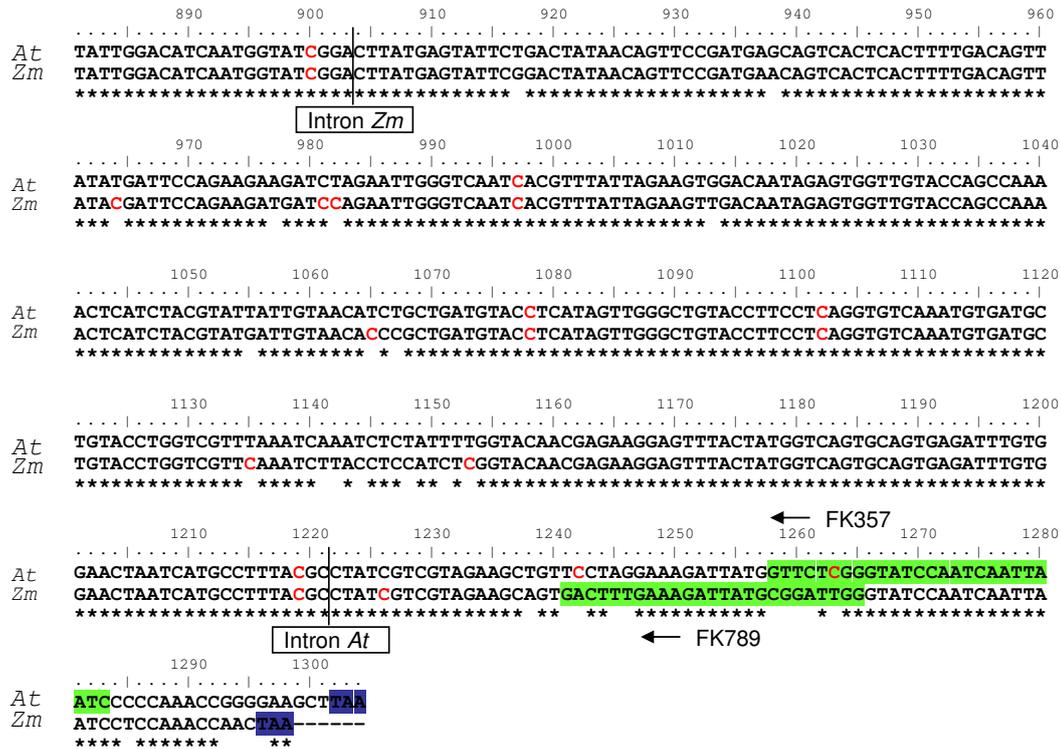


Abbildung A.3: Vergleich der *cox2* Sequenzen von *A. thaliana* und *Z. mays*



Fortsetzung zu Abbildung A.3

Für den Sequenzvergleich wurden 500 bp des 5' untranslatierten Bereichs und die kodierenden Regionen ohne Introns von *A. thaliana* (*At*) und *Z. mays* (*Zm*) *cox2* verwendet. NCBI-Einträge der Sequenzen: *Z. mays* „accession no.“ AY506529; *A. thaliana* „accession no.“ NC 001284. In der *A. thaliana* Sequenz wurde an Pos. +202 A → G und an Pos. +271 A → C geändert. Dies geschah aufgrund von mehrfach durchgeführten *A. thaliana cox2* Sequenzierungen in dieser Arbeit, in denen diese Sequenzabweichungen beobachtet wurden. Auch der Fusionsbereich der Exons von *A. thaliana* weicht von der publizierten Sequenz ab wie in Staudinger (2004) beschrieben. Die Start- und Stoppskodons sind blau unterlegt, RNA-Edierungspositionen sind in rot dargestellt und Intronpositionen sind markiert. Die Sequenzen von Oligonukleotiden sind grün unterlegt und mit einem Pfeil ist die Orientierung eingezeichnet.

	14 ↓	15 16 ↓ ↓	21 ↓
<i>Z.perennis</i> DNA (U16993)	ATACGATTCCAGAAGATGATCCAGAATTGG		TGATGCTGTACCTGGTCGTTCAAATCTG
<i>Z.perennis</i> cDNA (U16993)	..T.....TT.....	T.....
<i>A.calamus</i> DNA (AJ006146)	..T...CA.....TT.....		.C.....A.
<i>A.calamus</i> cDNA (AJ006146)	..T...CA.....TT.....		.C.....T...A.
<i>Z.mays</i> DNA (AY973492)TT.....	T...T
<i>Z.mays</i> cDNA (AY973492)TT.....	T...T
<i>T.aestivum</i> DNA (NC_007579)TT.....	T...T
<i>T.aestivum</i> cDNA (X52867)TT.....	T...T
<i>O.sativa</i> DNA (BA000029)TT.....	T...T
<i>O.sativa</i> cDNA (BA000029)TT.....	T...T
<i>A.thaliana</i> DNA (NC_001284)A...T.....	T...AA
<i>A.thaliana</i> cDNA (NC_001284)A...T.....	T...AA
<i>S.tuberosum</i> DNA (DQ185064)T.....	G...T...A.
<i>S.tuberosum</i> cDNA (DQ185064)T.....	G...T...A.
<i>Petunia</i> DNA (X17395)T.....	T...A.
<i>Petunia</i> cDNA (X17395)T.....	T...A.
<i>P.sativum</i> DNA (AJ414385)T.....	T...A.
<i>P.sativum</i> cDNA (X52866)T.....		TGG.....T...A.
<i>D.villosa</i> DNA (AF207747)T.....	T...A.
<i>D.villosa</i> cDNA (AF207747)T.....	T...A.
<i>L.formosa</i> DNA (AF208162)T.....	T...A.
<i>L.formosa</i> cDNA (AF208162)T.....	T...A.
<i>B.napus</i> DNA (AP006444)A...T.....	T...AA
<i>B.napus</i> cDNA (AP006444)A...T.....	T...AA
<i>C.lemmonii</i> DNA (AF207746)T.....	T...A.
<i>C.lemmonii</i> cDNA (AF207746)T.....	T...A.
<i>A.bracteata</i> DNA (AF207682)T.....	T...A.
<i>A.bracteata</i> cDNA (AF207682)T.....	T...A.
<i>R.sativus</i> DNA (AF036387)A..C.T.....	T...AA
<i>R.sativus</i> cDNA (AF036388)A...T.....	T...AA
<i>B.vulgaris</i> DNA (DQ381451)T.....	T...A.
<i>B.vulgaris</i> cDNA (DQ381451)T.....	T...A.
<i>N.wightii</i> DNA (AF207676)T.....	T...A.
<i>O.villaricae</i> DNA (X00212)T.....	T...A.
<i>M.pyramidata</i> DNA (U42696)T.....	T...A.
<i>N.tabacum</i> DNA (BA000042)T.....	T...A.
<i>B.rapa</i> DNA (AF036386)T.....	T...AA
<i>G.max</i> DNA (X04825)T.....	T...A.
<i>P.comosa</i> DNA (AF207674)T.....	T...A.
<i>M.tripetala</i> DNA (U43055)T.....	T...A.
<i>P.rugelii</i> DNA (AY818947)T.....	A..C..A.....T...AA

Abbildung A.4: Vergleich von *cox2* RNA-Edierungspositionen zwischen mono- und dikotylen Pflanzen

