

**Molekulare, zellbiologische und bioinformatische
Charakterisierung mitochondrialer PPR-Proteine aus
*Arabidopsis thaliana***

DISSERTATION

**Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**



**vorgelegt von
ANIKA BRUHS
Kiel, 2012**

Referent/in: Prof. Dr. Frank Kempken
Koreferent/in: Prof. Dr. Margret Sauter
Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2012
Zum Druck genehmigt: 09.08.2012

Der Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mitochondrien: von Endosymbionten zu Zellorganellen	1
1.1.1	Das Chondrom Höherer Pflanzen.....	3
1.1.2	Der RNA-Metabolismus in Mitochondrien Höherer Pflanzen	6
1.2	PPR-Proteine	11
1.2.1	Struktur von PPR-Proteinen	11
1.2.2	Evolution und Verbreitung von PPR-Proteinen	13
1.2.3	Die Funktionen von PPR-Proteinen im RNA-Metabolismus der Organellen	15
1.3	Zielstellung dieser Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Geräte und Chemikalien	20
2.2	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.2.1	T-DNA Insertionslinien.....	20
2.2.2	Anzucht auf Erde	20
2.2.3	Oberflächensterilisation von Samen.....	21
2.2.4	Anzucht in Sterilkultur	21
2.2.5	Hydroponische Sterilkulturen von <i>Arabidopsis</i> Wurzeln	22
2.2.6	<i>Arabidopsis</i> Zellkulturen	22
2.3	Arbeiten mit <i>Arabidopsis</i>	22
2.3.1	Lokalisation von PPR-GFP-Fusionsproteinen.....	22
2.3.1.1	Präparation von Protoplasten aus <i>Arabidopsis</i> Zellkulturen.....	22
2.3.1.2	Transformation von Protoplasten aus <i>Arabidopsis</i>	23
2.3.1.3	Färbung von Mitochondrien in isolierten und transformierten Protoplasten	24
2.3.1.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	24
2.3.2	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>Arabidopsis</i>	24
2.3.2.1	Schnellextraktion von genomischer DNA	24
2.3.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion genomischer DNA.....	25
2.3.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion von Gesamt-RNA.....	25
2.3.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Blütenständen	26
2.3.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Samen.....	26
2.3.3	Isolierung von Mitochondrien aus Wurzelkulturen	26
2.3.4	Isolierung von Proteinen	27
2.3.4.1	Isolierung von Proteinen aus Mitochondrien	27

2.3.4.2	Isolierung von Membranproteinen aus <i>Arabidopsis</i>	27
2.3.5	Polysomenanalysen.....	27
2.3.5.1	Präparation von Polysomen.....	27
2.3.5.2	Extraktion polysomaler RNA aus Saccharosedichtegradienten-Frak-tionen.....	28
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.4.1	Kommerzielle Kit-Systeme.....	28
2.4.2	Bakterienstämme und Anzucht.....	29
2.4.3	Oligonukleotide und Vektoren.....	30
2.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> - Zellen.....	30
2.4.4.1	Mini-Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> XL1-Blue mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit 31	
2.4.4.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> XL1-Blue mit dem NucleoBond® PC 100 Kit.....	31
2.4.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	31
2.4.5	Transformation von Plasmid-DNA in Mikroorganismen.....	31
2.4.5.1	Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	31
2.4.5.2	Elektroporation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.4.6	PCR-Techniken.....	32
2.4.6.1	Standard-PCR.....	32
2.4.6.2	RT-PCR.....	33
2.4.6.3	qRT-PCR.....	33
2.4.6.4	TAIL-PCR.....	34
2.4.7	Bestimmung von DNA- und RNA-Gehalt.....	35
2.4.8	Hydrolytische Spaltung von DNA.....	35
2.4.9	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	36
2.4.9.1	DNA-Gelelektrophorese.....	36
2.4.9.2	RNA-Gelelektrophorese.....	36
2.4.10	Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen.....	36
2.4.10.1	Aufreinigung von DNA mit dem <i>NucleoSpin® Extract II</i> -Kit.....	36
2.4.10.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem Enzym GELase®.....	37
2.4.11	DNA-Verdau mittels DNase I in RNA-haltigen Proben.....	37
2.4.12	DNA-Sequenzanalyse.....	37
2.4.13	DNA-Ligation.....	37
2.4.14	Blau-Weiß-Selektion.....	38
2.4.15	Transfertechniken und Hybridisierung.....	38
2.4.15.1	Southern Blot.....	38
2.4.15.2	Northern Blot.....	38
2.4.15.3	Decaprime Hybridisierung.....	39
2.4.16	Identifizierung von T-DNA-Insertionen mittels PCR.....	39
2.4.17	SNaPshot-Analyse.....	39

2.5	Proteinbiochemische Methoden	40
2.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
2.5.2	Aktivitätsmessung des Komplex IV in isolierten Mitochondrien.....	40
2.5.3	Techniken der Proteinelektrophorese.....	41
2.5.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.5.3.2	Blue-Native-PAGE (BN-PAGE).....	41
2.5.3.3	Zweidimensionale BN/SDS-PAGE.....	42
2.5.4	Western Blot.....	42
2.5.5	Proteinfärbung.....	43
2.5.5.1	Proteinfärbung durch Coomassie-Brilliant-Blau.....	43
2.5.5.2	Silberfärbung von Proteingelen.....	44
2.5.5.3	Ponceau-Färbung von immobilisierten Proteinen auf der Membran.....	44
2.6	Software und Datenbanken	44
3	ERGEBNISSE	46
3.1.1	Struktureller Aufbau der PPR Proteine AT3G15590 und AT1G15480 und ihrer Gene.....	46
3.1.2	Die PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480 weisen die für PPR-Proteine typischen helikalen Strukturen auf.....	48
3.1.3	<i>In silico</i> Analyse putativer RNA-Bindemotive.....	50
3.2	Die PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480 sind mitochondrial lokalisiert	54
3.3	Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten durch PCR-Genotypisierung	55
3.4	Morphologische Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien	59
3.4.1	Samen der TDA _{t3g15590} -Pflanzen sind in ihrer Keimungsfähigkeit beeinflusst.....	59
3.4.2	Beide T-DNA Insertionslinien zeigen bezüglich des Wachstums einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp.....	60
3.4.3	Die Vitalität der gebildeten Pollen ist in beiden T-DNA Insertionslinien stabil.....	61
3.4.4	Die Bildung von Lateralwurzeln ist in beiden T-DNA Insertionslinien beeinflusst.....	62
3.5	Gibt es weitere T-DNA Insertionen im Genom der <i>dweorg1</i> Mutante, die für den Phänotyp verantwortlich sein könnten?	64
3.5.1	Das Genom der <i>dweorg1</i> Mutante weist mehrere T-DNA Insertionen auf.....	64
3.5.2	Lokalisation aller T-DNA Insertionen im Genom der <i>dweorg1</i> Mutante.....	66
3.5.2.1	Eine weitere T-DNA Insertion im Pseudogen <i>at3g15600</i> ist ohne Auswirkung.....	69
3.5.2.2	Das Einbringen des <i>dweorg1</i> Wildtypgens in die <i>dweorg1</i> Mutante führt zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps.....	71
3.6	Mitochondriale Transkripte werden in <i>dweorg1</i> Mutanten vollständig ediert	73
3.7	Die Transkription des <i>cox2</i> Gens ist in <i>dweorg1</i> Mutanten nicht beeinflusst	77
3.8	Einfluss auf das mitochondriale Proteom der <i>dweorg1</i> Mutante	77
3.8.1	Das Protein DWEORG1 ist involviert in die Translation von <i>cox2</i>	78

3.8.2	Der Komplex IV in Mitochondrien von <i>dweorg1</i> Pflanzen ist in seiner Aktivität beeinträchtigt.....	80
3.8.3	Analyse des mitochondrialen Proteoms mittels BN- und BN/SDS-PAGE	82
3.9	Polysomengradientenanalyse	85
3.9.1	Organspezifisches Expressionsprofil von DWEORG1 und Etablierung einer Wurzelkultur ..	86
3.9.2	In <i>dweorg1</i> Mutanten ist die Polysomenassoziation des <i>cox2</i> Transkripts beeinträchtigt ..	88
3.9.3	Mit Polysomen assoziierte <i>cox2</i> Transkripte werden vollständig ediert	92
4	DISKUSSION	94
4.1	Phylogenie und Struktur der PPR-Proteine AT1G15480 und DWEORG1	94
4.2	Ein <i>knockout</i> von <i>at1g15480</i> und <i>dweorg1</i> führt zu unterschiedlichen Phänotypen in <i>Arabidopsis</i>	97
4.3	Der Verlust von DWEORG1 führt zu Veränderungen im mitochondrialen Proteom	99
4.3.1	Die Bedeutung von DWEORG1 für die mitochondriale Atmungskette	100
4.4	DWEORG1, ein Regulator der mitochondrialen ROS Homöostase?	103
4.5	Die Funktion von DWEORG1 im mitochondrialen RNA-Metabolismus.....	104
4.6	Wie erkennt und bindet DWEORG1 seine(n) Liganden?	106
4.7	Ausblick	110
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	112
6	SUMMARY	114
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	115
8	ANHANG.....	131
9	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....	139
9.1	Publikationen	139
9.2	Kongressbeiträge	139
10	DANKSAGUNG	140
11	LEBENS LAUF	141
12	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	142

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien: von Endosymbionten zu Zellorganellen

Mitochondrien sind für eukaryotische Zellen essentieller Bestandteil und unerlässlich für ihr Wachstum und Überleben. Eine der grundlegenden metabolischen Aktivitäten dieser Organellen ist die Produktion von Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung (Saraste 1999). Darüber hinaus sind sie Ort der Biogenese von FeS-Clustern, wesentlicher Bestandteil der Biosynthese von Aminosäuren, Fettsäuren und Vitaminen und maßgeblich involviert in die Ca^{2+} -Homöostase (Mackenzie und McIntosh 1999; Bowsher und Tobin 2001; Balk und Pilon 2011). Außerdem sind sie beteiligt an dem Prozess der Apoptose (Jones 2000; Youle und Karbowski 2005). Mitochondrien und Plastiden eukaryotischer Zellen sind das Produkt endosymbiotischer Ereignisse. Vergleichende Genomanalysen weisen darauf hin, dass Mitochondrien einen monophyletischen Ursprung haben, der auf eine eubakterielle Vorläuferzelle zurückgeht. Bei diesem Vorläufer werden Vertreter der α -Proteobakterien als Kandidaten für einen Endosymbionten diskutiert, der vor über 1,5 Mrd. Jahren in einen Vorläufer der eukaryotischen Zelle aufgenommen wurde und sich dann intrazellulär zum Organell entwickelt hat (Andersson *et al.* 1998; Gray 1999; Gray *et al.* 1999).

Der Symbiose zweier vormals unabhängiger Organismen folgte eine starke Umstrukturierung der zellulären Organisation in dessen Verlauf es zu Genverlust, Gentransfer und der Etablierung von Signalwegen und einer aufeinander abgestimmten Regulation kam. Infolge dieser Prozesse wurde das Proto-Mitochondrion in den Zellstoffwechsel der Wirtszelle eingebunden und in nahezu alle physiologischen Vorgänge integriert. Durch endosymbiotischen Gentransfer verschwanden viele Gene des Organellengenoms oder wurden in das Kerngenom integriert (Dyall *et al.* 2004; Knoop 2004; Timmis *et al.* 2004); die Autonomie und eubakterielle Identität des Endosymbionten ging verloren. Essentiell für einen erfolgreichen Gentransfer vom mitochondrialen Genom (Chondrom) in das Kerngenom war eine Vielzahl von Adaptionen, die nötig ist, um die Proteinbiosynthese der vormals organellencodierten Gene im Zellkern und dem Cytosol, sowie den Import in die Mitochondrien zu gewährleisten. Dieser Umstrukturierungsprozess lässt sich in mehrere Stadien unterteilen (Brennicke *et al.* 1993), die sich an dem gut untersuchten Beispiel eines endosymbiotischen Gentransfers des *cox2*-Gens der Leguminosen von dem Auftreten einer Genkopie im Kern, bis hin zur Aktivierung dieser Kopie und der Inaktivierung des ursprünglichen mitochondrialen Gens nachvollziehen lassen (Nugent und Palmer 1991; Covello und Gray 1992). Neben funktionellen Genen wurden in einigen Fällen auch

nichtfunktionelle Gene aus den Mitochondrien transferiert. Diese integrieren zwar in das Kerngenom, wurden dort aber zu Pseudogenen (D'Errico *et al.* 2004; Leister 2005). In Landpflanzen findet der endosymbiotische Genaustausch zudem auch häufig zwischen Mitochondrien und Plastiden statt, so konnten in den Mitochondrien diverser Pflanzen ursprünglich chloroplastidäre Gensequenzen und tRNA Gene chloroplastidären Ursprungs identifiziert werden (Stern *et al.* 1982; Stern und Palmer 1984; Schuster und Brennicke 1987; Schuster und Brennicke 1988), von denen einige sogar die native mitochondriale tRNA Spezies funktionell ersetzt haben (Joyce und Gray 1989). Darüber hinaus wurden auch nukleäre Sequenzen im Chondrom gefunden (Schuster und Brennicke 1987).

Welchem molekularen Mechanismus der z.T. massive Gentransfer zugrunde liegt, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden zwei Theorien, nach denen die Organellen-DNA als sogenannte „*bulk-DNA*“ durch die Lyse ganzer Mitochondrien oder Chloroplasten (Henze und Martin 2001) oder aber in Form von RNA-/cDNA-Intermediaten in das Kerngenom gelangt ist (Brennicke *et al.* 1993; Adams und Palmer 2003; Stegemann und Bock 2006). Neben der Frage nach dem genauen Mechanismus des Gentransfers ist auch nicht eindeutig geklärt, weshalb einige Gene im Chondrom verbleiben, was die Entstehung und Weiterentwicklung von mitochondrienspezifischen Transkriptions-, Translations- und Importmaschinerien sowie Regulations- und Signalwegen notwendig macht. Erklärungen für den Erhalt eines mitochondrieneigenen Genoms liefert zum Einen die Hydrophobizitätstheorie (von Heijne 1986; Adams und Palmer 2003), die besagt, dass die hydrophoben Protein, die im Chondrom codiert vorliegen, *in vivo* nicht in das Organell importiert werden könnten und daher vor Ort synthetisiert werden müssen. Eine Weitere Hypothese („CORR“-Hypothese, CORR = *co-location for redox regulation*) nennt die Redoxregulation als Grund für den mitochondrialen Verbleib einiger Gene (Allen 2003). Demnach erleichtert die gemeinsame Lokalisation von Gen und Genprodukt in einem Kompartiment die Regulation und zeitliche Expression der Gene der Atmungskette, so dass das Redoxgleichgewicht erhalten bleibt und die Entstehung von ROS (*reactive oxygen species*) verhindert wird.

Seit ihrer Entstehung vor etwa 1,5 Mrd. Jahren unterlagen Mitochondrien und ihre Genome stetigen Veränderungen und Umstrukturierungsprozessen, die bis heute nicht abgeschlossen sind (Liu *et al.* 2009). Wie das Chondrom heutiger Mitochondrien Höherer Pflanzen aufgebaut ist, wird im folgenden Kapitel beschrieben. Einen Überblick über den für das vergleichsweise kleine Genom der Mitochondrien erstaunlich komplexen RNA-Metabolismus gibt der Abschnitt 1.1.2.

1.1.1 Das Chondrom Höherer Pflanzen

Bedingt durch den andauernden endosymbiotischen Gentransfer codiert das heutige Chondrom für weitaus weniger Proteine als das Genom des endosymbiotischen Vorläufers. Der Großteil dieser Gene wurde, wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, in den Kern transferiert und in das dortige Genom integriert. Bis heute wurden in Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der *Organelle Genome Database* (GOBASE; <http://megasun.bch.umontreal.ca/gobase/>) mehrere Tausend mitochondriale Gensequenzen verschiedenster Organsimen veröffentlicht (siehe auch (Gray *et al.* 2004)).

In den Mitochondrien der Vertebraten führte der Prozess des endosymbiotischen Gentransfers zu einer Reduktion auf nunmehr etwa dreizehn proteincodierende Gene (Boore 1999). Diese Zahl scheint weitestgehend stabil zu sein, und ein weiterer Gentransfer vom Chondrom in das Kerngenom wird als unwahrscheinlich angesehen (Boore 1999). Im Gegensatz dazu ist das mitochondriale Genom Höherer Pflanzen sehr variabel und enthält zwischen 54 und 57 proteincodierende Gene (Unsold *et al.* 1997; Kubo *et al.* 2000; Notsu *et al.* 2002; Clifton *et al.* 2004; Sugiyama *et al.* 2005). Gleichzeitig unterscheiden sich auch die Genomgrößen erheblich. Während bekannte tierische Chondrome eine Größe von durchschnittlich 16 kbp (Boore 1999) und die von Hefen maximal 100 kbp betragen (McArthur und Clark-Walker 1983), sind pflanzliche Chondrome wesentlich größer und liegen zwischen 208 kbp im Weißen Senf (*Brassica hirta*) (Palmer und Herbon 1987) und über 2700 kbp in der Zuckermelone (*Cucumis melo*) (Rodriguez-Moreno *et al.* 2011). Trotz dieser überragenden Größe der Chondrome Höherer Pflanzen codieren diese jedoch nicht für eine proportional höhere Anzahl von Proteinen. So ist das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 1) mit etwa 367 kbp zwar ungefähr 22 mal so groß wie das menschliche Chondrom mit etwa 16 kbp, codiert dabei aber mit 57 Genen für gerade mal vier mal mehr Proteine als das menschliche mitochondriale Genom mit 13 proteincodierenden Genen (Unsold *et al.* 1997; Pakendorf und Stoneking 2005). Deutlich wird die Disproportion von Genomgröße und Informationsgehalt auch bei Betrachtung des mitochondrialen Genoms vom Mais (*Zea mays* subsp. *mays*), bei dem abzüglich der bekannten Gene, Introns, ORFs (*open reading frames*) und ursprünglich plastidären Sequenzen fast drei Fünftel des Chondroms unbekanntem Ursprungs und Funktion sind (Clifton *et al.* 2004).

Die Gründe für die enorme Größe der Chondrome Höherer Pflanzen sind, wie für den Mais beschrieben, auf das Auftreten von langen intergenomischen Regionen nichtcodierender Sequenzen, sowie von Introns und bisher nicht identifizierten ORFs zurückzuführen, die aus

dem Kern und den Plastiden in das mitochondriale Genom integriert wurden (Allen *et al.* 2007; Kubo und Mikami 2007). Darüber hinaus ist eine ständige Umstrukturierung des Genoms ein Charakteristikum der Mitochondrien von Angiospermen, welche ungerichtet über DNA-Rekombinationsereignisse zu Insertionen und Deletionen führt und deren Ursache noch ungeklärt ist (Kubo und Newton 2008). Dieses genetische Rearrangement variiert sogar innerhalb einer Spezies (Satoh *et al.* 2004; Satoh *et al.* 2006) und führt somit zu Polymorphismen zwischen den Genomen. Störungen der mitochondrialen Genexpression sind hingegen selten (Kubo und Newton 2008). Bedingt durch diese Veränderungen steht die Entwicklung des Chondroms der Angiospermen im Gegensatz zu dem seit dem endosymbiotischen Ereignis immer kleiner und kompakter werdenden mitochondrialen Genom der Säugetiere (Scheffler 2002a).

Die Abbildung 1 zeigt schematisch das mitochondriale Genom von *Arabidopsis*. Gezeigt sind die für diverse Proteine, tRNAs und rRNAs codierenden Gene, ORFs und Introns. Gemeinhin werden mitochondriale Genome als zirkuläres DNA Molekül dargestellt, welches in früheren Studien als „*master cycle*“ oder „Master Chromosom“ bezeichnet wurde (Lonsdale *et al.* 1984; Scheffler 2002b). Mittlerweile konnte allerdings gezeigt werden, dass die Struktur der mitochondrialen DNA *in vivo* weitaus komplexer ist. Bedingt durch anhaltende, aktive Rekombination langer, sich wiederholender Sequenzabschnitte entsteht in den meisten pflanzlichen Geweben eine überaus heterogene Population von mitochondrialen DNA-Molekülen, die sowohl in linearer als auch in zirkulärer Form vorkommen (Oldenburg und Bendich 2001; Kmiec *et al.* 2006). Auch unterschiedlich verzweigte Moleküle, die vorrangig Rekombinationsintermediate darstellen, wurden beobachtet (Backert und Borner 2000). Ein weiteres Rekombinationsereignis bei pflanzlichen Mitochondrien ist das sogenannte „*shifting*“, ein sporadisches Rekombinationsereignis kleiner Sequenzwiederholungen, das in einer geringen Anzahl von DNA Molekülen resultiert, die sich autonom replizieren und darüber hinaus in die Entstehung der cytoplasmatischen, männlichen Sterilität (CMS) involviert sind (Small *et al.* 1987; Janska *et al.* 1998; Abdelnoor *et al.* 2003).

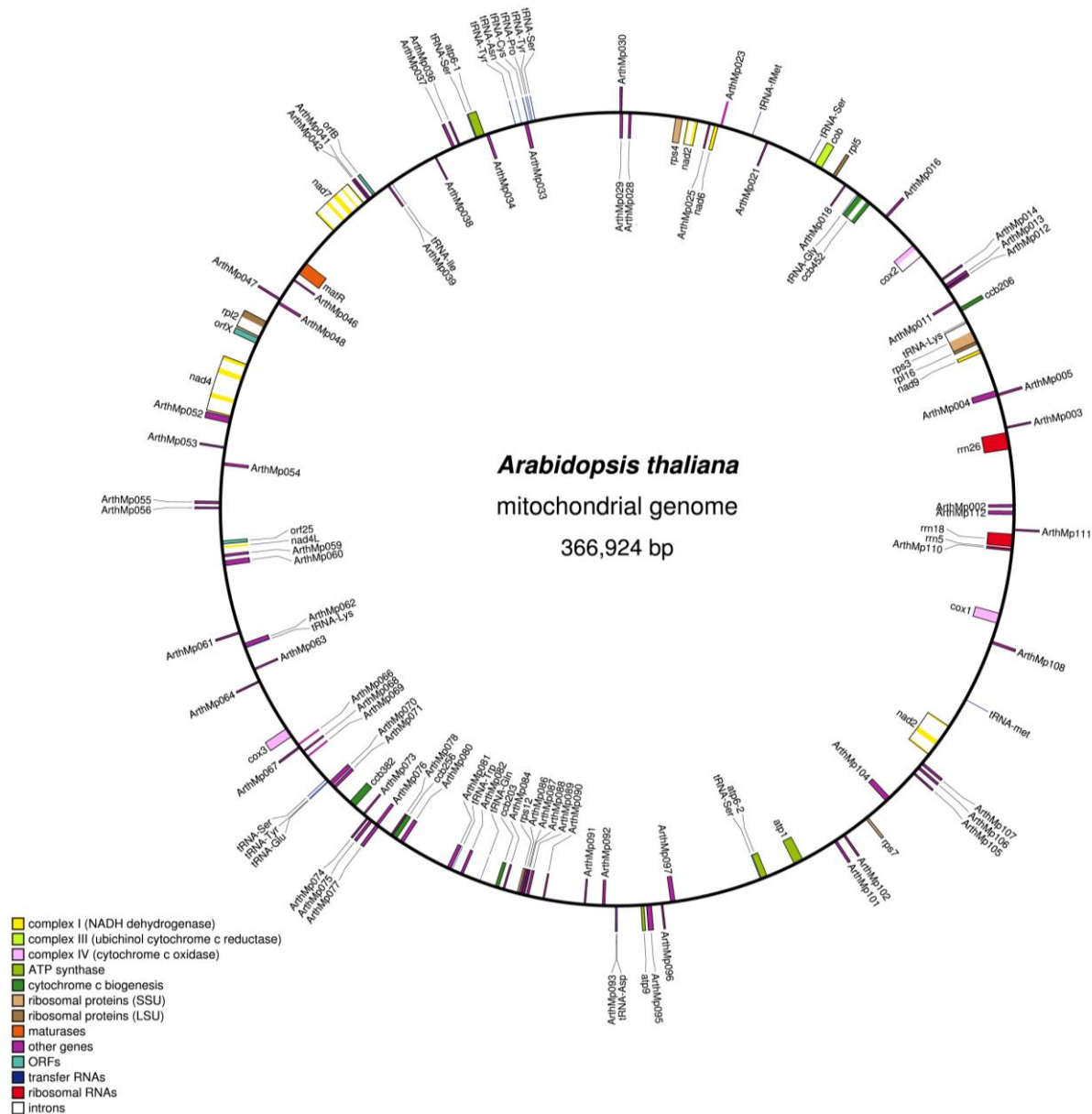


Abbildung 1: Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms von *Arabidopsis thaliana*. Gezeigt sind proteincodierende Gene, unbekannte sowie für tRNAs und rRNAs codierende Gene, als auch Introns und einige weitere Sequenzabschnitte gemäß der Legende. Die Grafik wurde mit dem Programm OGDRAW v1.1 (Lohse *et al.* 2007) unter der Verwendung der *accession* Nummer NC_001284 erstellt.

Die Gene, die im pflanzlichen Chondrom codiert werden, unterscheiden sich von Spezies zu Spezies nur geringfügig. In erster Linie codieren sie für Proteine, die direkt oder indirekt in die Oxidative Phosphorylierung und die Produktion von ATP involviert sind, sowie für diverse tRNAs und Komponenten des Translationsapparats. Die Gene sind entweder in Cluster organisiert, oder über das DNA-Molekül in polycistronischen Transkriptionseinheiten verteilt. Diese Co-Transkription mehrerer Gene erfordert eine posttranskriptionale Prozessierung der mRNA. Darüber hinaus erfolgen in den Mitochondrien höherer Pflanzen noch weitere Schritte

zur Prozessierung der Transkripte, wie beispielsweise die RNA-Edierung (Bruhs und Kempken 2010; Chateigner-Boutin und Small 2011; Knoop 2011), die Generierung von sekundären 5'- und 3'-Enden (Forner *et al.* 2007) und das Entfernen von Gruppe II Introns (Bonen 2008; Bonen 2010). Eine Übersicht über diese Abläufe und den RNA-Metabolismus in den pflanzlichen Mitochondrien gibt der folgende Abschnitt 1.1.2.

1.1.2 Der RNA-Metabolismus in Mitochondrien Höherer Pflanzen

Pflanzliche Mitochondrien besitzen ein eigenes genetisches System mit eigenen Transkriptions- und Translationsmaschinerien, die in die genetischen Systeme des Kerns und der Plastiden integriert sein müssen. So sind beispielsweise die im Chondrom codierten tRNAs nicht ausreichend für eine funktionierende Translation in den Mitochondrien, und die fehlenden tRNA-Moleküle - in *Arabidopsis* sind dies dreizehn tRNAs (Marienfeld *et al.* 1999) - müssen aus dem Cytosol importiert werden (Maréchal-Drouard *et al.* 1995; Kumar *et al.* 1996). Für diesen Prozess sind zusätzlich zu den Importwegen durch die Mitochondrienmembranen auch komplexe Signalwege und fein abgestimmte Regulationsmechanismen notwendig, die sich im Laufe der Biogenese der pflanzlichen Mitochondrien entwickelt haben.

Neben dem Import diverser tRNAs erfordert die mitochondriale Genexpression auch den Import von mindestens zwei kerncodierten RNA-Polymerasen (RNAPs) (Gray und Lang 1998). Diese Polymerasen bestehen anders als die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen des eukaryotischen Zellkerns, die sich aus mehreren Proteineinheiten zusammensetzen, nur aus einer einzelnen Untereinheit (Cermakian *et al.* 1997). Sie sind den RNA-Polymerasen der Phagen T3, T7 und SP6 sehr ähnlich (Hess und Borner 1999). Möglicherweise stammen die Gene für diese Polymerasen aus einem den Bakteriophagen Typ 3- oder Typ 7-ähnlichen Prophagen, der bereits in der endosymbiotischen Vorläuferzelle vorhanden war. Die Gene wurden dann im Zuge des endosymbiotischen Gentransfers in den Kern transferiert, integriert und reaktiviert (Filée und Forterre 2005). Im Gegensatz zu Pilzen und Tieren besitzen Pflanzen mehr als ein *RpoT*- (RNA-Polymerase vom T-Phagen Typ) Gen, das für eine T7-Phagentyp RNAP codiert. Diese wurden bereits in zahlreichen Organismen identifiziert (Hedtke *et al.* 1997; Young *et al.* 1998; Ikeda und Gray 1999; Hedtke *et al.* 2000; Emanuel *et al.* 2004). In Spezies, die der Gruppe der Eudicotyledonen angehören, wie beispielsweise *Arabidopsis* und *Nicotiana glauca*, wurden insgesamt drei Gene der *RpoT*-Genfamilie identifiziert, deren Proteinprodukte in Mitochondrien importiert werden (*RpoTm*), in Plastiden (*RpoTp*), sowie dual in beide Organellen (*RpoTmp*) (Hedtke *et al.* 2002). In

Nicotiana tabacum wurden sogar sechs *RpoT*-Gene identifiziert (Hedtke *et al.* 2002), in der Lycophyte *Selaginella moellendorffii* und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* jeweils nur eines (Yin *et al.* 2009; Liere und Börner 2010). In Monocotyledonen wurden mit *RpoTm* und *RpoTp* bisher nur zwei für RNA-Polymerasen codierende Gene gefunden, deren Genprodukte jeweils ausschließlich in ein Organell importiert werden (Chang *et al.* 1999; Ikeda und Gray 1999; Emanuel *et al.* 2004). Neben den Besonderheiten der für den Transkriptionsprozess unerlässlichen Enzyme, den RNA-Polymerasen und ihrer Gene, unterscheidet sich auch die Transkriptionsinitiation in pflanzlichen Mitochondrien von der anderer Organismen, wie z.B. die der Vertebraten, bei denen die Initiation der Transkription von nur einem Promotor ausgeht. Pflanzliche Mitochondrien hingegen transkribieren ihre Genome von zahlreichen Promotoren (Kühn *et al.* 2005), wie *in vitro* Transkriptions- und *capping* Studien und Sequenzanalysen für eine Vielzahl von Pflanzen gezeigt haben (Liere *et al.* 2011). So wurden beispielsweise im Chondrom von *Oenothera berteriana* achtzehn Promotorbereiche identifiziert (Binder und Brennicke 1993). Zwischen den einzelnen Promotoren dicotyler Pflanzen existieren zum Teil deutliche Sequenzübereinstimmungen, so dass bis heute einige gemeinsame Motive beschrieben sind (Dombrowski *et al.* 1999; Kühn *et al.* 2005). Auch die Promotoren der Monocotyledonen weisen Ähnlichkeiten in bestimmten Bereichen der DNA-Sequenz auf, jedoch sind diese weitaus weniger konserviert (Fey und Marechal-Drouard 1999; Weihe 2004). Es wird angenommen, dass das Vorkommen multipler Promotoren in pflanzlichen Mitochondrien eine funktionelle Genexpression auch bei ständiger rekombinatorischer Umstrukturierung des Chondroms gewährleistet (Lupold *et al.* 1999; Kühn *et al.* 2005). Auf DNA-Ebene können Promotoren durch ihre Stärke auch Einfluss auf die differentielle Genexpression nehmen (Muise und Hauswirth 1992); der Großteil der Genexpression wird allerdings auf RNA-Ebene reguliert (Binder und Brennicke 2003).

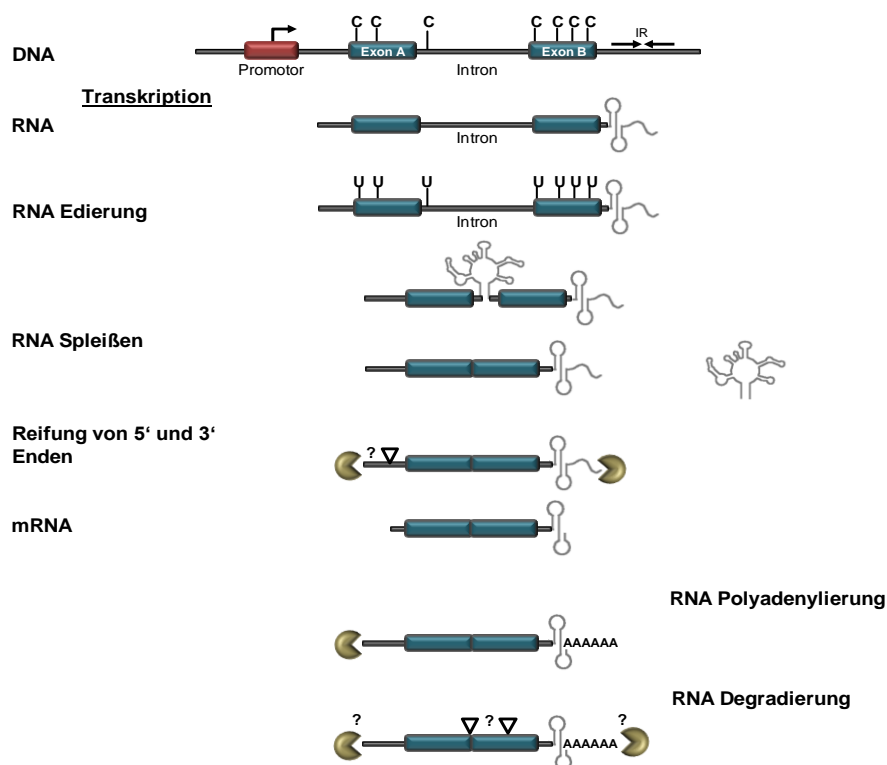


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozessierungsschritte zur Reifung vom Primärtranskript zur translationsfähigen mRNA in pflanzlichen Mitochondrien. Modifiziert nach (Binder und Brennicke 2003).

In pflanzlichen Mitochondrien sind zur Generierung funktioneller RNAs und damit der Erhaltung des eigenen genetischen Systems eine Vielzahl von posttranskriptionellen Modifikationen notwendig (Abbildung 2). Hierzu zählt die RNA-Edierung, bei der die Aminosäuresequenz der DNA nach erfolgter Transkription auf RNA-Ebene an definierten Positionen verändert wird (Covello und Gray 1989; Gualberto *et al.* 1989; Hiesel *et al.* 1989). In Mitochondrien betrifft dies in erster Linie die Umwandlung von Cytosin zu Uracil, selten auch umgekehrt (Shikanai 2006). Obwohl Edierungspositionen auch in Plastiden vorkommen, (Hoch *et al.* 1991) ist die Anzahl in Mitochondrien weitaus höher, so wurden beispielsweise in *Arabidopsis* 456 Edierungspositionen identifiziert, von denen sich 441 in codierenden Sequenzabschnitten befinden (Giegé und Brennicke 1999). Auch strukturelle RNAs, in erster Linie tRNAs werden ediert (Binder *et al.* 1994), jedoch betrifft die Edierung zum überwiegenden Teil proteincodierende Transkripte und innerhalb dieser vorrangig Positionen in Exonbereichen. Edierungen in Introns wurden allerdings auch gefunden und scheinen in einigen Fällen sogar essentiell für das Spleißen zu sein (Castandet *et al.* 2010). Häufig führen Edierungen zu einer veränderten Aminosäuresequenz und beeinflussen somit direkt die Genexpression. In vielen Fällen wird erst durch eine erfolgte Edierung ein Start- oder Stopcodon generiert oder entfernt oder die Eigenschaften eines Proteins werden

z. B. hinsichtlich ihrer Spezifität zu bestimmten Molekülen beeinflusst (Chapdelaine und Bonen 1991; Kempken *et al.* 1991; Hiesel *et al.* 1994; Maier *et al.* 1996). Bei den 441 Edierungsmodifikationen der mitochondrialen Transkripte von *Arabidopsis* wurde festgestellt, dass diese in den Proteinen einen Anstieg der Hydrophobizität bewirken (Giegé und Brennicke 1999). Die Frage, weshalb die entsprechende Nukleinsäuresequenz nicht bereits auf DNA-Ebene vorliegt, sondern durch eine komplexe Edierungsmaschinerie erst posttranskriptionell hergestellt wird, ist noch weitestgehend unklar. Nach bisherigen Kenntnissen wird vermutet, dass der Prozess der Edierung sich während der Aufteilung der Bryophyten entwickelt hat (Hiesel *et al.* 1994; Knoop *et al.* 2010). Im Verlauf der evolutionären Entwicklung könnte ein bereits bestehendes Protein sich zu einem RNA-modifizierenden Enzym entwickelt haben, welches, ausgestattet mit der entsprechenden Sequenz- und Strukturspezifität, zu einer Umwandlung von Cytidin zu Uracil in der Lage war. Im Zuge des genetischen *Drifts* könnte es zur Verbreitung und Weiterentwicklung gekommen sein, so dass Pflanzen die Fähigkeit erlangt haben, Mutationen auf RNA-Ebene zu korrigieren (Covello und Gray 1993). Die Enzyme, die für die Katalyse der Edierungsreaktion – wahrscheinlich eine Deaminase oder Transaminase – verantwortlich sind, konnten bis heute nicht identifiziert werden. Proteine, die ebenfalls maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind, sind die *pentatricopeptide repeat* Proteine (PPR-Proteine). Sie und ihre Rolle bei der Edierung werden in Abschnitt 1.2 näher beschrieben.

Ein weiterer essentieller Prozessierungsschritt in pflanzlichen Mitochondrien ist das Spleißen der Gruppe II-Introns, die in unterschiedlichen Häufigkeiten verteilt über das Chondrom in vielen Genen zu finden sind. Im Chondrom von *Arabidopsis* wurden beispielsweise 25 Gruppe II-Introns identifiziert (Unselde *et al.* 1997), während bisher nur in *Peperomia* und einigen anderen Pflanzen ein einziges Gruppe I-Intron im *cox1* Gen gefunden wurde (Vaughn *et al.* 1995; Cho *et al.* 1998). Die Einteilung in beide Gruppen erfolgt nach dem zugrunde liegenden Mechanismus. So benötigen Gruppe II-Introns im Unterschied zu Gruppe I-Introns keine weiteren Faktoren zum Spleißen, sondern verwenden die Hydroxylgruppe eines bestimmten Adenosins als Nucleophil. Die Länge mitochondrialer Introns variiert - zum Teil auch zwischen Homologen verschiedener Pflanzen - zwischen 327 bp im *cox1* Gen des Brachsenkrauts *Isoetes engelmannii* (Grewe *et al.* 2009) und 5,7 kbp im *nad4* Gen des Palmfarns *Cycas taitungensis* (Chaw *et al.* 2008). Diese Variation ist in erster Linie auf Insertions- und Deletionsvorgänge innerhalb der vierten von insgesamt sechs Domänen der Sekundärstruktur eines typischen Gruppe II-Introns zurückzuführen (Bonen 2008). Neben der charakteristischen Struktur können Introns der Gruppe II auch interne ORFs beinhalten, die

für ein Homolog einer Reversen Transkriptase codieren (Michel und Lang 1985). Diese können wiederum selbst in den Spleißprozess involviert sein und werden dann als Maturasen bezeichnet (Wank *et al.* 1999). In Höheren Pflanzen sind allerdings nur der für eine Maturase codierende ORF *mat-r* im fünften Intron des *nad1* Gens und *mat-k* im *trnK* Gen bekannt (Bonen 2008). Eine weitere Besonderheit des Spleißprozesses in Mitochondrien ist das *trans*-Spleißen, bei dem im Gegensatz zum *cis*-Spleißen nicht die Exons eines einzigen Primärtranskripts, sondern Exone von Transkripten unterschiedlicher Gene miteinander gespleißt werden. In *Arabidopsis* werden beispielsweise fünf Introns der Gene *nad1*, *nad2* und *nad5* *trans* gespleißt (Bonen 2008). Es wird angenommen, dass Gruppe II-Introns, die dem *trans*-Spleißen unterliegen, sich vor der Entstehung der Moose aus vormalig *cis*-gespleißten Introns entwickelt haben (Groth-Malonek *et al.* 2005). Der Spleißprozess in pflanzlichen Mitochondrien stellt insgesamt ein sehr komplexes System dar und trägt zur Vielschichtigkeit der Genexpression und ihrer Regulation bei. Wie auch bei der RNA Edierung sind auch hier PPR-Proteine maßgeblich am Spleißmechanismus beteiligt (siehe Abschnitt 1.2.3).

Neben den posttranskriptionellen Vorgängen der RNA-Edierung und des Spleißens sind auch 5'- und 3'-Prozessierung, sowie die Degradation von Transkripten Teil des mitochondrialen RNA-Metabolismus' (Binder *et al.* 2010). Im Gegensatz zur Prozessierung der 5'- und 3'-Enden von tRNA- und rRNA-Molekülen, bei denen dieser Vorgang sehr gut untersucht ist, ist gerade die 5'-Prozessierung der mRNAs noch nicht hinreichend geklärt. Analysen einer Vielzahl von mitochondrialen mRNAs in *Arabidopsis* haben gezeigt, dass die meisten 5'-Enden reifer mRNA-Moleküle erst posttranskriptional generiert wurden und nur ein geringer Teil der reifen Transkripte an der Position der Transkriptionsinitiation beginnt (Forner *et al.* 2007). Die Verbreitung prozessierter 5'-Enden weist demnach darauf hin, dass dieser Vorgang ein wichtiger Prozess ist, der eine noch nicht geklärte regulatorische Rolle in der pflanzlichen Genexpression in Mitochondrien darstellt. Als erster Faktor, der für die Prozessierung der 5'-Enden des *nad9*- und *cox3*-Gens in *Arabidopsis* zuständig ist, wurde RPF2 identifiziert, ein Mitglied der Familie der PPR-Proteine (Jonietz *et al.* 2010).

Wie in Abbildung 2 gezeigt, weisen die 3'-untranslatierten Bereiche (UTRs) mitochondrialer Transkripte häufig Sequenzen mit *inverted repeats* (gegenläufigen Sequenzen) auf (Schuster *et al.* 1986). Derartige Strukturen existieren auch in Plastiden, wo sie sowohl als RNA-Prozessierungssignal als auch als stabilisierende Struktur wirken, die das Transkript vor dem Abbau schützen (Stern und Grissem 1987). Für diese Transkripte wurde darüber hinaus gezeigt, dass sowohl Exo- als auch Endonukleasen in der Lage sind, an diese Strukturen am

3'-Terminus zu binden (Chen und Stern 1991). Ähnliche Mechanismen werden auch für die 3'-Prozessierung von mitochondrialen Transkripten vermutet. In *Arabidopsis* wurden bei Studien am *atp9* Transkript die zwei 3'-5' Exonukleasen PNPase und PNR1 identifiziert, die beide maßgeblich an der Generierung des 3'-Endes involviert sind (Perrin *et al.* 2004). Der 3'-Terminus eines Transkriptes, sowie die Sekundärstrukturen in diesem Bereich sind Teil des mitochondrialen RNA Degradationsprozesses. Auch hier spielen Haarnadelstrukturen im 3'-Bereich eine große Rolle, wie beispielsweise für das *cob* Transkript in Reis und Weizen gezeigt wurde (Kaleikau *et al.* 1992). Darüber hinaus ist auch eine Polyadenylierung der 3'-Enden von Transkripten für die exonukleolytische Degradation durch eine PNPase notwendig (Holec *et al.* 2006). Durch ihren Einfluss auf die Halbwertszeit und den *Turnover* von Transkripten sind sowohl 3'-Prozessierung als auch Degradation von mRNA wichtige Regulatoren in der mitochondrialen Genexpression.

Für viele der beschriebenen Prozesse des RNA-Metabolismus' in den Mitochondrien Höherer Pflanzen wurden erst wenige Faktoren identifiziert, die in diese essentiellen Abläufe involviert sind. Darunter sind auffällig viele Vertreter der PPR-Proteine, die eine zentrale Rolle in allen Prozessen der mitochondrialen Genexpression zu spielen scheinen und im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

1.2 PPR-Proteine

Als erstes PPR-Protein wurde das mitochondriale Protein Pet309p aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben, welches an der Translation des *cox1* Gens beteiligt ist (Manthey und McEwen 1995). Ein Homolog mit vergleichbarer Funktion, CYA-5, wurde kurze Zeit später in *Neurospora crassa* identifiziert (Coffin *et al.* 1997). Auch für dieses PPR-Protein, CYA-5, konnte die Bedeutung für posttranskriptionale Prozesse bestätigt werden. In *Arabidopsis* wurde man auf diese Genfamilie erst durch die Sequenzierung des gesamten Genoms aufmerksam (Arabidopsis Genome Initiative (2000)), von dem PPR-Proteine mit etwa 6 % einen beachtlichen Teil der Proteine mit unbekannter Funktion einnehmen.

1.2.1 Struktur von PPR-Proteinen

Die PPR-Proteine in Höheren Pflanzen wurden zeitgleich von (Aubourg *et al.* 2000) und (Small und Peeters 2000) beschrieben. Die Namensgebung beruht auf der Ähnlichkeit der charakteristischen Motive zu denen der bis dahin besser beschriebenen *tetratricopeptide repeat* Proteine (TPR-Proteine).

Die bezeichnenden 35 Aminosäuren langen PPR-Motive sind tandemartig angeordnet (Abbildung 3). Ihre Anzahl variiert zwischen zwei und 26 Motiven pro Protein, wobei durchschnittlich zwölf Wiederholungen auftreten (Lurin *et al.* 2004). Das Vorkommen von Variationen dieses Motivs teilt die gesamte Proteinfamilie in zwei größere Unterfamilien, der P- und der PLS-Unterfamilie, auf. Proteine, die der P-Unterfamilie angehören weisen ausschließlich P-Motive mit 35 Aminosäuren auf, während Proteine der PLS-Unterfamilie Variationen dieses Motivs aufweisen, die mit 31 kürzer (S-Motiv, *short*) oder mit mehr als 35 Aminosäuren länger (L1- und L2-Motiv, *large*) sind. Die Motive kommen in keiner definierten Abfolge vor und liegen in vielen Proteinen in unterschiedlicher Kombination vor. Sie machen darüberhinaus mindestens zwei Drittel der gesamten Proteinsequenz aus (Lurin *et al.* 2004). In *Arabidopsis* ist von den insgesamt 442 PPR-Proteinen mit 242 Proteinen etwa die Hälfte der P-Unterfamilie zuzuordnen, während die verbleibenden 200 Proteine zu der PLS-Unterfamilie gehören. Small und Peeters (2000) postulierten, dass es durch die Abfolge der PPR-Motive zu einer Ausbildung einer charakteristischen Sekundärstruktur kommt, die aus antiparallelen α -Helices besteht, die wiederum eine Tertiärstruktur, eine Superhelix mit einer zentralen Furche bilden, welche aufgrund ihrer dort vorherrschenden Aminosäuren und der hydrophilen Eigenschaften eine Bindung von Nukleinsäuren begünstigt. Röntgenkristallanalysen der menschlichen mitochondrialen RNA-Polymerase, die zwei PPR-Motive enthält, bestätigen die Bildung antiparalleler α -Helices (Ringel *et al.* 2011).

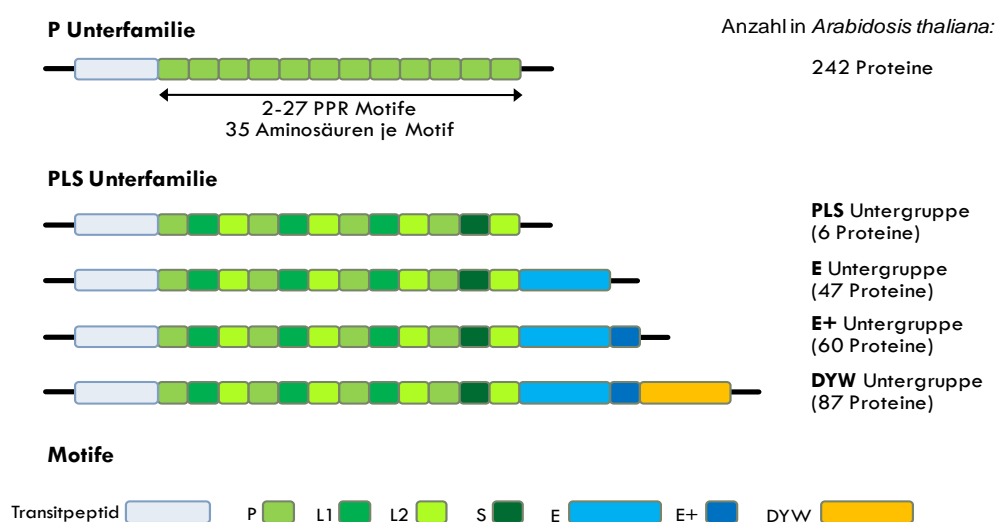


Abbildung 3: Struktur von PPR-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*. Gezeigt sind typische Strukturen von PPR-Proteinen unterschiedlicher Unterfamilien und Untergruppen. Angegeben ist außerdem die jeweilige Anzahl der einzelnen Unterfamilien- und Gruppen in *Arabidopsis*. Anordnung und Anzahl der Motive variiert in unterschiedlichen Proteinen. Modifiziert nach (Lurin *et al.* 2004).

Neben den PPR-Motiven wurden bei einigen PPR-Proteinen weitere Sequenzbereiche identifiziert, die sich am C-Terminus befinden und nur innerhalb der Proteine der PLS-Untergruppe zu finden sind. Diese Bereiche werden als E-, E+- und DYW-Domänen bezeichnet (Lurin *et al.* 2004) und die Proteine entsprechend ihres Terminus in die jeweilige Untergruppe eingeteilt. Die Domänen sind nicht mit dem PPR-Motiv verwandt, kommen trotzdem, bis auf eine Ausnahme, ausschließlich in PPR-Proteinen vor (Lurin *et al.* 2004). Charakteristisch ist die Abfolge der Domänen innerhalb eines Proteins, die strikt konserviert ist und in keiner abweichenden Form zu existieren scheint. Enthält ein PPR-Protein alle drei Domänen, so sind diese colinear in der Reihenfolge E, E+, DYW angeordnet. Bei Proteinen mit zwei Domänen folgt die E+-Domäne auf die E-Domäne. Die E-Domäne kann auch alleine vorkommen, es sind jedoch keine multiplen Kopien einer Domäne in ein und demselben Protein vorzufinden (Lurin *et al.* 2004). Wie vergleichende Analysen zeigen, sind die E- und die E+-Domäne stark degeneriert und daher schwierig zu identifizieren, während sich die DYW-Domäne durch hoch konservierte Aminosäuren auszeichnet. Für diese Domäne wurde daher lange eine mögliche katalytische Funktion angenommen (Aubourg *et al.* 2000; Saha *et al.* 2007), was bis heute jedoch nicht bestätigt wurde. Allerdings gibt es einen direkten Zusammenhang von Proteinen mit DYW-Domäne und der RNA-Edierung (Salone *et al.* 2007; Rüdinger *et al.* 2008). Darüber hinaus kommen PPR-Proteine der PLS-Untergruppe ausschließlich im Pflanzenreich vor. Der Ursprung der Domänen der PLS-Untergruppe ist noch ungeklärt. Die DYW-Domäne entstammt möglicherweise einem horizontalen Gentransfer zwischen einem Vertreter der Pflanzen und einem zu den Protisten gehörenden Vertreter der Heterolobosen (Knoop und Rüdinger 2010).

1.2.2 Evolution und Verbreitung von PPR-Proteinen

PPR-Proteine wurden in allen eukaryotischen Organismen gefunden, ihre Anzahl variiert allerdings erheblich. Während in *Arabidopsis* 450 und in einem Vertreter der Pappeln (*Populus trichocarpa*) sogar 600 PPR-Proteine identifiziert wurden, sind diese außerhalb der Gruppe der Landpflanzen, z.B. bei *Drosophila* oder *Saccharomyces*, bei denen zwei bzw. fünf PPR-Proteine bekannt sind, eher selten (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Die weitere Analyse verschiedener Genome, wie z.B. dem der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (12 PPR-Proteine) und des Mooses *Physcomitrella patens* (103 PPR-Proteine) hinsichtlich der Anzahl von PPR-Proteinen führte letztlich zu der Hypothese, dass die massive Verbreitung der PPR-Proteine nach der Abspaltung der Landpflanzen von den Algen, aber vor der Abzweigung der Samenpflanzen von den Bryophyten aufgetreten ist (Fujii und Small 2011).

Ein Mechanismus, der mit großer Wahrscheinlichkeit zur Verbreitung der PPR-Proteine beigetragen hat, ist der Vorgang der Retrotransposition, bei dem das Produkt einer Reversen Transkription in das Genom reintegriert wird. Die Tatsache, dass mehr als 80 % aller für PPR-Proteine codierenden Gene von *Arabidopsis* und *Oryza* intronlos sind (Lurin *et al.* 2004; O'Toole *et al.* 2008), während über 75 % der PPR- Gene von *P. patens* Introns enthalten, wie auch die meisten der evolutionär älteren PPR-Genen von *Arabidopsis* und *Oryza* (O'Toole *et al.* 2008), bestätigt diese Theorie. Neben der Retrotransposition wird auch die Genomduplikation als ein weiterer Mechanismus diskutiert, der zu dem Anstieg der für PPR-Proteine codierenden Gene beigetragen haben könnte. Ein derartiger Vorgang kann massive Auswirkungen auf die Genanzahl von schon bestehenden Genfamilien haben und ist im Falle der Angiospermen bereits mindestens zweimal im Laufe der Evolution aufgetreten (Bowers *et al.* 2003; De Bodt *et al.* 2005). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welcher selektive Druck gewirkt hat, der zur Erhaltung der durch Retrotransposition und Genomduplikation verursachten großen Anzahl an PPR-codierenden Genen beigetragen hat. Die Verbreitung der PPR-Proteine scheint nach heutigen Kenntnissen eng mit dem Auftreten der pflanzenspezifischen PLS-Unterfamilie verbunden zu sein, deren Vertreter in großer Anzahl am Prozess der RNA-Edierung beteiligt sind (Hammani *et al.* 2009). Da sowohl die pflanzliche RNA-Edierung, als auch die PPR-Proteine der PLS-Unterfamilie gleichermaßen erstmalig in Landpflanzen auftraten und die Anzahl der Edierungspositionen unmittelbar mit der Anzahl an PLS-Proteinen korreliert, wird davon ausgegangen, dass die Verbreitung der RNA-Edierung maßgeblich zu dem massiven Anstieg von PPR-Proteinen der PLS-Klasse beigetragen hat (Salone *et al.* 2007; Fujii und Small 2011).

Im Gegensatz zu der Evolution und der Verbreitung der PPR-Proteine ist die Frage nach ihrem eigentlichen Ursprung weitestgehend unbeantwortet. Die Omnipräsenz in Eukaryoten und die strikte Assoziation mit Funktionen der Organellen sprechen für einen Ursprung, der in den prokaryotischen Endosymbionten liegt. Allerdings wurden für PPR-Proteine codierende Gene oder ORFs weder im Chondrom oder im Plastom, noch in Vertretern der α -Proteobakterien und der Cyanobakterien gefunden (Lurin *et al.* 2004), so dass man die Möglichkeit in Betracht zieht, dass die PPR-Proteine ihren Ursprung in den Eukaryoten haben. Small und Peeters (2000) zufolge könnten sich die PPR-Proteine aus den strukturell sehr ähnlichen TPR-Proteinen entwickelt haben, die im Gegensatz zu PPR-Proteinen sowohl in Eukaryoten, als auch in Archaeen und Bakterien vorkommen (Blatch und Lassle 1999; D'Andrea und Regan 2003). Sie bilden, wie die PPR-Proteine auch, durch die sich wiederholenden TPR-Motive antiparallele Helices, die eine Superhelix mit zentraler Furche

ausbilden, deren Oberfläche durch eine bestimmte Ladungsverteilung die Bildung von Liganden begünstigt (Blatch und Lassle 1999; D'Andrea und Regan 2003). TPR-Proteine sind zwar in erster Linie in Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert, jedoch gibt es einige TPR-Proteine, die auch in der Lage sind, RNA zu binden (D'Andrea und Regan 2003; Sane *et al.* 2005). Aufgrund dieser funktionellen Übereinstimmung erscheint eine Entwicklung der PPR-Proteine aus den TPR-Proteinen denkbar.

1.2.3 Die Funktionen von PPR-Proteinen im RNA-Metabolismus der Organellen

Etwa die Hälfte der PPR-Proteine aus *Arabidopsis* sind gemäß *in silico* Analysen mitochondrial lokalisiert, während ein Viertel als chloroplastidär lokalisiert eingestuft wird (Lurin *et al.* 2004; O'Toole *et al.* 2008). Außerhalb dieser Organellen wurden bisher nur zwei PPR-Proteine gefunden (Ding *et al.* 2006; Hammani *et al.* 2011b). Beide sind im Nukleus an der Genexpression beteiligt.

PPR-Proteine wurden aufgrund ihrer Struktur schon früh als RNA-bindende Proteine beschrieben (Small und Peeters 2000). Diese Annahme hat sich seitdem vielfach *in vivo* bestätigt (z.B. (Schmitz-Linneweber *et al.* 2005; Schmitz-Linneweber *et al.* 2006; Beick *et al.* 2008; Pfalz *et al.* 2009), wobei bei vielen dieser Analysen zwar eine Assoziation mit RNA-Molekülen, nicht jedoch eine klare, physikalische Interaktion nachgewiesen wurde. Detaillierte Bindestudien mit definierten Ziel-RNAs sind nur für sehr wenige PPR-Proteine verfügbar, jedoch weisen diese darauf hin, dass es kein allgemeingültiges, definiertes RNA-Sequenzmotiv oder eine bestimmte Sekundärstruktur gibt, die generell als PPR-Protein bindend bezeichnet werden kann (Schmitz-Linneweber und Small 2008).

Neben Analysen zur RNA-Bindung von PPR-Proteinen wurden zahlreiche Studien an Mutanten durchgeführt, die zeigen, dass homozygote Mutationen in PPR-Genen zu einer Ausbildung von drastischen Phänotypen und in vielen Fällen sogar zu Embryoletalität führt (Lurin *et al.* 2004; Schmitz-Linneweber und Small 2008). In allen Fällen war in den Mutanten die RNA-Prozessierung oder die Translation in den Organellen betroffen (Andrés *et al.* 2007; Schmitz-Linneweber und Small 2008). Hierbei wurden die Defekte in einzelnen PPR-Genen auch einzelnen Transkripten zugeordnet, so dass trotz der hohen Anzahl an PPR-Genen von einer Spezifität und nicht-redundanten Funktion der einzelnen PPR-Proteine für die Genexpression in Chloroplasten und Mitochondrien auszugehen ist.

Als transkriptspezifische, in den Organellen lokalisierte, RNA-bindende Proteine sind die PPR-Proteine in Pflanzen in nahezu alle Schritte des organellären RNA-Metabolismus' involviert (Abbildung 4, siehe auch Kapitel 1.1.2).

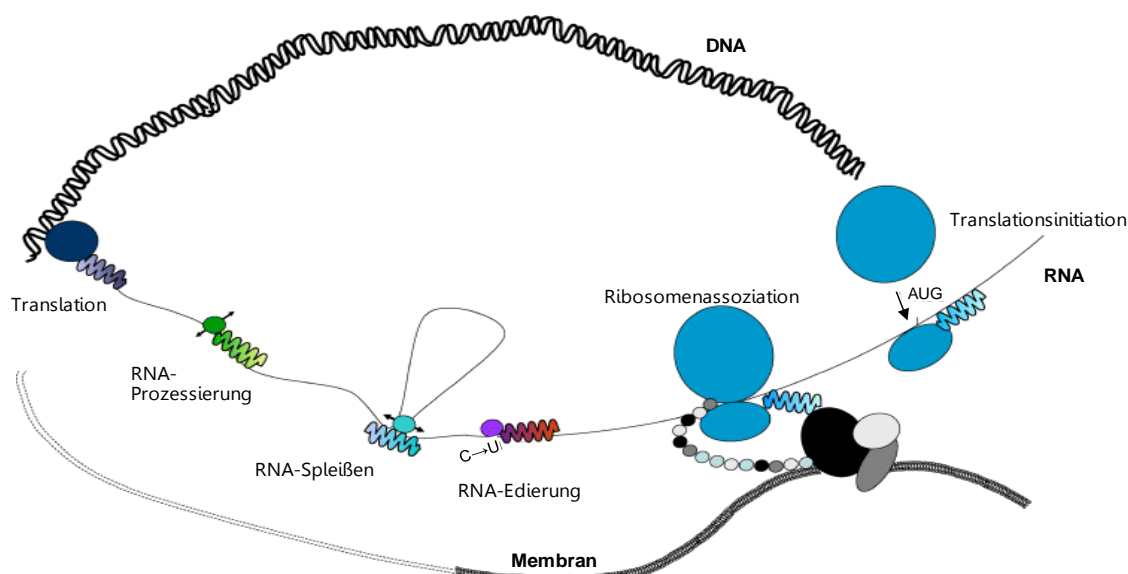


Abbildung 4: Funktionen von PPR-Proteinen in der Genexpression in Mitochondrien Höherer Pflanzen.
Modifiziert nach (Andrés *et al.* 2007).

Bei den ersten charakterisierten PPR-Proteinen Pet309p aus *Saccharomyces* und seinem Ortholog CYA-5 aus *Neurospora* (Manthey und McEwen 1995; Coffin *et al.* 1997; Manthey *et al.* 1998) handelt es sich um für die Translation von COX1 essentielle Faktoren in Mitochondrien. Für Pet309p wurde gezeigt, dass es mit der 5'-untranslatierten *leader*-Sequenz der *cox1* mRNA assoziiert und in einem Proteinkomplex, der auch auf weitere Transkripte translationsaktivierend wirkt, gebunden an die innere mitochondriale Membran vorliegt (Naithani *et al.* 2003; Krause *et al.* 2004). Das Protein Pet309p stellt darüberhinaus eine Verbindung zwischen Transkription und Translation dar, da es außerdem mit Nam1p, einem Protein, welches an die mitochondriale Polymerase bindet, in einem Komplex vorliegt (Naithani *et al.* 2003). Dies lässt den Schluss zu, dass Transkription, Translation und die Assemblierung von Proteinen der Atmungskette gemeinsam in der inneren mitochondrialen Membran ablaufen (Krause *et al.* 2004; Shadel 2004). Auch in Pflanzen wurden bereits mehrere PPR-Proteine identifiziert, die in die Translation involviert sind, so beispielsweise die Proteine PPR2 und CRP1 aus *Zea mays*, die für die Akkumulation und Synthese der plastidären Translationsmaschinerie bzw. die Translation der *petA* und *psaC* mRNA verantwortlich sind (Fisk *et al.* 1999; Williams und Barkan 2003). Ähnlich wie Pet309p bindet auch CRP1 in einem Bereich des 5' UTRs und liegt assoziiert mit den Polysomen vor (Barkan *et al.* 1994). Somit scheinen diese Proteine auch für die Initiation der Translation eine wesentliche Rolle in pflanzlichen Organellen zu spielen, bei denen der Vorgang aufgrund fehlender klassischer Shine-Dalgarno Sequenzen im Wesentlichen noch ungeklärt ist (Zerges 2000).

Ein Großteil der Regulation der Genexpression findet allerdings nicht während der Translation, sondern bereits während und nach der Transkription statt. Hier ist ein einfacher und gleichsam effektiver Weg zur Kontrolle der Genexpression in Mitochondrien die Veränderung der Menge an mRNA Molekülen. Dies geschieht beispielweise durch die Stabilisierung von Transkripten oder aber durch mRNA-Degradation; beides sind Prozesse in die PPR-Proteine maßgeblich involviert sind. Für die Transkriptstabilisierung spielen die PPR-Proteine der ubiquitär vorkommenden P-Unterfamilie eine entscheidende Rolle, was zusammen mit anderen Fakten darauf hinweist, dass es sich bei dieser Funktion um eine sehr frühe Fähigkeit handelt, die sich im Verlauf der Evolution weiterentwickelte (Zoschke *et al.* 2010). Der grundsätzliche Mechanismus basiert auf dem Schutz gegen exo- und endonukleolytische Spaltung der mRNA durch die Bindung eines PPR-Proteins an definierte Regionen des Transkripts am 3'- und 5'-Ende. Gut untersuchte Beispiele für diese Prozesse sind die PPR-Proteine PPR10 und CRP1 aus Mais, die an der Stabilisierung der plastidären Transkripte *atpH* und *psaJ* bzw. *petD* und *petB* beteiligt sind (Fisk *et al.* 1999; Pfalz *et al.* 2009) und das Protein PGR3 aus *Arabidopsis*, welches Transkripte des *petL*-Operons stabilisiert (Yamazaki *et al.* 2004).

Ein weiterer, für die Genexpression essentieller Prozessierungsschritt ist das Spleißen. Allerdings ist für einige PPR-Proteine nicht gänzlich geklärt, ob sie direkt am Prozess des Spleißens der Transkripte beteiligt sind, oder ob Veränderungen im Spleißverhalten lediglich Konsequenzen einer Veränderung der RNA-Stabilität sind (de Longevialle *et al.* 2010). Dessen ungeachtet wurden bisher fünf PPR-Proteine identifiziert, die unmittelbar in das Spleißen von Transkripten involviert sind. Von diesen Proteinen sind insgesamt vier in den Chloroplasten lokalisiert; zu ihnen gehören das PPR4-Protein in Mais, das für das Spleißen des ersten Introns des *rps12*-Gens verantwortlich ist (Schmitz-Linneweber *et al.* 2006) und das PPR-Proteine OTP51 aus *Arabidopsis*, welches das Spleißen von Introns der Transkripte *ycf3* und *atpF* beeinflusst (de Longevialle *et al.* 2008). Das einzige PPR-Protein, das als Spleißfaktor in die Prozessierung mitochondrialer Transkripte involviert ist, ist das Protein OTP43. Dieses wird für das Spleißen der ersten *nad1*-Introns in den Mitochondrien von *Arabidopsis* benötigt (de Longevialle *et al.* 2007).

Von allen posttranskriptionellen Prozessen ist die RNA-Edierung der am wenigsten verstandene Vorgang in pflanzlichen Organellen. Weder die molekularen Mechanismen der Edierungsreaktion noch die daran beteiligten enzymatischen Faktoren, die für diese Reaktion verantwortlich sind, wurden bislang beschrieben. Nachdem für die Plastiden schon relativ früh einige an der Edierung beteiligte Faktoren beschrieben wurden, ist im Laufe der letzten

Jahre auch für die Mitochondrien eine große Anzahl von PPR-Proteinen identifiziert worden, die essentielle Funktionen für die RNA-Edierung hat (Fujii und Small 2011). Mittlerweile sind in pflanzlichen Mitochondrien 21 PPR-Proteine beschrieben, die an der Edierung beteiligt sind (Fujii und Small 2011; Hammani *et al.* 2011a; Uchida *et al.* 2011; Verbitskiy *et al.* 2011; Okuda und Shikanai 2012; Yuan und Liu 2012), in Chloroplasten sind es derzeit 17 (Fujii und Small 2011; Okuda und Shikanai 2012). Darüber hinaus wurde mit den MORF-Proteinen (MORF: *multiple organellar RNA editing factor*) erst kürzlich eine ganze Familie von Proteinen beschrieben, deren Vertreter mit den PPR-Proteinen zusammen in einem Editosom agieren und für die RNA-Edierung zahlreicher Transkripte in Plastiden und Mitochondrien verantwortlich sind (Takenaka *et al.* 2012). Die für die Edierung essentiellen PPR-Proteine gehören alle der PLS-Unterfamilie an, die am C-Terminus wenigstens eine E-Domäne tragen. Diese ist möglicherweise an der Rekrutierung des noch unbekanntes Edierungsenzyms beteiligt (Shikanai 2006), was bisher allerdings nicht experimentell bestätigt wurde. Auch weitestgehend ungeklärt ist der Erkennungsmechanismus, der für die Spezifität einzelnen PPR-Proteine zu ihrer Ziel-RNA verantwortlich ist.

Zusätzlich zu posttranskriptionalen Prozessen sind PPR-Proteine auch in weitere zelluläre Vorgänge involviert, so sind beispielsweise bis auf wenige Ausnahmen alle Proteine, die in der Wiederherstellung der cytoplasmatischen, männlichen Sterilität (CMS) in CMS-Pflanzen den PPR-Proteinen zuzuordnen (Andrés *et al.* 2007). Sie stellen als Rf-Faktoren (Rf: *restorer of fertility*) die Fertilität wieder her, indem sie die Expression der CMS-auslösenden Gene auf verschiedene Weisen unterdrücken (Schnable und Wise 1998). Andere pflanzliche PPR-Proteine spielen beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der Gametogenese und der Embryogenese (Lu *et al.* 2011) sowie bei der Abwehr von Pathogenen und der Stresstoleranz gegen diverse abiotische Faktoren (Laluk *et al.* 2011; Yuan und Liu 2012).

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Die PPR-Proteine bilden zusammen in *Arabidopsis* die größte Genfamilie, deren bekannte Vertreter in eine Vielzahl von Prozessen in den Chloroplasten und Mitochondrien involviert sind (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Trotz alledem stellen sie mit etwa 6 % einen beachtlichen Teil der Proteine mit unbekannter Funktion und sind daher Gegenstand aktueller Forschungen. Ungeklärt sind vor allem die Mechanismen der spezifischen RNA-Erkennung und -Interaktion.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden in *in vitro*-Analysen zwei Proteine aus *Arabidopsis*, AT1G15480 und AT3G15590, identifiziert, die spezifisch an ein RNA-Fragment des *cox2*-Gens binden, welches die Edierungsposition +276 beinhaltet. Diese Proteine wurden als PPR-Proteine mit einer vorhergesagten Lokalisation in den Mitochondrien klassifiziert (Bolle 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen diese beiden Proteine charakterisiert werden und eine mögliche Rolle für den mitochondrialen RNA-Metabolismus aufgeklärt werden. Die Analysen sollten dabei sowohl auf bioinformatischer, als auch auf molekularer und biochemischer Ebene erfolgen. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden können z.B. wichtige Erkenntnisse über die Struktur, die für PPR-Proteine experimentell noch nicht bestätigt wurde, erhalten werden. Darüber hinaus bieten Datenbanken die Möglichkeit, putative RNA-Bindemotive zu identifizieren. Ebenfalls wichtiger Gegenstand der Arbeit sollte die Analyse von T-DNA Insertionsmutanten für die beiden zu untersuchenden Proteine sein. Da in zahlreichen Studien an Mutanten mit homozygoten T-DNA Insertionen in PPR-Genen bereits auffällige Phänotypen beschrieben wurden (Lurin *et al.* 2004; Schmitz-Linneweber und Small 2008), versprechen Mutantanalysen und phänotypische Untersuchungen der Mutanten weiterführende Hinweise auf die Funktion der beiden PPR-Proteine. Die Verfügbarkeit homozygoter *knockout*-Pflanzen ermöglicht außerdem zahlreiche Analysen hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der Transkription und der Translation ausgesuchter Gene. So können Analysen des Edierungsstatus', der Transkriptionsrate und des mitochondrialen Proteoms Veränderungen der Mutanten gegenüber dem Wildtyp aufzeigen, um Rückschlüsse zu erhalten, ob und in welche Prozesse die Proteine AT1G15480 und AT3G15590 involviert sind. Außerdem soll die zelluläre Lokalisation der Proteine experimentell bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), Qiagen (Hilden), BioRad (München), Fluka (München), Merck (Darmstadt) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen. Die verwendeten Geräte entsprechen der laborüblichen Ausstattung.

2.2 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana*

2.2.1 T-DNA Insertionslinien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Wildtyppflanzen (WT-Pflanzen) und T-DNA Insertionsmutanten von *Arabidopsis* des Ökotyps Columbia (Col-0) und Wassilewskija (WS-4) verwendet. Die Samen der T-DNA Insertionspflanzen (Tabelle 1) wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC; <http://arabidopsis.info/>) und dem *Versailles Genetics and Plant Breeding Laboratory Arabidopsis thaliana Resource Centre* (INRA; <http://dbsgap.versailles.inra.fr/portail/>) bezogen.

Tabelle 1: Verwendete T-DNA Insertionslinien. Angegeben sind neben der Linienbezeichnung die MATDB-Nummer, die in der Datenbank angegebene Lokalisation der T-DNA, die Bezugsquelle, sowie die jeweilige Referenz

MATDB-Nr.	Lokalisation der T-DNA	Bezeichnung	Bezugsquelle	Referenz
At3g15590	Exon	GK_188B06	NASC	(Li <i>et al.</i> 2007)
At1g15480	Exon	FLAG_465F03	INRA	(Samson <i>et al.</i> 2002)

2.2.2 Anzucht auf Erde

Etwa 20 Samen von *Arabidopsis* wurden gemeinsam in Pflanztöpfen mit einem Durchmesser von 9 cm auf einem 2:3 Gemisch aus Sand und Torfkultursubstrat (TKSII, Floragard) ausgesät. Zur Synchronisation der Keimung und der Vernalisation wurden die Aussaaten zwei Tage bei einer Temperatur von 10 °C dunkel gelagert, bevor sie dann unter den angegebenen Anzuchtbedingungen (Tabelle 2) im Klimaschrank (Percival Scientific) oder in der Klimakammer (Brown, Boveri & Cie.) kultiviert wurden. Nach zweiwöchiger Anzucht wurden die Keimlinge in einzelne Töpfe (ø 5 cm) pikiert und unter den entsprechenden Bedingungen weiter angezogen.

Tabelle 2: Anzuchtbedingungen für *Arabidopsis*. Einstellungen der für die Anzucht von *Arabidopsis* relevanten Parameter der Klimakammer und des Klimaschranks

Parameter	Klimakammer	Klimaschrank
Lichtperiode (Tag/Nacht)	12 Std./12 Std.	16 Std./ 8 Std.
Lichtqualität	Philips Alto II	Osram L Lumilux
Lichtintensität	110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	135 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Luftfeuchtigkeit	unreguliert	70 %
Temperatur (Tag/Nacht)	25°C/25°C	22°C/22°C

2.2.3 Oberflächensterilisation von Samen

Um den Befall von Pflanzen in Sterilkultur mit Mikroorganismen auszuschließen, wurden die Samen vor der Aussaat sterilisiert. Hierfür wurden etwa 20-25 mg Samen von *Arabidopsis* in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für eine Minute in 70 % (v/v) Ethanol geschüttelt und die Samen anschließend sedimentiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation unter Schütteln in 1,0 ml Natriumhypochloridlösung (50 % (v/v) Natriumhypochlorid, 0,05 % (v/v) Triton X-100). Anschließend wurden die Samen erneut sedimentiert und viermal mit autoklaviertem Wasser gewaschen.