	24	25
	↓	↓
<i>Z.perennis</i> DNA (U16993)	CTATCGT	CGTAGAAGCAGT
<i>Z.perennis</i> cDNA (U16993)
<i>A.calamus</i> DNA (AJ006146)G.....TT.CA.....
<i>A.calamus</i> cDNA (AJ006146)G.....TT.CA.....
<i>Z.mays</i> DNA (AY973492)
<i>Z.mays</i> cDNA (AY973492)T.....
<i>T.aestivum</i> DNA (NC_007579)
<i>T.aestivum</i> cDNA (X52867)
<i>O.sativa</i> DNA (BA000029)G.....
<i>O.sativa</i> cDNA (BA000029)G.....
<i>A.thaliana</i> DNA (NC_001284)T..TC..AG.....
<i>A.thaliana</i> cDNA (NC_001284)T..TT..AG.....
<i>S.tuberosum</i> DNA (DQ185064)T..TC..AG.....
<i>S.tuberosum</i> cDNA (DQ185064)T..TT..AG.....
<i>Petunia</i> DNA (X17395)T..TC..AG.....
<i>Petunia</i> cDNA (X17395)T..TCT..AG.....
<i>P.sativum</i> DNA (AJ414385)T..TC..AGT.....
<i>P.sativum</i> cDNA (X52866)N.....T..TT..AGT.....
<i>D.villosa</i> DNA (AF207747)T..TC..ACT.....
<i>D.villosa</i> cDNA (AF207747)T..TT..ACT.....
<i>L.formosa</i> DNA (AF208162)T..TC..ACT.....
<i>L.formosa</i> cDNA (AF208162)T..TT..ACT.....
<i>B.napus</i> DNA (AP006444)T..TC..AG.....
<i>B.napus</i> cDNA (AP006444)T..TT..AG.....
<i>C.lemmonii</i> DNA (AF207746)T..TC..ACT.....
<i>C.lemmonii</i> cDNA (AF207746)T..TT..ACT.....
<i>A.bracteata</i> DNA (AF207682)GAT..CT.....T..TT..ACT.....
<i>A.bracteata</i> cDNA (AF207682)GAT..CT.....T..TC..ACT.....
<i>R.sativus</i> DNA (AF036387)T..TC..AG.....
<i>R.sativus</i> cDNA (AF036388)T..TT..AG.....
<i>B.vulgaris</i> DNA (DQ381451)T..TT..AG.....
<i>B.vulgaris</i> cDNA (DQ381451)T..TT..AG.....

Fortsetzung zu Abbildung A.4

Für den Sequenzvergleich wurden die *cox2* Sequenzen von cDNA und genomischer DNA aus Einträgen in der Datenbank des NCBI verwendet, die entsprechenden „accession no.“ sind in Klammern angegeben. Dargestellt sind die Sequenzvergleiche um *Z. mays* *cox2* RNA-Edierungspositionen (a) 14, 15 und 16, (b) 21, (c) 24, sowie *A. thaliana* *cox2* RNA-Edierungsposition 25. Die zu der *Z. perennis* *cox2* Sequenz identischen Nukleotide sind mit Punkten dargestellt, die abweichenden Nukleotide sind angegeben. Da für einige Pflanzen nur partielle *cox2* DNA-Sequenzen vorlagen, fehlen für diese entsprechende Sequenzbereiche um die RNA-Edierungspositionen 15 und 25.

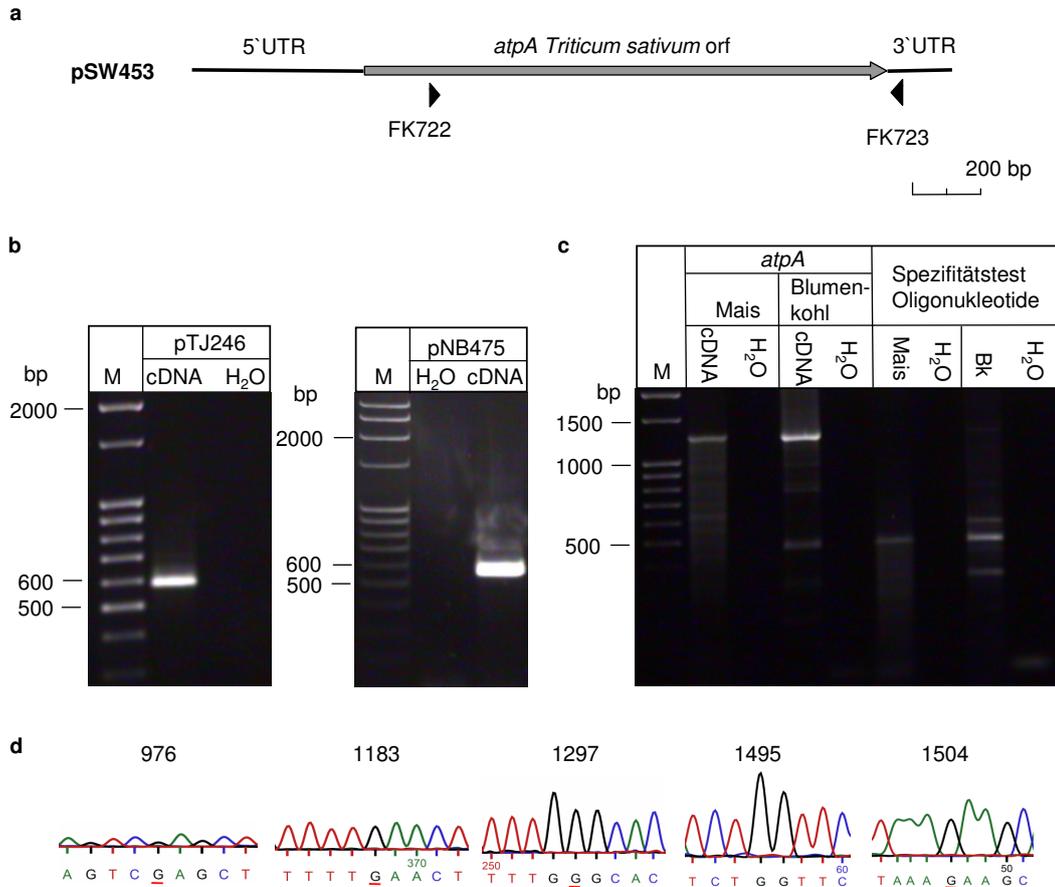


Abbildung A.5: Analyse der RNA-Edierung des *T. sativum atpA* Transkriptes nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl

a Schematische Darstellung des *T. sativum atpA*-Gens im Plasmid pSW453. Die Lokalisation der zur Amplifikation von cDNA verwendeten Oligonukleotide FK722 und FK723 ist mit Dreiecken eingezeichnet. UTR= untranslatierte Region. **b** Gelelektrophoretische Auftrennung von cDNA und entsprechenden H₂O-Kontrollen von RNA aus Mitochondrien aus Mais, elektroporiert mit dem Plasmid pTJ246 und RNA aus Blumenkohl elektroporiert mit dem Plasmid pNB475. Hierbei handelt es sich um eine Aktivitätskontrolle der in **c** und in Abb. A.6c verwendeten Mitochondrien. Die *cox2* Transkripte wurden in den heterologen Mitochondrien effizient gespleißt und ediert (nicht gezeigt). M= Größenmarker. **c** Das Plasmid pSW453 mit dem *atpA* Gen aus *T. sativum* wurde durch Elektroporation in Mais- und Blumenkohl-Mitochondrien eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden FK722 und FK723 durchgeführt. Hier zu sehen ist die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNAs und der H₂O-Kontrollen der RT-PCR mit der RNA aus den transformierten Mitochondrien, sowie mit RNA aus untransformierten Mitochondrien zur Spezifitätskontrolle der Oligonukleotide. Es konnten hierbei RT-PCR-Fragmente auf ca. der erwarteten Höhe von 1244 bp in allen Proben amplifiziert werden, auch in der Spezifitätskontrolle. In der Sequenzierung konnte aber eine spezifische Amplifikation der *atpA* cDNA Fragmente aus der Transformation von pSW453 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). **d** Die Ausschnitte des Chromatogramms zeigen die fünf untersuchten der insgesamt sieben RNA-Edierungspositionen des *T. sativum atpA* Transkriptes (aus der Transformation von pSW450 in Mais-Mitochondrien) in revers komplementärer Sequenz. An keiner der untersuchten Positionen ist RNA-Edierung feststellbar. Die Edierungspositionen sind rot unterstrichen und entsprechend ihrer Position im offenen Leserahmen nummeriert.