2.2.4 Anzucht in Sterilkultur

Die Anzucht von *Arabidopsis* unter sterilen Bedingungen erfolgte in sterilen Petrischalen (\varnothing 14,5 cm, Sarstedt, Nümbrecht) auf Festmedium (2,203 g/l Murashige Skoog Medium mit Vitaminen, 1 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) MES, 2 % (w/v) Phytagar, pH 5,7) nach Murashige und Skoog (Murashige und Skoog 1962), dem zur Selektion von T-DNA-Insertionslinien Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 mg/l zugesetzt wurde. Zum Ausbringen wurden etwa 50–200 zuvor oberflächensterilisierte Samen (2.2.3) in 5 ml autoklavierter 0,1 %iger Agaroselösung aufgenommen und durch Schwenken gleichmäßig auf dem Medium verteilt. Anschließend wurden die Petrischalen offen bis zum Trocknen der Suspension unter der Sterilwerkbank (Thermo Fisher Scientific) gelagert. Die Synchronisation der Keimung, die Vernalisierung und die weitere Anzucht erfolgten gemäß Abschnitt 2.2.2. Optional konnte ein Umsetzen der Keimlinge auf Erde oder eine weitere Kultivierung als hydroponische Wurzelkultur zwei bis drei Wochen nach dem Auskeimen durchgeführt werden.

2.2.5 Hydroponische Sterilkulturen von *Arabidopsis* Wurzeln

Zur Gewinnung großer Mengen Biomasse innerhalb kurzer Zeit wurden hydroponische Wurzelkulturen von *Arabidopsis* nach dem Protokoll von (Czakó *et al.* 1993) etabliert. Hierfür wurden etwa 20 in Sterilkultur (siehe 2.2.4) angezogene Keimlinge unter sterilen Bedingungen in 200 ml *Arabidopsis* Wurzelkulturmedium, WKM (4,4 g/l Murashige & Skoog basale Salze, 200 mg/l Myo-Inositol, 0,3 % (v/v) Miller's solution (6 % KH_2PO_4), 0,2 % Vitamix Stocklösung (0,5 % Vitamin B1, 0,05 % Vitamin B6, 0,1 % Glycin, 0,05 % Nikotinsäure, 0,025 % Folsäure, 0,05 % Biotin), 3 % Saccharose, pH 5,8) überführt und für vier bis sechs Wochen im abgedunkelten Schüttelinkubator bei 25 °C und 70 rpm inkubiert. Nach zwei Wochen Anzucht wurde der Kultur das zur Gruppe der Auxine gehörende Phytohormon Indol-3-essigsäure (IAA) in einer Enkonzentration von 50 µg/l zur Stimulation des Wurzelwachstums (Rahman *et al.* 2001) zugesetzt. Nach weiteren fünf Tagen erfolgte ein Austausch des IAA-haltigen Mediums gegen frisches WKM ohne Phytohormonzusatz.

2.2.6 *Arabidopsis* Zellkulturen

Zellkulturen der Linie MM1 (Menges und Murray 2002) von *Arabidopsis* wurden steril in MSMO-Medium (4,4 g/l MSMO, 3 % Saccharose, pH 5,7), welches mit 0,5 mg/l Naphtalensäure (NAA) und 0,05 mg/l Kinetin versetzt wurde bei 25°C unter Lichtausschluss bei 130 rpm in einem Inkubationsschüttler kultiviert. In einem Intervall von sieben Tagen wurde frisches Medium mit der 0,1 fachen Menge Zellkultur inokuliert.

2.3 Arbeiten mit *Arabidopsis*

2.3.1 Lokalisation von PPR-GFP-Fusionsproteinen

2.3.1.1 Präparation von Protoplasten aus *Arabidopsis* Zellkulturen

Die Präparation von Protoplasten aus *Arabidopsis*-Zellen wurde abgewandelt nach (Damm und Willmitzer 1988) durchgeführt. Arbeiten mit Protoplasten fanden unter einer Sterilwerkbank statt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 100 x *g* und minimaler Beschleunigungs- und Bremsrate in einem Ausschwingrotor (S4180, Beckman Coulter) durchgeführt. Um die auf die Protoplasten einwirkenden Scherkräfte zu minimieren, wurden ausschließlich abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten drei bis fünf Tage alte Zellkulturen der Linie MM1, von denen 40 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert wurden. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 25 ml Enzymlösung (1 % (w/v)

Cellulase, 0,2 % (w/v) Maceroenzym, in MS-GM) resuspendiert und mit MS-GM (0,44 % (w/v) MS Medium, 3 % (w/v) Glukose, 3 % (w/v) Mannitol, pH 5,5) auf 50 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde in zwei Petrischalen (\varnothing 14,5 cm) überführt und das Volumen nochmals um weitere 25 ml pro Petrischale mit MS-GM gesteigert, so dass jede der beiden Schalen 50 ml Zellsuspension enthielt. Es folgte eine Inkubation für drei bis fünf Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler. Der enzymatische Verdau der Zellwand wurde während dieser Zeit mehrfach mikroskopisch kontrolliert und solange fortgeführt, bis die Zellen vereinzelt vorlagen. Die Suspension wurde in Zentrifugationsröhrchen überführt, zentrifugiert, mit 25 ml MS-GM gewaschen und erneut zentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden dann in 10 ml MS-S (0,44 % (w/v) MS-Medium, 10 % (w/v) Saccharose, pH 5,5) resuspendiert bevor in einem weiteren Zentrifugationsschritt die intakten von den kollabierten Protoplasten aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt werden konnten. Während zerstörte Protoplasten am Gefäßboden pelletieren, sammeln sich die intakten Zellen am Flüssigkeitsmeniskus. Sie wurden abpipettiert und mit dem gleichen Volumen W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES, pH 5,7) verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden dann in 1,2 ml MMg-Lösung (400 mM Mannitol, 15 mM MgCl₂) resuspendiert und bis zur sich direkt anschließenden Transformation im Dunkeln gelagert.

2.3.1.2 Transformation von Protoplasten aus *Arabidopsis*

Pro Transformationsansatz wurden 200 μ l der nach 2.3.1.1 isolierten Protoplasten verwendet. Diese wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig mit 20 mg Plasmid-DNA vermischt. Nach der Zugabe von 220 μ l PEG/Ca-Lösung (40 % (v/v) PEG 4000, 200 mM Mannitol, 100 mM CaCl₂) erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei RT und unter Lichtausschluss. Anschließend wurde dem Ansatz 800 μ l W5-Lösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES, pH 5,7) zugegeben, dieser zentrifugiert und das Pellet in 500 μ l MS-GM aufgenommen. Nach einer Inkubation für sechs bis sechzehn Stunden im Dunkeln und bei RT erfolgte die mikroskopische Analyse der transformierten Protoplasten.

2.3.1.3 Färbung von Mitochondrien in isolierten und transformierten Protoplasten

Für die Bestimmung der Lokalisation von PPR-GFP-Fusionsproteinen wurden die transformierten Protoplasten zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos (Molecular Probes, (Poot *et al.* 1996)) behandelt. Dieser Farbstoff diffundiert passiv durch die Plasmamembran und akkumuliert in den Mitochondrien. Sind diese intakt und respirationsaktiv, so wird der nicht fluoreszierende, reduzierte Farbstoff in einen oxidierten Zustand überführt, wodurch die Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch sichtbar werden. Die Behandlung der Protoplasten mit MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos erfolgte mit einer Konzentration von 300 nM nach Angaben des Herstellers unmittelbar vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse.

2.3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der transformierten Protoplasten erfolgte an einem Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (Model TCS SP) der Firma Leica Microsystems, mit einer Anregung von 488 nm und einer Emission im grünen (500-540 nm) und roten Bereich (560 -620 nm) in der Zentralen Mikroskopie im Biologiezentrum der CAU zu Kiel. Die Aufnahme der digitalen Bilder erfolgte unter Verwendung der Software „LCSLite“.

2.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren aus *Arabidopsis*

2.3.2.1 Schnellextraktion von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis* erfolgte verändert nach dem Protokoll von (Edwards *et al.* 1991). Zwei bis drei Blätter der zu testenden Pflanze wurden in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff mit einem Mikropistill zerrieben. Anschließend wurden 500 µl Extraktionspuffer (0,4 M LiCl, 0,2 M TRIS-HCl (pH 9,0), 25 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS hinzugefügt, der Ansatz gründlich auf einem Vortexschüttler (Merck Eurolab GmbH) homogenisiert und dann durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 20.000 x *g* und 4 °C in Überstand und Pellet getrennt. Der Überstand wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und der Ansatz für eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Die so gefällte DNA wurde dann für 10 min bei 20.000 x *g* und 4 °C pelletiert, vom Überstand getrennt, getrocknet und anschließend in 100 µl sterilem, destilliertem Wasser rückgelöst.

2.3.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion genomischer DNA

Zur Isolierung von Gesamt-DNA im größeren Maßstab wurde Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zerrieben und mit 2,5 ml Lysepuffer (10 mM TRIS-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % SDS) gründlich vermischt. Nach einer ersten Phenolisierung mit 2,5 ml Phenol und einer 15-minütigen Zentrifugation bei $2.500 \times g$ und RT erfolgte das zweimalige Ausschütteln mit jeweils 2,5 ml eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1). Im Anschluss an einen weiteren Extraktionsschritt mit einem Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (24:1) folgte zum Abbau von RNA die Zugabe von 10 µg RNaseA (Sigma-Aldrich, Steinheim) zum Überstand und eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Proben ein weiteres Mal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol sowie einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt, bevor die DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 1/10 Volumen 8M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol absolut gefällt wurde. Die Fällungsreaktion erfolgte dabei für 30 bis 60 Minuten bei -80°C. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation und nach Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde die pelletierte DNA in 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0) rückgelöst.

2.3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte abgewandelt nach dem Protokoll von (Manickavelu *et al.* 2007). Hierfür wurden Rosettenblätter mit einem Pistill in einem Mörser unter Stickstoff fein zerrieben und ein 2 ml Reaktionsgefäß zu etwa einem Viertel mit dem Pulver gefüllt. Nach Zugabe von 500 µl kochendem RNA-Lysepuffer (0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1 % SDS, pH 9,0) und gründlichem Durchmischen wurden 500 µl auf 60°C erwärmtes Phenol zugegeben und das Homogenat anschließend für 10 min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert. Es folgte daraufhin eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender alkoholischer Fällung der Nukleinsäuren wie unter 2.3.2.2 beschrieben und eine selektive LiCl-Fällung der RNA über Nacht. Die pelletierte RNA wurde abschließend in 40 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Blütenständen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Blüten von *Arabidopsis* erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® RNA XS Kit der Fa. Macherey-Nagel. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Samen

Da Pflanzensamen große Mengen an Polysacchariden, Polyphenolen, Lipiden und Proteinen enthalten und diese während der Präparation mit der RNA interferieren oder diese degradieren, müssen die sekundären Pflanzenstoffe mit Hilfe einer geeigneten Isolierungsmethode entfernt werden. Daher erfolgte die Präparation von RNA aus Samen unverändert nach (Birtic und Kranner 2006).

2.3.3 Isolierung von Mitochondrien aus Wurzelkulturen

Die Isolierung von Mitochondrien aus hydroponischen Wurzelkulturen (2.2.5) erfolgte nach einer vereinfachten Methode von (Klein *et al.* 1998). Alle Schritte erfolgten bei 10°C und/oder auf Eis. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst in kaltem Extraktionspuffer (450 mM Saccharose, 15 mM MOPS, 1,5 mM EGTA-KOH, pH 7,4, 10 mM Dithiothreitol, 6 g/l Polyvinylpyrrolidon) in einem vorgekühlten Mixer zerkleinert, bevor anschließend durch eine Filtration durch Miracloth (Calbiochem) und anschließende Zentrifugation des Filtrats für 5 min bei 2.000 x *g* und 4°C Zelltrümmer abgetrennt wurden. Die Mitochondrien, sowie weitere Zellbestandteile wurden bei 16.000 x *g* und 4°C für 10 min pelletiert und mit einem Pinsel in wenigen Millilitern in Waschpuffer (300 mM Saccharose, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA-KOH, pH 5,2) resuspendiert. Diese Suspension wurde auf einen gekühlten diskontinuierlichen Saccharosegradienten (20 %/ 36 %/ 40 %/ 52 % (w/v)) aufgetragen und für 90 Minuten und 4°C bei 100.000 x *g* in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Aufgrund ihrer Dichte sammeln sich die Mitochondrien an der Phasengrenze zwischen 40 % und 52 %. Sie wurden abpipettiert, mit kaltem Resuspensionspuffer (400 mM Mannitol, 10 mM Tricine-KOH, 1 mM EGTA-KOH, pH 7,2) verdünnt, bei 14.000 x *g* und 4°C für 10 min pelletiert und anschließend in Resuspensionspuffer wieder aufgenommen und nach einer erfolgten Proteinbestimmung (2.5.1) entweder frisch verwendet oder in 1 mg Aliquots bei -80°C gelagert.

2.3.4 Isolierung von Proteinen

2.3.4.1 Isolierung von Proteinen aus Mitochondrien

Die Isolierung löslicher Proteine aus *Arabidopsis* erfolgte leicht abgewandelt nach dem Protokoll von (Ni *et al.* 1996). Hierfür wurden etwa 500 mg gemörseretes Pflanzenmaterial in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Puffer QB (100 mM KPO₄, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, 0,1 mM AEBSF) homogenisiert und anschließend bei 20.000 x *g* und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert und der Überstand anschließend mit einem Volumen 5x SDS-Probenpuffer (313 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenol Blau, 50 % (v/v) Glycerin) und einem Zehntel Volumen 1 M DTT versetzt. Die Proben konnten so entweder bei -20°C gelagert werden oder direkt nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C für die SDS-PAGE (2.5.3.1) verwendet werden. Optional erfolgte vor dem Versetzen mit dem reduzierenden Probenpuffer eine Proteinbestimmung (2.5.1).

2.3.4.2 Isolierung von Membranproteinen aus *Arabidopsis*

Für die Isolierung unlöslicher Proteine aus *Arabidopsis* wurden etwa 500 mg gemörseretes Pflanzenmaterial in 1,5 ml kaltem Extraktionspuffer (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM AEBSF) homogenisiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert, durch Miracloth (Calbiochem®) in ein 2 ml Reaktionsgefäß filtriert und anschließend bei 18.000 x *g* und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Extraktionspuffer resuspendiert und mit Extraktionspuffer auf 2 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die pelletierten Proteine dann wie unter 2.3.4.1 beschrieben mit 5x SDS-Probenpuffer und DTT versetzt.

2.3.5 Polysomenanalysen

2.3.5.1 Präparation von Polysomen

Die Präparation von Polysomen erfolgte nach dem Protokoll von (Barkan 1993). Pro Ansatz wurden für die Polysomenanalysen 10 mg nach 2.3.3 aufgearbeitete Mitochondrien (entspricht nach (Eubel *et al.* 2004) 1 mg mitochondrialer Proteine) eingesetzt. Diese wurden für 10 min bei 14.000 x *g* und 4 °C pelletiert und anschließend mit 500 µl Polysomenextraktionspuffer (0,2 M TRIS-HCl pH 8,0, 0,2 M KCl, 35 mM MgCl₂, 25 mM EGTA, 0,2 M Saccharose, 1 % Triton X-100, 2 % Polyoxyethylen-10-Tridecylether, 0,5 mg/ml Heparin, 5 mM DTT, 0,1 M β-Mercaptoethanol, 100 µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Cycloheximid)

versetzt. Um eine Dissoziation der Polysomenkomplexe zu bewirken, wurde jeweils ein Parallelansatz mit einem Polysomenextraktionspuffer versetzt, der zusätzlich 50 mM EDTA enthielt, jedoch kein Magnesiumchlorid. Es folgte die Lyse der Mitochondrien und Solubilisierung der Proteine für 5 min auf Eis. Nicht solubilisierete Bestandteile wurden durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand für eine weitere Solubilisierung mit einem Zehntel des Volumens an 10 %igem Desoxycholat versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 13.000 x g und 4 °C wurde der Überstand auf einen fünfstufigen, kontinuierlichen Saccharosegradienten (15-55 % Saccharose in 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml Chloramphenicol, 500 µg/ml Heparin) aufgetragen. Die Herstellung des Gradienten, sowie die Zentrifugation und anschließende Fraktionierung erfolgte gemäß (Barkan 1988). Die Ultrazentrifugation erfolgte für 60 min bei 150.000 x g und 4°C. Anschließend wurden die im Gradienten größenfraktionierten Polysomen in acht Fraktionen mit je 375 µl Volumen abpipettiert und mit jeweils 265 µl DEPC behandeltem Wasser versetzt. Um eine Dissoziation der Ribosomen von der RNA zu bewirken, wurde den Fraktionen EDTA und SDS bis zu einer Endkonzentration von 20 mM bzw. 0,5 % zugesetzt. Aus den Ansätzen erfolgte anschließend die RNA Isolierung (siehe 2.3.5.2).

2.3.5.2 Extraktion polysomaler RNA aus Saccharosedichtegradienten-Fraktionen

Für die Isolierung polysomaler RNA wurde den einzelnen Fraktionen der Polysomenisolierung (2.3.5.1) je 700 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) zugesetzt. Dem Durchmischen folgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C für 30 min. Dem Überstand wurden dann 20 µg Glycogen (RNase-frei, Fermentas) zugesetzt bevor durch Zugabe von LiCl bis zu einer Endkonzentration von 2 M die selektive Fällung der RNA bei 7°C über Nacht erfolgte. Am nächsten Tag wurde die RNA für 30 min und 20.000 x g und 4°C pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 25 µl DEPC-behandeltem Wasser rückgelöst.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Kommerzielle Kit-Systeme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Kit-Systeme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Ihre Anwendung erfolgte nach Angaben der Hersteller.

Tabelle 3: Verwendete kommerzielle Kitsysteme, ihre Bezugsquelle, sowie deren Verwendung

Kit-System	Bezugsquelle	Verwendung
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey und Nagel	Plasmidisolierung
NucleoBond® PC 100	Macherey und Nagel	Plasmidisolierung
NucleoSpin® Extract II	Macherey und Nagel	Aufreinigung aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen
NucleoSpin® RNA XS	Macherey und Nagel	Isolierung von RNA aus Blüten
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas	Klonierungen
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen	RT-PCR
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen	qRT-PCR

2.4.2 Bakterienstämme und Anzucht

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, ihr Genotyp, sowie deren Verwendung und Referenz sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C in LB-Medium (1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,2) als Flüssigkultur oder auf Festmedium, welches durch Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar-Agar hergestellt wurde. Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* wurden in 2x YT Medium (1,6 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, 1,0 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,5) unter aeroben Bedingungen bei 30°C ebenfalls als Flüssigkultur oder auf Festmedium kultiviert. Die Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme, deren Genotyp, Verwendung und Referenz

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F' ::Tn10 proA+B+lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17(rK- mK+) glnV44 relA1 lac	Klonierungen	(Bullock <i>et al.</i> 1987)
<i>E. coli</i> DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1	Vermehrung von Plasmiden mit ccdB-Gen	(Hanahan 1983; Bernard und Couturier 1992)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 [pMP90]	pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) in C58C1; Rif ^r , Gentr	Transformation von Pflanzen	(Koncz und Schell 1986)

Selektivmedien wurden durch einzelne oder kombinierte Zugabe von Ampicillin, Gentamycin, Kanamycin, Rifampicin, Spectinomycin und Tetrazyklin und hergestellt. Die eingesetzten Endkonzentrationen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Für Selektivmedien verwendete Antibiotika und ihre eingesetzte Endkonzentration

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	50 µg/ml
Gentamycin	25 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml
Spectinomycin	50 µg/ml
Tetrazyklin	12 µg/ml

2.4.3 Oligonukleotide und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Eingesetzt wurden sie in diversen PCR-Techniken (2.4.6) für die Amplifikation von DNA und Transkripten, sowie für die Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten (2.4.12). Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (8). Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Neben ihrer Bezeichnung sind ihre relevanten Merkmale und/oder Verwendung, sowie ihre Referenz aufgeführt. Die Plasmidkarten sind dem Anhang (8) zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pAB714	Wildtyp-Gen <i>at3g15590</i> in pB2GW7	diese Arbeit
pAB716	Wildtyp-Gen <i>at3g15590</i> mit Präsequenz in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pAB718	Wildtyp-Gen <i>at1g15480</i> mit Präsequenz in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pB2GW7	Pflanzen-Überexpressionsvektor, 35S Promotor, Sm ^R , <i>bar</i> -Gen	(Karimi <i>et al.</i> 2002)
pDONR201	Gateway [®] Klonierungsvektor, Kan ^R	Invitrogen (Karlsruhe)
pJET1.2_blunt	Klonierungsvektor, Amp ^R	Fermentas (St. Leon-Rot)
pOL-GFPS65C	GFP-S65C, CaMV35S-Promotor, Amp ^R	(Peeters <i>et al.</i> 2000)

2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* - Zellen

Abhängig von den benötigten DNA-Mengen und der Größe der zu isolierenden Plasmid-DNA kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Alle Protokolle gehen auf die Methode der alkalischen Lyse zurück (Birnboim und Doly 1979).

2.4.4.1 Mini-Plasmidisolierung aus *E. coli* XL1-Blue mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die entsprechenden Kulturen über Nacht bei 37 °C aerob angezogen. Die Präparation erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid QuickPure-Kits (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben.

2.4.4.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* XL1-Blue mit dem NucleoBond® PC 100 Kit

Die Transformation von Plasmid-DNA in Protoplasten (2.4.8) erforderte größere Mengen DNA, so dass zu diesem Zweck das NucleoBond® PC 100 Kit zur Anwendung kam. Für die Kultivierung wurden 50 ml der entsprechenden Kultur für 16 Stunden bei 37 °C aerob angezogen. Die Isolierung erfolgte anschließend auch hier nach Vorschrift des Herstellers.

2.4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1-Blue

Für die Isolierung von Plasmiden mit einer Größe von über 10 kb wurden aus einer entsprechenden Bakterienkultur 4 ml bei 11.000 x *g* für 30 sec pelletiert und anschließend in 250 µl Puffer 1 (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer 2 (1 % (w/v) SDS, 200 mM NaOH) erfolgte bei RT für maximal 5 min die Zelllyse mittels SDS und die Denaturierung von chromosomaler DNA und Proteinen durch NaOH. Nach der Inkubation wurden 300 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8 mit Essigsäure) zugegeben und das Bakterienlysat für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 11.000 x *g*, woraufhin der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol *p.a.* gefällt wurde. Nach Wiederholung der Zentrifugation wurde das Pellet mit 800 µl 70 %igen Ethanol und durch eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 11.000 x *g* gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und die Plasmid-DNA anschließend in 50 µl hochreinem Wasser oder 5 mM TRIS-HCl, pH 8,0 rückgelöst.

2.4.5 Transformation von Plasmid-DNA in Mikroorganismen

2.4.5.1 Elektroporation von *Escherichia coli*

Die Transformation von Bakterienzellen mit doppelsträngiger, zirkulärer Fremd-DNA erfolgte mittels Elektroporation nach (Dower *et al.* 1988). Hierfür wurde die zu transformierende DNA in anwendungsabhängiger Menge mit 40 µl elektrokompenten Zellen gemischt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit Hilfe des Gene Pulser® II Electroporation

Systems (Biorad) bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω nach Angaben des Herstellers elektroporiert. Nach Zugabe von 900 μ l SOC-Medium (2 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 20 mM α -D(+)-Glucose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, pH 7,0) und einer Regenerationszeit von fünf bis zehn Minuten erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf dem entsprechenden Selektionsmedium und die anschließende Inkubation über Nacht bei 37 °C.

2.4.5.2 Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Elektroporation von Agrobakterien erfolgte wie unter 2.4.5.1 beschrieben. Abweichend wurde für die Regeneration der elektroporierten Zellen 2x YT-Medium (2.4.2) verwendet und die Regenerationszeit auf vier bis sechs Stunden verlängert.


2.4.6 PCR-Techniken

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.* 1986; Saiki *et al.* 1988) ermöglicht ausgehend von synthetischen Oligonukleotiden die *in vitro*-Amplifikation von Nukleotidsequenzen durch eine hitzestabile DNA- oder RNA abhängige Polymerase. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse PCR-Techniken angewendet.

2.4.6.1 Standard-PCR

Standard-PCR-Reaktionen wurden anwendungsbedingt mit *Taq*- oder *Pwo*-DNA-Polymerase durchgeführt. Als Matrize wurden 0,1 – 1 ng Plasmid-DNA oder 100 – 1000 ng genomische DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt weiterhin PCR-Puffer in einfacher Konzentration, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M jedes dNTP's, 100 nM jedes Oligonukleotids, 1 % (v/v) des vom Herstellers (Molzym) zur der *Taq*-Polymerase mitgelieferten „*Enhancers*“ und 0,025 U/ μ l *Taq*-Polymerase. Wurde die *Pwo*-Polymerase verwendet, welche neben einer 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, die Fehler bei der DNA-Synthese minimiert, so wurden abweichend 300 nM jedes Oligonukleotids und 0,05 U/ μ l des Enzyms eingesetzt. Das Temperatur- und Zyklusprofil einer Standard-PCR ist der Tabelle 7 zu entnehmen. Bei Verwendung der *Pwo*-Polymerase wurde die Elongation bei 68°C statt 72°C durchgeführt.

Tabelle 7: Standard-PCR-Programm zur Amplifikation von DNA

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Doppelstrang-Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30 s	 30-40 Zyklen
Primer- <i>Annealing</i>	variabel	30 s	
Elongation	72°C	30 s pro 500 bp	
Vervollständigung der Elongation	72°C	5 min	
Kühlung	10°C	∞	

2.4.6.2 RT-PCR

Die cDNA-Amplifikation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die in die Reaktion eingesetzte RNA wurde zuvor mit DNaseI behandelt (2.4.11) und der Erfolg des DNA-Abbaus mit einer Standard-PCR (2.4.6.1) überprüft.

2.4.6.3 qRT-PCR

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit, die eingesetzte Menge an Matrize spezifisch, sensitiv und reproduzierbar zu quantifizieren. Die Quantifizierung basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes bereits während der Amplifikation, d.h. in Echtzeit (*real time*), wobei die Intensität proportional mit der Menge des PCR-Produkts zunimmt. Da die Zunahme der Fluoreszenz und die Menge an neusynthetisierten PCR-Produkten über einen weiten Bereich proportional zueinander sind, kann anhand der erhaltenen Daten die Ausgangsmenge an Matrize bestimmt werden. Um Aussagen über die Transkription eines Gens machen zu können, muss für eine relative Quantifizierung eine Normalisierung der erhaltenen Daten über einen Abgleich mit dem Transkriptionsniveau eines *housekeeping*-Gens erfolgen. Das Signal dieses *housekeeping*-Gens, das konstant in allen Geweben transkribiert sein sollte, wird verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten Matrize auszugleichen.

Verwendet wurde für die Durchführung das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Das Volumen eines Reaktionsansatzes wurde abweichend zum Herstellerprotokoll auf 25 µl reduziert, wobei die Endkonzentration der Einzelkomponenten unverändert blieb. Verwendet wurde für die Reaktion das „7300 Real Time PCR System“ (Applied Biosystems, Darmstadt). Das Programm ist in Tabelle 8 aufgeführt. Unmittelbar im Anschluss an die Vervollständigung der Elongation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um nach erfolgter PCR zwischen dem Zielprodukt und unspezifischer DNA

differenzieren zu können. Zu diesem Zweck werden die im finalen Elongationsschritt entstandenen Doppelstränge in einem charakteristischen Temperaturprofil aufgeschmolzen und wieder renaturiert, worauf sich dann in insgesamt 80 Zyklen eine schrittweise Erhöhung der Temperatur um je 0,5 °C anschließt. Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „7300 System Sequence Detection Software, Version 1.3 (Applied Biosystems). Für die Berechnung der relativen Änderung der Transkriprate wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001).

Tabelle 8: Programm zur Durchführung einer quantitativen Real Time PCR mit dem 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt)

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	50°C	30 min
Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	95°C	15 min
Denaturierung	95°C	15 s
Primer- <i>Annealing</i>	55°C	60 s
Elongation	72°C	30 s
Vervollständigung der Elongation	72°C	5 min
	95°C	1 min
Schmelzkurvenanalyse	55°C	1 min
	55°C (+ 0,5°C)	10 s

40 Zyklen

2.4.6.4 TAIL-PCR

Mit Hilfe der *thermal asymmetric interlaced* (TAIL-) PCR (Liu und Whittier 1995) wurden die flankierenden Sequenzen der T-DNA im Genom der T-DNA Insertionslinie GK_188B06 (Tabelle 1) identifiziert. Das Prinzip beruht bei dieser Methode auf der Verwendung von drei *nested* („verschachtelten“), sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen jeweils in Kombination mit einem degenerierten Oligonukleotid mit niedriger Schmelztemperatur eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte nach (Hihlal *et al.* 2011). Ein PCR-Ansatz der Primärreaktion enthielt 100 ng GesamtdNA als Matrize, einfach konzentrierten PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 150 nM des spezifischen Oligonukleotids AB2397, 5 µM des degenerierten Oligonukleotids AB2404, 1 % (v/v) des vom Herstellers (Molzym) zur der *Taq*-Polymerase mitgelieferten „*Enhancers*“, sowie 0,03 U/µl *Taq*-Polymerase. In die Sekundärreaktion wurde für einen 25 µl PCR-Ansatz 1 µl einer 40fachen Verdünnung der Primärreaktion als Matrize eingesetzt. Dieser enthielt außerdem abweichend 200 nM des spezifischen Oligonukleotids AB2398 und 3 µM des degenerierten Oligonukleotids AB2404. In die Tertiärreaktion wurde für einen 50 µl PCR-Ansatz 1 µl einer

40fachen Verdünnung der Sekundärreaktion als Matrize eingesetzt. Als spezifisches Oligonukleotid wurde AB2399 eingesetzt. Die Konzentrationen entsprachen denen der Sekundärreaktion. Die mehrstufigen Temperatur- und Zyklusprofile der drei Reaktionen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Programmeinstellungen und Zyklenzahlen der primären, sekundären und tertiären TAIL-PCR

Reaktion	Zyklenzahl	Programm
Primär	1	92°C (2 min), 95°C (1 min)
	4	94°C (15 s), 55°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	94°C (15 s), 30°C (3 min), 30°C (+ 0,2°C/s)
		18°C (+ 0,3°C/s), 72°C (2min)
	9	94°C (5 s), 37°C (1 min), 72°C (2 min)
	11	94°C (5 s), 55°C (1 min), 72°C (2 min)
		94°C (5 s), 55°C (1 min), 72°C (2 min)
Sekundär		94°C (5 s), 37°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	72°C (5 min)
	1	94°C (2 min)
	1	94°C (5 s), 55°C (1 min), 72°C (2 min)
	9	94°C (5 s), 55°C (1 min), 72°C (2 min)
Tertiär		94°C (5 s), 55°C (1 min), 72°C (2 min)
		94°C (5 s), 37°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	72°C (5 min)
	1	94°C (2 min)
	19	94°C (30 s), 37°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	72°C (5 min)

2.4.7 Bestimmung von DNA- und RNA-Gehalt

Die Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte spektrophotometrisch bei monochromatischem Licht einer Wellenlänge von 260 nm in einem BioPhotometer (Eppendorf) oder mit dem NanoDrop® ND-1000 (Peqlab). Nach (Sambrook *et al.* 1989) entspricht eine Extinktionseinheit einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

2.4.8 Hydrolytische Spaltung von DNA

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Typ II-Restriktionsendonucleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA an spezifischen 4-8 bp langen Sequenzen zu erkennen und zu hydrolysieren, wobei je nach Enzym DNA-Fragmente mit glatten (*blunt*) oder überhängenden (*sticky*) Enden entstehen (Nathans und Smith 1975). Die Hydrolyse von DNA erfolgte unter den vom eingesetzten Enzym abhängigen optimalen Reaktionsbedingungen nach Angaben des Herstellers.

2.4.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.4.9.1 DNA-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen TBE-Gelen nach (Sambrook *et al.* 1989). Bei dieser Methode werden DNA-Moleküle, die bei neutralem pH-Wert als Polyanion vorliegen, im elektrischen Feld ihrer Größe nach getrennt, wobei der Trennbereich von der Porengröße des Gels abhängig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarosegele verwendet, deren Agarosekonzentrationen je nach aufzutrennender DNA zwischen 0,8 % und 3,0 % lagen. Die Agarose wurde dafür in 1x TBE-Puffer (1 M Borsäure, 1 M TRIS-HCl, pH 8,3, 20 mM EDTA) aufgekocht und nach dem Abkühlen mit 0,006 % (v/v) Homidiumbromidlösung versetzt, bevor das Gel gegossen wurde. Die Elektrophorese der mit 1/5 Volumeneinheiten 6x DNA-Ladepuffers (10 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol FF, 0,15 % Orange G, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzten Proben erfolgte dann bei einer Spannung von 100 V. Als Vergleichstandard dienten der erweiterte 100-5.000 bp Marker (MBBL) oder der *Low Molecular Weight DNA Marker* (New England Biolabs). Aufgrund des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Homidiumbromid konnten nach Beendigung der Elektrophorese die aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht werden.

2.4.9.2 RNA-Gelelektrophorese

Die aufzutrennende RNA wurde mit RNA-Ladepuffer (56 % (v/v) Formamid, 11 % (v/v) MOPS (10x), 18 % (v/v) Formaldehyd, 7 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und zur Auflösung der Sekundärstrukturen 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1,5 %igen Formaldehyd-Agarose-Gelen in 1x MOPS-Puffer.

2.4.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen

2.4.10.1 Aufreinigung von DNA mit dem *NucleoSpin[®] Extract II-Kit*

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder PCR-Ansätzen erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin[®] Extract II-Kits* (Macherey und Nagel) gemäß Herstellerangaben nach dem entsprechenden Protokoll. Das Grundprinzip der Aufreinigung stellt bei dieser Methode die Bindung der DNA an einer Silika-Membran unter hohen Salzbedingungen dar. Durch mehrere Waschschrte wird anschließend die DNA von Proteinen, Salzen, Agarose und Homidiumbromid getrennt.

2.4.10.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem Enzym GELase®

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden mit einer Größe von über 10 kb aus Agarosegelen wurde das β -Agarose verdauende Enzym GELase® (Biozym) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Elektrophorese von DNA, die aus Agarosegelen enzymatisch aufgereinigt werden sollte, erfolgte in 1 %igen Gelen, die mit der *TopVision Mow Melting Point Agarose* (Fermentas) hergestellt wurden.

2.4.11 DNA-Verdau mittels DNase I in RNA-haltigen Proben

Für die Durchführung von RT- und qRT-PCR Reaktionen wurden ausschließlich RNA Proben eingesetzt, die frei von genomischer DNA waren. Für den Abbau der DNA wurden die RNA-Proben daher vorher mit dem Enzym Deoxyribonuclease I (DNase I, Fermentas) behandelt. Dieses Enzym spaltet zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier Nukleotide und sorgt auf diese Weise für eine Fragmentierung der DNA. Die Reaktion, in die anwendungsbedingt 1-4 μ g RNA eingesetzt wurden, erfolgte nach Herstellerangaben in einem 20 μ l Reaktionsansatz.

2.4.12 DNA-Sequenzanalyse

Sequenzanalysen doppelsträngiger DNA wurden als Auftragssequenzierungen am Institut für Klinische Molekularbiologie der CAU Kiel oder durch die Firma Eurofins MWG Operon nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.* 1977) durchgeführt.

2.4.13 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Reaktion werden die Enden zweier Nukleotidsequenzen verknüpft, wobei eine Phosphordiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphatrest der einen Nukleotidfolge und der 3'-OH-Gruppe der anderen Nukleotidfolge erzeugt wird.

2.4.14 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion diente bei Klonierungen in Vektoren mit dem *lacZ*-Gen dazu, positive Transformanten zu identifizieren. Für diesen auch als α -Komplementation (Ullmann *et al.* 1967) bezeichneten Test wurden selektive LB-Festmedium mit 80 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal und 0,5 mM IPTG verwendet. Bei einer erfolgreichen Insertion eines Fragments in die multiple Klonierungsstelle des Vektors kommt es zu einer Unterbrechung des *lacZ*-Leserasters, so dass eine funktionsfähige β -Galaktosidase nicht mehr gebildet werden kann. Die betreffenden Bakterienkolonien bleiben in Gegenwart von X-Gal farblos, während bei nicht erfolgter Insertion die exprimierte β -Galaktosidase das X-Gal enzymatisch zu Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol umsetzt, durch den die Kolonien eine blaue Farbe annehmen.

2.4.15 Transfertechniken und Hybridisierung

2.4.15.1 Southern Blot

Zur Durchführung eines Southern Blots wurden 5 μg genomische DNA nach 2.4.8 hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.4.9.1). Nach der Dokumentation wurde das Gel zunächst 40 min lang in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend 40 min in Neutralisierungspuffer (2M NaCl, 1 M TRIS-HCl, pH 5,5) auf einem Kreisschüttler inkubiert. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Perkin Elmer) mit nukleinsäurebindenden Eigenschaften erfolgte über Nacht mittels Kapillartransfer in 20X SSPE-Puffer (3,6 M NaCl, 0,02 M EDTA, 0,16 M Na_2HPO_4 , 0,04 M NaH_2PO_4 , pH7,4) nach (Southern 1975). Nach dem Transfer wurde die Membran mit 2x SSPE-Puffer gespült und die DNA im UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert.

2.4.15.2 Northern Blot

Der Transfer der nach 2.4.9.2 aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran erfolgte nach (Alwine *et al.* 1977). Da die Denaturierung bereits vor und während der Gelelektrophorese erfolgt ist, konnte das Gel direkt nach der Elektrophorese zum Transfer verwendet werden. Der Transfer wurde dem Southern Blot (2.4.15.1) entsprechend durchgeführt.

2.4.15.3 Decaprime Hybridisierung

Sonden für die Southern- und Northern-Blot Hybridisierung wurden mit [α - 32 P]-Desoxyadenosin-5'-triphosphat und dem DECAprime II DNA Labeling Kit (Ambion®) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Die zu markierenden DNA-Fragmente wurden in einer PCR (2.4.6.1) amplifiziert und aufgereinigt (2.4.10.1). Die Prähybridisierung erfolgte zwei bis vier Stunden bei 37°C in Hybridisierungspuffer (50 % (v/v) Formamid, 25 % (v/v) 20x SSPE-Puffer, 0,2 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) BSA, 0,2 % (w/v) Ficoll, 0,2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, pH 7-7,5). Nach einem Pufferwechsel wurde die radioaktive Sonde hinzugegeben und die Membran über Nacht im Hybridisierungssofen bei 37°C inkubiert. Um nicht oder unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen, wurde die Membran in Waschpuffer (5x SSPE-Puffer, 0,02 % (w/v) SDS) ggf. in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten bei 55-70°C gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte in Abhängigkeit der Signalstärke für zwei bis sieben Tage bei -80°C.

2.4.16 Identifizierung von T-DNA-Insertionen mittels PCR

Der Nachweis einer T-DNA-Insertion im Genom von *Arabidopsis* erfolgte mittels PCR. Zur Identifizierung der T-DNA wurde genomische DNA der zu testenden Pflanze als Matrize eingesetzt. Für die PCR zum Nachweis einer T-DNA-Insertion wurde das Oligonukleotid LBa1 verwendet, welches 363 bp vor Ende der *left-border* (LB) an die DNA innerhalb der T-DNA bindet und in Richtung des LB-Endes orientiert (5'-3') ist. Ein weiteres genspezifisches Oligonukleotid bindet innerhalb des zu untersuchenden Gens in der T-DNA flankierenden Sequenz, die mit Hilfe der TAIR-Datenbank identifiziert wurde. Wurde in der PCR ein Produkt amplifiziert, so konnte von einer T-DNA-Insertion im untersuchten Gen in wenigstens einem der Chromosomen des diploiden Chromosomensatzes ausgegangen werden. In einer zusätzlichen PCR wurden zwei genspezifische Oligonukleotide verwendet, die einen Bereich umschließen, in den die T-DNA inseriert ist. Liegt eine Homozygotie in Bezug auf die T-DNA Insertion in dem untersuchten Gen vor, kommt es durch die Insertion der T-DNA und der für die Amplifikation eines entsprechend längeren Fragments zu kurzen Elongationszeit in der PCR zu keiner Amplifikation.

2.4.17 SNaPshot-Analyse

Eine Überprüfung der Edierungsstellen mittels SNaPshot-Analyse (Takenaka und Brennicke 2009; Takenaka 2011) in der T-DNA Insertionsmutante GK_188B06 und im Wildtyps Col-0 wurde freundlicherweise von Dr. Mizuki Takenaka, Ulm durchgeführt.

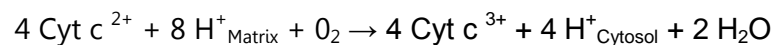
2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von (Bradford 1976). Von der zu messenden Probe wurden 5 µl in einer Einweg-Kunststoffküvette (Sarstedt) mit destilliertem H₂O auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl des Reagenz „Bio-Rad Protein Assay“ (Bio-Rad) Bradford-Reagenz gut vermischt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten erfolgte die Absorptionsmessung mit dem Photometer Uvikon 930 (Kontron Instruments) bei 595 nm gegen eine Leerprobe. Mittels einer BSA-Eichreihe wurde der Proteingehalt nach (Bradford 1976) berechnet.

2.5.2 Aktivitätsmessung des Komplex IV in isolierten Mitochondrien

Der Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase, ist der letzte Komplex der Atmungskette, der am Elektronen- und Protonentransport beteiligt ist. Bei der Reaktion wird Cytochrom-c oxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert. Die dabei freigesetzte Energie wird genutzt, um Protonen vom Matrixraum in den Intermembranraum zu transportieren und so einen Protonengradienten aufzubauen. Die Reaktionsgleichung stellt sich wie folgt dar:



Durch die Veränderung des Oxidationszustandes von Cytochrom-c verändert sich das Absorptionsverhalten. Auf dieser Tatsache basiert die Methode der Aktivitätsmessung der Cytochrom-c-Oxidase. Die Bestimmung der Absorption von Cytochrom-c bei 550 nm im oxidierten und reduzierten Zustand dient hierbei als Parameter um die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase darzustellen (Wharton und Tzagoloff 1967).

Um die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in isolierten Mitochondrien zu untersuchen, wurden in einer Küvette 800 µl 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 + 0,5 % (v/v) Tween-20 mit 200 µl einer Cytochrom-c-Lösung (500 µM) gemischt. Der Reaktionsansatz wurde gegen den Leerwert, der anstelle der Cytochrom-c-Lösung das gleiche Volumen destilliertes Wasser enthielt, bei 550 nm im Photometer (Uvikon 930, Kontron Instruments) gemessen (Zeitpunkt t_0). Nach Zugabe von 50 µl einer 40 mM Ascorbatlösung zu beiden Proben wurde die Extinktion 3 min lang alle 10 sec dokumentiert. Nach sofortiger Zugabe von 10 µg mitochondrialer Proteine (in einem Volumen von 200 µl) zu beiden Ansätzen wurde die Extinktion weiterhin für 3 min im selben Zeitintervall aufgenommen. Nach diesem Dokumentationsschema wurde auch nach der abschließenden Zugabe von 50 µl einer 100 mM NaN₃-Lösung verfahren.

2.5.3 Techniken der Proteinelektrophorese

2.5.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung isolierter Proteine erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im 10-15 %igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-Gel) nach (Lämmli 1970). Wesentliches Grundprinzip der SDS-PAGE ist die Bindung von Natriumdodecylsulfat an die Proteine, so dass negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis entstehen. Die Zugabe von SDS im Überschuss und das Erhitzen der Probe auf 95 °C, sowie Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen bewirken die Auflösung von Sekundär-Tertiär- und Quartärstruktur, wodurch das Protein denaturiert vorliegt und als SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld aufgrund seiner negativen Ladung in Richtung der Anode wandert. Für die SDS-PAGE wurde das *Owl P8DS Separation System* (Fisher Scientific GmbH) verwendet. Zunächst wurde das Trenngel (375 mM TRIS-HCl, pH 8,8, 10-15 % (w/v) AA/BA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,04 % (v/v) TEMED, 0,1 (w/v) APS) pipettiert und zwischen die Glasplatten gegossen, wobei das Volumen etwa zwei Drittel des Gesamtgelvolumens einnehmen sollte. Direkt nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und mit destilliertem Wasser mehrfach gespült. Das Sammelgel (125 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 5 % (w/v) AA/BA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,01 % (v/v) TEMED, 0,1 (w/v) APS) wurde über das Trenngel gegossen und ein Geltaschenformer eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels konnte der Taschenformer entfernt und das Gel in den Gießstand mit 1x SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) zur Elektrophorese eingesetzt werden. Nachdem die wie in 2.3.4.1 und 2.3.4.2 beschrieben behandelte Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert wurden, erfolgte die Elektrophorese bei konstant 25 mA/Gel. Als Molekulargewichtsstandard diente der *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

2.5.3.2 Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)

Die Blue-Native-PAGE (BN-PAGE) nach (Schagger und von Jagow 1991) ermöglicht die Untersuchungen von Proteinkomplexen in enzymatisch aktiver Form. Anstelle des in der denaturierenden SDS-PAGE verwendeten SDS wird in der BN-PAGE Coomassie Brilliant Blau G-250 verwendet. Dieser negativ geladene Farbstoff bindet an die Proteine und bildet so negativ geladene Farbstoff-Protein-Komplexe ohne die native Struktur der Proteine zu zerstören. Die Komplexe wandern bei physiologischem pH unabhängig vom isoelektrischen Punkt in Richtung Anode. Die für diese Methode benötigten kontinuierlichen Gradientengele,

sowie Puffer und Lösungen entstammten dem „SERVAGE™ N Native Starter Kit“. Die Durchführung der BN-PAGE wurde nach Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt. Für eine eindimensionale BN-PAGE wurden 10-25 µg, für eine zweidimensionale BN/SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung 50-100 µg mitochondriale Proteine verwendet. Die Solubilisierung der Mitochondrien erfolgte, wie für pflanzliche Mitochondrien empfohlen, mit 1,5 % Dodecylmatsid (Jansch *et al.* 1996).

2.5.3.3 Zweidimensionale BN/SDS-PAGE

Nach der Durchführung einer BN-PAGE erfolgte optional eine Auftrennung der Proteinkomplexe in einer zweiten Dimension mit Hilfe der Tricine-SDS-PAGE (Schagger und von Jagow 1987). Wesentlicher Unterschied zur SDS-PAGE nach (Lämmli 1970) ist der Einsatz von Tricin anstelle von Glycin und dem daraus resultierenden besseren Auftrennungsvermögen insbesondere kleinerer Proteine. Gele zur Auftrennung der Proteinkomplexe in der zweiten Dimension bestehen aus drei verschiedenen Bereichen: einem Trenngel, einem „*Space*“-Gel und einem Sammelgel, in welches der Gelstreifen aus der BN-PAGE waagrecht eingebettet wird. Das Gießen derartiger Gele, sowie die gesamte Durchführung dieser Methode wurden nach dem detaillierten Protokoll von (Eubel und Millar 2009) durchgeführt.

2.5.4 Western Blot

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembran (2.5.3.1) erfolgte *Semi-Dry* in einem kontinuierlichen Puffersystem (Towbin *et al.* 1979; Kyhse-Andersen 1984). Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden das Gel, die Membran, vier Schwammtücher und vier Stück Whatmanpapier in Towbin-Transferpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert. Das Gel und die Membran wurden aufeinander gelegt und auf der Anode luftblasenfrei zwischen jeweils zwei Schwammtücher und zwei Lagen Whatmanpapier gebettet. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur und 3,5mA/cm² Membranfläche für 30 min. Zur Überprüfung des Transfers wurde anschließend die Membran reversibel mit Ponceau-Rot (2.5.5.3) gefärbt. Für die Immundetektion wurde die Membran viermal für je 2 min in TBST-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,5) geschwenkt und zur Absättigung freier Bindestellen für zwei bis sechzehn Stunden bei 10°C auf dem Kippschüttler in Blockierungslösung (1 % (w/v) Casein in TBST-Puffer) inkubiert. Die Detektion der auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine erfolgte immunologisch mit den in Tabelle 10 aufgelisteten primären Antikörpern über

Nacht. Nachfolgend wurde die Membran viermal für 2 min bei RT in TBST gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 10) für 30 min bei RT inkubiert. Um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Nitrocellulosemembran erneut dreimal für 2 min bei RT in TBST gewaschen. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgt mit dem „Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit“ (Roche) bzw. dem Roti[®]-Lumin Chemilumineszenz-Substrat“ (Roth) nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase oxidiert das im Reagenz enthaltene Luminol. Die daraus resultierende Chemolumineszenz wurde durch ein- bis zehnminütige Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper. Angegeben sind Primär- und Sekundärantikörper mit ihrem Antigen, ihrem Wirt, ihrer verwendeten Verdünnung, sowie ihre Referenz

Antikörper	Antigen	Wirt	Verdünnung	Referenz
Primärantikörper	COXII	Hase	1:3.000	Agrisera, Schweden
Primärantikörper	LHCBI	Hase	1:3.000	Agrisera, Schweden
Primärantikörper	ATP6	Hase	1:1000	Agrisera, Schweden
Primärantikörper	ATPB	Hase	1:5.000	Agrisera, Schweden
Primärantikörper	NAD9	Hase	1:10.000	(Lamattina <i>et al.</i> 1993)
Sekundärantikörper	Hase IgG	Esel	1:10.000	Agrisera, Schweden
Sekundärantikörper	Hase IgG	Ziege	1:50.000	Agrisera, Schweden

2.5.5 Proteinfärbung

2.5.5.1 Proteinfärbung durch Coomassie-Brilliant-Blau

Die nach 2.5.3.1 aufgetrennten Proteine wurden unmittelbar nach der SDS-PAGE im Gel mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Hierfür wurde das Gel nach Abbau der Elektrophoreseapparatur von den Glasplatten abgelöst und das Sammelgel verworfen. Anschließend erfolgte für mindestens zwei Stunden Färbung des Trenngels in etwa 70 ml Coomassie-Färbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blau R-250) bei RT auf einem Kreisschüttler bis das Gel eine gleichmäßig tiefblaue Farbe angenommen hatte. Zur Entfernung des nicht gebundenen Farbstoffs wurde das Gel zunächst mehrmals mit destilliertem H₂O gewaschen und daraufhin in 100 ml solange in Entfärbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) geschüttelt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar und der Hintergrund des Gels nahezu klar war.

2.5.5.2 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteingelen wurde nach (Blum *et al.* 1987) durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine im Gel nach erfolgter Elektrophorese durch eine 30-min Inkubation in Lösung 1 (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,019 % (v/v) Formaldehyd) fixiert und das Gel anschließend 3-mal für 15 min in Lösung 2 (50 % (v/v) Ethanol) geschwenkt. Es folgte eine 1-minütige Inkubation in einer 0,013 %igen Thiosulfat-Lösung. Nachdem das Gel dann 3-mal für jeweils 20 sec in destilliertem Wasser gewaschen wurde, folgte eine 20-minütige Inkubation in Silberlösung (0,2 % AgNO₃ (w/v), 0,075 % (v/v) Formaldehyd). Nach zweimaligem Waschen für je 20 sec in destilliertem Wasser wurden für die Entwicklung 10 ml der Lösung 7 (30 % (w/v) Na₂CO₃, 0,25 % Formaldehyd (v/v)) mit 40 ml destilliertem Wasser und 10 µl der Lösung 3 (10 % (w/v) Thiosulfat) gemischt und das Gel zur Entwicklung in diesem Gemisch inkubiert, bis die gewünschte Bandenintensität erreicht ist. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch zweimaliges Spülen des Gels mit destilliertem Wasser und anschließendem Schwenken für 15 min in Lösung 9 (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure).

2.5.5.3 Ponceau-Färbung von immobilisierten Proteinen auf der Membran

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer (2.5.4) zehn Minuten auf dem Taumelschüttler in etwa 70 ml Ponceau-Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure) inkubiert. Anschließend erfolgte das Entfärben mit destilliertem Wasser bis die Banden sich deutlich vom Hintergrund abhoben. Das Ergebnis wurde dokumentiert und die Membran mit destilliertem Wasser vollständig entfärbt.

2.6 Software und Datenbanken

Sequenzanalysen erfolgten mit Hilfe der Programme *Chromas Lite 2.01* (Technelysium Pty Ltd), *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Version 7.0.9.0, (Hall 1999) und *Clone Manager 9 Professional Edition* (Version 9.0, Scientific & Educational Software). Letztgenanntes Programm wurde außerdem für den Entwurf von Oligonukleotiden und zur Planung von Klonierungen verwendet. Informationen zu Genen und Proteinen wurden den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), der *Universal Protein Resource* (UniProt, www.uniprot.org) der *Arabidopsis Information Resource* (TAIR, www.arabidopsis.org) und der *Pfam*-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk>) entnommen. Für Sequenzvergleiche wurden die Programme *ClustalW2* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) und diverse *BLAST*-Analyseprogramme (*Basic Local*

Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) genutzt. Die Visualisierung der Proteinstrukturmodelle erfolgte unter Nutzung des Programmes *PyMOL* (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.1 Schrödinger, LLC.). Zu Vorhersagen über putative RNA-Bindedomänen von Proteinen wurden die Programme RNABindR v2.0 (<http://einstein.cs.iastate.edu/RNABindR>, (Terribilini *et al.* 2007)) und BindN+ ([http://bioinfo.ggc.org/bindn+/,](http://bioinfo.ggc.org/bindn+/) (Wang und Brown 2006; Wang *et al.* 2010)) verwendet. Die Oligonukleotide zur Verifizierung von T-DNA Insertionslinie wurden mit Hilfe des *SIGNAL iSect-Tools* des *SALK Institute Genomic Analysis Laboratorys* entworfen (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Erstellt wurde diese Arbeit mit Microsoft® Office 2007. Als Literaturverwaltungsprogramm wurde das Programm *Endnote X4* (Thomson Reuters) verwendet.

3 Ergebnisse

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden in *in vitro*-Analysen zwei Proteine aus *Arabidopsis*, AT1G15480 und AT3G15590, identifiziert, die spezifisch an ein RNA-Fragment des *cox2*-Gens binden, welches die Edierungsposition +276 beinhaltet. Diese Proteine wurden als PPR-Proteine mit einer vorhergesagten Lokalisation in den Mitochondrien klassifiziert (Bolle 2008). Um ihre Funktion in den Mitochondrien aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit beide Proteine mit Hilfe verschiedener Methoden charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend beschrieben.

3.1.1 Struktureller Aufbau der PPR Proteine AT3G15590 und AT1G15480 und ihrer Gene

Die PPR Proteine AT3G15590 und AT1G15480 gehören der P-Unterfamilie der PPR-Proteine an. Ihre Struktur ist schematisch in der Abbildung 5 gezeigt. Am N-Terminus befindet sich jeweils eine *targeting* Sequenz, deren genaue Länge bioinformatisch ermittelt wurde (siehe Abbildung 7). Wie alle PPR-Proteine der P-Unterfamilie besitzen diese beiden Proteine keine C-terminale Domäne, die der E, E+, oder DYW Klasse zugeordnet werden kann. Auch wurden mittels bioinformatischer Analysen keine weiteren Pfam-Domänen (Punta *et al.* 2012) identifiziert. Im strukturellen Aufbau und in ihrer Größe ähneln sich die beiden Proteine AT3G15590 und AT1G15480. So ist das Proteine AT3G15590 mit 610 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 69,4 Da nur geringfügig größer und schwerer als das Proteine AT1G15480 mit 594 Aminosäuren und 67,5 Da und besitzt mit insgesamt neun PPR-Domänen zwei Domänen mehr als das Protein AT1G15480. Beide Proteine weichen somit nur unerheblich von der durchschnittlichen Länge der PPR-Proteine von 642 Aminosäuren (Lurin *et al.* 2004) ab.

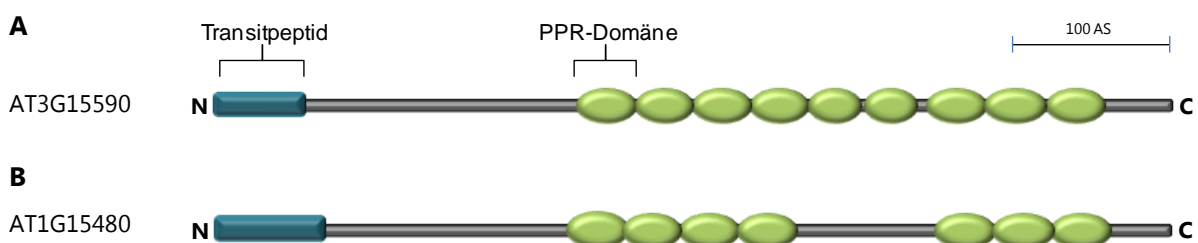


Abbildung 5: Schematische Übersicht des Proteinaufbaus der Proteine AT3G15590 und AT1G15480. Angegeben sind für die Proteine AT3G15590 (A) und AT1G15480 (B) die Lage des Transitpeptids (blau) und der einzelnen PPR-Domänen (grün). Der Balken repräsentiert eine Länge von 100 Aminosäuren (AS). Die Darstellung ist maßstabsgetreu.

Analog zur Proteinstruktur ähneln sich auch die Gene *at3g15590* und *at1g15480* in Länge und Struktur stark (Abbildung 6). Beide Gene weisen in ihrem kodierenden Bereich zwei Introns auf und gehören somit zu dem mit etwa sieben Prozent kleinsten Anteil von PPR-Proteinen, die mehr als ein Intron besitzen (Lurin *et al.* 2004).

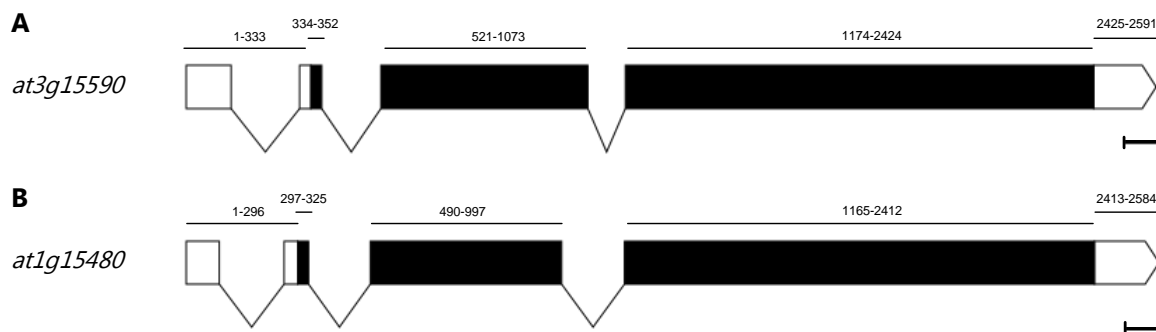


Abbildung 6: Struktureller Aufbau der Gene *at3g15590* und *at1g15480*. Weiße Boxen kennzeichnen die UTR's der Gene *at3g15590* (A) und *at1g15480* (B), schwarze Boxen die Exons der kodierenden Bereiche der Gene. Die Introns sind dreieckig dargestellt. Die jeweiligen Längen der Bereiche sind in bp angegeben. Der Balken repräsentiert eine Länge von 100 bp. Die Darstellung ist maßstabsgetreu.

Die Abbildung 7 zeigt ein Proteinalignment der PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480, welches mit ClustalW erstellt wurde. Das jeweilige bioinformatisch bestimmte *targeting* Signal ist grün umrandet und umfasst beim Protein AT3G15590 insgesamt 56 Aminosäuren und 71 Aminosäuren beim Protein AT1G15480. Insgesamt besteht zwischen den beiden Proteinen eine Sequenzähnlichkeit von 44 Prozent, wobei die Ähnlichkeit einzelner PPR-Domänen zwischen den Proteinen zwischen 37 und 65 Prozent liegt. Eine eindeutige Consensus Sequenz, die allen pro- und eukaryotischen PPR-Proteinen gemein ist, konnte allerdings bisher nicht identifiziert werden. Es scheinen zwar Aminosäuren mit bestimmten Eigenschaften gehäuft an bestimmten Positionen der PPR-Domänen vorkommen, jedoch sind diese nur semikonserviert und die PPR-Motive somit weitestgehend degeneriert (Small und Peeters 2000). Damit übereinstimmend sind, bezogen auf die Proteine AT3G15590 und AT1G15480, Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz nicht auf die PPR-Motive beschränkt. So weisen die Bereiche zwischen den Aminosäuren 145 und 242 zum Teil sehr starke Übereinstimmungen auf, ebenso wie die gesamten C-terminalen Bereiche stromabwärts der PPR-Motive, die zwischen den beiden PPR-Proteinen stark konserviert sind. Eine mögliche Signifikanz dieser homologen Bereiche für die biologische Funktion der Proteine ist bisher nicht bekannt. Allerdings ist aufgrund der Tatsache, dass bisher keine Consensus Sequenz der PPR-Domänen identifiziert wurde und diese lediglich bioinformatisch bestimmt werden, nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei um weitere PPR-Motive handelt könnte.

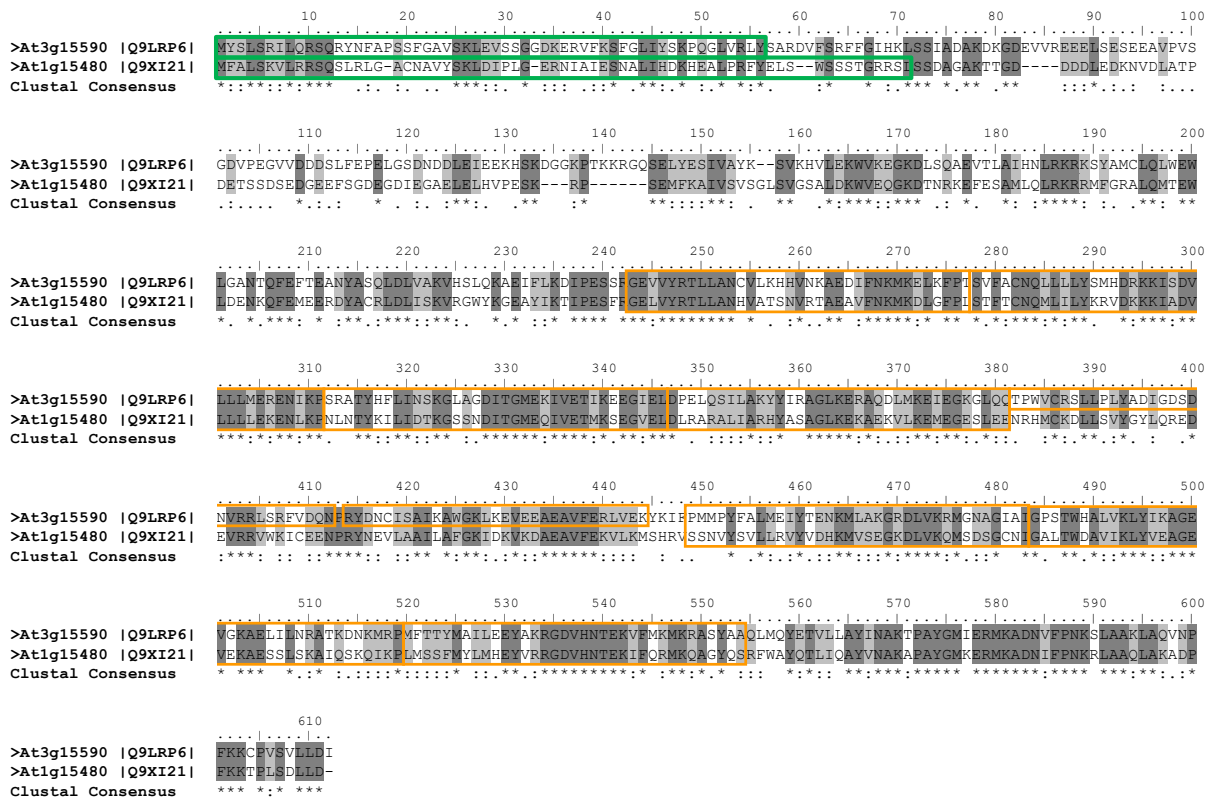


Abbildung 7: Proteinalignment der Proteine AT3G15590 und AT1G15480. Gleiche Aminosäure sind dunkel hinterlegt, ähnliche Aminosäuren hell. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*), semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt (.) und Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften durch einen Doppelpunkt (:) markiert. Das jeweilige *targeting* Signal ist durch eine grüne Umrandung gekennzeichnet, die PPR-Domänen sind jeweils orange umrandet.

3.1.2 Die PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480 weisen die für PPR-Proteine typischen helikalen Strukturen auf

Räumliche Struktur und biochemische Funktionen sind bei Makromolekülen eng miteinander verknüpft. Somit kann die Aufklärung der Proteinstruktur Hinweise auf die physiologische Bedeutung eines Proteins liefern. Neben den experimentellen Ansätzen der strukturellen Genomik wie beispielsweise die Strukturklärung mittels Röntgenkristallanalyse oder Kernspinresonanzspektroskopie, werden heutzutage auch rechengestützte Methoden zur Strukturvorhersage genutzt. Für Proteine der PPR-Familie sind bisher keine experimentellen Daten vorhanden, jedoch konnte mittels Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale Struktur einer menschlichen, mitochondrialen RNA-Polymerase aufgeklärt werden, die zwei PPR-Motive enthält (Ringel *et al.* 2011). Diese entsprechen in ihrer Räumlichkeit der postulierten Struktur von jeweils zwei antiparallelen Helices (Small und Peeters 2000). Bioinformatische Vorhersagen der Tertiärstruktur von zwei zur RF-Familie gehörenden PPR-Proteinen (Kotchoni *et al.* 2010) und des PPR-Proteines HCF152 (Kobayashi *et al.* 2011)

bestätigen dies ebenfalls. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für beide untersuchten PPR-Proteine AT3G15590 und At1G15480 ebenfalls auf der Basis der Aminosäuresequenz Strukturanalysen durchgeführt und 3D-Modelle der Proteine erstellt (Abbildung 8).

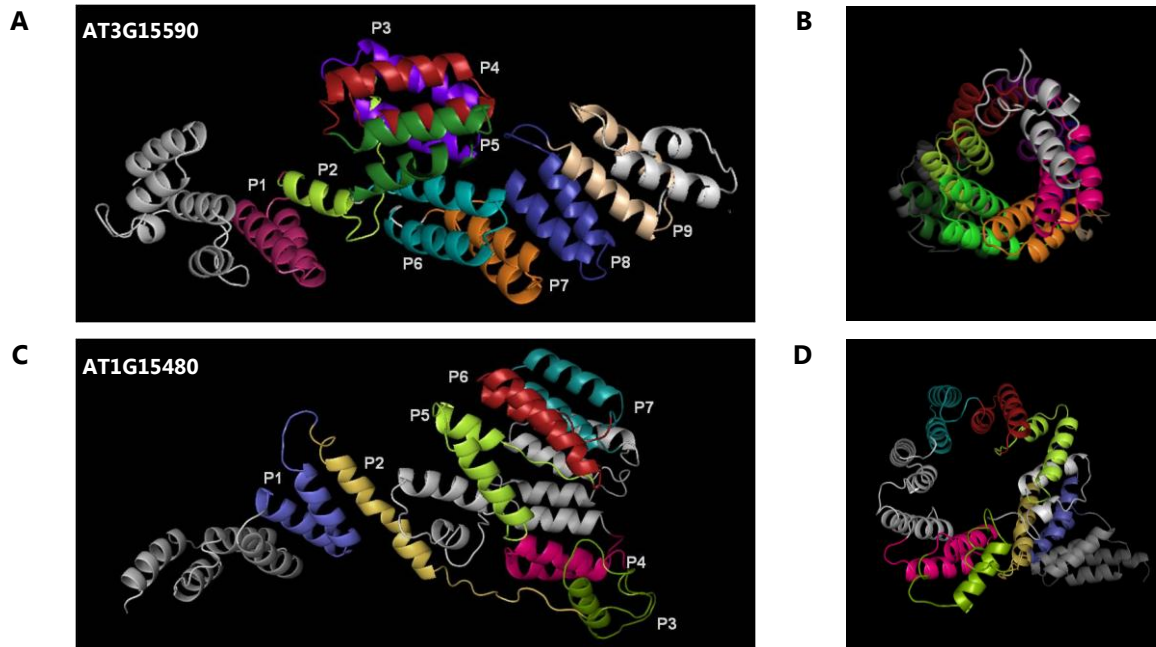


Abbildung 8: Proteinstrukturmodelle von AT3G15590 und AT1G15480. (A,B) Im *Cartoon*-Modell von AT3G15590 sind die Aminosäuren 173 bis 595 mit den neun PPR Motiven (P1-P9) in unterschiedlichen Farben dargestellt. Alle weiteren Aminosäureabschnitte sind in weiß abgebildet. (C,D) Analog dazu die *Cartoon*-Darstellung von AT1G15480 und der Aminosäuren 156 bis 571 mit sieben PPR-Motiven (P1-P7). Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.

Wie die Proteinstrukturmodelle für die Proteine AT3G15590 (Abbildung 8 A) und AT1G15480 (Abbildung 8 C) zeigen, wird die Tertiärstruktur in den gezeigten Abschnitten der Proteine in beiden Fällen deutlich von α -Helices dominiert. Andere Strukturelemente wie β -Faltblätter liegen nicht vor. Somit stimmen auch die Vorhersagen dieser beiden untersuchten Proteine mit den bisherigen Strukturanalysen von PPR-Proteinen überein. Wie auch die beiden PPR-Domänen der humanen, mitochondrialen RNA-Polymerase bestehen einzelne PPR-Domänen aus zwei antiparallel verlaufenden Helices, die in größerer Anzahl zusammen die Gesamtproteinstruktur bilden. Durch das direkte Aufeinanderfolgen mehrerer PPR-Domänen entsteht außerdem auf Gesamtproteinebene eine Superhelix (Abbildung 8 B und D), was auch für das PPR-Proteine PPR5 gezeigt werden konnte (Williams-Carrier *et al.* 2008). Auffällig ist darüber hinaus, dass auch Bereiche der Aminosäuresequenz, die keiner PPR-Domäne zuzuordnen sind, einzelne, aber in den meisten Fällen ebenfalls paarweise α -Helices bilden. Bei diesen Abschnitten handelt es sich um die im Abschnitt 3.1.1 bereits erwähnten stark homologen Bereiche der beiden Proteine, von denen nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich auch hier um PPR-Domänen handelt.

3.1.3 *In silico* Analyse putativer RNA-Bindemotive

Neben den Studien von (Kobayashi *et al.* 2011), die experimentell die Beteiligung bestimmter Aminosäuren an der RNA-Bindung untersuchten, gibt es weiterhin nur wenige, auf bioinformatischen Modellen beruhenden Daten, die auf putative RNA-Bindemotive hinweisen (Small und Peeters 2000; Stern *et al.* 2004; Fujii *et al.* 2011). Für die Proteine AT3G15590 und AT1G15480 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Strukturmodellen gezeigt, dass sie mit ihren einzelnen PPR-Domänen eine superhelikale Struktur bilden und einzelne PPR-Domänen und Aminosäuren durch ihre exponierte Lage an der Bindung von RNA-Liganden beteiligt sein könnten (3.1.2). Für weitere Analysen wurden auf der Grundlage von zwei Programmen Vorhersagen für mögliche RNA-Bindemotive durchgeführt. Die Programme RNABindR (Terribilini *et al.* 2007) und BindN+ (Wang und Brown 2006; Wang *et al.* 2010) analysieren die Primärsequenz eines Proteins und gleichen diese über eine Protein Datenbank mit RNA-bindenden Aminosäuren in bekannten Protein-RNA Komplexen ab. Darüber hinaus gehen pK_a -Werte, Hydrophobizität und Molekulargewicht der Aminosäuren in die Analyse ein. Beide Programme beschränken sich zudem nicht auf eine Bindung von Nucleinsäuren im Allgemeinen, sondern sind strikt auf die Analyse von RNA-bindenden Proteinen ausgerichtet. Die Ergebnisse für die Proteine AT3G15590 und AT1G15480 sind in der Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt. Grundsätzlich wurden für beide Proteine Aminosäurereste, die als RNA-bindend klassifiziert wurden, identifiziert. Dies sind teilweise lediglich vereinzelt Aminosäuren, jedoch werden auch gehäuft ganze Sequenzbereiche als RNA-bindend erkannt. Gleichmaßen gibt es auch Sequenzbereiche, die den Analysen zufolge kaum oder gar nicht an einer RNA-Interaktion beteiligt zu sein scheinen. So beispielsweise der Bereich 220 – 356 des Proteins AT3G15590 (Abbildung 9) und der Bereich 393 – 496 des Proteins AT1G15480 (Abbildung 10). Nach aktuellem Stand wird davon ausgegangen, dass mindestens zwei PPR-Domänen für die Bindung eines RNA-Moleküls notwendig sind, wobei die Affinität mit der Anzahl der PPR-Domänen steigt (Nakamura *et al.* 2003; Kobayashi *et al.* 2011). Die für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren befinden sich bisherigen Studien zufolge im Bereich des Übergangs zweier benachbarter PPR-Domänen (Small und Peeters 2000; Stern *et al.* 2004; Fujii *et al.* 2011; Kobayashi *et al.* 2011). Für beide hier analysierten PPR-Proteine sind derartige Bereiche von beiden Programmen übereinstimmend als RNA-bindend erkannt worden, wie z.B. in der Sequenz des Übergangs von der PPR-Domäne zwei zu drei und fünf zu sechs des Proteins AT3G15590 oder von der PPR-Domäne drei zu vier des Proteins AT1G15480. Da hier jedoch keine absolut eindeutige Regelmäßigkeit herrscht, ist unklar, ob alle oder nur vereinzelt PPR-Domänen für eine Interaktion mit der Ziel-RNA verantwortlich sind.