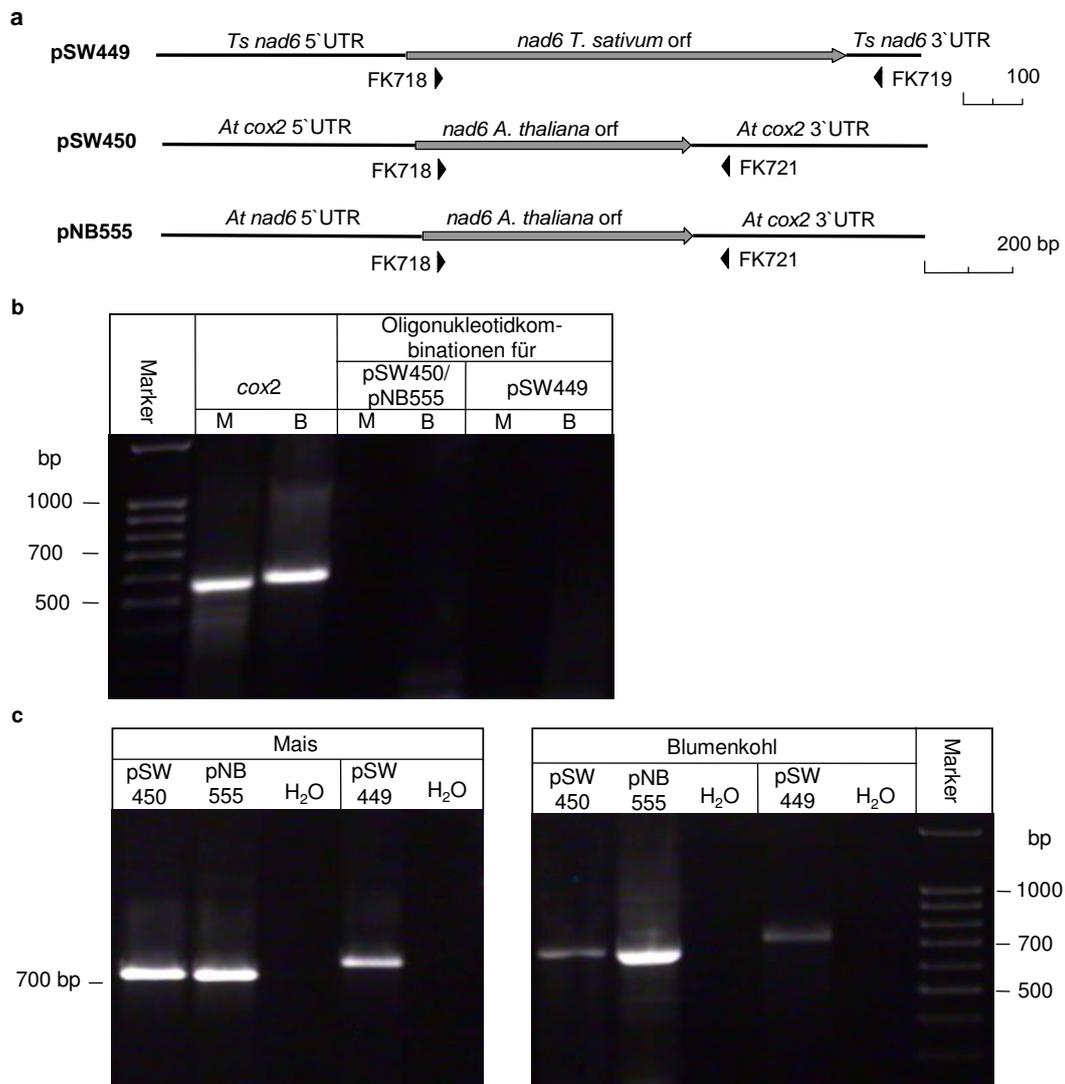


Abbildung A.6: Analyse der RNA-Edierung der *nad6* Transkripte nach *in organello* Inkubation in Mitochondrien aus Mais und Blumenkohl

a Schematische Darstellung des *T. sativum nad6* (*Ts*) Gens im Plasmid pSW449, sowie der kodierenden Sequenz des *A. thaliana* (*At*) *nad6* Gens mit den untranslatierten Regionen (UTR) aus *A. thaliana cox2* im Plasmid pSW450 bzw. mit dem *A. thaliana nad6* Promotor und der 3' untranslatierten Region des *A. thaliana cox2* im Plasmid pNB555. Die Lokalisation der zur Amplifikation von cDNA verwendeten Oligonukleotide FK718 und FK719 bzw. FK721 ist mit Dreiecken eingezeichnet. **b** Spezifitätstest der Oligonukleotidkombinationen mit RNA aus untransformierten Mitochondrien aus Mais (M) und Blumenkohl (B) und Integritätstest der verwendeten RNAs durch Amplifikation eines Fragmentes aus dem jeweiligen endogenen *cox2* Transkript mit den Oligonukleotidkombinationen NB852/FK789 für Mais-RNA und FK638/FK357 für Blumenkohl-RNA. **c** Die Plasmide pSW449, pSW450 und pNB555 wurden durch Elektroporation in Mais- und Blumenkohl-Mitochondrien eingebracht. Nach der *in organello* Inkubation wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und eine RT-PCR mit den in **a** dargestellten spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Hier zu sehen ist die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNAs und der H₂O-Kontrollen der RT-PCR. Für alle drei Konstrukte konnten cDNAs der erwarteten Größe, mit 727 bp für Transkripte von pSW450 und pNB555, und 732 bp für Transkripte von pSW449, amplifiziert werden.

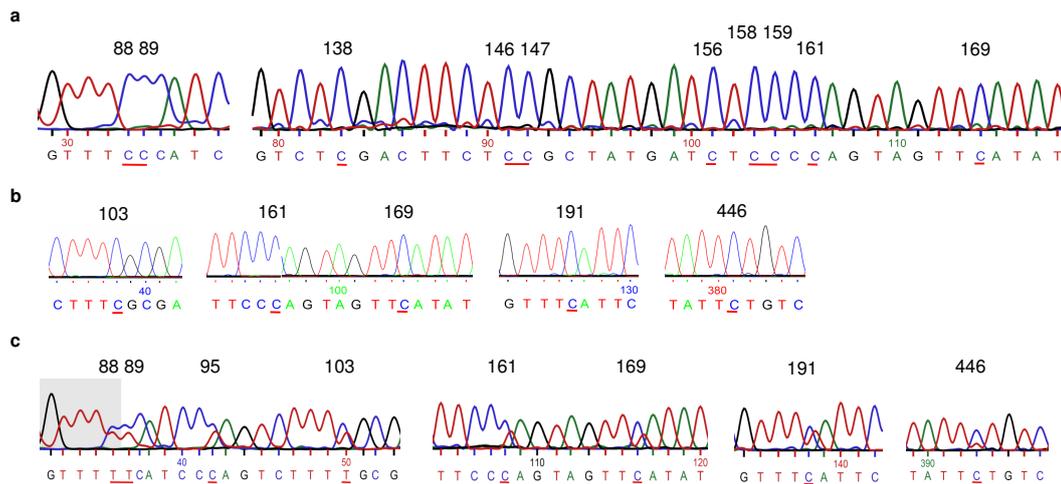


Abbildung A.7: RNA-Edierungspositionen des *B. oleracea var. botrytis nad6* Transkriptes und Analyse der Edierung von *nad6* Transkripten in heterologen Mitochondrien

a Sequenzierung der *nad6* cDNA Fragmente aus der Transformation von pSW449 in Mitochondrien aus Mais. Die Ausschnitte des Chromatogramms zeigen zehn der fünfzehn RNA-Edierungspositionen des *nad6* Transkriptes aus *T. sativum*. **b** Sequenzierung der *nad6* cDNA Fragmente aus Transformation von pSW450 in Mitochondrien aus Mais. Die Ausschnitte des Chromatogramms zeigen fünf der zehn RNA-Edierungspositionen des *nad6* Transkriptes aus *A. thaliana*. An keiner der untersuchten Positionen ist RNA-Edierung feststellbar. **c** Sequenzierung der cDNA des endogenen *nad6* Transkriptes aus Blumenkohl. Hierfür wurde eine RT-PCR mit DNA-freier RNA aus Blumenkohl-Mitochondrien und den Blumenkohl *nad6*-spezifischen Oligonukleotiden FK718 und FK713 durchgeführt und die erhaltene cDNA wurde sequenziert. Durch einen Abgleich mit der entsprechenden DNA Sequenz (*B. oleracea var. botrytis nad6*, NCBI „accession no.“ DQ257687) konnten im analysierten Bereich RNA-Edierungspositionen identifiziert werden. Hier sind die Ausschnitte des Chromatogramms mit den entsprechenden Positionen gezeigt. Die im analysierten Bereich vorliegenden acht Edierungspositionen stimmen mit denen aus *A. thaliana* bekannten überein (Giege und Brennicke, 1999), werden allerdings nur partiell ediert. In den Ausschnitten der Chromatogramme sind die RNA-Edierungspositionen rot unterstrichen und ihre Position im offenen Leserahmen ist angegeben.

Tabelle A.1: Edierungspositionen des *Brassica oleracea* var. *botrytis nad6* Transkriptes und in *organello* Edierung des *A. thaliana nad6* Transkriptes

Edierungspositionen im <i>A. thaliana nad6</i> Transkript ¹	Edierungspositionen im <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis nad6</i> Transkript ²	<i>A. thaliana</i> RNA-Edierungspositionen untersucht in <i>organello</i> in Mitochondrien aus Blumenkohl (pSW450/pNB555)	<i>A. thaliana</i> RNA-Edierungspositionen untersucht in <i>organello</i> in Mitochondrien aus Mais (pSW450/pNB555)
26	+	na/na	na/na
53	+	na/na	na/ -
88	(+)	na/na	-/-
89	(+)	na/na	-/-
95	(+)	na/-	-/-
103	(+)	na/ -	-/-
161	(+)	-/-	-/-
169	(+)	-/-	-/-
191	(+)	-/-	-/-
446	(+)	-/-	-/-

¹NCBI „accession no.“: NC 001284; Positionsangaben relativ zum Start-Kodon

²Position 88 bis 446: diese Arbeit; ansonsten Raczynska et al., 2006

- = keine RNA-Edierung ; + = RNA-Edierung; (+) = partielle RNA-Edierung; na = nicht analysiert

Tabelle A.2: Edierungspositionen des *T. aestivum nad6* Transkriptes und *in organello* Edierung des *T. sativum nad6* Transkriptes

Edierungspositionen im <i>T. aestivum nad6</i> Transkript ¹	<i>T. sativum nad6</i> RNA- Edierungspositionen untersucht <i>in organello</i> in Mitochondrien aus Blumenkohl (pSW449)	<i>T. sativum nad6</i> RNA- Edierungspositionen untersucht <i>in organello</i> in Mitochondrien aus Mais (pSW449)
25	na	na
26	na	na
88	-	-
89	-	-
138	-	-
146	-	-
147	-	-
156	-	-
158	-	-
159	-	-
161	-	-
169	-	-
191	-	-
446	-	-
569	-	-

¹Haouazine et al., 1992; Positionsangaben relativ zum Start-Kodon (aus Haouazine-Takvorian et al., 1997)

- = keine RNA-Edierung ; na = nicht analysiert

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Ta  G T C T G G T C A G G A A G A C T C G G A A T C A T T C T C A C G G C C A C C C C A C A C G G G A G C G G C T T C T C G C C A A T C G A T C A T C A C T T G C
Zm  ----- G G C C A G C C A G G A T C T G A G A T T C C A T G T G T C C T A C T T C T C T C G C -- C T T G G A G G A T A T G T C G C G A T G A A T G A
At  ----- T C G T T C T A C T C C G A A T A G A A G G C T G A G T C C T T A C A C G C C G C A ----- A A T A T A G A A T T G C C G G A - G G

      90      100     110     120     130     140     150     160
Ta  A T A C A A A A A A A G C C C T T T T C C A A T G G A A A C C T G G G A A A T A C A G T T G C T C A A T T C A T T C G A T T T C G A A A T A G C G T A T A
Zm  A T A - A A A G G C A G C T G T C T C G A T T G G C A A T A G C A T T T C G A G T T G T G T T T T T T C A G A C - T T G A A T A T T G A T C T G G C G C A
At  A T T A C A A C G G A T C C A G G A A A T G G A C G T A A C C T G G A G A A C G A G A G G T - C T C C T A C C T G G C G G G A A C T A G C C G G C C G

      170     180     190     200     210     220     230     240
Ta  A A G T G A T T C T T G C A A T T T C A --- C T G C A --- G G C A G C G T A G C A A T T C T C G C G G A A T C T C G G T C T T G T T T G G C
Zm  G A C T T C T A G T G G T A G T C C A A A C T C T G A A T G A G A A T G C A A G C A A G G A A G C T C C A A T G C A A T G G T G A C T A C T T A G C G C
At  C A T C G A T - - T G G A G G T C C C G A G C T G C A G G G A A A G T G C G C G C A A T C G C C C T G G A T A T G T A C G A G A T C T C A A C T

      250     260     270     280     290     300     310     320
Ta  C G A T C C T T A A C G - A G A C C T A G T C G A A - - A G C G C C C A T A A A A G A G T A A A T C G T T T T C G G T A T G G G T A C G C T G G C C C C T
Zm  C G C T A T G T G A G A A - G C G G T A T C A A A G A A T A G C A G G A A T C A A A T A A G C A C A G C T T C T C T T C A T A T A --- T A G T T T A T
At  C G A C A T A T G G A G C A G G G C T T G A T C A G G A A T T A G T A A G G C A A C A G G A A T G A G T C C G C C T C G A A G A --- A G A A G G T

      330     340     350     360     370     380     390     400
Ta  A C G A G G G C C G T A A G C A A G G T A G A G A C A G G A G C A G C A C G C G A A G G G T C T T C C C A T C T C T T C T G T A T T C T C T T T G -
Zm  C G C T A T G T G A G A A - G C G G T A T C A A A G A A T A G C A G G A A T C A A A T A A G C A C A G C T T C T C T T C A T A T A --- T A G T T T A T
At  T T T A T C T T G A T G A G A A G C T C T C T A A A T T A A T T C A A G A C T G C C T T G A T T T T C C A G T T A T T A C T C G A G C G C C T G A G G C

      410     420     430     440     450     460     470     480
Ta  --- T C C G A G A T G C C C G C T T C - - A C C A A T G A G A A --- T T C A A A T C G A G A T T G T G T C A A G T A A A G A A C T T T T T C T T G A
Zm  A A C T C T G A A C T A A G C T G C T - - A G T A G G T A T G C - - - - - T T C C C T C C A G C A C C T T G A A G A T C G A G G T T T T T C T T T T T G A
At  T T G A A C C A A A G C C T T T T A G T G A T T A G T C T G C T A G T T T C T T T G A T C T T A G T C G T G T A A A T T A T C C T T T T T T T T T C T