Bisher wurden, wie bereits erwähnt, in erster Linie die PPR-Domänen als RNA-bindende Sequenzbereiche diskutiert. Durch die von den Programme RNABindR und BindN+ getroffenen Vorhersagen wurden für beide untersuchten Proteine auch Bereiche als RNA-bindend identifiziert, die sich *upstream* der PPR-Domänen befinden. Bei dem Protein AT3G15590 handelt es sich um den Bereich 153 – 178 und bei dem Protein AT1G15480 um den Bereich 174 – 192. Diese Aminosäuren wurden fast lückenlos und übereinstimmend von beiden Programmen als RNA-bindend klassifiziert und heben sich dadurch deutlich von den umgebenden Sequenzbereichen, die kaum RNA-bindende Aminosäuren aufweisen, ab. Für die Bereiche außerhalb der PPR-Domänen der Proteine AT3G15590 und AT1G15480 wurde keine Übereinstimmung mit bisher bekannten Pfam-Domänen gefunden; möglicherweise befinden sich jedoch auch hier Motive, von denen denkbar wäre, dass sie zusätzlich zu den PPR-Domänen eine RNA-Bindung vermitteln und/oder begünstigen.

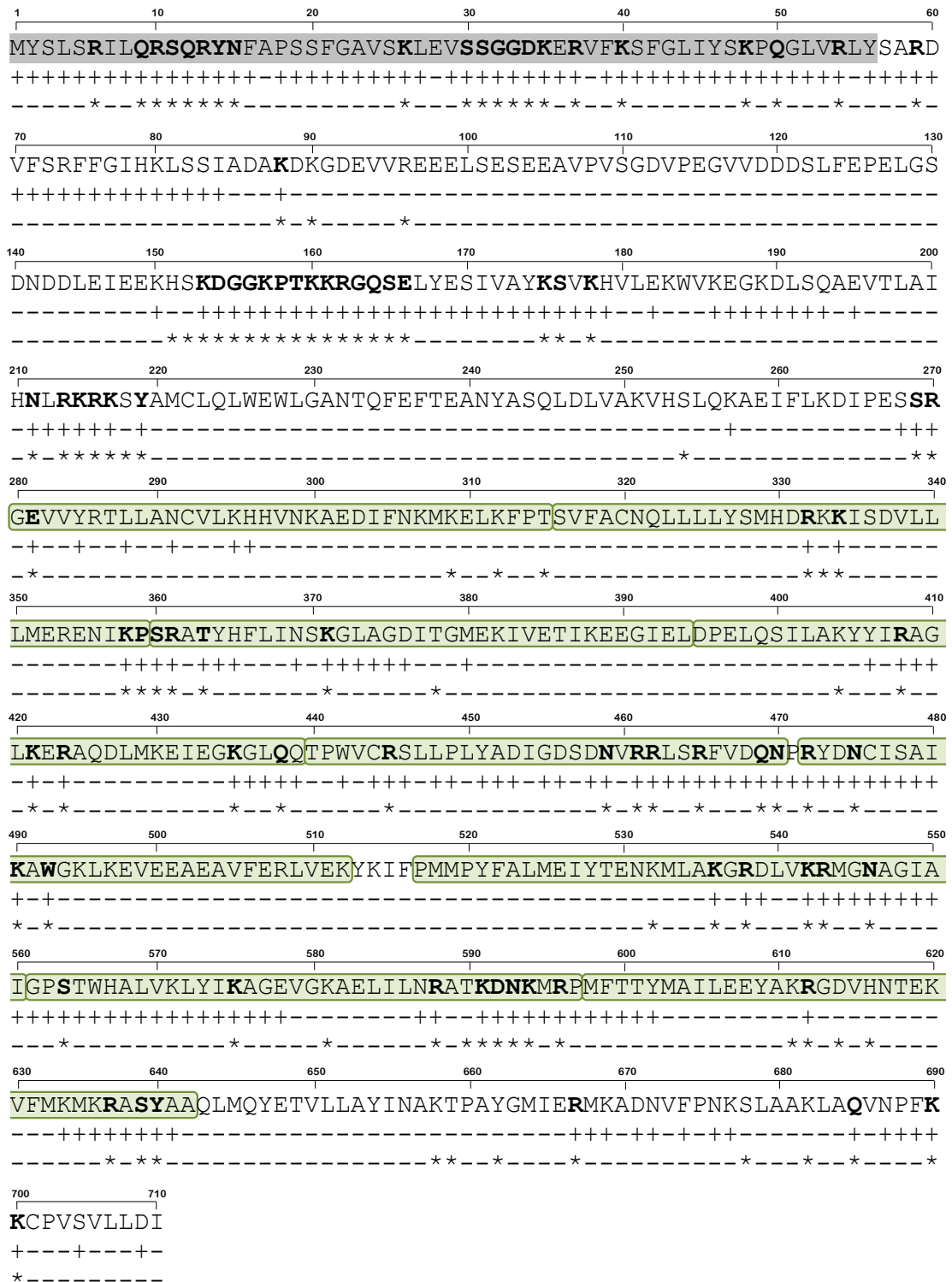


Abbildung 9: *In silico* Analyse der Primärsequenz von AT3G1590 hinsichtlich RNA-bindender Aminosäurereste durch die Programme BindN+ und RNABindR. Putativ RNA-bindende Aminosäurereste sind gekennzeichnet: + BindN+; * RNABindR. Aminosäuren, die von beiden Programmen als RNA-bindend identifiziert wurden, sind fett gedruckt. Die PPR-Domänen sind grün hinterlegt. Das Transitpeptid ist grau hinterlegt.

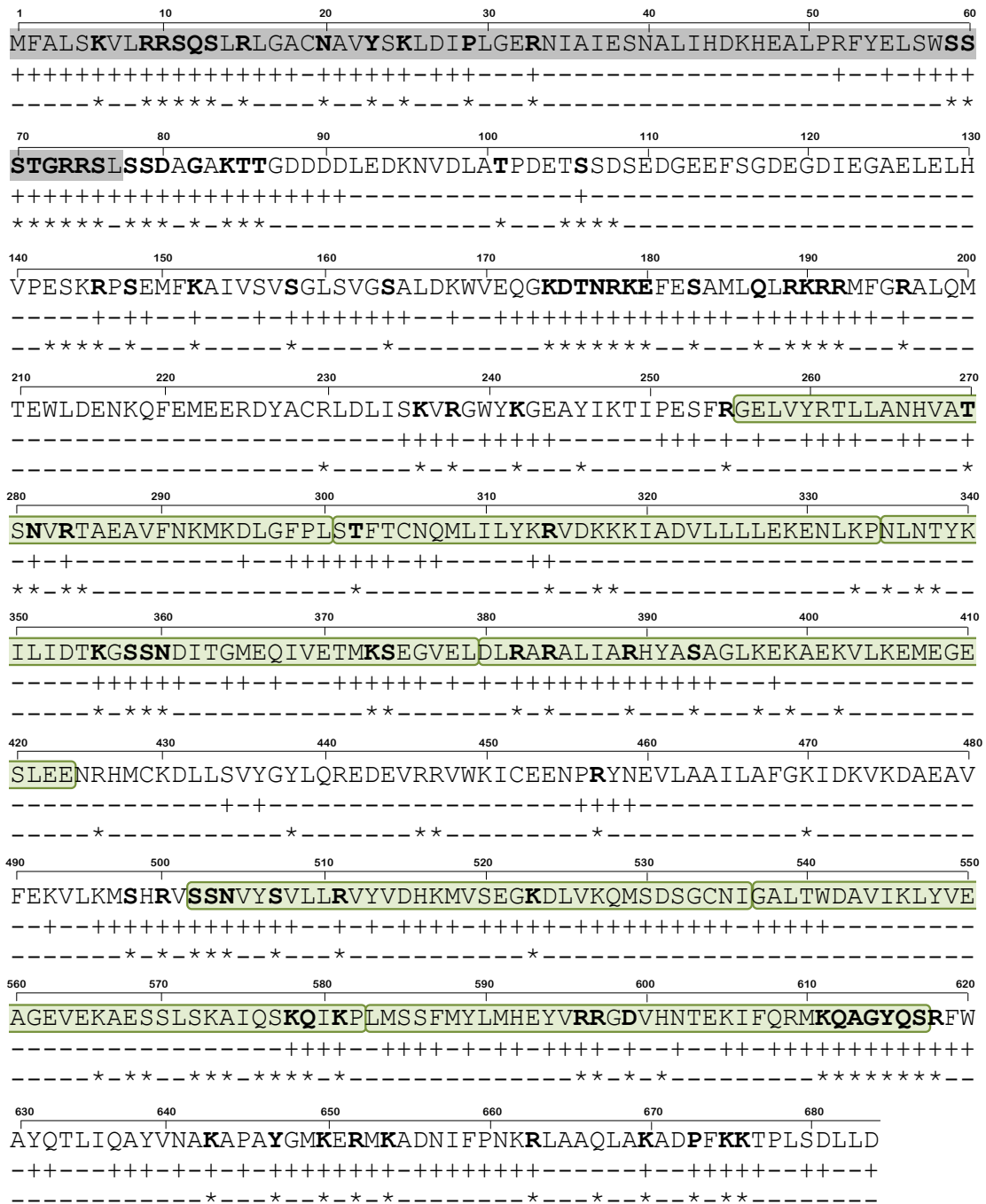


Abbildung 10: *In silico* Analyse der Primärsequenz von AT1G15480 hinsichtlich RNA-bindender Aminosäurereste durch die Programme BindN+ und RNABindR. Putativ RNA-bindende Aminosäurereste sind gekennzeichnet: + BindN+; * RNABindR. Aminosäuren, die von beiden Programmen als RNA-bindend identifiziert wurden, sind fett gedruckt. Die PPR-Domänen sind grün hinterlegt. Das Transitpeptid ist grau hinterlegt.

3.2 Die PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480 sind mitochondrial lokalisiert

Die Mehrheit der PPR-Proteine enthält N-terminale Sequenzbereiche, die für die Lokalisation in den Mitochondrien oder den Chloroplasten verantwortlich sind, wie *in silico* Analysen zeigen (Lurin *et al.* 2004; O'Toole *et al.* 2008). Bisher wurde allerdings nur für wenige PPR-Proteine die subzelluläre Lokalisation *in vivo* analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher mit Hilfe eines Reportergenkonstrukts die vorhergesagte mitochondriale Lokalisation der beiden PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480 *in vivo* experimentell bestätigt werden. Als Reporterprotein wurde das *green fluorescence protein* (GFP) verwendet, dessen Gen mit dem jeweiligen zu untersuchenden Gen gekoppelt wird, so dass sie gemeinsam transkribiert werden und ein Fusionsprotein entsteht. Das GFP, ein 28 kDa großes Protein wurde bei der Reinigung von Aequorin aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* entdeckt (Shimomura *et al.* 1962) und später als ein wichtiges Werkzeug für Promotor- und Expressionsstudien nutzbar gemacht (Chalfie *et al.* 1994; Inouye und Tsuji 1994). Für die Biolumineszenz des Proteins sorgt das Tripeptid Ser-Tyr-Gly, welches posttranslational zyklisiert und als p-Hydroxybenzylidenimidazolinon für die spektralen Eigenschaften, blaues und UV-Licht (470 bzw. 395 nm) zu absorbieren und grünes Licht (509 nm) zu emittieren, verantwortlich ist. Das GFP benötigt somit weder Substrate noch Co-Faktoren und wirkt außerdem nicht toxisch. Eine schematische Darstellung des für die transiente Transformation verwendeten Plasmids ist in Abbildung 11 gezeigt. Für den Nachweis der subzellulären Lokalisation der PPR-Proteine AT3G15590 und AT1G15480 wurde das Plasmid in isolierte *Arabidopsis* Protoplasten transformiert, eine Färbung mit dem Mitochondrienfarbstoff „MitoTracker CM-H2TMRos“ durchgeführt und die so behandelten Protoplasten anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert (2.3.1). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 gezeigt.



Abbildung 11: Schematische Darstellung des für die transiente Transformation verwendeten Plasmids kodierend für das AT3G15590:GFP- und A1G15480:GFP-Fusionsprotein. Als Basisvektor diente das Plasmid pOL-GFPS65C (Peeters *et al.* 2000). An die 35S-Promotorsequenz mit doppeltem *Enhancer* schließt sich eine *translation leader* Sequenz (TL) zur Steigerung der Translationseffizienz aus dem Tabakmosaikvirus an. Darauf folgen die jeweilige Vollständigsequenz exklusive des Stoppcodons von *at3g15590* bzw. *at1g15480* und das für das GFPS65C kodierende Gen unter Einhaltung des Leserahmens. *Downstream* der für das GFP-Fusionsprotein kodierenden Sequenz befindet sich ein Polyadenylierungssignal (PA) sowie die 35S-Terminatorsequenz aus dem Tabakmosaikvirus. Die einzelnen Elemente sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

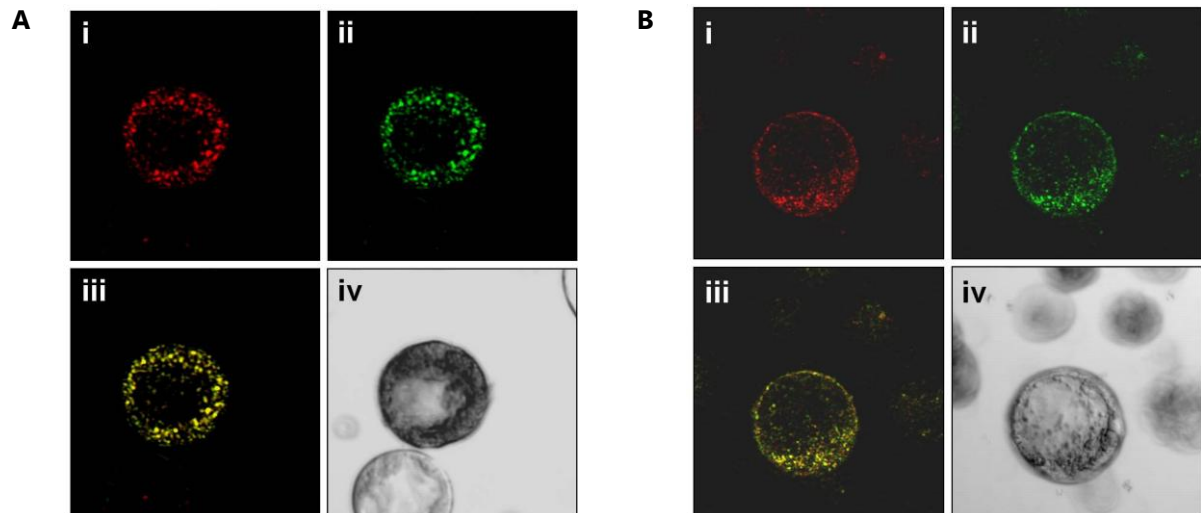


Abbildung 12: Subzelluläre Lokalisation von AT3G15590 und AT1G15480 in Protoplasten von *Arabidopsis*. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen des Nachweises von Mitochondrien durch den Farbstoff „MitoTracker CM-H2TMRos“ (i), der GFP-Fluoreszenz (ii), der Übereinanderlagerung der Aufnahmen i und ii (iii), sowie eine errechnete Hellfeldaufnahme der Protoplasten (iv) für das jeweilige GFP-Reportergerkonstrukt AT3G15590:GFP (A) und AT1G15480:GFP (B).

Für beide PPR-Proteine konnte die zunächst nur auf bioinformatischen Analysen beruhende Vorhersage der Lokalisation in den Mitochondrien mittels GFP-Fusionsproteinen *in vivo* bestätigt werden. Die GFP-Fluoreszenz (Abbildung 12 (ii)) ist punktförmig in den Protoplasten verteilt. Eine Gegenfärbung mit dem mitochondrienspezifischen Farbstoff „MitoTracker CM-H2TMRos“ (Abbildung 12 (i)) weist diese punktförmigen Strukturen eindeutig als Mitochondrien aus und bestätigt gleichzeitig die Integrität dieser Organellen. Die Überereinanderlagerung der Aufnahmen (i) und (ii) zeigt für beide untersuchten PPR-Proteine eine nahezu vollständige Deckung der GFP- und der Mitotrackerfluoreszenz (Abbildung 12 (iii)). Somit wurde auch eine möglicherweise duale Lokalisierung, wie beispielsweise für das PPR-Protein PNM1 (Hammani *et al.* 2011b) gezeigt, ausgeschlossen.

3.3 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten durch PCR-Genotypisierung

Für die Untersuchung der Funktion der beiden PPR-Proteine wurden unter anderem T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana* verwendet, bei denen das entsprechende Gen durch T-DNA-Insertionsmutagenese (Azpiroz-Leehan und Feldmann 1997) inaktiviert wurde. Bei dieser Form der Mutagenese wird das Ti-Plasmid aus *A. tumefaciens* über Infektion der Zielpflanze stabil in das Pflanzengenom übertragen (Zupan und Zambryski 1995). Für die vollständige Inaktivierung eines Gens muss die Insertion der T-DNA in beiden Allelen im diploiden Chromosomensatz von *A. thaliana* vorliegen, da nur dann eine komplette Inaktivierung des entsprechenden Gens gewährleistet ist. Die potentiellen *ko*-Linien mussten daher in zwei Schritten auf T-DNA-Insertion und Homozygotie getestet werden.

In einer ersten PCR wurde mit einem genspezifischen Oligonukleotid und einem Oligonukleotid, welches innerhalb eines bestimmten Bereichs der T-DNA, der *left border*, bindet, überprüft ob die Insertion der T-DNA im Zielgen vorliegt. Der Test auf Homozygotie erfolgte durch die Verwendung von zwei genspezifischen Oligonukleotiden, die den unter *T-DNA-Express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) für jede verfügbare *ko*-Linie angegebenen Insertionsort einschließen. Die Abbildung 13 zeigt schematisch die Funktionsweise der Identifizierung der beiden T-DNA-Insertionslinien und der homozygoten Linien mittels PCR.

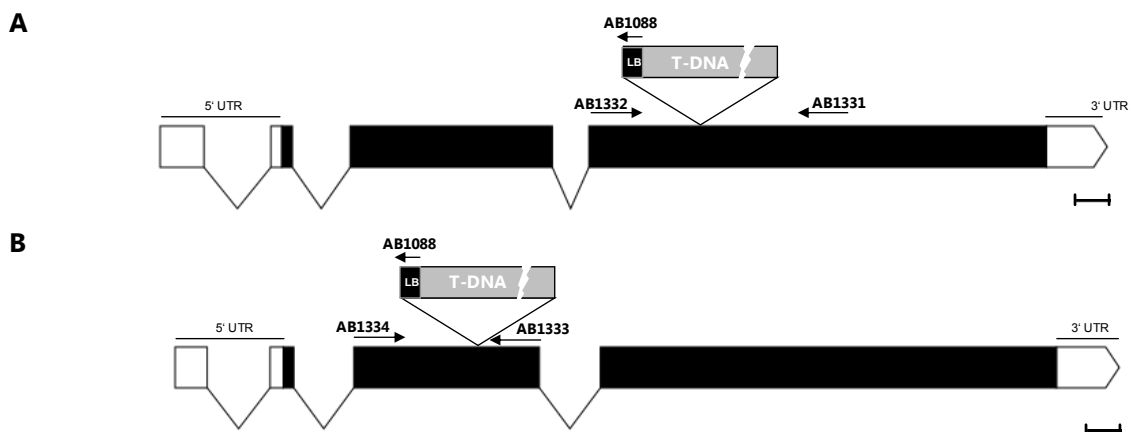


Abbildung 13: Schematische Übersicht der Position der T-DNA Insertion und der Oligonukleotidbindestellen der PCR-Ansätze zur Identifizierung der T-DNA-Insertion in den Genen *at3g15590* und *at1g15480*. (A) Für den Nachweis der T-DNA im Gen *at3g15590* im dritten Exon wurden in der PCR-Reaktion das genspezifische Oligonukleotid AB1332 zusammen mit dem an der *left border* (LB) bindenden Oligonukleotid AB1088 eingesetzt. Der Nachweis der Hetero- oder Homozygotie in Bezug auf das entsprechende Gen erfolgte unter Verwendung der beiden genspezifischen Oligonukleotide AB1331 und AB1332. (B) Die Genotypisierung der T-DNA-Insertionsmutante für das Gen *at1g15480* erfolgte analog dazu unter Verwendung der beiden genspezifischen Oligonukleotide AB1333 und AB1334, sowie des Oligonukleotids AB1088 in den entsprechenden PCR-Reaktionen. Der Balken entspricht einer Länge von 100 bp.

Die T-DNA Insertionslinie TDA_{t3g15590} (GK-188B06) der GABI-Kat-Sammlung (Li *et al.* 2003; Rosso *et al.* 2003) wurde unter Verwendung des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) generiert und trägt eine T-DNA-Insertion des Vektors pAC161, deren Lokalisation im dritten Exon an Position +367 des codierenden Bereichs angegeben ist (Abbildung 13 A). Die T-DNA Insertionslinie TDA_{t1g15480} (FLAG_465F03) der Versailles T-DNA Kollektion (Samson *et al.* 2002) wurde unter Verwendung des Ökotyps Wassilevskija (WS-4) generiert und trägt eine T-DNA-Insertion des Vektors pGKB5 (Bouchez *et al.* 1993), deren Lokalisation im zweiten Exon an Position +318 des codierenden Bereichs angegeben ist (Abbildung 13 B). Unter Verwendung der in Abbildung 13 angegebenen Oligonukleotide wurde die Genotypisierung von Pflanzen der T-DNA Insertionslinien für die Gene *at3g15590* und *at1g15480* vorgenommen. Für je eine Pflanze der T2-Generation sind die Ergebnisse der PCR-Reaktionen nach erfolgter Gelelektrophorese in der Abbildung 14 gezeigt.

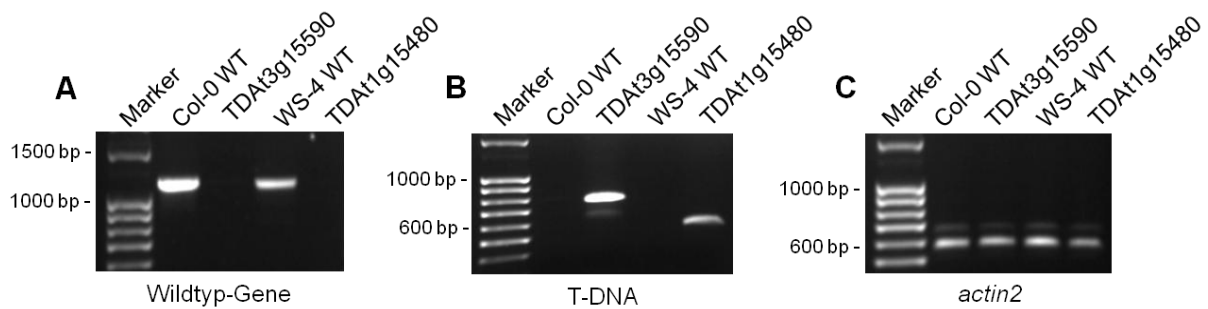


Abbildung 14: Identifizierung homozygoter T-DNA Insertionslinien für die Gene *At3g15590* und *At1g15480*. (A) Nachweis der Wildtypgene *at3g15590* und *at1g15480* in Wildtyppflanzen Col-0 und WS-4, sowie in den jeweiligen T-DNA Insertionslinien TDA3g15590 und TDA1g15480. (B) Nachweis der T-DNA Insertion im Gen *at3g15590* bzw. *at1g15480* in Wildtyppflanzen Col-0 und WS-4, sowie in den jeweiligen T-DNA Insertionslinien TDA3g15590 und TDA1g15480. (C) Nachweis des Gens *actin2* in Wildtyppflanzen Col-0 und WS-4, sowie in den jeweiligen T-DNA Insertionslinien TDA3g15590 und TDA1g15480.

Für beide Gene, *at3g15590* und *at1g15480*, wurde erfolgreich eine homozygote T-DNA Insertionslinie identifiziert (Abbildung 14). Während das jeweilige Wildtypgen *at3g15590* mit einer Amplifikatgröße von 1142 bp und das Gen *at1g15480* mit einer Amplifikatgröße von 1132 bp nur in den korrespondierenden Wildtyppflanzen nachgewiesen wurde und nicht in den Insertionslinien, war unter Verwendung eines T-DNA spezifischen und des jeweiligen genspezifischen Oligonukleotids nur in den T-DNA-Insertionslinien TDA3g15590 und TDA1g15480 eine Amplifikation möglich. Somit war von einer T-DNA Insertion im entsprechenden Gen auf beiden Chromosomen auszugehen. Die Integrität der DNA wurde durch erfolgreiche Amplifikation eines 574 bp langen Fragments des *housekeeping*-Gens *actin2* in allen getesteten Pflanzen nachgewiesen. Da jedoch eine T-DNA Insertion, selbst wenn sie in einem Exon des kodierenden Bereichs eines Gens lokalisiert ist, nicht zwangsläufig die Transkription des betroffenen Gens verhindert (Wang 2008), wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierfür wurde aus den T-DNA Insertionslinien TDA3g15590 und TDA1g15480, sowie aus den korrespondierenden Wildtyppflanzen Col-0 und WS-4 RNA isoliert und diese DNaseI behandelt. Der Erfolg der DNaseI Behandlung wurde mittels PCR getestet (Daten nicht gezeigt) und die RNA als Matrize für die RT-PCR verwendet. Die in die Reaktionen eingesetzten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie theoretisch in der Lage sind, den gesamten codierenden Bereich der Gene *at3g15590* und *at1g15480* zu amplifizieren. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse nach erfolgter Gelelektrophorese sind in der Abbildung 15 gezeigt.

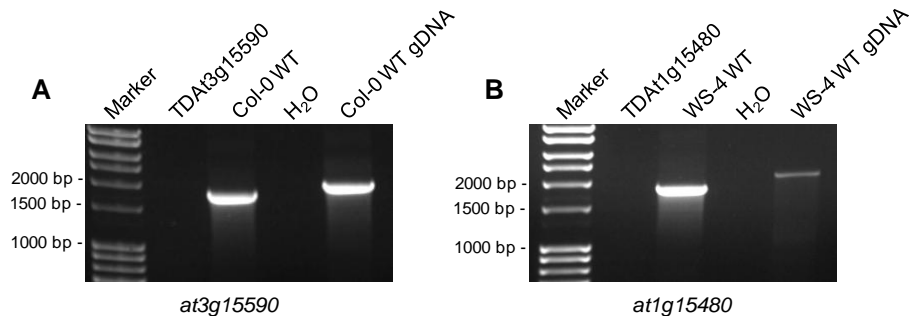


Abbildung 15: RT-PCR Analyse zur Kontrolle der Transkription der Gene *at3g15590* und *at1g15480*. Als Matrize wurde DNA-freie RNA der T-DNA Insertionslinie TDA3g15590 (A) bzw. TDA1g15480 (B), sowie einer korrespondierenden Wildtyppflanze eingesetzt. Als Kontrolle wurden Kontrollreaktionen mit H₂O statt RNA und genomischer Wildtyp-RNA durchgeführt. Die eingesetzten Oligonukleotide amplifizieren jeweils die gesamte Länge der kodierenden Sequenz von *at3g15590* und *at1g15480*.

Für beide untersuchten Gene wurde in der RT-PCR lediglich unter Verwendung von RNA der entsprechenden Wildtyppflanzen und von genomischer DNA als Kontrolle die Transkription der untersuchten Gene *at3g15590* und *at1g15480* nachgewiesen, jedoch nicht in den T-DNA Insertionslinien TDA3g15590 und TDA1g15480. In der Abbildung 15 A ist eine Bande der erwarteten Größe für das *at3g15590*-Transkript von 1831 bp in der Spur, die die Reaktion mit Wildtyp-RNA repräsentiert, zu erkennen. Das geringfügig größere Amplifikat in der Kontrollreaktion beinhaltet aufgrund der Verwendung von genomischer DNA des Wildtyps als Matrize auch Introns der Sequenz von *at3g15590* und ist 2089 bp groß. Die Ergebnisse für den Test auf Transkription des Gens *at1g15480* in der T-DNA Insertionslinie TDA1g15480 zeigt ein vergleichbares Ergebnis. Auch hier erfolgte eine Amplifikation des 1783 bp großen Vollängentranskripts nur unter Verwendung von Wildtyp-DNA. Mit 2114 bp ist das ebenfalls erfolgreich amplifizierte RT-PCR Produkt von genomischer DNA als Positivkontrolle bedingt durch das Vorhandensein von Intronsequenzen größer.

Zusammenfassend wurden somit erfolgreich homozygote T-DNA Insertionslinien für die beiden Gene *at3g15590* und *at1g15480* identifiziert, in denen kein entsprechendes Transkript nachzuweisen war. Es wurde also von einem vollständigen *knockout* der Gene in den jeweiligen T-DNA Insertionslinien ausgegangen. Samen dieser erfolgreich auf eine homozygote T-DNA Insertion und einen *knockout* getesteten Pflanzen wurden kontinuierlich vermehrt und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter Lichtausschluss bei RT gelagert.

3.4 Morphologische Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien

Phänotypische Anomalien von Pflanzen einer T-DNA Insertionslinie können erste Informationen über die physiologische Bedeutung des fehlenden Proteins geben. Daher wurde eine Auswahl von Untersuchungen zur Morphologie der T-DNA Insertionslinien TDA_t3g15590 und TD1g15480 durchgeführt, deren Ergebnisse nachfolgend dargestellt werden.

3.4.1 Samen der TDA_t3g15590-Pflanzen sind in ihrer Keimungsfähigkeit beeinflusst

Der Prozess der Keimung beinhaltet alle physiologischen Abläufe von der Wasseraufnahme des ruhenden Samens bis hin zur vollständigen Ausbildung des Keimlings (Bewley 1997). In diesen Ablauf ist eine Vielzahl von Genen und Proteinen involviert. Um einen möglichen Einfluss der Proteine AT3G15590 und AT1G15480 auf die Keimung zu untersuchen, wurden Keimungsversuche durchgeführt. Hierfür wurden Samen der T-DNA Insertionslinien und des korrespondierenden Wildtyps auf sterilem Festmedium ausgebracht, was im Gegensatz zur Kultivierung auf Erde gleiche Bedingungen hinsichtlich der Feuchtigkeit und der Nährstoffversorgung gewährleistet. Des Weiteren wurde auf die Zugabe von Saccharose zu dem Medium verzichtet, um eine mögliche phänotypische Komplementation durch die zusätzliche Kohlenstoffquelle zu verhindern. Nach Kultivierung (2.2.4) für fünf Tage wurden ausgekeimte und nicht ausgekeimte Samen ausgezählt und der Versuch statistisch ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 gezeigt. Die Keimungsraten der Pflanzen der T-DNA Insertionslinien TDA_t3g15590 und TDA_t1g15480 sind im Vergleich zum Wildtyp geringfügig niedriger. So wurde für die Linie TDA_t3g15590 eine Verringerung der Keimungsrate um etwa 25 % beobachtet. Samen der Linie TDA_t1g15480 keimten nahezu gleichermaßen aus wie die des Wildtyps WS-4.

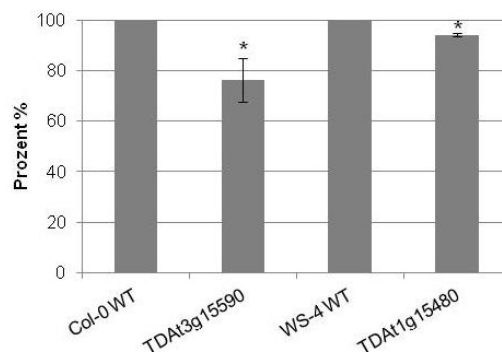


Abbildung 16: Keimungsrate der T-DNA Insertionslinien TDA_t3g15590 und TDA_t1g15480 im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp. Die Keimungsraten der jeweiligen Wildtyppflanzen Col-0 und WS-4 wurden gleich hundert Prozent und die Keimungsraten der T-DNA Insertionslinien TDA_t3g15590 und TDA_t1g15480 entsprechend dazu in das Verhältnis gesetzt. Je Pflanzenlinie wurden in drei unabhängigen Versuchen jeweils 32 Samen auf ihre Keimungsfähigkeit hin untersucht. Mit * markierte Daten sind nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp

Somit scheint die Abwesenheit des Proteins AT1G15480 keinen maßgeblichen Einfluss auf den Prozess der Keimung zu haben. Das Protein AT3G15590 hingegen ist möglicherweise in diesen Prozess involviert.

3.4.2 Beide T-DNA Insertionslinien zeigen bezüglich des Wachstums einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp

Zur Untersuchung des Wachstumshabitus' wurden Pflanzen der zu untersuchenden T-DNA Insertionslinie, sowie die entsprechenden Wildtyplinien Col-4 und WS-4 unter Langtagbedingungen kultiviert und ihr Wachstum dokumentiert. Die Abbildung 17 zeigt die Phänotypen der TD-Insertionslinien TDA_t3g15590 und TDA_t1g15480 im Vergleich zum Wildtyp. Es lässt sich hierbei zunächst feststellen, dass beide *ko*-Mutanten sich in ihrem vegetativen und generativen Wachstum vom jeweiligen Wildtyp unterscheiden. Pflanzen der Linie TDA_t1g15480 gehen deutlich früher in die generative Wachstumsphase über und haben bereits nach vier Wochen eine mehrere Zentimeter lange primäre Infloreszenz mit mehreren Blüten gebildet (Abbildung 17 A). Anhand der Infloreszenz- und Blütenbildung befinden sich die Pflanzen der Linie TDA_t1g15480 somit bereits in der Wachstumsphase 6 (Boyes *et al.* 2001), während sich Pflanzen des Wildtyps in der Phase 3 befinden. Allerdings beschränkt sich das fortgeschrittene Wachstum scheinbar lediglich auf das generative Wachstum, da der Rosettendurchmesser im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps deutlich geringer ist und weniger Rosettenblätter ausgebildet sind. Das Wachstum der Pflanzen der Linie TDA_t1g15480 ist diesbezüglich also eher der frühen dritten Wachstumsphase einzuordnen. Das Fehlen des Proteins AT1G15480 begünstigt daher möglicherweise das generative Wachstum, während das vegetative Wachstum leicht vermindert zu sein scheint. Pflanzen der T-DNA Insertionslinie TDA_t3g15590 entwickeln sich während ihres gesamten Wachstums im Vergleich zum Wildtyp Col-0 stark verzögert (Abbildung 17 B und C). Nach einer fünfwöchigen Kultivierung ist der Rosettendurchmesser der *ko*-Mutanten deutlich kleiner als der des Wildtyps. Nach acht Wochen befinden sich Pflanzen des Wildtyps bereits in der achten Wachstumsphase mit deutlicher Bildung von sekundären Infloreszenzen, sowie fortgeschrittener Blüten- und Schotenbildung. Pflanzen der Linie TDA_t3g15590 sind deutlich kleiner, beginnen gerade erst mit der Bildung von sekundären Infloreszenzen und tragen nur vereinzelt Blüten. Ihr Wachstum ist nach (Boyes *et al.* 2001) der Phase 5 bis 6 zuzuordnen. Im Gegensatz zu Pflanzen der Linie TDA_t1g15480 scheint die Abwesenheit des Proteins AT3G15590 also in den Pflanzen eine Verzögerung des vegetativen wie auch des generativen Wachstums zu bewirken. Aufgrund des zwergwüchsigen Phänotyps von Pflanzen der Linie TDA_t3g15590 wurde diese Mutante als *dweorg1* (altenglisch für „Zwerg“) bezeichnet.

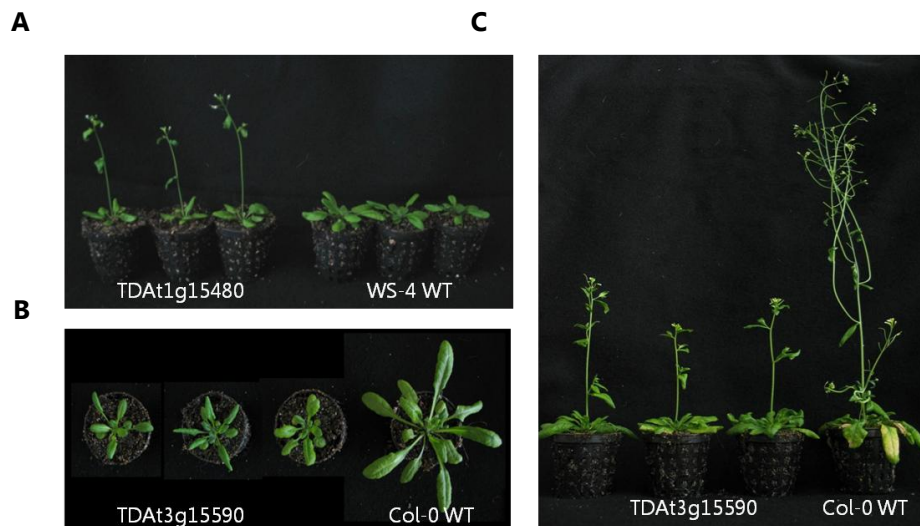


Abbildung 17: Phänotypen von TDA1g15480 und TDA3g15590 Pflanzen, sowie der korrespondierenden Wildtyppflanzen. (A) Pflanzen der Linie TDA1g15480 im Vergleich zum Wildtyp WS-4 nach vier Wochen Anzucht unter Langtagbedingungen. (B) Pflanzen der Linie TDA3g15590 im Vergleich zum Wildtyp Col-0 nach fünf Wochen Anzucht unter Langtagbedingungen. (C) Pflanzen der Linie TDA3g15590 im Vergleich zum Wildtyp Col-0 nach acht Wochen Anzucht unter Langtagbedingungen.

3.4.3 Die Vitalität der gebildeten Pollen ist in beiden T-DNA Insertionslinien stabil

Eine Vielzahl von Proteinen der PPR-Familie ist eng mit dem Phänomen der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS, *cytoplasmic male sterility*) assoziiert (Linke und Borner 2005). Als *restorer of fertility* (RF-) Proteine sorgen diese PPR-Proteine für das Wiederherstellen der Fertilität (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Bei von der cytoplasmatischen männlichen Sterilität betroffenen Pflanzen kommt es zu einer Vielzahl von phänotypischen Veränderungen, die für den Verlust der Fruchtbarkeit verantwortlich sind. So sind in erster Linie sowohl Blüten- als auch Pollenbildung betroffen (Linke und Borner 2005; Chase 2007). Um einen möglichen Effekt der Proteine DWEORG1 und AT1G15480 auf diesen Aspekt hin zu untersuchen, wurden Samen der entsprechenden Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich ihrer Vitalität und Fertilität untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Samen nach (Alexander 1969; Alexander 1980) gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Die Färbelösung enthält Malachitgrün, das Cellulose in den Pollenwänden anfärbt, und Säurefuchsin, welches das Protoplasma des Pollens anfärbt. Somit erscheinen Pollen, die früh in der Entwicklung abgestorben sind und kein Cytoplasma entwickelt haben schwach grünlich, während vitale Pollen dunkel violett erscheinen. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 gezeigt.

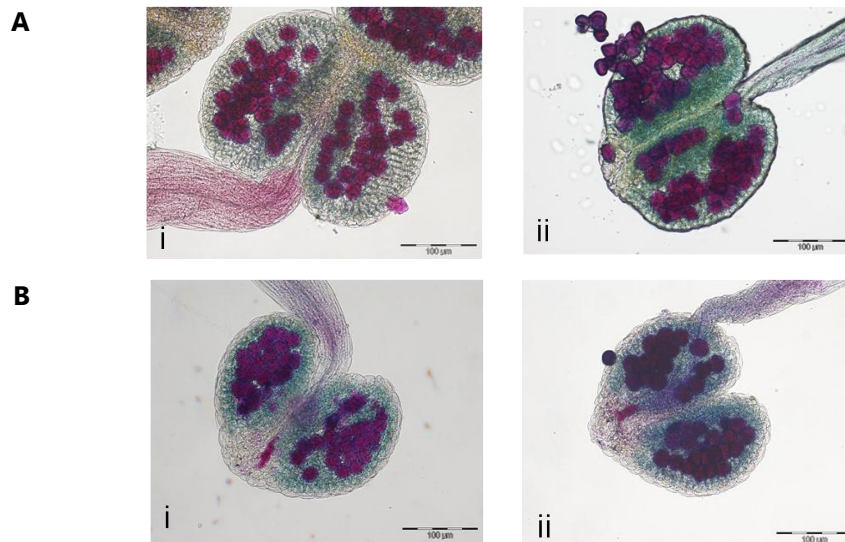


Abbildung 18: Bestimmung der Pollenvitalität von Pollen der T-DNA Insertionslinien *dweorg1* und TDA1g15480 im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Wildtyp. (A) Antheren und Samen der *dweorg1* Mutante (i) und des Wildtyps Col-0 (ii). (B) Antheren und Samen der Linie TDA1g15480 (i) und des Wildtyps WS-4 (ii). Die Färbung wurde nach (Alexander 1969; Alexander 1980) durchgeführt und die Antheren mit den Pollen lichtmikroskopisch untersucht. Der Balken entspricht einer Länge von 100 µm.

Alle Pollen, die der T-DNA Insertionslinien wie auch die der Wildtyppflanzen weisen eine dunkel violette Färbung auf. Die Morphologie der Samen und der Antheren ist ebenfalls gegenüber dem Wildtyp nicht verändert. Auch die Blütenbildung war in den T-DNA Insertionslinien nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Eine Funktion der beiden PPR-Proteine DWEORG1 und AT1G15480 bei der Wiederherstellung der Fertilität in CMS-Pflanzen erscheint somit unwahrscheinlich.

3.4.4 Die Bildung von Lateralwurzeln ist in beiden T-DNA Insertionslinien beeinflusst

Mit der Beeinflussung der Keimungsrate von Samen der *dweorg1* Mutante und den Veränderungen im Wachstumsverhalten beider T-DNA Insertionsmutanten wurden bereits deutliche phänotypische Veränderungen beschrieben. Die Wurzel stellt neben dem Blatt und der Sprossachse eines der drei Grundorgane des Kormus dar und wurde ebenfalls auf phänotypische Veränderungen hin analysiert. Zu diesem Zweck wurden Samen der T-DNA Insertionslinien und des jeweiligen Wildtyps oberflächensterilisiert und auf MS-Festmedium ausgebracht. Um eine Komplementation eines möglichen Phänotyps durch eine zusätzliche Kohlenstoffquelle zu verhindern, wurde dem Medium keine Saccharose zugefügt. Nach einer zweitägigen Vernalisation wurden die Petrischalen dann in senkrechte Orientierung gebracht und die Pflanzen für zwei Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Wurzelwachstum dokumentiert, die Anzahl der Lateralwurzeln bestimmt und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

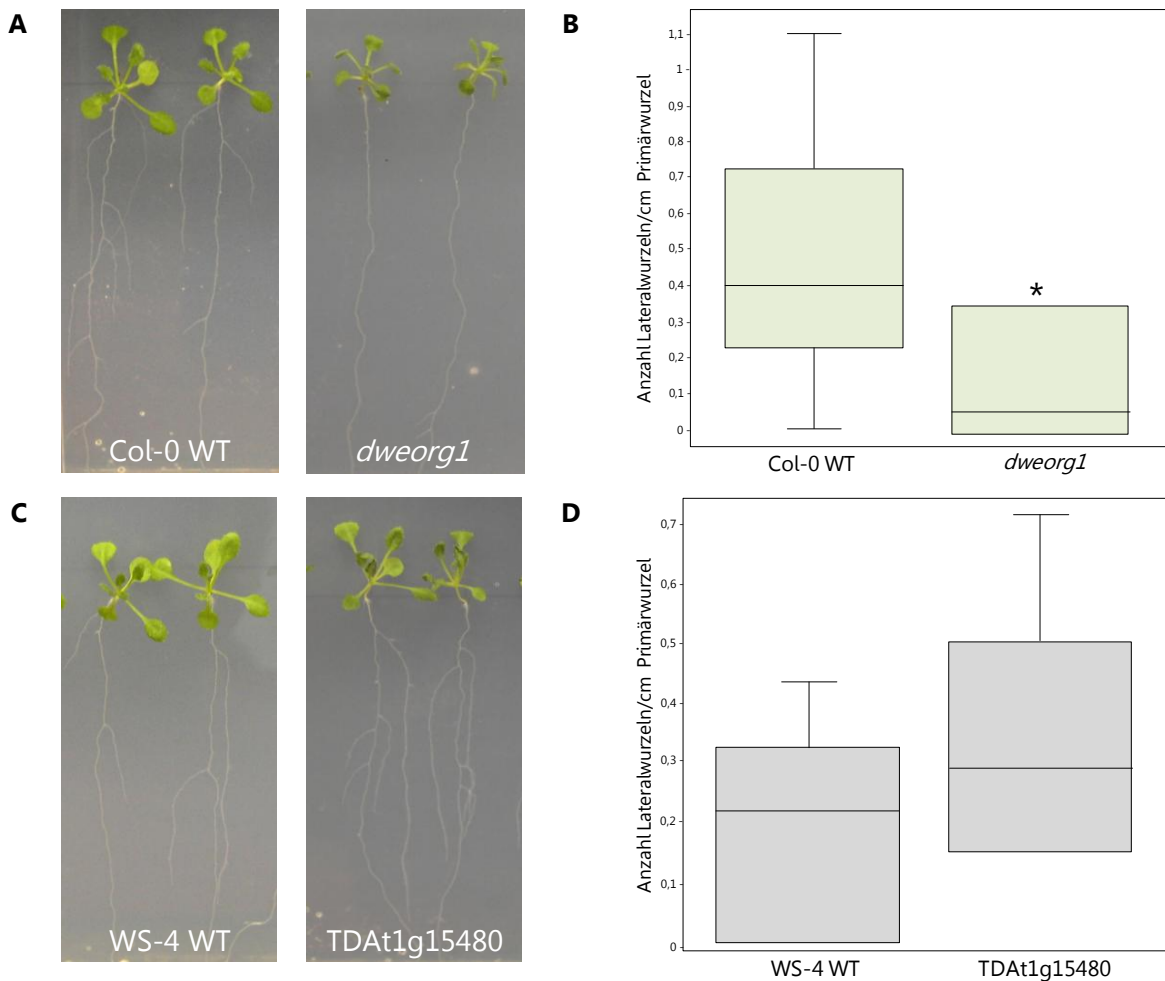


Abbildung 19: Analyse des Wurzelwachstums und Bestimmung der Anzahl der Lateralwurzeln pro cm Primärwurzel der beiden T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp. Die Samen wurden oberflächensterilisiert und auf MS-Festmedium ohne Saccharose ausgebracht. Die Petrischalen wurden in senkrechte Orientierung gebracht und die Pflanzen unter Langtagbedingungen kultiviert. Gezeigt sind exemplarisch zwei Individuen des Col-0 Wildtyps und der *dweorg1* Mutante (A) und die statistische Auswertung von jeweils zehn Pflanzen (B), sowie zwei Individuen des WS-4 Wildtyps und der Linie TDA1g15480 (C) und die statistische Auswertung von jeweils zehn Pflanzen (D). Mit * markierte Daten sind nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Bei der Box Plot-Darstellung verläuft die Box vom oberen (75 %) Quartil zum unteren (25 %). Die Lage des Medians hängt von der Art der Verteilung ab. Die kleinsten bzw. größten Werte sind durch die *Whisker* gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 19 gezeigt, bilden Keimlinge der *dweorg1* Mutante bei gleicher Länge der Primärwurzel (Daten nicht gesondert gezeigt) weniger Lateralwurzeln aus. Während Keimlinge des Wildtyps Col-0 durchschnittlich 0,2 bis 0,7 Lateralwurzeln pro Zentimeter Primärwurzel ausbilden, bilden Keimlinge der *dweorg1* Mutante lediglich 0 bis 0,3 Lateralwurzeln pro Zentimeter aus. In vielen Fällen ist somit ausschließlich die Primärwurzel entwickelt. Des Weiteren ist, wie bereits in Abbildung 17 B und C gezeigt, das deutlich verringerte Wachstum der *dweorg1* Mutante zu sehen. Bei Keimlingen der Linie TDA1g15480 ist die Länge der Primärwurzel ebenfalls vergleichbar zu der Länge der

Keimlinge des Wildtyps WS-4. Die Anzahl der Lateralwurzeln pro Zentimeter Primärwurzel ist vergleichsweise nur geringfügig erhöht, wobei der Unterschied nicht signifikant ist (Abbildung 19 D).

Ähnlich dem Einfluss auf die Keimungsrate zeigen somit Pflanzen der *dweorg1* Mutante einen stärkeren Einfluss auf den Phänotyp verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp. Aus diesem Grund fokussierten sich weiterführende Untersuchungen ausschließlich auf die *dweorg1* Mutante und der Aufklärung der Funktion des Proteins DWEORG1.

3.5 Gibt es weitere T-DNA Insertionen im Genom der *dweorg1* Mutante, die für den Phänotyp verantwortlich sein könnten?

Mit Hilfe der PCR-Genotypisierung der Linien TDA3g15590 und TDA1g5480 (3.3) wurde erfolgreich eine T-DNA Insertion im entsprechenden Gen in beiden Allelen nachgewiesen. Diese Analyse schließt jedoch nicht aus, dass sich noch andere T-DNA Insertionen an anderen Positionen im Genom der untersuchten Pflanzen befinden. Um mögliche phänotypische Veränderungen der Pflanzen eindeutig dem *knockout* eines bestimmten Genprodukts zuweisen zu können, müssen weitere Insertionen und damit verbundene Auswirkungen auf die Genexpression ausgeschlossen werden.

3.5.1 Das Genom der *dweorg1* Mutante weist mehrere T-DNA Insertionen auf

Zur Untersuchung der Anzahl von T-DNA Insertionen im Genom wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde sowohl genomische DNA des Wildtyps Col-0, als auch genomische DNA der *dweorg1* Mutante mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert. Für jedes der drei verwendeten Enzyme existieren innerhalb der T-DNA und im gesamten Genom Erkennungssequenzen. Durch die Hydrolyse entstehen somit DNA-Fragmente, die je nach Vorhandensein von T-DNA zum Teil aus T-DNA-Sequenzen und zum Teil aus Sequenzen genomischer DNA oder gänzlich aus genomischer DNA bestehen (Abbildung 20 A). Da die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen innerhalb der genomischen DNA in unterschiedlicher Entfernung zur T-DNA liegen, ergibt sich für jede unabhängige T-DNA Insertion ein Restriktionsfragment charakteristischer Größe. Mit Hilfe einer spezifischen Sonde, die innerhalb der T-DNA bindet, lassen sich diese Fragmente nachweisen. Somit entspricht die Anzahl der detektierten Banden im Southern Blot der Anzahl der T-DNA Insertionen im Genom. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 20 B gezeigt.

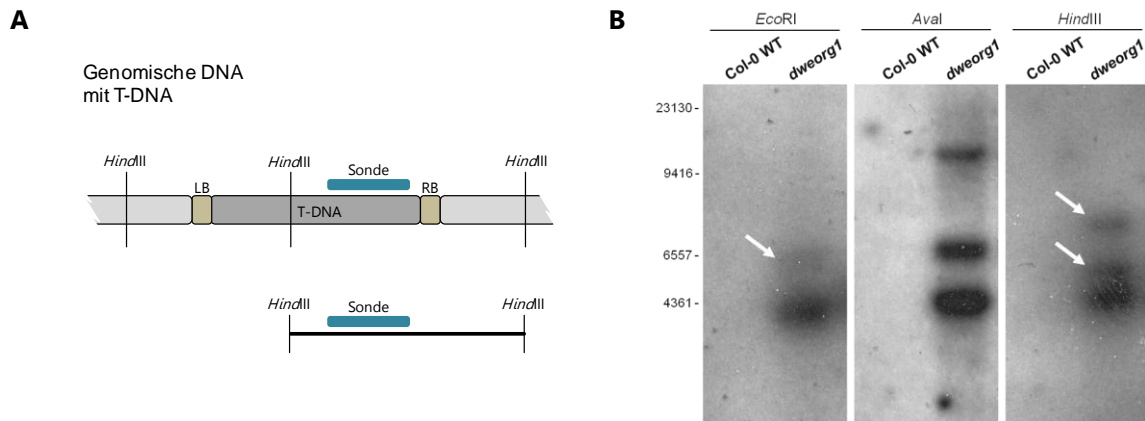


Abbildung 20: Southern Blot Analyse zur Bestimmung der Anzahl der T-DNA Insertionen im Genom der *dweorg1* Mutante. (A) Schematische Darstellung der Funktionsweise der Analyse am Beispiel einer Hydrolyse der DNA mit *HindIII*. Abhängig vom Vorhandensein der T-DNA und der Lage weiterer Restriktionsschnittstellen im Genom entstehen unterschiedliche Restriktionsfragmente. Fragmente mit T-DNA Insertion können mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden. (B) Ergebnisse der Southern Blot Analyse. Zur Absicherung wurde die Hydrolyse der DNA vom Wildtyp Col-0 und der *dweorg1* Mutante jeweils mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer T-DNA-spezifischen Sonde. Schwache Banden sind mit einem Pfeil markiert.

Das Autoradiogramm der Southern Blot Analyse weist auf multiple T-DNA Insertionen im Genom der *dweorg1* Mutante hin, während im Genom des Wildtyps erwartungsgemäß unter Verwendung der T-DNA spezifischen Sonde kein Fragment detektiert wurde. Die exakte Anzahl der T-DNA Insertionen im Genom der *dweorg1* Mutante lässt sich allerdings nach dieser Analyse nicht mit Sicherheit bestimmen, da nach Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* zwei Fragmente, nach der Hydrolyse mit *Aval* und *HindIII* jedoch drei Fragmente detektiert wurden. Läge nur die vorhergesagte T-DNA ausschließlich im *dweorg1* Gen vor, so läge die erwartete Größe des nachgewiesenen DNA-Fragments nach *EcoRI* Hydrolyse bei 7907 bp, für *Aval* bei 4395 bp und für die Hydrolyse mit *HindIII* bei 5038 bp. Banden mit übereinstimmender Größe zeigt auch das Autoradiogramm. Die Detektion weiterer DNA-Fragmente weist allerdings auf wenigstens eine weitere T-DNA Insertion im Genom der *dweorg1* Mutante hin. Generell scheint es insbesondere bei der durch Agrobakterien vermittelten Transformation zu multiplen Insertionen im Genom zu kommen, wobei sowohl vollständige als auch unvollständige T-DNA Sequenzen integriert werden (Jorgensen *et al.* 1987; De Neve *et al.* 1997). Auch nach Angaben des *Salk Institute Genomic Analysis Laboratories* (SIGNAL; <http://signal.salk.edu/>) tragen etwa nur die Hälfte der T-DNA Insertionslinien lediglich eine Insertion, während bei der anderen Hälfte zwei oder mehreren Insertionen im Genom vorliegen. Um weiterhin die phänotypischen Veränderungen der *dweorg1* Mutante eindeutig dem Fehlen des entsprechenden Gens zuweisen zu können, wurden daher weitere Analysen durchgeführt. Hierbei wurde zunächst mittels TAIL-PCR die Lokalisation der T-DNA Insertionen nachgewiesen.

3.5.2 Lokalisation aller T-DNA Insertionen im Genom der *dweorg1* Mutante

Da für die *dweorg1* Mutante gezeigt wurde, dass im Genom mehrere T-DNA Integrationen vorlagen, wurden die Loci aller Insertionen mit Hilfe der TAIL-PCR (Liu und Whittier 1995) bestimmt. Eine Übersicht über verwendeten Oligonukleotide und die Funktionsweise der Methode ist in Abbildung 21 A gezeigt, die Ergebnisse in der Abbildung 21 B.

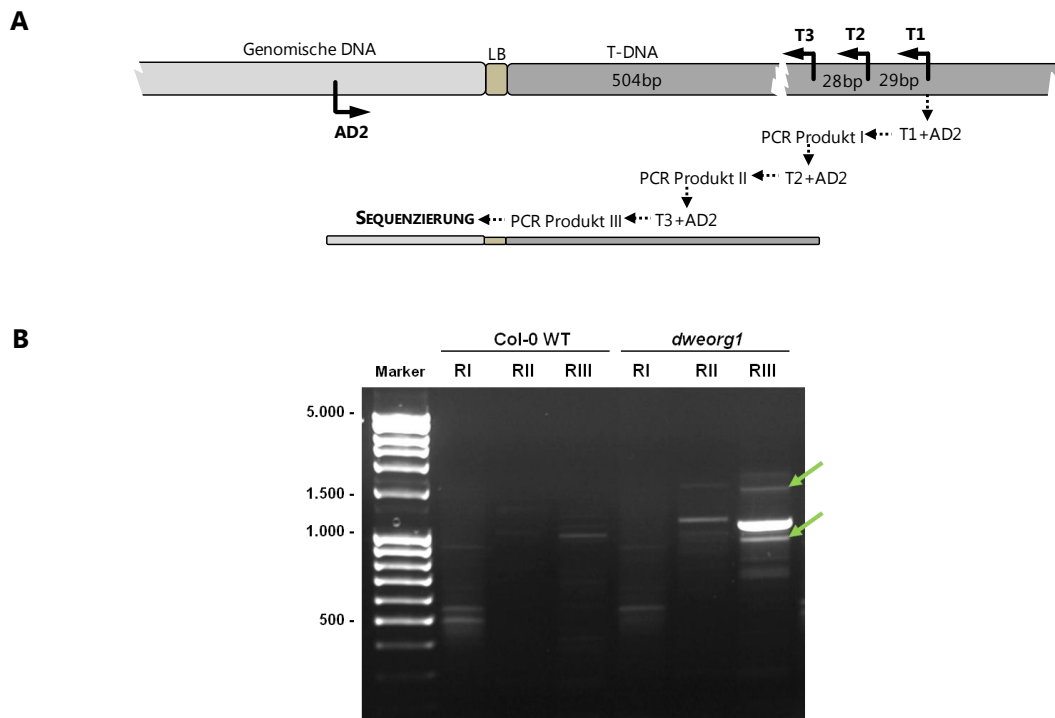


Abbildung 21: Untersuchung der T-DNA flankierenden Sequenzen im Genom der *dweorg1* Mutante mittels TAIL-PCR. (A) Schematische Darstellung der Funktionsweise der TAIL-PCR und der verwendeten Oligonukleotide. In drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen (I, II, III) werden erst die im Bereich der T-DNA bindenden Oligonukleotide T1, dann T2 und schließlich das Oligonukleotid T3 mit dem degenerierten Oligonukleotid AD2 kombiniert. In der Reaktion I dient genomische DNA als Matrize. In den folgenden Reaktionen RII und RIII eine Verdünnung der jeweils zuvor durchgeführten PCR. Alle PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Produkte der Reaktion III werden sequenziert. (B) Gelelektrophoretische Analyse der drei TAIL-PCR-Reaktionen (RI, RII, RIII) für den Wildtyp Col-0 und die *dweorg1* Mutante. Zwei Banden der Größen von etwa 1.000 bp und 1.500 bp in der Reaktion drei (RIII) unter Verwendung der DNA der *dweorg1* Mutante wurden jeweils mit einem Pfeil markiert.

Wie in Abbildung 21 B gezeigt, wurden unter Verwendung von genomischer DNA der *dweorg1* Mutante in der dritten Reaktion RIII mehrere PCR-Produkte amplifiziert, wobei drei Banden mit einer Größe von etwa 1.000 bp, 1.200 bp und 1.500 bp stärker amplifiziert wurden. Da die Menge dieser Amplifikate von der zweiten TAIL-PCR Reaktion RII zur dritten Reaktion RIII bei diesen drei Fragmenten zugenommen hat, war davon auszugehen, dass es sich bei allen drei Amplifikaten der Reaktion II und III um DNA-Fragmente handelt, die einen

Bereich einer T-DNA-Insertion, sowie deren flankierenden Bereich enthalten. Die Spezifität der Produkte wird zudem dadurch bestätigt, dass die Größe der elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente sich von der Reaktion II zur Reaktion III geringfügig verringert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Bindestellen der Oligonukleotide T2 und T3 knapp 30 bp auseinanderliegen (siehe Abbildung 21 A). Parallel zur Untersuchung der *dweorg1* Mutante mittels TAIL-PCR wurde diese Analyse unter Verwendung der gleichen Oligonukleotide auch für den Wildtyp Col-0 durchgeführt. Hier kam es zu keiner spezifischen Amplifikation in keiner der drei Reaktionen, was darauf zurückzuführen ist, dass die DNA des Wildtyps nachweislich keine T-DNA Insertion aufweist und somit auch über keine Sequenz zur Bindung der T-DNA spezifischen Oligonukleotide T1, T2 und T3 verfügt. Das Auftreten von Banden schwacher Signalstärke lässt sich durch multiple Bindungen des degenerierten Oligonukleotids AD2 erklären, wodurch kleine Mengen von unspezifischen Produkten amplifiziert werden. Die drei spezifischen Banden aus der Reaktion III der *dweorg1* Analyse wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt und ausgehend vom Oligonukleotid T3 sequenziert. Für die genaue Analyse der Integrationsorte in der genomischen DNA der *dweorg1* Mutante mit Hilfe der Sequenzierungsergebnisse wurden dann BLAST-Analysen, sowie DNA Alignments durchgeführt, deren Ergebnisse hier nicht gesondert dargestellt sind. Eine zusammenfassende, grafische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse ist in der folgenden Abbildung 22 gezeigt.

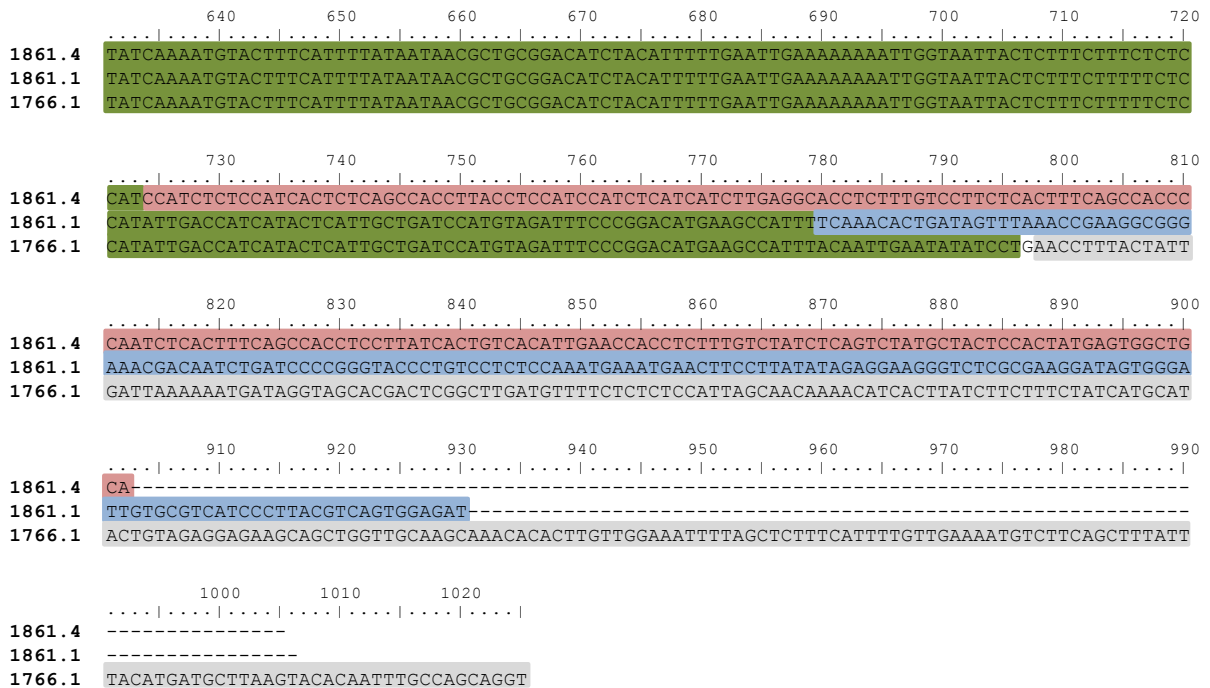


Abbildung 22: Schematische Darstellung eines Ausschnittes der Sequenzierungsergebnisse der drei spezifischen Produkte der TAIL-PCR zur Identifikation der T-DNA Integrationsorte in der *dweorg1* Mutante. Die Nummerierung 1861.4, 1861.1 und 1766.1 stellt eine interne Bezeichnung der drei Sequenzierungsproben dar. Grün hinterlegt ist die Sequenz, die der T-DNA entspricht. Die rote Sequenz kennzeichnet den Abschnitt, der mit dem Gen *at3g15600* übereinstimmt, die blau hinterlegte Sequenz stimmt mit einem Sequenzbereich des Ti-Plasmids pAC161 überein. Der grau markierte Abschnitt stimmt mit der Sequenz des *dweorg1* Gens überein.

Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse der Banden aus der TAIL-PCR bestätigte in einem Fall, in der Abbildung 22 mit 1766.1 bezeichnet, eindeutig die T-DNA Insertion im *dweorg1* Gen. Die hier experimentell ermittelte Integration der T-DNA in die DNA zwischen dem Nukleotid 5276433 und 5276434 auf dem Chromosom 3 und somit zwischen dem Nukleotid +367 und +368 (Adenin des Startcodons = 1) des Gens bestätigt den vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (<http://www.arabidopsis.org>) angegebenen Insertionsort. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Integrationsort mit Guanin (in der Abbildung 22 an der Position 797) ein zusätzliches Nukleotid aufweist, welches weder der T-DNA, noch der Gensequenz des *dweorg1* Gens zuzuordnen ist. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um sogenannte „filler“ DNA, die während der Integration der T-DNA durch zufällige Addition von einem oder mehreren Nukleotiden oder aber möglicherweise durch komplexe Reparaturmechanismen entsteht (Gheysen *et al.* 1991). Eine derartige Insertion, wie sie auch in diesem Falle zu beobachten war, wird daher auch als unpräzise bezeichnet (Matsumoto *et al.* 1990; Gheysen *et al.* 1991; Mayerhofer *et al.* 1991). Die Sequenzierung

eines weiteren Amplifikats aus der TAIL-PCR, in der Abbildung 22 mit 1861.4 bezeichnet, weist auf eine zusätzliche Integration in dem Gen *at3g15600* hin. Dieses Gen befindet sich auf dem Chromosom 3 in entgegengesetzter Orientierung mit 1773 bp (gerechnet als Abstand zwischen beiden Startcodons) Abstand in direkter Nähe des *dweorg1* Gens. Der genaue Insertionsort der T-DNA konnte ermittelt werden und liegt zwischen dem Nukleotid 5281076 und 5281077 im dritten Exon des Gens *at3g15600*. Hierbei handelt es sich außerdem im Gegensatz zur Insertion im *dweorg1* Gen um eine präzise Insertion. Es wurde allerdings gezeigt, dass die T-DNA unvollständig in das Genom integriert wurde. Im Vergleich zu der Sequenz 1766.1 die das Ergebnis für die Insertion im *dweorg1* Gen repräsentiert, ist der Abschnitt der T-DNA Sequenz, die in das Gen *at3g15600* inseriert ist um 72 bp verkürzt. Ebenfalls um 17 bp verkürzt liegt eine weitere T-DNA im Genom vor. Die Analyse des Sequenzierungsergebnisses weist hier auf eine Sequenz des Ti-Plasmids pAC161 selbst hin, welche sich unmittelbar an die T-DNA flankierende Sequenz anschließt. Hierbei handelt es mit großer Wahrscheinlichkeit um eine unvollständige T-DNA Kopie, die an eine vollständige T-DNA Insertion angrenzt. Derartiges Auftreten von Teilbereichen des Ti-Plasmids angrenzend an den T-DNA Borderbereich wurde bereits mehrfach beschrieben (Herman *et al.* 1990; Gheysen *et al.* 1991; Mayerhofer *et al.* 1991).

Zusammenfassend konnten mittels TAIL-PCR T-DNA Insertionen und deren genaue Position für die beiden Gene *dweorg1* und *at3g15600* bestimmt werden. Um einen möglichen Einfluss der T-DNA Insertion im Gen *at3g15600* auf die Untersuchungen der *dweorg1* Mutante zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf die Transkription dieses Gens untersucht.

3.5.2.1 Eine weitere T-DNA Insertion im Pseudogen *at3g15600* ist ohne Auswirkung

Das bisher nicht charakterisierte Gen *at3g15600* ist in der Datenbank des NCBI als Pseudogen annotiert. Bei Pseudogenen handelt es sich um nicht oder nicht mehr funktionelle Kopien von bereits bestehenden Genen (Lynch und Conery 2000; Prince und Pickett 2002). Das Pseudogen *at3g15600* ist 1986 bp lang und befindet sich *upstream* in unmittelbarer Nähe des *dweorg1* Gens auf dem Chromosom 3 in *forward*-Orientierung. Aufgrund des Aufbaus mit einer Exon-/Intron-Struktur ist davon auszugehen, dass es sich um ein nicht-prozessiertes Pseudogen handelt, welches im Gegensatz zu prozessierten Pseudogenen nicht durch Retrotransposition, sondern durch DNA-Duplikation entstanden ist (Vanin 1985; Ohshima *et al.* 2003). Per Definition sind Pseudogene nicht funktionell und werden demnach nicht transkribiert. Ist dies auch für das Gen *at3g15600* der Fall, so wäre die zusätzliche T-DNA Insertion in Genom der *dweorg1* Mutante ohne Auswirkung. Da allerdings etwa 20 %

der als Pseudogene annotierten Gene in *A. thaliana* expremiert werden (Yamada *et al.* 2003), wurde die Transkription des Gens mittels RT-PCR überprüft. Hierfür wurden Oligonukleotide eingesetzt, die theoretisch eine Amplifikation eines 189 bp langen Fragments ermöglichen, sofern das Transkript vorhanden ist. Da außerdem komplementäre *sense* und *antisense* Expression von RNA von als Pseudogenen annotierten Gene in vielen Fällen, und auch für *A. thaliana* beobachtet wurde (Yamada *et al.* 2003), wurden außerdem zwei Oligonukleotidpaare in unabhängigen Reaktionen verwendet, die in der Lage sind, sowohl an mit der *sense*, als auch mit der *antisense* RNA des Gens zu hybridisieren. Das Ergebnis der RT-PCR nach erfolgter Gelelektrophorese ist in der Abbildung 23 gezeigt.

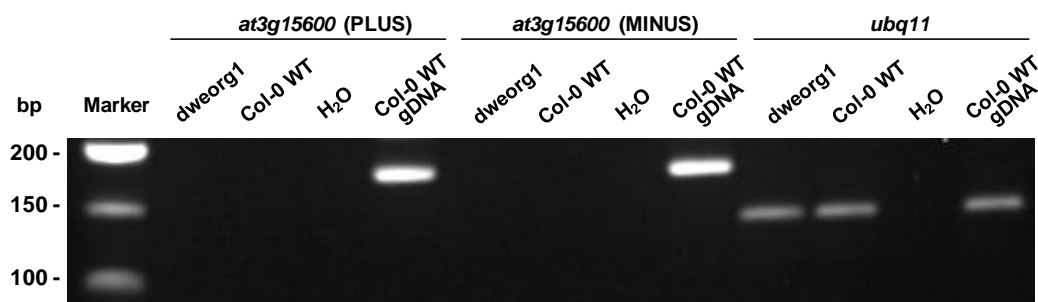


Abbildung 23: Analyse der Transkription des als Pseudogens annotierten Gens *at3g15600* in Wildtyppflanzen und *dweorg1*-Mutante mittels RT-PCR. In der RT-PCR wurden Oligonukleotide eingesetzt, die in der Lage sind, ein 189 bp großes Fragment (*at3g15600* PLUS bzw. *at3g15600* MINUS) zu amplifizieren. Der Nachweis der Integrität der RNA wurde durch erfolgreiche Amplifikation eines Abschnitts des *ubq11* Gens erbracht. Als Negativkontrolle wurde H₂O als Matrice in die RT-PCR eingesetzt, als Positivkontrolle wurde als Matrice genomische DNA des Wildtyps Col-0 verwendet.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, wurde unter Verwendung der Oligonukleotide für das Gen *at3g15600* weder *sense*, noch *antisense* Transkript in keiner der Reaktionen nachgewiesen. Als Matrice wurde jeweils RNA der *dweorg1* Mutante und des Wildtyps Col-0 verwendet. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Wildtyps in die RT-PCR eingesetzt. Da in diesen Reaktionen für die erfolgreiche Amplifikation kein Transkript notwendig ist, wurde somit die Funktionalität der Oligonukleotide nachgewiesen. Durch die erfolgreiche Amplifikation eines 145 bp langen Fragments des *housekeeping* Gens *ubq11* wurde außerdem die Integrität der RNA belegt. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass das als Pseudogen annotierte Gen *at3g15600* in der Pflanze tatsächlich nicht transkribiert wird und somit die zusätzliche T-DNA Insertion in diesem Gen keine Auswirkungen hat.

3.5.2.2 Das Einbringen des *dweorg1* Wildtypgens in die *dweorg1* Mutante führt zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps

Um eindeutig zu bestätigen, dass der Phänotyp der *dweorg1* Mutante auf die T-DNA Insertion im *dweorg1* Gen zurückzuführen ist, wurde analysiert, ob sich durch das Einbringen der kodierenden Sequenz in die *dweorg1* T-DNA Insertionslinie der Mutantenphänotyp komplementieren lässt. Hierfür wurde mit Hilfe der GATEWAY™ Technologie ein Komplementationsvektor auf der Basis des Pflanzentransformationsvektors pB2GW7 erstellt, der das *dweorg1* Gen unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaik-Virus' (CaMV), sowie weitere für die Funktionalität essentielle Bereiche enthält (Abbildung 24 A). Dieser wurde durch Agrobakterien vermittelte Transformation in die *dweorg1* Mutanten eingebracht und Pflanzen der Nachfolgenergeneration über die vom Vektor pAB714 vermittelte Bialaphos-Resistenz auf Erde selektiert. Keimlinge, die nach mehrmaligem Besprühen mit dem bialaphoshaltigem Herbizid BASTA™ noch lebensfähig waren, wurden auf frische Erde umgesetzt und mittels PCR und RT-PCR auf erfolgreiche Transformation getestet. Die Ergebnisse dieser Analysen für zwei putative Transformanden T1 und T2 sind in der Abbildung 24 B und C gezeigt.