      490     500     510     520     530     540     550     560
Ta  A A - G C G G A T T T C C C C T C A A A A T A T C A T C C A C T A A T T T G T - T A A A G T A T G G A A T T C T C A C C C A G A G C T G C G G A A C T C A
Zm  A A A G C G G A T T T A T C C A T C - - - G T C T T T G T T T G T T A A A G T A A A G T A A G T A T G G A A T T C T C A C C A A G A G C T G C G G A A C T C A
At  A A A G C G G A T T C T C C T T - - - - - G C C T C T T A A T T A A A A A T - G C A A T T A T G G A A T T A T C T C C T A G A G C T G C G G A A C T A A

      570     580     590     600     610     620     630     640
Ta  C G A C T C T A T T A G A A A G T A G A A T G A C C A A C T T T T A C A C G A A T T T T C A A G T G G A T G A G A T C G G T C G A G T G G T C T C A G T T G G A
Zm  C G A C T C T A T T A G A A A G T A G A A T G A T C A A C T T T T A C A C G A A T T T G A A G T G G A T G A G A T C G G T C G A G T G G T C T C A G T T G G A
At  C G A T C T A T T C G A A A G T C G A A T A G G A A C T T T T A C C G A A T T T T C A A G T G G A T G A G A T C G G T C G A G T G G T C T C A G T T G G A

      650     660     670     680     690     700     710     720
Ta  G A T G G G A T T G C A C G T G T T T A T G G A T T G A A C G A G A T T C A A G C A G G A G A A A T G G T G G A A T T G C C A G C G G T G T G A A A G G A A T
Zm  G A T G G G A T T G C A C G A G T T T A C G G A T T G A A C G A G A T T C A A G C A G G A G A A A T G G T G G A A T T G C C A G C G G T G T G A A A G G A A T
At  G A T G G G A T T G C A C A G T T T A T G G A T T G A A C G A G A T T C A A G C T G G C G A A A T G G T C T T T T T G C C A A C G G T G T G A A A G G A A T

      730     740     750     760     770     780     790     800
Ta  C G C C T T A A A T C T T G A G A A T G A G A A T G A G G T A T T G T T G T C T T T G G T A G T G A T A C C G C T A T T A A A G A A G G A G A T C T T G T C A
Zm  A G C C T T G A A T C T T G A G A A T G A G A A T G A G G T A T T G T T G T C T T T G G T A G T G A T A C C G C T A T T A A A G A A G G A G A T C T T G T C A
At  G G C C T T G A A T C T T G A G A A T G A G A A T G C G G C A T T G T T G T C T T T G G T G G T G A T A C C G C T A T A A A G A A G G A G A T C T T G T C A

      810     820     830     840     850     860     870     880
Ta  A G C C A C T G G A T C T A T T G T G G A T G T T C C T G C G G G A A A G G C C A T G T A G G C C G T G T G T C G A C G C C T T G G G A G T A C C T A T T
Zm  A G C C A C T G G A T C T A T T G T G G A T G T T C C T G C G G G A A A G G C C A T G T A G G C C G T G T G T C G A C C C T T G G G A G T A C C T A T T
At  A G C C A C T G G A T C T A T T G T G G A T G T T C C C G C G G G A A A G G C T A T G C T A G G C C G T G T G T C G A C C G A T G G G A G T A C C T A T T