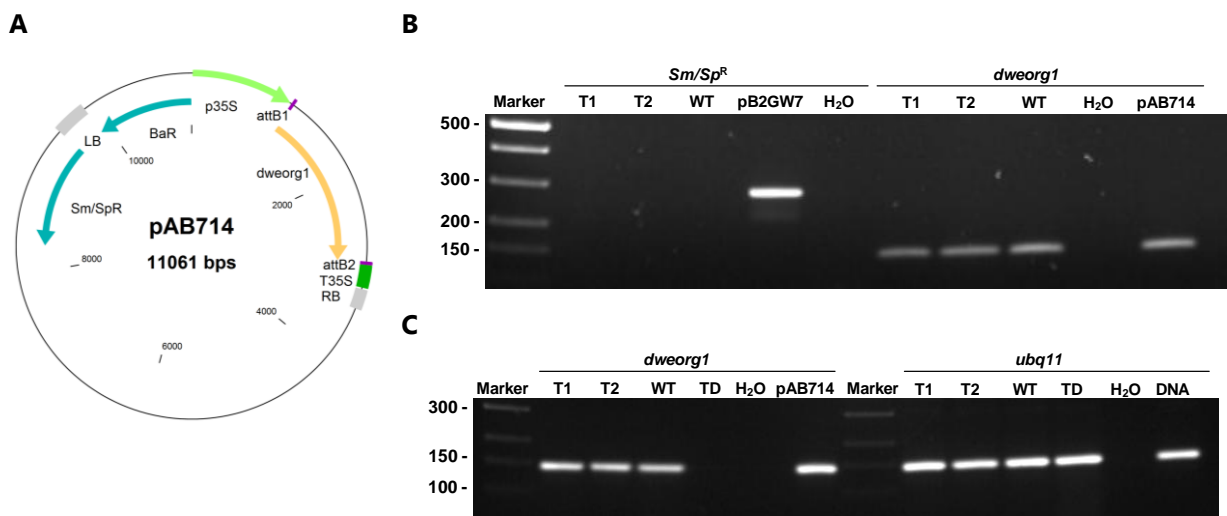


Abbildung 24: Nachweis der erfolgreichen Herstellung von *dweorg1* Komplementationstransformanden mit eingebrachtem *dweorg1* Wildtypgen. (A) Für die Komplementation erstellter Komplementationsvektor pAB714. Farblich hervorgehobene Abschnitte repräsentieren die Resistenzgene (blau) *Sm/SpR* (Streptomycin-Spektinomycin) und *BaR* (Bialaphos), Promotor- und Terminatorbereiche (hell- bzw. dunkelgrün), GATEWAY™ attachment sites (*attB1/2*, violett), left und right border Regionen LB und RB (grau), sowie das eingebrachte *dweorg1* Wildtypgen (orange). (B) Nachweis der erfolgreichen Transformation des Vektors pAB714 in die *dweorg1* Mutanten. Nachgewiesen wurde das *dweorg1* Gen, sowie das *Sm/Sp* Resistenzgen, welches außerhalb der T-DNA lokalisiert ist. Getestet wurden zwei Transformanden T1 und T2 nach erfolgter BASTA™ Selektion, sowie der Wildtyp Col-0. Als Positivkontrolle dienten für den *Sm/SpR*-Nachweis der Ausgangsvektor pB2GW7 bzw. das Plasmid pAB714 für den Nachweis des *dweorg1* Gens. (C) Nachweis der Transkription des eingebrachten *dweorg1* Gens in den Transformanden T1 und T2 mittels RT-PCR. Zum Vergleich wurde auch die *dweorg1* Mutante (TD) getestet, sowie der Wildtyp Col-0. Die Integrität der RNA wurde durch die erfolgreiche Amplifikation eines 145 bp langen Fragments des housekeeping-Gens *ubq11* bestätigt.

Zur Bestätigung der erfolgreichen Transformation wurden zwei PCR Analysen durchgeführt, bei denen sowohl das *dweorg1* Gen als auch das *Sm/Sp* Resistenzgen nachgewiesen wurde. Das 145 bp große Amplifikat des *dweorg1* Gens wurde so in beiden untersuchten putativen Transformanden T1 und T2, sowie im Wildtyp Col-0 nachgewiesen. Da das *dweorg1* Gen in der ursprünglichen T-DNA Insertionslinie nicht nachweisbar war (3.3, Abbildung 14), ist davon auszugehen, dass die Transformation des Gens in diese Pflanzen erfolgreich war und das *dweorg1* Gen, welches sich innerhalb der T-DNA, die bei der Transformation in das Genom der *dweorg1* Mutante integriert wird, als Expressionskassette eingebracht wurde. Um auszuschließen, dass die Amplifikation des *dweorg1* Fragments auf agrobakterielle Kontamination mit Plasmid-DNA zurückzuführen ist, wurden in einer weiteren PCR Analyse Oligonukleotide eingesetzt, die in der Lage sind, ein 278 bp langes Fragment des *Sm/Sp* Resistenzgens zu amplifizieren. Da dieses Gen in dem Komplementationsvektor außerhalb der T-DNA lokalisiert ist und somit nach erfolgter Transformation nicht in das Genom integriert wird, handelt es sich nur dann um gesicherte Transformanden, wenn es in dieser Reaktion zu keiner Amplifikation kommt. Wie in der Abbildung 24 B gezeigt, wurde dieses Fragment auch in beiden getesteten Transformanden T1 und T2 nicht amplifiziert. Auch im Wildtyp Col-0 wurde erwartungsgemäß kein Amplifikat detektiert, da dieses Gen natürlicherweise nicht im Genom vorhanden ist. In der Positivkontrolle, unter Verwendung des Basistransformationsvektors pB2GW7 als Matrize, wurde erfolgreich das entsprechende Genfragment amplifiziert. Somit wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Transformanden T1 und T2 um Pflanzen handelt, die erfolgreich mit dem die *dweorg1* Expressionskassette tragenden Vektor pAB714 transformiert wurden. Um die Transkription des Gens zu bestätigen, wurde in einer RT-PCR ein 145 bp langes Fragment des *dweorg1* Transkripts nachgewiesen (Abbildung 24 C). Auch diese Analyse bestätigte die erfolgreiche Transformation und die Transkriptionsfähigkeit des *dweorg1* Wildtypgens in den Transformanden T1 und T2. Auch im Wildtyp Col-0 wird das Gen erwartungsgemäß transkribiert, während in der *dweorg1* T-DNA Insertionslinie kein Transkript detektierbar war. Die Integrität der RNA wurde in allen Fällen durch die erfolgreiche Amplifikation eines 145 bp langen Fragments des *housekeeping*-Gens *ubq11* bestätigt.

Für die Phänotypanalyse der Komplementationsmutante wurden Samen der positiv getesteten Transformande T1 ausgesät und die Pflanzen nach drei Wochen hinsichtlich ihres Wachstums analysiert. Parallel dazu wurden Samen des Wildtyps Col-0 und der *dweorg1* Mutante ausgesät und die Pflanzen unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Abbildung 25 zeigt beispielhaft je eine Pflanze der unterschiedlichen Genotypen im Vergleich.



Abbildung 25: Phänotyp drei Wochen alter Pflanzen des Wildtyps Col-0, der *dweorg1* Komplementationsmutante (*dweorg1* + DWEORG1) und der *dweorg1* Mutante. Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Wie in der Abbildung 25 zu sehen, wurde durch das Einbringen des *dweorg1* Wildtypgens in die *dweorg1* Mutante der Phänotyp des Wildtyps vollständig wiederhergestellt. Während die Pflanzen der *dweorg1* Mutante, wie bereits gezeigt (Abbildung 17 B und C), ein deutlich verringertes Wachstum zeigten, entwickelten sich die Komplementationsmutanten im gleichen Maße wie der Wildtyp und zeigten nach drei Wochen Anzucht eine gleichartige Morphologie. Dies bestätigt zum Einen die Funktionalität des eingebrachten *dweorg1* Gens und zum Anderen, dass der Phänotyp der *dweorg1* Mutante bedingt ist durch die T-DNA im entsprechenden Gen und das Fehlen des Proteins DWEORG1.

3.6 Mitochondriale Transkripte werden in *dweorg1* Mutanten vollständig ediert

Das PPR-Protein DWEORG1 wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit mit einer auf der Interaktion Streptavidin-beschichteter Magnetpartikel mit Biotin-markierter RNA bzw. RNA-Protein-Komplexen basierenden Methode isoliert und identifiziert (Bolle 2008). Als Köder-RNA wurde in diesen Untersuchungen ein 40 Nukleotid langes *cox2* Fragment verwendet, welches die Edierungsstelle +476 sowie 31 Nukleotide *downstream* und acht Nukleotide *upstream* dieser Edierungsstelle enthält. Die Bindung von DWEORG1 an die *cox2* Sequenz legt daher nahe, dass dieses PPR-Protein in den Prozess der RNA-Edierung involviert ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierfür wurde RNA der *dweorg1* Mutante und des Wildtyps Col-0 isoliert, diese einer DNaseI Behandlung unterzogen und der Erfolge der vollständigen Hydrolyse der DNA durch eine PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die DNA-freie RNA wurde dann mit Oligonukleotiden, die das gesamte *cox2* Transkript amplifizieren in die RT-PCR eingesetzt, die korrekte Amplifizierung gelelektrophoretisch kontrolliert, das Amplifikat sequenziert und die Sequenz hinsichtlich der korrekten Edierung analysiert.

Exemplarisch ist in Abbildung 26 das Ergebnis für die Edierungspositionen +476 dargestellt. Die Edierung an dieser Position führt dazu, dass im Wildtyp Col-0 anstelle des Cytosins in der Sequenz der genomischen DNA nun Thymin an dieser Stelle der cDNA vorliegt. Bei einer beeinträchtigten Edierungsmaschinerie in den *dweorg1* Mutanten wäre zu erwarten gewesen, dass eine Edierung an dieser Position nicht oder nur unvollständig ablaufen kann, was im Elektropherogramm zu einem veränderter *Peak* an der entsprechenden Position führen würde. Die Edierung an der Position +476 des *cox2* Transkripts ist allerdings nicht beeinflusst. Da eine Vielzahl von PPR-Proteinen, die an der Edierung beteiligt sind, mehrere Transkripte erkennen (Hammani *et al.* 2009; Okuda *et al.* 2009; Hammani *et al.* 2011a; Okuda und Shikanai 2012), ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch das Proteine DWEORG1 dazu in der Lage ist und in deren Edierung involviert ist. Daher wurden neben dem *cox2*-Transkript insgesamt 18 weitere Transkripte mit bekannten Edierungspositionen und mitochondrialer Codierung mittels RT-PCR Analyse analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammengefasst. Für keine der 191 ebenfalls untersuchten Edierungspositionen konnte eine Beeinträchtigung der Edierung festgestellt werden.

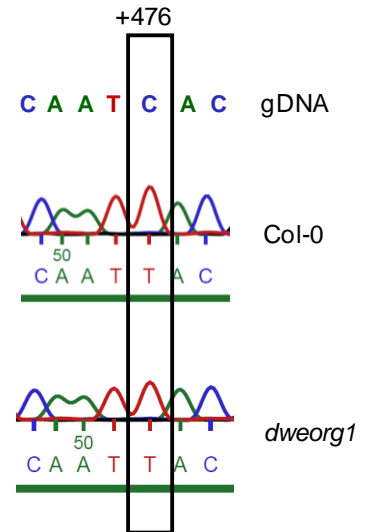


Abbildung 26: Elektropherogramme der Sequenzanalyse der Edierung der Position +476 des *cox2* Transkripts von Wildtyp Col-0 und *dweorg1* Mutante.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Sequenzanalysen der Transkripte von 19 mitochondrial codierten Genen hinsichtlich der Edierung in *dweorg1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0.

Gen	Größe des Amplifikats (bp)	Anzahl Edierungen		Edierungsstatus in <i>dweorg1</i> Pflanzen		Summe
		im Amplifikat	im Gen	ediert	nicht ediert	
<i>atp1</i>	436	4	5	4	0	4
<i>atp4</i>	681	8	8	9	0	9
<i>atp9</i>	272	3	4	3	0	3
<i>ccb203</i>	493	12	12	10	0	10
<i>ccb206</i>	601	36	39	0	0	0
<i>ccb256</i>	591	25	28	0	0	0
<i>ccb382</i>	480	11	22	5	0	5
	578	9		5	0	5
<i>ccb452</i>	832	10	16	0	0	0
	651	6		1	0	1
<i>cob</i>	800	6	7	6	0	6
<i>cox2</i>	780	12	15	12	0	12
<i>cox3</i>	463	7	8	6	0	6
<i>matR</i>	412	4	9	1	0	1
	348	5		6	0	6
<i>nad1</i>	384	5	24	4	0	4
	581	17		16	0	16
<i>nad2</i>	745	17	32	12	0	12
	714	14		11	0	11
<i>nad3</i>	360	8	12	7	0	7
<i>nad4</i>	441	6	32	6	0	6
	475	15		14	0	14
	419	6		7	0	7
<i>nad5</i>	666	16	27	17	0	17
<i>orfx</i>	764	23	24	27	0	27
<i>rpl5</i>	490	5	10	3	0	3

Das mitochondriale Genom von *Arabidopsis* codiert für insgesamt 58 identifizierte Gene (Marienfeld *et al.* 1999). Ihre Transkripte weisen 441 Edierungspositionen auf, weitere 15 Edierungspositionen liegen in nicht codierenden Bereichen (Giegé und Brennicke 1999). Mittels RT-PCR Analysen wurde somit nur ein kleiner Teil der Edierungspositionen erfasst. Um möglichst alle Positionen der *dweorg1* RNA auf ihren Edierungsstatus hin zu untersuchen, wurden von M. Takenaka an der Universität Ulm SNaPshot-Analysen durchgeführt (Takenaka und Brennicke 2007; Takenaka 2011). Diese, auch „multiplex single base extension typing“ genannte Methode beruht auf der Methode zur Identifizierung von SNPs (*single nucleotide polymorphism*) und erlaubt die gleichzeitige Analyse einer Vielzahl von RNA Edierungsstellen im Genom. Hierbei wird cDNA in einer SNaPshot-Reaktion zusammen mit Oligonukleotiden gestaffelter Länge eingesetzt, die für jede Edierungsstelle spezifisch sind. Durch den Einbau von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTP's, der abhängig von dem Edierungsstatus der RNA in der SNaPshot-Reaktion erfolgt, kann mit Hilfe der Messung der relativen Fluoreszenz auf das Nukleotid in der Sequenz und somit auf eine korrekte oder fehlerhafte Edierung geschlossen werden. Diese Analyse wurde für die *dweorg1* Mutante und den Wildtyp Col-0 durchgeführt. Die Abbildung 27 zeigt beispielhaft für 20 Edierungspositionen die Elektropherogramme für den Wildtyp Col-0 und die *dweorg1* Mutante.

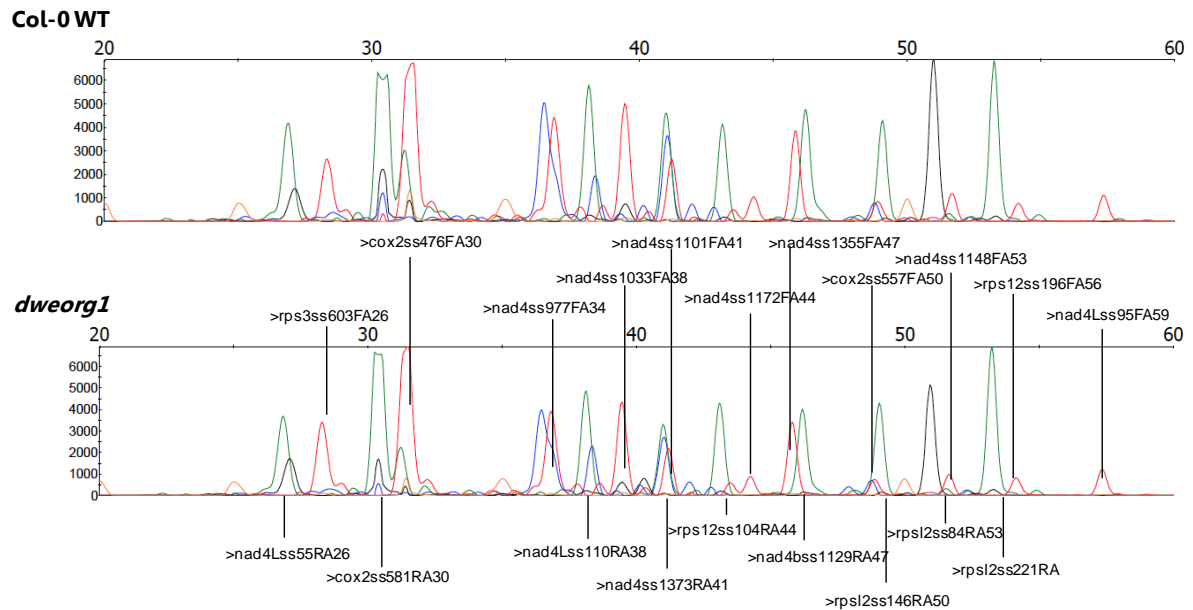


Abbildung 27: Ausschnitt eines Elektropherogramms der SNaPshot-Analyse für 20 Edierungspositionen in den Transkripten der Gene *rps3*, *nad4*, *rps3* und *cox2* in Wildtyppflanzen und der *dweorg1* Mutante. Die Edierungspositionen und die Gene sind an den entsprechenden *Peaks* angegeben. Die Farbe des *Peaks* entspricht dem an dieser Position befindlichen Nukleotids (schwarz=C, blau=G, rot=T, grün=A).

Analog zur Edierungsanalyse mittels RT-PCR lässt sich der Edierungsstatus eines Nukleotids auch bei der SNaPshot-Analyse durch den Vergleich der *Peaks* in den Elektropherogrammen bestimmen. Bei einer unvollständigen oder nicht erfolgten Edierung in einem Transkript der *dweorg1* Mutante wäre ein zusätzlicher oder aber ein alleiniger *Peak* entsprechend des nicht edierten Nukleotids zu erwarten. Die Abbildung 27 zeigt insgesamt 20 Edierungspositionen der Transkripte der mitochondrialen Gene *rps3*, *nad4*, *rps3* und *cox2* im Wildtyp und der *dweorg1* Mutante. Beide Elektropherogramme stimmen überein, somit werden die Transkripte der *dweorg1* Mutante korrekt ediert.

Insgesamt wurden durch die SNaPshot-Analysen 408 Edierungspositionen in 36 Genen erfasst (Daten nicht gezeigt). Auch hier konnte kein Effekt auf die Edierung in *dweorg1* Mutanten festgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass das Protein DWEORG1 nicht in den Prozess der RNA-Edierung involviert ist.

3.7 Die Transkription des *cox2* Gens ist in *dweorg1* Mutanten nicht beeinflusst

Aufgrund der Bindung des DWEORG1-Proteins an die *cox2*-RNA könnte das Protein eine Rolle bei dem Prozess der Transkription spielen. Eine derartige Funktion in der RNA-Stabilisierung und der Aktivierung der Translation wurde bereits für diverse PPR-Proteine beschrieben (Stern *et al.* 2010). Um zu untersuchen, ob das Proteine DWEORG1 ebenfalls in diese Vorgänge involviert ist, wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 28 gezeigt.

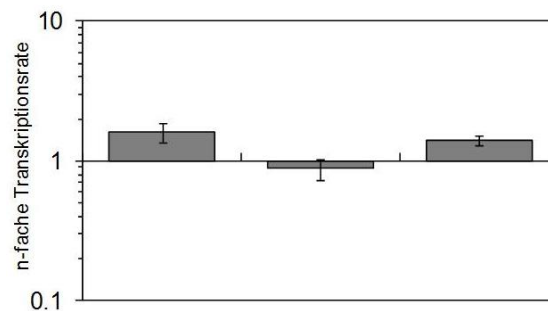


Abbildung 28: Transkription des *cox2* Gens im Wildtyp Col-0 und *dweorg1* Mutanten. Auswertung der Ergebnisse von drei unabhängigen qRT-PCR Analysen zur Untersuchung der *cox2*-Transkriptmenge in drei *dweorg1*-Proben. Die Transkription von *cox2* im Wildtyp Col-0 wurde gleich eins gesetzt und die Werte für die *dweorg1*-Proben auf diesen Wert normiert. Mögliche Variationen der Ausgangsmenge an Matrize wurden über einen Abgleich mit den Werten für die Transkription der *housekeeping* Gene *ubq11* und *gapdh* ausgeglichen.

Die Analysen der *cox2* Transkripte zeigt, dass die Transkription des *cox2* Gens in *dweorg1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 unverändert ist. Eine quantitative Analyse der Transkription wurde mittels qRT-PCR erbracht. In Relation zum Wildtyp ist die Transkription des *cox2* Gens um weniger als das 0,1 fache in *dweorg1* Mutanten verändert und damit weder positiv noch negativ beeinflusst. Ein Einfluss des DWEORG1 Proteins auf Stabilisierung des Transkripts und Aktivierung der Transkription scheint daher nicht zu bestehen.

3.8 Einfluss auf das mitochondriale Proteom der *dweorg1* Mutante

Neben diversen Vorgängen der RNA-Prozessierung, ist auch die Translation von Genen ein Vorgang, in denen eine Vielzahl von PPR-Proteinen involviert ist (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Um den Einfluss von DWEORG1 auf das mitochondriale Proteom zu untersuchen, wurde die Expression dieser Gene mittels Western Blot Analysen und Blue-Native-PAGE untersucht.

3.8.1 Das Protein DWEORG1 ist involviert in die Translation von *cox2*

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Antikörpern beschränkten sich die Western Blot Analysen auf die Cytochrom-C-Oxidase (zweite Untereinheit, COX2), die Adenosintriphosphatsynthase (dritte und neunte Untereinheit, ATPB und ATP9) und die NADH-Dehydrogenase (neunte Untereinheit, NAD9). Alle drei Proteine sind in den Mitochondrien unmittelbar an der Elektronentransportphosphorylierung und der Substratphosphorylierung in der Atmungskette beteiligt. Für die Western Blot Analysen wurden entweder Membranproteine aus dem Wildtyp und der *dweorg1* Mutante verwendet oder aber Proteine aus Mitochondrien, isoliert aus hydroponisch gewachsenen Wurzelkulturen der entsprechenden Pflanzen. Die zweitgenannte Methode war notwendig, da bei Verwendung der Gesamtmembranproteine das Detektionslevel für den ATP9 und NAD9 Antikörper möglicherweise unterschritten wurde. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen sind in Abbildung 29 gezeigt.

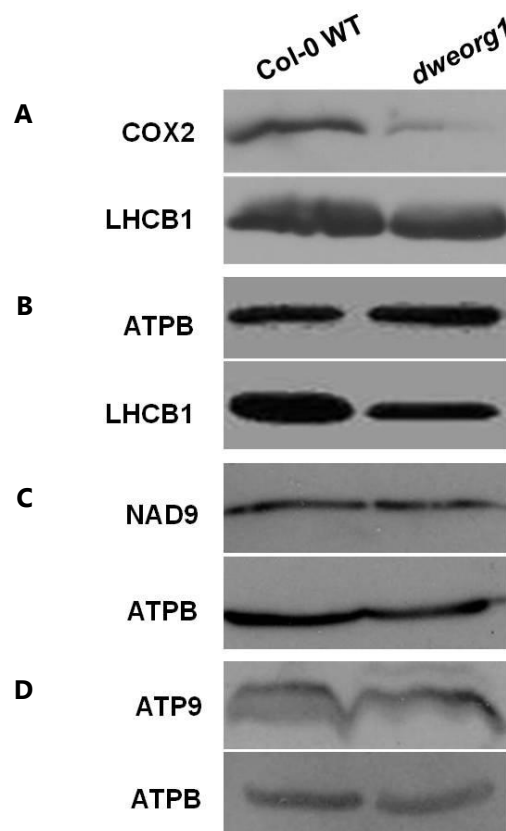


Abbildung 29: Western Blot Analyse mitochondrialer Proteine im Wildtyp Col-0 und *dweorg1* Mutanten. Für die Analysen wurden Gesamtmembranproteine (A und B) bzw. Proteine isolierter Mitochondrien aus hydroponischen Wurzelkulturen (C und D) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und Western Blot Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper durchgeführt: (A) COX2 Antikörper (B) ATPB Antikörper (C) NAD9 Antikörper (D) ATP9 Antikörper. Die Ladekontrolle ist um jeweiligen unteren Abschnitt gezeigt.

Die Expression der mitochondrialen Proteine ATPB, NAD9 und ATP9 ist verglichen zum Wildtyp Col-0 in der *dweorg1* Mutante nicht beeinflusst. Die Stärke des Signals auf dem Röntgenfilm nach der Chemilumineszenzreaktion ist bei diesen drei Proteinen vergleichbar. Als Kontrolle der äquivalenten Proteinmengen auf der Membran diente der Vergleich mit dem Protein LHCB1 (*light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein*) bzw. ATPB. Ein deutlich schwächeres Signal verglichen mit dem Wildtyp konnte allerdings für den Nachweis von COX2 beobachtet werden (Abbildung 29 A). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass in den *dweorg1* Mutanten die Translation dieser Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase erheblich beeinträchtigt ist und nur eine geringfügige Menge des Proteins in den Mitochondrien vorhanden ist.

Um zu untersuchen, ob analog zum Wachstumsverhalten der *dweorg1* Komplementationsmutanten auch die Reduktion von COX2 durch das Wiedereinbringen des Wildtypgens *dweorg1* komplementiert werden kann, wurden Western Blot Analysen auch für die beiden Transformanten T1 und T2 durchgeführt, die nachweislich das *dweorg1* Gen transkribieren (siehe 3.5.2.2). Das Ergebnis ist in Abbildung 30 gezeigt. In den beiden Transformanten T1 und T2 wurde durch das Einbringen des *dweorg1* Wildtypgens erfolgreich die reduzierte Translation der *cox2* mRNA komplementiert. Nach Durchführung der Western Blot Analysen und nach der Chemilumineszenzreaktion zeigen beide Transformanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 eine vergleichbare Signalstärke auf dem Röntgenfilm. Dies bestätigt, dass die Reduktion von COX2 auf das Fehlen des DWEORG1 Proteins zurückzuführen ist.

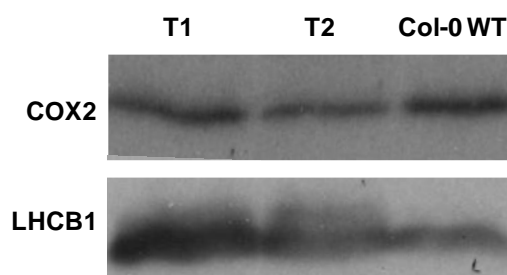


Abbildung 30: Western Blot Analyse zum Nachweis des COX2 Proteins in zwei Komplementationsmutanten T1 und T2 und im Wildtyp Col-0. Für die Analysen wurden Gesamtmembranproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und Western Blot Analysen unter Verwendung eines spezifischen COX2 Antikörpers durchgeführt. Die Ladekontrolle ist im unteren Abschnitt der Abbildung gezeigt.

3.8.2 Der Komplex IV in Mitochondrien von *dweorg1* Pflanzen ist in seiner Aktivität beeinträchtigt

Mittels Western Blot Analysen wurde gezeigt, dass die Menge an COX2 Protein in *dweorg1* Pflanzen stark vermindert ist (3.8.1). COX2 ist Teil des Komplex IV, zu dem in *Arabidopsis* weitere 13 Untereinheiten, COX1, COX3, COX5b, COX5c, COX6a, COX6b, COX6c und COX X1 bis COX X6 gehören (Millar *et al.* 2004). Dieser Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase, ist essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und maßgeblich an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt. Um zu überprüfen, ob eine stark verringerte Menge einer dieser Untereinheiten, COX2, Einfluss auf die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase hat, wurde die Aktivität des Komplexes in Mitochondrien von Wildtyppflanzen und *dweorg1* Pflanzen spektrophotometrisch untersucht. Hintergrund dieser Methode ist die Tatsache, dass sich durch die Cytochrom-c-Oxidase-vermittelte Katalyse der Oxidation von Cytochrom-c die Extinktion bei 550 nm verändert, deren Veränderung Rückschlüsse auf die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase ermöglicht (Wharton und Tzagoloff 1967). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Abbildung 31 gezeigt.

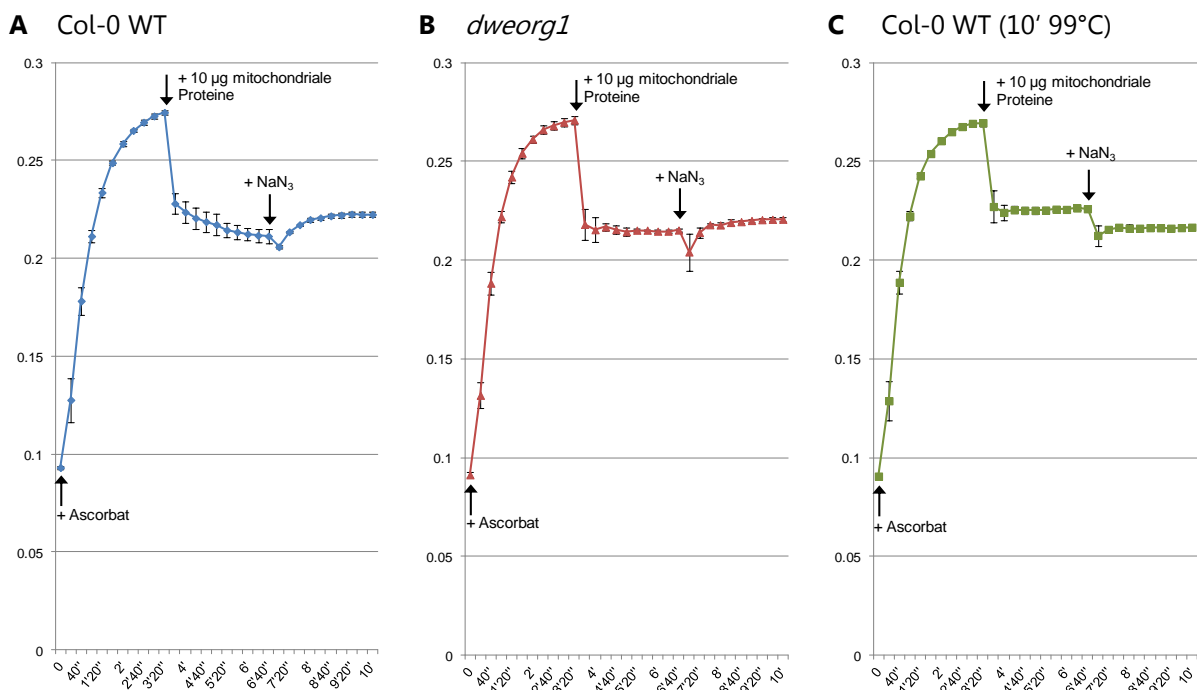


Abbildung 31: Darstellung der vom Redoxstatus der Cytochrom-c-Oxidase abhängigen Extinktionsänderung von Cytochrom-c in isolierten Mitochondrien von Col-0 Wildtyppflanzen (A und C) und *dweorg1* Pflanzen (B) nach Zugabe reduzierender und oxidierender Substanzen zur Messung der Komplex IV-Aktivität. Bestimmt wurde die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in Mitochondrien aus Col-0 Wildtyppflanzen und *dweorg1* Pflanzen. Als Kontrolle wurden außerdem Mitochondrien aus Col-0 Wildtyppflanzen verwendet, die vor der Messung 10 min lang bei 99°C inkubiert wurden (C). Der Zeitpunkt der Zugabe von Ascorbat, der Mitochondrien und der NaN_3 -Lösung ist in den Diagrammen durch einen Pfeil gekennzeichnet. Nach jeder Zugabe wurde die Extinktion bei 550 nm 3 Minuten lang dokumentiert. Die Messungen wurden in dreifacher Wiederholung und gegen einen Leewert ohne Cytochrom-c durchgeführt.

Die Abbildung 31 zeigt das Ergebnis für die Untersuchungen von jeweils 100 µg Mitochondrien (10 µg mitochondriale Proteine) aus Wildtyppflanzen und *dweorg1* Pflanzen. Als Kontrolle wurden Wildtypmitochondrien für 10 Minuten bei 99°C inkubiert, um die Cytochrom-c-Oxidase zu denaturieren und so ihre Fähigkeit zur Oxidation von Cytochrom-c zu eliminieren. Bei allen Proben wurde zunächst ein Nullabgleich durchgeführt, wobei der Leerwert bei jeder Messung anstelle von Cytochrom-c das gleiche Volumen destilliertes Wasser enthielt. Zum Zeitpunkt t_0 ist die Extinktion unverändert. Die Zugabe von Ascorbat führte in allen Proben zu einem starken Anstieg der Extinktion von etwa 0,09 auf etwa 0,27. Da das Normpotential von Ascorbat/Dehydroascorbat mit +60 mV (Muallem und Hall 1982) unter dem von Cytochrom-c_{ox}/Cytochrom-c_{red} mit +250 mV (Heineman und Kuwana 1973) liegt, führt die Zugabe von Ascorbat zu einer Reaktion, bei der unter Abspaltung von zwei Protonen, zwei Elektronen auf zwei oxidierte Cytochrom-c-Moleküle übertragen werden, welche somit reduziert werden. Die Reaktion stellt sich daher wie folgt dar:



Die Zugabe von Mitochondrienextrakt aus Wildtyppflanzen führte dann zu einer Oxidation von Cytochrom-c, die sich in einem schnellen Abfall der Extinktion auf etwa 0,23 und einem im Verlauf von drei Minuten langsameren aber stetigen weiteren Absinken der Extinktion widerspiegelt. Verursacht wurde dies durch die im Mitochondrienextrakt vorhandene Cytochrom-c-Oxidase, die das reduzierte Cytochrom-c wieder oxidiert, indem Elektronen an molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die biphasische Kinetik der Cytochrom-c-Oxidase mit einer schnellen initialen Katalyse und einer darauf folgenden langsameren Reaktionsphase (Thompson und Ferguson-Miller 1983; Suarez *et al.* 1984) steht mit diesem Verlauf in Einklang. Die Zugabe von Natriumazid (NaN₃) führte wiederum zu einem Anstieg der Extinktion. Das Azid-Ion bindet irreversibel an die Sauerstoffbindestelle der Cytochrom-c-Oxidase, so dass eine weitere Oxidation von Cytochrom-c nicht mehr möglich ist und das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Reduktion von Cytochrom-c liegt.

Die Versuche unter Verwendung von Mitochondrien aus *dweorg1* Pflanzen zeigten nach Ascorbatzugabe zunächst einen vergleichbaren Extinktionsverlauf. Nach Zugabe des *dweorg1* Mitochondrienextrakts kam es auch bei diesen Versuchen zwar zu einem initialen Abfallen der Extinktion, jedoch veränderte sich die Extinktion, wie im Falle des Wildtyps, im Laufe der folgenden drei Minuten nicht. Dieses Ergebnis erbrachten auch die Versuche mit den denaturierten Mitochondrien, bei denen ebenfalls nur ein initiales Abfallen der Extinktion ohne weitere Veränderung beobachtet wurde. Bei den Versuchen mit den denaturierten Mitochondrien wäre ein Abfallen der Extinktion, also eine Oxidation von Cytochrom-c nicht zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist das initiale Abfallen der Extinktion nach Zugabe der

Mitochondrien nicht bedingt durch die biphasische Reaktion der Cytochrom-c-Oxidase und der damit verbundenen Oxidation des Cytochrom-c's, sondern durch die Gegenwart einer Vielfalt weiterer Proteine und Moleküle, die die Absorption der Testansätze verfälschen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass bei dem Versuch mit den aktiven Wildtyp-Mitochondrien die Extinktion nach Zugabe des Natriumazids lediglich wieder bis auf das Niveau ansteigt, welches nach dem initialen Absenken nach Zugabe der Mitochondrien erreicht wurde.

Dieser Annahme folgend weisen die Ergebnisse der Versuche darauf hin, dass die Fähigkeit der Cytochrom-c-Oxidase zur Oxidation von Cytochrom-c in Mitochondrien von *dweorg1*-Pflanzen beeinträchtigt ist. Während der Extinktionsverlauf und somit die Oxidation von Cytochrom-c beim Wildtyp nachweisbar ist, ist diese Reaktion bei Mitochondrien von *dweorg1* Pflanzen ähnlich zu bewerten, wie die in den denaturierten Mitochondrien.