      890     900     910     920     930     940     950     960
Ta  G A T G G A A A A G G G C T C T A A G C G A T C A C G A A C G A A G A C G T G T G A A G T G A A A G C C C C A G G G A T T A T T G A A C G T A A A T C T G T
Zm  G A T G G A A A A G G G C T C T A A G C G A T C A C G A A C G A A G A C G T G T C G A A G T G A A A G C C C C A G G G A T T A T T G A A C G T A A A T C T G T
At  G A T G G A A A A G G G C T C T A A G C G A T C A C G A G C A A A A G A C G T G C G A A G T G A A A G C C C C T G G G A T T C T T G A A C G T A A A T C A C T

```

Abbildung A.8: Vergleich der *atpA* Sequenzen von *T. sativum*, *Z. mays* und *A. thaliana*

	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Ta	GCACGAACCCATGCAAAACAGGCTTAAAAGCAGTGGATAGCCTGGTTCCATAGGCCGTGGTCAACGAGAACCTATAATCG							
Zm	CCACGAACCTATGCAAAACAGGCTTAAAAGCAGTGGATAGCCTGGTTCCATAGGCCGTGGTCAACGAGAACCTATAATCG							
At	GCACGAGCCTATGCAAAACAGGCTTAAAAGCGTATAGTAGCCTGGTTCCATAGGCCGTGGTCAACGAGAACCTATAATCG							
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Ta	GGGACAGACAAACTGGAAAACTGCAATAGCTATCGATACTATATAAACCAAAGCAAATGAACTCAAGGGGCACAAAT							
Zm	GGGACAGACAAACTGGAAAACTGCAATAGCTATCGATACTATATAAACCAAAGCAAATGAACTCAAGGGGCACAAAT							
At	GTGCGCGACAAACTGGAAAACTGCAATAGCTATCGATACTATATAAACCAAAGCAAATGAACTCAAGGGGCACAAAT							
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Ta	GAGAGTGAGACATTGTATTGTCTATGTTGCGATTGGACAAAAACGCTCGACTGTGGCACAATTAGTTCAAATTCCTTC							
Zm	GAGAGTGAGACATTGTATTGTCTATGTTGCGATTGGACAAAAACGCTCGACTGTGGCACAATTAGTTCAAATTCCTTC							
At	GAGAGTGAGACAATTGTATTGTCTATGTTGCGATTGGACAAAAACGCTCGACTGTGGCACAATTAGTTCAAATTCCTTC							
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
Ta	AGAAGCGAATGCTTTGGAATATCCATTCTTGTAGCAGCCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCGCAATTCCTGGCCCCAT							
Zm	AGAAGCGAATGCTTTGGAATATCCATTCTTGTAGCAGCCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCGCAATTCCTGGCCCCAT							
At	AGAAGCGAATGCTTTGGAATATCCATTCTTGTAGCAGCCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCGCAATTCCTGGCCCCAT							
	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
Ta	ATTCAAGGTGTGCCATGGGGGAATATTTCCCGGATAATGGAATGCAGGCATTAATTATATATGATGATCTAAGTAAACAG							
Zm	ATTCTGGGTGTGCCATGGGGGAATATTTCCCGGATAATGGAATGCAGGCATTAATTATATATGATGATCTAAGTAAACAG							
At	ATTCCGGGTGTGCCATGGGGGAATATTTCCCGGATAATGGAATGCAGGCATTAATTATATATGATGATCTAAGTAAACAG							
	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Ta	CCGGTGGCATATCGACAAATGCATTATTGTTACGCCGACCACCGCCGTGAGGCTTTCCAGGGGATGTTTTCTATTT							
Zm	CCGGTGGCATATCGACAAATGCATTATTGTTACGCCGACCACCGCCGTGAGGCTTTCCAGGGGATGTTTTCTATTT							
At	CCGGTGGCATATCGACAAATGCATTATTGTTACGCCGACCACCGCCGTGAGGCTTTCCAGGGGATGTTTTCTATTT							
	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520
Ta	ACATTCCCGTCTCTTAGAAAGAGCCGCTAAACGATCGGACCAGACAGGTGCAGGTAGCTCGACTGCGTTACCCGATGTTG							
Zm	ACATTCCCGTCTCTTAGAAAGAGCCGCTAAACGATCGGACCAGACAGGTGCAGGTAGCTCGACTGCGTTACCCGATGTTG							
At	ACATTCCCGTCTCTTAGAAAGAGCCGCTAAACGATCGGACCAGACAGGTGCAGGTAGCTCGACTGCGTTACCCGATGTTG							
	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
Ta	AAACACAAGCTGGAGACGTATCGGCCATATATCCACCAATGTGATCTCCATTACAGATGGACAAATCTGTTTGGAAACA							
Zm	AAACACAAGCTGGAGACGTATCGGCCATATATCCACCAATGTGATCTCCATTACAGATGGACAAATCTGTTTGGAAACA							
At	AAACACAAGCTGGAGACGTATCGGCCATATATCCACCAATGTGATCTCCATTACAGATGGACAAATCTGTTTGGAAACA							
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Ta	GAGCTCTTTTATCGCGGAATTAGACCAGCTATTAACGTTGGCTTATCCGTCAGTCGCGTCGGGTCGCGCTCAGTTGAA							
Zm	GAGCTCTTTTATCGCGGAATTAGACCAGCTATTAACGTTGGCTTATCCGTCAGTCGCGTCGGGTCGCGCTCAGTTGAA							
At	GAGCTCTTTTATCGCGGAATTAGACCAGCTATTAACGTTGGCTTATCCGTCAGTCGCGTCGGGTCGCGCTCAGTTGAA							
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
Ta	AGCTATGAAACAAGTCTGCGGTAGTTAAAACCTGGAATTGGCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCCTTCGCTCAATTTGGGT							
Zm	AGCTATGAAACAAGTCTGCGGTAGTTAAAACCTGGAATTGGCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCCTTCGCTCAATTTGGGT							
At	AGCTATGAAACAAGTCTGCGGTAGTTAAAACCTGGAATTGGCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCCTTCGCTCAATTTGGGT							
	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840
Ta	CAGACCTTGATGCTGCGACTCAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTGCACAAACAACCACAATATGAA							
Zm	CAGACCTTGATGCTGCGACTCAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTGCACAAACAACCACAATATGAA							
At	CAGACCTTGATGCTGCGACTCAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTGCACAAACAACCACAATATGAA							
	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
Ta	CCACTTCCAATTGAAAAACAAATGTTGTCATTTATGCTGCTGTCAACGGCTTCTGTGATCGAATGCCACTAGACAGAAT							
Zm	CCACTTCCAATTGAAAAACAAATGTTGTCATTTATGCTGCTGTCAACGGCTTCTGTGATCGAATGCCACTAGACAGAAT							
At	CCACTTCCAATTGAAAAACAAATGTTGTCATTTATGCTGCTGTCAACGGCTTCTGTGATCGAATGCCACTAGACAGAAT							

Fortsetzung zu Abbildung A.8



Fortsetzung zu Abbildung A.8

Die *atpA* Sequenzen der kodierenden Regionen sowie 500 bp der 5' untranslatierten Bereiche und 300 bp der 3' untranslatierten Bereiche sind folgenden Einträgen des NCBI entnommen: *T. aestivum* (Ta): „accession no.“ AP008982; *Z. mays* (Zm): „accession no.“ AY506529; *A. thaliana* (At): „accession no.“ Y08501. Im mitochondrialen Genom von *Z. mays* liegen die beiden *atp1* Kopien *atp1-a1* und *atp1-a2* vor. Da diese identisch sind, ist hier nur eine Sequenz angegeben. Die Start- und Stopp-Kodons sind mit blauen Buchstaben und die RNA-Edierungspositionen mit roten Buchstaben gekennzeichnet. Die grün unterlegten Bereiche kennzeichnen die Lage der Oligonukleotide FK722 und FK723. Im Fall der *T. aestivum* Sequenz beruhen die Angaben über die Lage der RNA-Edierungspositionen auf den für Triticale bekannten RNA-Edierungspositionen (Laser et al., 1995). Für *A. thaliana* wurden die Angaben über die RNA-Edierungspositionen dem genannten NCBI-Eintrag entnommen. Für *Z. mays atp1* sind keine RNA-Edierungspositionen bekannt. Übereinstimmende Sequenzbereiche sind schwarz unterlegt.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
At  -----ATTGATAGACAGAAG--AATCATGGTTTGCACTTCCGTGTACTAGCT-----AAAGCTTTACGT
Bo  -----ATTGATAGACAGAAG--AATCATGGTTTGCACTTCCGTGTACTAGCT-----AAAGCTTTACGT
Ta  -----ATTGATAGACAGAAG--AATCATGGTTTGCACTTCCGTGTACTAGCT-----AAAGCTTTACGT
Zm  -----ATTGATAGACAGAAG--AATCATGGTTTGCACTTCCGTGTACTAGCT-----AAAGCTTTACGT

      90      100     110     120     130     140     150     160
At  CTATCTGGTGGAGATCATATTCCAGCGGGTACAGTAGTAGG--TAAACTTGAAGGAGACAGAGAGTCAACTTTGGGTTT
Bo  CTATCTGGTGGAGATCATATTCCAGCGGGTACAGTAGTAGG--TAAACTTGAAGGAGACAGAGAGTCAACTTTGGGTTT
Ta  GCGAAATACGGCTTCCTTAATATCCAATTTCAACAAGGGGGCTGGGCTGCTCCCTTCATAGAAAGGCGACCGGGCTA
Zm  AGAGTAGATATGGACTTTTCCTCATAAAGCCTATATAGG--TGGTGTGATCATAGTAAGTCTTTTCTACTGATGT-

      170     180     190     200     210     220     230     240
At  GTTGATTTACT--GCGCGATGATTATGTTGAAAAGATCG--AAGCCGCGGTATCTTT--TTCACCTCAAGATTGGAT
Bo  GTTGATTTACT--T-GCGCGATGATTATGTTGAAAAGATCG--AAGCCGCGGTATCTTT--TTCACCTCAAGATTGGAT
Ta  GATTAGATCTTCGCTTTTATAGAAAGAAAAGAGAGTAAAGGGGGGGTTTGGAGATTCTTCAAGAATGCATGG
Zm  GTTGAGTCAATGGCTTGATTCCTCCGGCGGTGAATG--GAAGGGCCAAAGGTTTACA--ATGAAACAATATGCGATATA

      250     260     270     280     290     300     310     320
At  CTCGCTACCATAACCAC-----AAGGCTATCTGAGTTC--ACAGGTTTAGTTGCCTG--TACCTTTTTTTGAATCGATA
Bo  CTCGCTACCATAACCAC-----AAGGCTATCTGAGTTC--ACAGGTTTAGTTGCCTG--TACCTTTTTTTGAATCGATA
Ta  CTTCTCTCATTTCCGCTTCAACAGAGCCCTTAAATCCTGCTGCTATGCGAGCAGGGTTATCCATTTCATAGGGGAGG
Zm  TTTGCAACAGAGCCCTTAAATCCTGCTGCTATGCGAGCAGGGTTATCCATTTCATAGGGGAGG

      330     340     350     360     370     380     390     400
At  TTTTTGTGTTGTTTCACTACCGCTCCGTTGGTACAAAGATCGAAAAGAATGCATTAAATGGATGCAT--TGAGATTCCG
Bo  TTTTTGTGTTGTTTCACTACCGCTCCGTTGGTACAAAGATCGAAAAGAATGCATTAAATGGATGCAT--TGAGATTCCG
Ta  GTGGGGGAGAAAGCAAGCCGAACTCTCATCCACCGGACACGTCAAAATTTCTGGCGCCGAGAGAAAGACGAGATTCAG
Zm  GGGTGCATAGCCAAATCTTCTCTCAAGATGGTACGAACACCGGTGTCGGGGTTCGAAATCCACTTCGAGCGGGC

      410     420     430     440     450     460     470     480
At  TAAGTAATCAGTGAAGTCTTTCT-----AAGAAAGAAG--GGCTTGGAGAAGAAAATGAAATAGGAACAACCGGCTG
Bo  TAAGTAATCAGTGAAGTCTTTCT-----AAGAAAGAAG--GGCAAGGAAGAAGAAAATGAAATAGGAACAACCGGCTG
Ta  TAAGTAATCAGTGAAGTCTTTCTTTTATAAGAAAGCGTCCGGCTTGGAGAAGAAAATGAAATAGGAACAACCGGCTG
Zm  TGGGGCTCCACCGGGAGCGAGCTACTGAAGGAAGTTTATTCTTGAACTTCTATTTTATCCAAATATTTATCTTTT

      490     500     510     520     530     540     550     560
At  GTCGTAATAGATCGACTTTTCATGCTGAAGCAAGAACTAGCATGAAAGTTCCA-----TTTCAGGGAAGGACGACG
Bo  GTTGTAATAGATCGACTTTTCATGCTGAAGCAAGAACTAGCATGAAAGTTCCA-----TTTCAGGGAAGGACGACG
Ta  GTTGTAATAGATCGACTTTGAAAGCGTCTTCTTCTCCAGCATTCAAGTTCCA-----TTTCAGGGAAGGACGACG
Zm  TTTGAAATACCAACCCACATATGATCTTTAAGTCTCCCTTCTCTTTTGGAGCAGATCTTTCAAAGATGGGAAT-

      570     580     590     600     610     620     630     640
At  GTACCTATACACTTTCTGTTTTGTCGAGCCCTGCTTTGGTCTCTGGTTTATGTTGACGTGCTAAAATCCGGTACAT
Bo  TACCTATACACTTTCTGTTTTGTCGAGCCCTGCTTTGGTCTCTGGTTTATGTTGACGTGCTAAAATCCGGTACAT
Ta  -TACCTATACACTTTCTGTTTTGTCGAGCCCTGCTTTGGTCTCTGGTTTATGTTGACGTGCTAAAATCCGGTACAT
Zm  -TCCATATCTTTCTGTTTTGTCGAGCCCTGCTTTGGTCTCTGGTTTATGTTGACGTGCTAAAATCCGGTACAT

      650     660     670     680     690     700     710     720
At  TCCGTTTTGTTTCCATCCAGTCTTTCCGACACTTCAGGTTTACTTCTTTTGTAGGTCTCGACTTCTTCGCTATGAT
Bo  TCCGTTTTGTTTCCATCCAGTCTTTCCGACACTTCAGGTTTACTTCTTTTGTAGGTCTCGACTTCTTCGCTATGAT
Ta  TCCGTTTTGTTTCCATCCAGTCTTTCCGACACTTCTGGTTTACTTATTTTGTAGGTCTCGACTTCTTCGCTATGAT
Zm  TCCGTTTTGTTTCCATCCAGTCTTTCCGACACTTCTGGTTTACTTATTTTGTAGGTCTCGACTTCTTCGCTATGAT

      730     740     750     760     770     780     790     800
At  CTTCCAGTAGTTATATAGGAGCTATAGCCGTTTATTCTTTTCGTTGTTATGATGTTCCATATTCAAATAGCGGAGA
Bo  CTTCCAGTAGTTATATAGGAGCTATAGCCGTTTATTCTTTTCGTTGTTATGATGTTCCATATTCAAATAGCGGAGA
Ta  CTTCCAGTAGTTATATAGGAGCTATAGCCGTTTATTCTTTTCGTTGTTATGATGTTCCATATTCAAATAGCGGAGA
Zm  CTTCCAGTAGTTATATAGGAGCTATAGCCGTTTATTCTTTTCGTTGTTATGATGTTCCATATTCAAATAGCGGAGA

```

Abbildung A.9: Vergleich der *nad6* Sequenzen von *A. thaliana*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *T. aestivum* und *Z. mays*

	810	820	830	840	850	860	870	880
At	TTCACGAAGAAGTATTGCGCTATTTACCACTGAGTGGGATTATGGACTGATCTTTGGTGGGAAATGTTTTTCATTTTA							
Bo	TTCACGAAGAAGTATTGCGCTATTTACCACTGAGTGGGATTATGGACTGATCTTTGGTGGGAAATGTTTTTCATTTTA							
Ta	TTCACGAAGAAGTATTGCGCTATTTACCACTGAGTGGTATTATGGACTGATCTTTGGTGGGAAATGTTCTTCATTTTA							
Zm	TTCACGAAGAAGTATTGCGCTATTTACCACTGAGTGGTATTATGGACTGATCTTTGGTGGGAAATGTTCTTCATTTTA							
	890	900	910	920	930	940	950	960
At	GATAATGAAAGCATTCCATTACTACCAACCCAAAGAAATACGACCTCTCTTAGATATACGGTTTATGCCGGAAAGGTACG							
Bo	GATAATGAAAGCATTCCATTACTACCAACCCAAAGAAATACGACCTCTCTTAGATATACGGTTTATGCCGGAAAGGTACG							
Ta	GATAATGAAACCATTCCATTACTACCAACCCACAGAAATACGACCTCTCTGAGATATACGGTTTATGCCGGAAAGGTACG							
Zm	GATAATGAAACCATTCCATTACTACCAACCCACAGAAATACGACCTCTCTGAAATATACGGTTTATGCCGGAAAGGTACG							
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
At	AAGTTGGACTAATTTGGAACATTGGGCAATTTACTTTTATACCTACTATTCTGTCTGGTTTTTGGTTCCTAGTCTTATTT							
Bo	AAGTTGGACTAATTTGGAACATTGGGCAATTTACTTTTATACCTACTATTCTGTCTGGTTTTTGGTTCCTAGTCTTATTT							
Ta	AAGTTGGACTAATTTGGAACATTGGGCAATTTACTTTTATACCTACTATTCTGTCTGGTTTTTGGTTCCTAGTCTGATTT							
Zm	AAGTTGGACTAATTTGGAACATTGGGCAATTTACTTTTATACCTACTATTCTGTCTGGTTTTTGGTTCCTAGTCTGATTT							
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
At	TATTAGTAGCCATGATTGGGGCTATAGTACTGACTATGCATAGGACTACTAAGGTGAAAAGACAGGATGTATTCCGACGA							
Bo	TATTAGTAGCCATGATTGGGGCTATAGTACTGACTATGCATAGGACTACTAAGGTGAAAAGACAGGATGTATTCCGACGA							
Ta	TATTAGTAGCTATGATTGGGGCTATAGTACTTACTATGCATAGGACTACAAAGGTGAAAAGACAGGATGTATTCCGACGA							
Zm	TATTAGTAGCTATGATTGGGGCTATAGTACTTACTATGCATAGGACTACAAAGGTGAAAAGACAGGATGTATTCCGACGA							
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
At	AATGCTATTGATTTTAGGAGGACTA-----TAATGAGGAGGACGACTGACCCACTCACGATCTACTAA-----							
Bo	AATGCTATTGATTTTAGGAGGACTA-----TAATGAGGAGGACGACTGACCCACTCACGATCTACTAA-----							
Ta	AATGCCTTGGATTCTAGGAGCCATA-----TAATGAAACAGGACTATTTCTCCTTTTGCCTATAGCCATAGAGAAGCTTCT							
Zm	AATGCCTTGGATTCTAGGAGGACTACTATTCTATTTCAGAACAGAAAGCTTCTTCTCCACAAGGGGATGACGCACCTGT							
	1210	1220	1230	1240	1250			
At	-----							
Bo	-----							
Ta	CCTCCGGAGCGGGGGACCGCCTGACAATTACAAAGAAACCTTTAAAATGTGGATTTAG							
Zm	CCCCCGCTGATCCGGAATCCATTTAA-----							

Fortsetzung zu Abbildung A.9

Die *nad6* Sequenzen der kodierenden Regionen, sowie 500 bp der 5' untranslatierten Bereiche (für *B. oleracea* var. *botrytis* sind nur 355 bp der 5' untranslatierten Region bekannt) sind folgenden Einträgen des NCBI entnommen: *A. thaliana* (At): „accession no.” NC 001284; *B. oleracea* var. *botrytis* (Bo): „accession no.” DQ257687; *T. aestivum* (Ta): „accession no.” AP008982; *Z. mays* (Zm): „accession no.” AY506529. Die Start-Kodons sind mit blauen Buchstaben und die RNA-Edierungspositionen sind mit roten Buchstaben gekennzeichnet. Übereinstimmende Bereiche im Sequenzvergleich sind schwarz unterlegt. Die Angaben bezüglich der Lage der Start-Kodons von *Z. mays* und *T. aestivum nad6* sind aus Haouazine-Takvorian et al. (1997) und für *A. thaliana* und *B. oleracea* var. *botrytis* aus den genannten NCBI-Einträgen entnommen. Für *T. aestivum nad6* sind zwei mögliche Start-Kodons im Abstand von 54 Nukleotiden angegeben. Die Information über die Lage der RNA-Edierungspositionen ist im Fall von *T. aestivum* in Haouazine et al. (1992), für *Z. mays* in Haouazine-Takvorian et al. (1997), und für *A. thaliana* in Giege und Brennicke (1999) beschrieben. Acht von zehn RNA-Edierungspositionen des Blumenkohl *nad6* Transkripts wurden in dieser Arbeit im Juni 2006 analysiert (siehe Abb. A.7), im September 2006 wurden die RNA-Edierungspositionen von Blumenkohl *nad6* Transkript in Raczynska et al. (2006) als übereinstimmend mit denen von *A. thaliana nad6* beschrieben. Im Falle von *A. thaliana* und *B. oleracea* var. *botrytis nad6* ist in Raczynska et al. (2006) beschrieben, dass die 3' Enden der Transkripte 5-6 Kodons vor dem hier angegebenen Ende der kodierenden Sequenz liegen.

Eigene Veröffentlichungen

Staudinger, M., Bolle, N., und Kempken, F. (2005). Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric *atp6* transcripts. *Mol Genet Genomics*, 273:130–136.

Bolle, N. und Kempken, F. (2006). Mono- and dicotyledonous plant-specific RNA editing sites are correctly edited in both in organello systems. *FEBS Lett.*, 580:4443–4448.

Kempken, F., Bolle, N., Forner, J., und Binder, S. (2007). Transcript end mapping and analysis of RNA editing in plant mitochondria. In Leister, D. und Herrmann, H., editors, *Mitochondria, Methods Mol. Biol.*, 372:177–192.

Bolle, N., Hinrichsen, I., und Kempken, F. (2007). Plastid mRNAs are neither spliced nor edited in maize and cauliflower mitochondrial in organello systems. *RNA*, 13:2061–2065.

Bolle, N. und Kempken, F. (2008). RNA-Edierung in Mitochondrien von Pflanzen – Elektroporation und in organello Analysen. *Bioforum*, in Druck.

Hinrichsen, I., Bolle, N., Paun, L., und Kempken, F. (2008). RNA processing in plant mitochondria is independent of transcription. *Plant Molecular Biology*, überarbeitetes Manuskript in Vorbereitung.

Tagungsbeiträge

Bolle, N., Wulff, S., Staudinger, M. und Kempken, F. (2005). Plant mitochondrial in organello RNA editing. International congress on plant mitochondrial biology, Obernai, Frankreich.

Bolle, N. und Kempken, F. (2006). Analysis of RNA processing in mitochondria of higher plants. 19. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Bolle, N. und Kempken, F. (2006). Mono- and dicotyledonous plant-specific RNA editing sites are correctly edited in both in organello systems. Plant Genetics – Joined conference of the German genetics society and the German society for plant breeding, Kiel.

Bolle, N. und Kempken, F. (2006). Plastid mRNAs are neither spliced nor edited in higher plant mitochondrial in organello systems. Plant Genetics – Joined conference of the German genetics society and the German society for plant breeding, Kiel.

Bolle, N. und Kempken, F. (2007). Analysis of in organello editing of mitochondrial

and plastid transcripts in higher plant mitochondria. RNA editing – Gordon research conference, Ventura, California, USA.

Bolle, N. und Kempken, F. (2007). RNA editing in plant mitochondria: Further insights by the use of in organello analysis. 20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Bolle, N. und Kempken, F. (2007). Insights into plant mitochondrial RNA editing. Botanikertagung, Hamburg.

Bolle, N. und Kempken, F. (2007). In organello analysis of cauliflower and maize mitochondrial editing. Botanikertagung, Hamburg.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Kempken, dessen Interesse an der RNA-Edierung meine Arbeit ermöglichte und sie mit vielen hilfreichen Anregungen unterstützte.

Ich möchte Dr. Christoph Gelhaus (Zoologisches Institut, Kiel) danken für die Anleitung zur Probenvorbereitung für die MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrischen Analysen und für die Durchführung dieser Analysen.

Außerdem danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie in Kiel für die gute Zusammenarbeit. Hierbei möchte ich insbesondere Hanna Schmidt für ihre Unterstützung in vielerlei Belangen danken und Sandra Wulff, Inga Hinrichsen und Anika Bruhs für fachliche Diskussionen und Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Ilka Braumann für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für viele motivierende Gespräche.

Ilka Braumann und Anika Bruhs möchte ich außerdem ganz herzlich für die Durchsicht der Arbeit danken.

Als letztes danke ich den mir wichtigen Menschen aus meiner Familie und meinen Freunden, hierunter einem ganz besonders, für die fortwährende Unterstützung.

Lebenslauf

Nina Bolle

Geburtsdatum: 22.02.1978
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

August 1984 - Juli 1988 Grundschule Kielortallee in Hamburg
August 1988 - Juli 1997 Gymnasium Kaiser-Friedrich-Ufer in Hamburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
August 1997 - Juli 1998 Ausübung eines freiwilligen sozialen Jahres bei
„Leben mit Behinderung Hamburg“

Studium

Oktober 1998 - Januar 2004 Biologie-Studium an der Universität Hamburg
Hauptfach: Genetik/Molekularbiologie
Nebenfächer: Mikrobiologie und Zoologie.
Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr.
Mühlbach in der Abteilung „Molekulare
Phytopathologie und Genetik“.
seit September 2004 Durchführung von experimentellen Arbeiten zur
Promotion im Fach Zellbiologie unter Betreuung
von Prof. Dr. Kempken in der Abteilung
„Botanische Genetik und Molekularbiologie“ an
der Christian-Albrechts-Universität in Kiel.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die wörtlich oder inhaltlich anderen Quellen entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

- Bolle, N. und Kempken, F. (2006). Mono- and dicotyledonous plant-specific RNA editing sites are correctly edited in both in organello systems. *FEBS Lett.*, 580:4443–4448.
- Kempken, F., Bolle, N., Forner, J., und Binder, S. (2007). Transcript end mapping and analysis of RNA editing in plant mitochondria. In Leister, D. und Herrmann, H., editors, *Mitochondria, Methods Mol. Biol.*, 372:177–192.
- Bolle, N., Hinrichsen, I., und Kempken, F. (2007). Plastid mRNAs are neither spliced nor edited in maize and cauliflower mitochondrial in organello systems. *RNA*, 13:2061–2065.
- Bolle, N. und Kempken, F. (2008). RNA-Edierung in Mitochondrien von Pflanzen – Elektroporation und in organello Analysen. *Bioforum*, in Druck.

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

Kiel, den

Nina Bolle