3.8.3 Analyse des mitochondrialen Proteoms mittels BN- und BN/SDS-PAGE

Zur Analyse des mitochondrialen Proteoms von Wildtyp- und *dweorg1*-Pflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit neben Western Blot Analysen auch das gelelektrophoretische Verfahren der eindimensionalen BN- sowie der zweidimensionalen BN/SDS-PAGE angewandt. Diese Methode, die ursprünglich zur Untersuchung des mitochondrialen OXPHOS Systems entwickelt wurde (Schagger und von Jagow 1991), bietet die Möglichkeit, auch membranständige, intakte Proteinkomplexe aufzutrennen. In Kombination mit einer Tricin-SDS-PAGE (Schagger und von Jagow 1987), während der die Komplexe dissoziieren, kann zudem ein Großteil der mitochondrial lokalisierten Proteine gleichzeitig gelelektrophoretisch abgebildet und analysiert werden. Vorbereitend für die BN-PAGE wurden die mitochondrialen Proteine des Wildtyps und der *dweorg1* Mutante mit einem Detergens solubilisiert. Dieser Schritt ist notwendig, um Proteinkomplexe aus der Membran zu lösen. Die Wahl des Detergens' und seiner Konzentration wirkt sich stark auf das Ergebnis der BN-PAGE aus (Eubel *et al.* 2003; Eubel *et al.* 2005); Proteinkomplexe sollen aus der Membran solubilisiert werden, dürfen aber gleichzeitig nicht in ihre Untereinheiten dissoziieren. Analysiert wurden nach der Durchführung sowohl die mit Coomassie gefärbten Gelstreifen aus der BN-PAGE, als auch silbergefärbte Gele nach einer zweidimensionalen Auftrennung der mitochondrialen Proteine (siehe Abbildung 32).

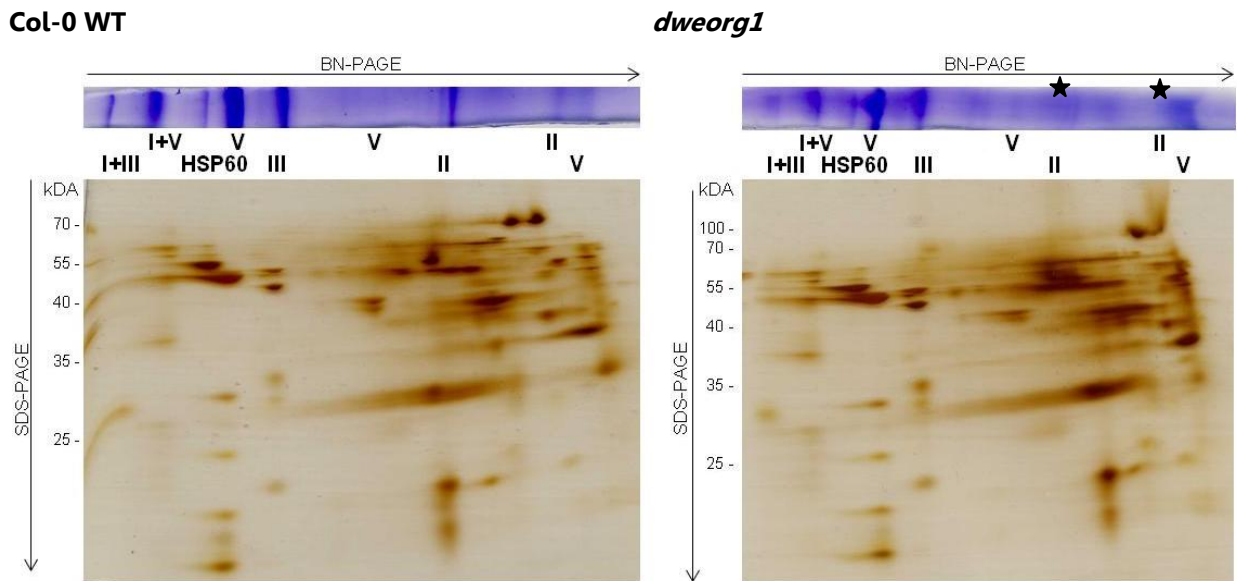


Abbildung 32: Ein- und zweidimensionale Auftrennung mitochondrialer Proteine aus *Arabidopsis* Wildtyp- (Col-0 WT) und *dweorg1* Pflanzen. Gezeigt sind repräsentative Gele aus BN- und BN/SDS-PAGE Analysen. Die anhand von Referenzgelen identifizierten Proteinkomplexe sind entsprechend ihrer Lokalisation in den Gelen angegeben. Die Laufrichtung der Gelelektrophoresen ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die verminderte Menge des Komplexes II in *dweorg1*-Pflanzen ist auf dem Streifen des BN-Gels durch einen Stern markiert.

Die Identifikation der durch Spots und Banden repräsentierten Proteine und Proteinkomplexe erfolgte durch den Abgleich von Referenzgelen, die ebenfalls das mitochondriale Proteom von *Arabidopsis* abbilden (Jansch *et al.* 1996; Eubel *et al.* 2003; Giegé *et al.* 2003). Darüber hinaus wurde die *online*-Plattform „GelMap 2.0“ (Klodmann *et al.* 2011; Rode *et al.* 2011) genutzt, die weitreichende Möglichkeiten zur Proteinidentifikation bietet. Diverse Gele von BN/SDS-PAGEs stehen dort zur Verfügung, deren Proteinspots den jeweiligen Proteinen zugeordnet sind und die per Mausklick auf dem virtuellen Gel einzeln angewählt werden können. Auch die Anzeige gewünschter Proteine oder Komplexe ist möglich. Für das mitochondriale Proteom aus *Arabidopsis* wurden auf dieser Plattform 471 Proteine aus BN/SDS-PAGEs mittels Massenspektrometrie identifiziert, von denen einige den insgesamt 35 verschiedenen Proteinkomplexen angehören (Klodmann *et al.* 2011). Somit stellte diese Plattform ein hilfreiches Werkzeug zur Identifikation von Proteinen und Proteinkomplexen des im Rahmen dieser Arbeit analysierten mitochondrialen Proteoms dar.

Ein Großteil des mitochondrialen Proteoms besteht aus Proteinen, die gemeinsam die fünf Komplexe der mitochondrialen Atmungskette bilden (Komplex I bis V). Von diesen Komplexen konnten mittels eindimensionaler BN-PAGE sowohl in Wildtyp- als auch in *dweorg1*-Pflanzen der Komplex I, II, III und V identifiziert werden. Sie bilden auf dem Gelstreifen deutliche Banden (Abbildung 32). Sie liegen z.T. in unterschiedlichen Superkomplexen vor (Eubel *et al.* 2003), weshalb sie mehrfach und in unterschiedlichen

Molekulargewichten auf dem Gelstreifen zu sehen sind. Der einzige Komplex, der in den BN-PAGE-Analysen nicht identifiziert werden konnte, ist der Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase. Dieser Komplex wurde in diversen BN/SDS-PAGE-Studien bereits identifiziert (Eubel *et al.* 2003; Giegé *et al.* 2003; Klodmann *et al.* 2011), jedoch wird angenommen, dass eine erfolgreiche Solubilisierung und gelelektrophoretische Auftrennung dieses Komplexes einen entscheidenden Einfluss darauf hat, ob dieser Komplex erfolgreich identifiziert werden kann (Eubel *et al.* 2003). Nachdem bereits gezeigt wurde, dass die zum Komplex IV gehörige Untereinheit COX2 in *dweorg1* Pflanzen stark verringert ist und auch die Aktivität des gesamten Komplexes beeinträchtigt ist, wäre zu erwarten gewesen, dass auch weitere Untereinheiten möglicherweise in ihrer Menge reduziert sind. Für den Komplex IV lassen sich allerdings keine Aussagen treffen. Die BN-PAGE zeigt allerdings, dass der Komplex II, die Succinat Dehydrogenase, in *dweorg1* Pflanzen in einer verminderten Menge vorkommt. Die Banden des Komplexes II sind schwächer ausgeprägt als im Gel des Wildtyps, was auf eine geringere Quantität der den Komplex bildenden Proteinuntereinheiten hinweist.

Nach Auftrennung in der zweiten Dimension konnten über einen Referenzgelabgleich und mithilfe von GelMap 2.0 im mitochondrialen Proteom des Wildtyps insgesamt 65, im dem der *dweorg1*-Mutante 61 Proteinspots unterschieden werden. Von diesen konnten für den Wildtyp 45, für die *dweorg1*-Mutante 42 Proteinspots bestimmten Proteinen zugeordnet werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in der folgenden Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der anhand von Abgleichen mit Referenzgelen identifizierten Proteinspots der mittels BN/SDS-PAGE durchgeführten zweidimensionalen Auftrennung mitochondrialer Proteine von Wildtyp- und *dweorg1*-Mitochondrien.

	Anzahl identifizierter Spots		Proteinkomplex	Physiologische Funktion der Proteine
	Wildtyp Col-0	<i>dweorg1</i>		
	4	6	Komplex I	Oxidative Phosphoreylierung
	4	4	Komplex II	Oxidative Phosphoreylierung
	5	5	Komplex III	Oxidative Phosphoreylierung
	8	9	Komplex IV	Oxidative Phosphoreylierung
	2	2	HSP60	Proteinfaltung
	5	5	diverse	Pyruvatmetabolismus, Citratzyklus
	4	3	diverse	Transport
	1	1	diverse	Nukleinsäuremetabolismus
	5	3	diverse	Aminosäuremetabolismus
	6	3	diverse	Andere metabolische Prozesse
	1	1	diverse	Nicht charakterisiert
Σ	45	42		
<i>n.b.</i>	20	19		

n.b. = Spot keinem Protein zuzuordnen (nicht bestimmbar)

Sowohl im Wildtyp als auch in *dweorg1*-Pflanzen sind über die Hälfte der identifizierten Proteine den Komplexen der oxidativen Phosphorylierung zuzuordnen. Darüber hinaus sind weitere, erfolgreich identifizierte Proteine den physiologischen Prozessen des Pyruvatmetabolismus' bzw. des Citratzyklus', dem Nuklein- und Aminosäuremetabolismus, dem Transport und der Proteinfaltung zuzuordnen. Das Hitzestressprotein 60 (HSP60) ist letzterem Prozess zuzuordnen und kann als Protein der mitochondrialen Matrix als guter Indikator für die Unversehrtheit der Mitochondrien dienen. Das HSP60 ist im mitochondrialen Proteom des Wildtyps und der *dweorg1* Mutante sowohl nach erfolgter BN-PAGE, als auch nach BN/SDS-PAGE-Analysen deutlich als Bande bzw. Spot zu erkennen. Insgesamt wurden von den 45 bzw. 42 erfolgreich identifizierten Proteinen 37 übereinstimmend sowohl in Mitochondrien des Wildtyps als auch in Mitochondrien der *dweorg1* Mutante identifiziert. Proteine, die nicht übereinstimmend identifiziert wurden, gehören verschiedenen Proteinkomplexen an und sind in verschiedene physiologische Prozesse involviert. Ein direkter Vergleich beider BN/SDS-Gele weist darüberhinaus keine signifikant erkennbaren Unterschiede bezüglich des Auftretens bestimmter Proteine auf, so dass davon auszugehen ist, dass keine mit dieser Methode detektierbaren Veränderungen des mitochondrialen Proteoms in seiner Gesamtheit in *dweorg1*-Pflanzen vorliegen. Leichte Veränderungen in der Quantität einzelner Proteine wurden allerdings aufgrund der Silberfärbung der hier präsentierte Gele nicht festgestellt. Im Vergleich zur Coomassie-Färbung ist die Sensitivität der Silberfärbung zwar um ein Vielfaches höher, weswegen sie auch in dieser Arbeit verwendet wurde, jedoch eignet sie sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkung auf unterschiedlich aufgebaute Proteine und möglicher metachromatischer Effekte nur sehr bedingt für quantitative Analysen (Szyrový und Hodný 1991; Smith 2002).

3.9 Polysomengradientenanalyse

Bisherige Analysen zeigten, dass in *dweorg1* Mutanten die Menge an COX2 Proteine deutlich reduziert ist, was darauf hinweist, dass DWEORG1 maßgeblich an der Translation der *cox2* mRNA beteiligt ist. Gleichzeitig scheint die Transkription von *cox2* in den *dweorg1* Mutanten unverändert zu sein. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob in *dweorg1* Mutanten der Translationsprozess gestört ist, oder ob es zwar zur Translation des Transkripts kommt, das Protein jedoch instabil ist. Eine Möglichkeit zur näheren Analyse des Translationsvorgangs ist die Polysomengradientenanalyse. Bei dieser Analyse wird der Translationskomplex aus zu translatierender mRNA und Ribosomen entsprechend ihrer Masse über einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Je höher die Anzahl der Ribosomen, die die mRNA besetzen ist, desto höher ist die Translationseffizienz und desto stärker

sedimentiert die mRNA im Gradienten. Diese Methode ermöglicht somit eine Aussage über eine verstärkte oder verminderte Rekrutierung von Ribosomen an die mRNA und weiterführend über die Translation eines speziellen Transkripts.

3.9.1 Organspezifisches Expressionsprofil von DWEORG1 und Etablierung einer Wurzelkultur

Für die Isolierung und Fraktionierung von Polysomen sollten aufgereinigte Mitochondrien verwendet werden, da unter Verwendung von Gesamtpflanzenmaterial nachfolgende Analysen, wahrscheinlich aufgrund des verhältnismäßig geringen Anteils mitochondrialer Proteine, keine verwertbaren Ergebnisse brachten. Um die für eine Mitochondrienisolierung benötigte große Biomasse an Pflanzenmaterial zu erhalten, sollte eine möglichst zeiteffiziente und ertragreiche Methode zur Biomassenproduktion von *Arabidopsis* etabliert werden. Im Vorfeld durchgeführte qRT-PCR Analysen zur Transkription von *dweorg1* in verschiedenen Organen von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen (Abbildung 33) lieferten hierfür nützliche Informationen.

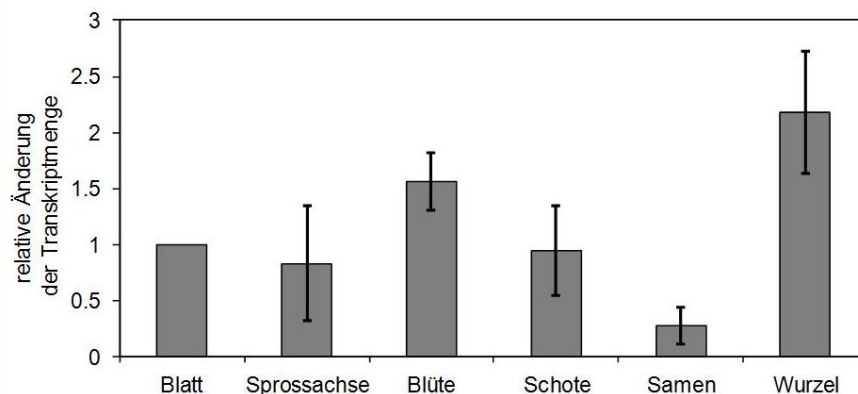


Abbildung 33: Transkription des *dweorg1* Gens in unterschiedlichen Organen von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen. Die Abbildung zeigt die Auswertung der Ergebnisse von drei unabhängigen qRT-PCR Analysen. Die Transkription von *dweorg1* im Blatt wurde gleich eins gesetzt und die Werte für die Transkription in den anderen Organen auf diesen Wert normiert. Mögliche Variationen der Ausgangsmenge an Matrize wurden über einen Abgleich mit den Werten für die Transkription der *housekeeping* Gene *ubq11* und *gapdh* ausgeglichen.

Für die Durchführung der qRT-PCR Analysen wurde aus den Pflanzenorganen Blatt, Sprossachse, Blüte, Schote, Samen und Wurzel Gesamt-RNA isoliert und diese nach erfolgreicher Hydrolyse der DNA in einer definierten Menge in die qRT-PCR eingesetzt. Die nach Berechnung erhaltenen Werte für die einzelnen Blütenorgane wurden auf den Wert der Ergebnisse für das Blatt, welches gleich eins gesetzt wurde, normiert. Demzufolge entsprechen Werte <1 eine im Vergleich zum Blatt geringere Transkriptionsrate des *dweorg1* Gens, während Werte >1 auf eine erhöhte Transkription hinweisen. Wie in der Abbildung 33 gezeigt, ist die Transkriptionsrate in den Wurzeln am höchsten und etwa um das zweifache im Vergleich zu der Transkription im Blatt gesteigert. Leicht erhöht ist die Transkription außerdem in der Blüte, während in der Sprossachse und der Schote nur unwesentlich geringerer Mengen des *dweorg1* Transkripts nachgewiesen werden konnten. Eine im Vergleich stark erniedrigte Transkription des *dweorg1* Gens scheint in den Samen vorzuliegen.

Da für das DWEROG1 Protein kein Antikörper zur Verfügung steht, konnten keine Untersuchungen zur organspezifischen Proteinexpression, wie z.B. Western Blot Analysen durchgeführt werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass in *Arabidopsis* für die Mehrzahl an Proteinen eine deutliche Korrelation zwischen Transkription und Expression, bzw. zwischen Transkriptom und Proteom besteht (Baerenfaller *et al.* 2008; Baginsky *et al.* 2010). Daher wurde davon ausgegangen, dass nicht nur, wie in Abbildung 33 gezeigt, die Menge an *dweorg1* Transkript, sondern auch die des entsprechenden Proteins in den Wurzeln im Vergleich zu anderen Pflanzenorganen erhöht ist. Somit bietet eine hydroponische Wurzelkultur nicht nur den Vorteil, dass sie verhältnismäßig leicht zu etablieren ist und innerhalb kurzer Zeit eine große Biomasse liefert, sondern es ist zu erwarten, dass die Abwesenheit von DWEROG1 in dem Organ den stärksten Effekt hat, in dem die Transkription bzw. Expression unter Normalbedingungen im Wildtyp am stärksten ist. Die Abbildung 34 zeigt exemplarisch eine hydroponische Wurzelkultur und einen Saccharosedichtegradienten nach Auftrennung des Wurzelextrakts zur Anreicherung von Mitochondrien.

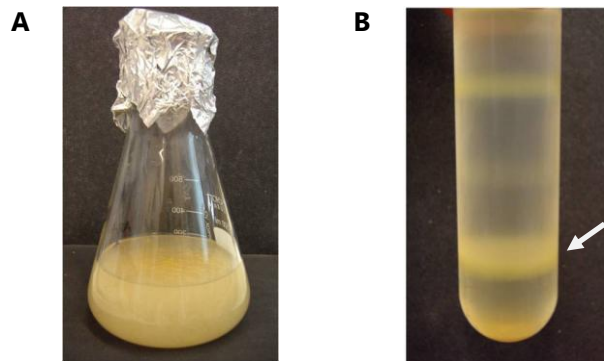


Abbildung 34: Hydroponische Wurzelkultur und über Saccharosedichtegradienten aufgetrenntes Wurzelmaterial zur Isolierung von Mitochondrien. (A) Hydroponische Wurzelkultur von *Arabidopsis thaliana* nach dreiwöchiger Kultivierung unter Lichtausschluss. Nach zwei Wochen wurde der Kultur das Phytohormon Indoleessigsäure zugesetzt. (B) Auftrennung des zerkleinerten Wurzelextraktes aus (A) über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten. Die Bande der angereicherten Mitochondrien ist mit einem Pfeil markiert.

Die Kultivierung von hydroponischen Wurzelkulturen, ausgehend von etwa einer Woche alten sterilen Keimlingen oberflächensterilisierter Samen, ermöglichte eine effiziente Methode zum Erhalt großer Mengen an Pflanzenmaterial vom Wildtyp Col-0 und der *dweorg1* Mutante. Nach einer sechs- bis achtwöchigen Kultivierung in 250 ml WKM (siehe 2.2.5) betrug das Nassgewicht der Wurzelkultur etwa 20 g pro Erlenmeyerkolben. Vorteilhaft ist außerdem, dass die Wurzelkulturen ohne Einschränkung des Wachstums unter vollständigem Ausschluss von Licht kultiviert werden können, wodurch die Bildung von funktionsfähigen Chloroplasten in den noch verbliebenen Keimlingen unterdrückt wird. Mit Hilfe dieser Kultivierungsmethode konnten regelmäßig aus etwa 100 – 120 g Wurzelmasse 100 – 140 mg Mitochondrien (entsprechen 10 – 14 mg mitochondrialer Proteine (Eubel *et al.* 2004)) isoliert werden.

3.9.2 In *dweorg1* Mutanten ist die Polysomenassoziation des *cox2* Transkripts beeinträchtigt

Eine Vielzahl von PPR-Proteinen ist an der Translation beteiligt (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Welche Rolle genau diese Proteine bei diesem komplexen Prozess spielen, ist allerdings weitestgehend ungeklärt. Für einige dieser PPR-Proteine wurde bereits gezeigt, dass diese mit Polysomen in den Mitochondrien assoziiert vorliegen (Uyttewaal *et al.* 2008; Hammani *et al.* 2011b), wobei noch ungeklärt ist, ob diese PPR-Proteine durch direkte Bindung an die Polysomen an der Translation beteiligt sind oder Teil eines RNA-Reifungskomplexes sind, der mit den Polysomen interagiert. Da das Protein DWEORG1 über einen noch unbekanntem Mechanismus an der Translation von *cox2* beteiligt zu sein scheint, wurde daher zunächst überprüft, ob eine Assoziation des *cox2* Transkripts mit den

Polysomen vorliegt und ob diese in *dweorg1* Mutanten beeinflusst ist. Für die Polysomengradientenanalyse wurden Mitochondrien aus hydroponischen Wurzelkulturen des Wildtyps Col-0 und der *dweorg1* Mutante isoliert und diese unter Anwesenheit der Translationsinhibitoren Cycloheximid und Chloramphenicol solubilisiert. Diese Inhibitoren blockieren die Translokation der Ribosomen und verhindern so eine vorzeitige Dissoziation des Polysomenkomplexes (Weisberger *et al.* 1964; Colombo *et al.* 1965). Das Mitochondrienlysat wurde dann nach der Abtrennung nicht solubilisierter Bestandteile auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten gegeben. Mittels Ultrazentrifugation wurden dann die überwiegend translationsinaktiven mRNPs (*messenger ribonucleoproteins*) von den translationsaktiven Polysomen getrennt. Entsprechend ihrer Masse, die mit der ribosomalen Besetzung des Transkripts korreliert, sedimentieren die Moleküle schneller oder langsamer und sammeln sich entsprechend ihrer Dichte im Saccharosegradienten an. Die Abbildung 35 A zeigt schematisch den Ablauf und die Funktionsweise dieses Versuchs. Aufgrund des unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens erhält man nach der Ultrazentrifugation und der anschließenden RNA-Isolierung aus den einzelnen Fraktionen ein charakteristisches Absorptionsprofil bei der anschließenden Messung der RNA (Abbildung 35 B und C). Sowohl für die Analyse des Wildtyps als auch der *dweorg1* Mutante wurden jeweils zwei Gradientenanalysen durchgeführt, von denen jeweils eine der Überprüfung der Integrität der isolierten und fraktionierten Polysomen diente. In diesen Versuchen wurde sowohl die Solubilisierung der Mitochondrien als auch die Auftrennung im Saccharosegradienten in Anwesenheit von $MgCl_2$ und Abwesenheit von EDTA durchgeführt. Unter diesen Bedingungen dissoziieren die Polysomenkomplexe vollständig (Henshaw 1968; Perry und Kelley 1968), wodurch das Sedimentationsverhalten der nun freien Ribosomen verändert wird, was sich wiederum auf das RNA-Absorptionsprofil auswirkt. Im Gegensatz zu dem Absorptionsprofil der Analysen unter polysomenstabilisierenden Bedingungen (-EDTA), welches sich durch eine starke Absorption und damit verbunden einer hohen RNA-Konzentration in den leichteren (d.h. im Gradienten oberen) Fraktionen zwei und drei und einem Wiederanstieg der Absorption in den Fraktionen fünf bis sieben auszeichnet, ist dieses Ansteigen in den Versuchen unter polysomendestabilisierenden Bedingungen (+EDTA) nicht zu beobachten (Abbildung 35 B und C). Dieser *shift* der Absorption zugunsten der leichteren Fraktion zwei und drei resultiert aus den aufgrund der destabilisierenden Bedingungen nun frei vorliegenden Ribosomen, die sich zusammen mit den 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten und den 80S Monosomen in den leichteren Fraktionen ansammeln. Diese Moleküle sind für die hohe Absorption in den leichteren Fraktionen aller Versuche verantwortlich und kennzeichnen die Absorptionsprofile von Polysomenanalysen. Unter

polysomenstabilisierenden Bedingungen wurde sowohl bei den Analysen des Wildtyps, als auch der *dweorg1* Mutante ein Ansteigen der Absorption und damit der RNA-Konzentration festgestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich bei der Ultrazentrifugation die mit unterschiedlicher Anzahl von Ribosomen beladene mRNA in den unteren Fraktionen des Gradienten ansammeln. Insgesamt wurde damit bestätigt, dass sowohl aus dem Wildtyp als auch aus der *dweorg1* Mutante translationsaktive Polysomenkomplexe isoliert werden konnten. Um den Einfluss von DWEORG1 auf die Translation von *cox2* näher zu untersuchen, wurde die RNA aus den einzelnen Fraktionen aller Versuche mittels Northern Blot Analysen näher untersucht.

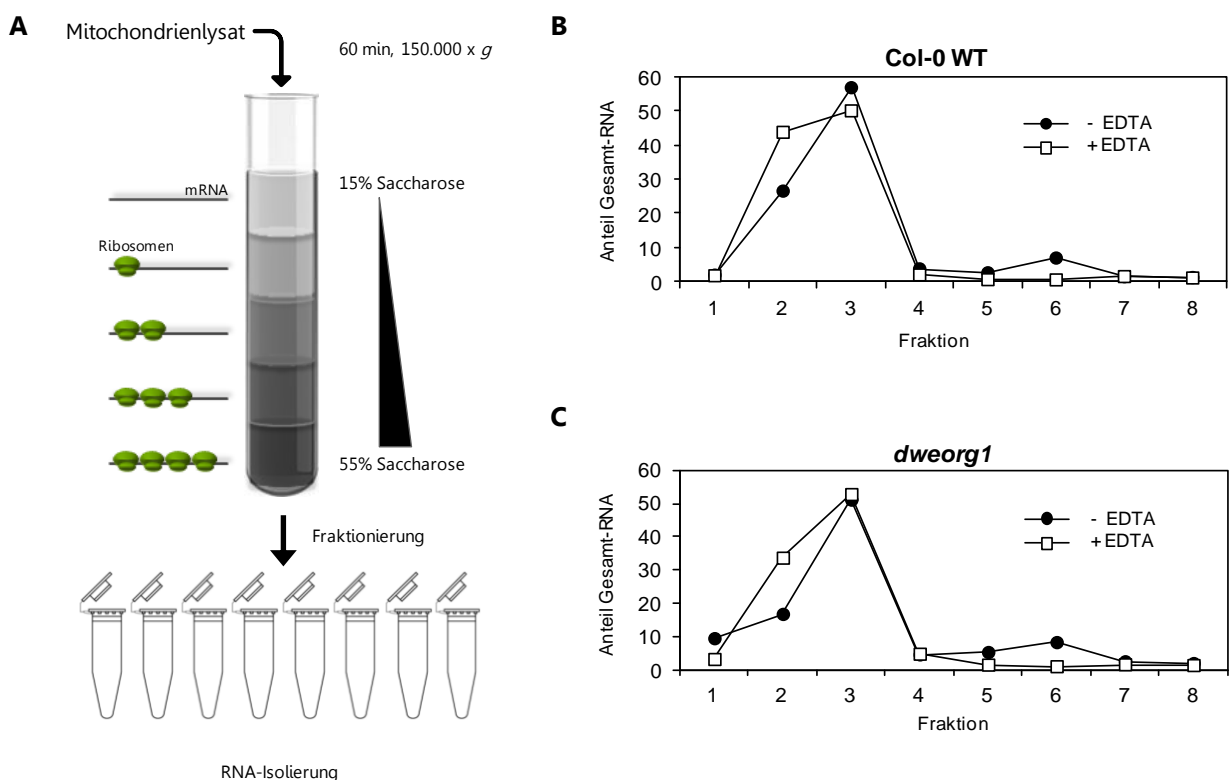


Abbildung 35: Polysomenfraktionierung zur Analyse polysomaler RNA aus Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*. (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Fraktionierung der Polysomen über einen Saccharosegradienten. Das Lysat aus solubilisierten Mitochondrien wird mittels Ultrazentrifugation über einen Saccharosegradienten aufgetrennt und der Gradient anschließend fraktioniert und die RNA isoliert. Polysomale RNA sedimentiert im Gradienten schneller als nicht polysomenassoziierte RNA. (B) Repräsentatives Absorptionsprofil der aus acht Fraktionen isolierten RNA aus aufgetrennten Polysomen aus dem Wildtyp Col-0. Gezeigt ist der jeweilige prozentuale Anteil von der Summe der isolierten RNA aller acht Fraktionen für Versuche unter polysomenstabilisierenden (- EDTA) und polysomendestabilisierenden (+ EDTA) Bedingungen. (C) Analog zu (B) ist des Absorptionsprofils der Analyse polysomaler RNA aus der *dweorg1* Mutante gezeigt.

Um zu untersuchen, ob die Assoziation des *cox2* Transkripts in *dweorg1* Mutante beeinträchtigt ist, wurde die aus allen Fraktionen isolierte RNA des Wildtyps und der *dweorg1* Mutante gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *cox2*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Northern Blot Analysen sind in der Abbildung 36 gezeigt. Im Wildtyp wurde nach der Gradientenanalyse unter polysomenstabilisierenden Bedingungen (-EDTA) in nahezu allen Fraktionen das *cox2* Transkript nachgewiesen. Deutliche Signale sind in den Fraktionen eins bis sechs zu sehen. Dies weist auf einen aktiven Translationsprozess der *cox2* mRNA hin, da sich das Transkript als aktiver Polysomenkomplex in den unteren Bereichen des Saccharosegradienten anreichert. Im Gegensatz dazu scheint die Translationsaktivität in der *dweorg1* Mutante beeinträchtigt zu sein. Während die Signale der ersten beiden Fraktionen auf dem Autoradiogramm vergleichbar zu denen des Wildtyps sind, ist das Signal der Fraktion drei bereits schwächer und in den Fraktionen vier bis sechs nur äußerst schwach ausgeprägt. Dies spricht für eine deutlich verringerte Translation des *cox2* Transkripts. Die Tatsache, dass die Translationsaktivität in *dweorg1* Mutanten nicht vollständig aufgehoben ist, geht einher mit den Ergebnissen der Western Blot Analysen (3.8.1), in denen gezeigt wurde, dass die Menge an COX2 deutlich, jedoch nicht vollständig reduziert ist.

Die Northern Blot Analysen der RNA der unter polysomendestabilisierenden Bedingungen (+EDTA) fraktionierten Polysomen bestätigt die Assoziation des *cox2* Transkripts mit den Polysomen und somit die erfolgreiche Isolierung und Fraktionierung translationsaktiver Polysomenkomplexe.

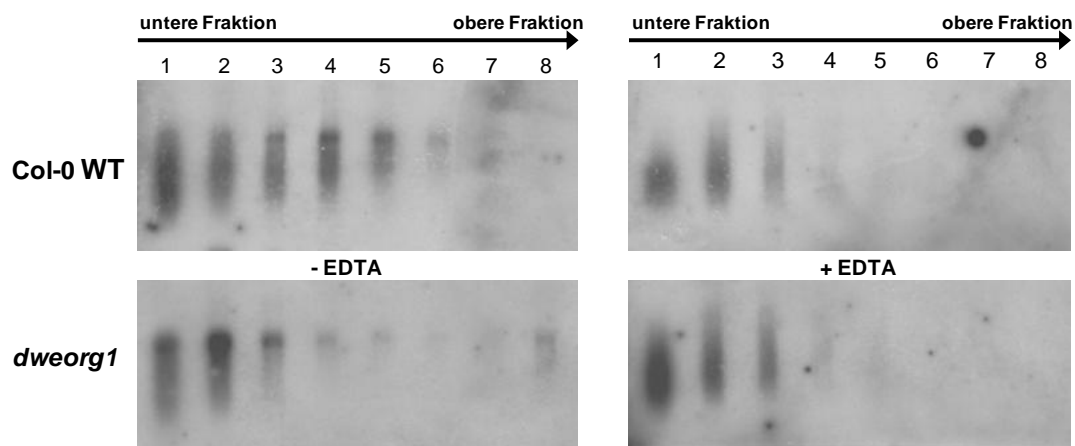


Abbildung 36: Northern Blot Analysen der polysomalen Fraktionen des Wildtyps Col-0 und der *dweorg1* Mutante unter Verwendung einer *cox2* spezifischen Sonde. Die oberen Abbildungen zeigen die Autoradiogramme der Analysen der polysomalen RNA aus dem Wildtyp Col-0, die unteren Abbildungen die der Analysen der polysomalen RNA aus der *dweorg1* Mutante. Für die Versuche unter polysomenstabilisierenden (-EDTA, jeweils linkes Autoradiogramm) und polysomendestabilisierenden (+EDTA, jeweils rechtes Autoradiogramm) Bedingungen wurde jeweils RNA aller acht Fraktionen des Saccharosegradienten gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *cox2* spezifischen Sonde hybridisiert.

3.9.3 Mit Polysomen assoziierte *cox2* Transkripte werden vollständig ediert

Die in *dweorg1* Mutanten beeinträchtigte Assoziation des *cox2* Transkripts an die Polysomen weist auf eine essentielle Rolle dieses Proteins im Translationsprozess hin. Möglicherweise ist das Protein DWEORG1 selbst ebenfalls Bestandteil eines translationsaktiven Polysomenkomplexes. Da ein DWEORG1-Antikörper leider nicht verfügbar ist, kann diese Vermutung allerdings nicht bestätigt werden. Für einige PPR-Proteine konnte hingegen bereits eine Assoziation mit Polysomen nachgewiesen werden (Uyttewaal *et al.* 2008; Davies *et al.* 2009). Zusammen mit einem spezifischen Transkript könnten diese PPR-Proteine Teil eines Reifungskomplexes sein, der an die Ribosomen bindet. Dies würde bedeuten, dass RNA-Reifung und Translation im mitochondrialen RNA-Metabolismus gekoppelt ablaufen. Für diese Theorie spricht die Tatsache, dass für einige Gene nicht oder unvollständig edierte sowie ungespleißte Transkripte gebunden an Polysomen entdeckt wurden (Yang und Mulligan 1993; Lu und Hanson 1996). Um zu untersuchen, ob die polysomenassoziierten *cox2* Transkripte vollständig ediert vorliegen, wurde die RNA aller Fraktionen des Wildtyps Col-0 und der *dweorg1* Mutante aus den Analysen unter polysomenstabilisierenden Bedingungen zusammen mit *cox2* spezifischen Oligonukleotiden als Matrize in eine RT-PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und einer Sequenzanalyse unterzogen, um den Status der Edierungspositionen des *cox2* Transkripts zu überprüfen. Exemplarisch sind die Ergebnisse für die sechs in der Sequenzierung erfassten Edierungspositionen in der Abbildung 37 gezeigt.

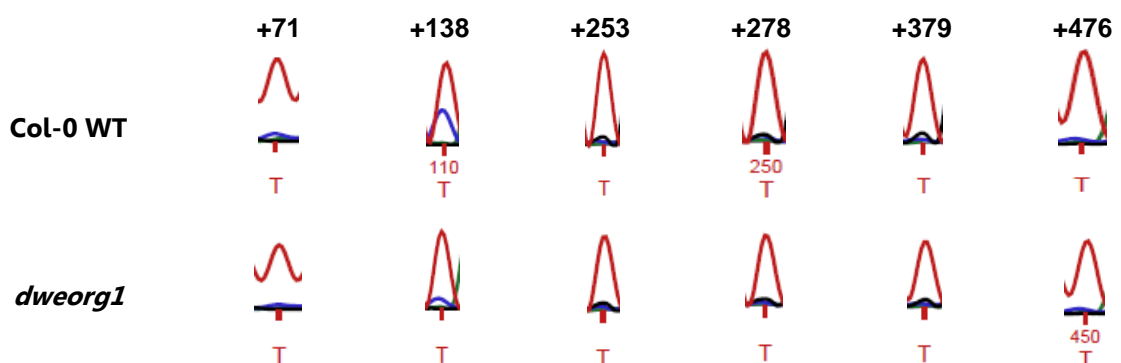


Abbildung 37: Ausschnitte der Elektropherogramme der Sequenzanalysen von sechs Edierungspositionen des *cox2* Transkripts amplifiziert mittels RT-PCR aus Polysomengradientenanalysen. Die in die RT-PCR eingesetzte RNA stammt aus der Fraktion zwei der Polysomengradientenanalysen unter polysomenstabilisierenden Bedingungen. Der obere Abschnitt zeigt Ausschnitte des Elektropherogramms aus dem Versuch mit dem Wildtyp, der untere Abschnitt aus dem Versuch mit der *dweorg1* Mutante. Bei der Sequenzierung erfasst wurden die Edierungspositionen +71, +138, +253, +278, +379 und +476 des *cox2* Transkripts.

Die Abbildung 37 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Sequenzanalyse des *cox2* Transkripts für die zweite Fraktion aus der Polysomengradientenanalyse. Bei der Sequenzierung wurden ausgehend von einem *cox2*-spezifischen Oligonukleotid sechs Edierungspositionen von insgesamt 15 annotierten Edierungsstellen (Giegé und Brennicke 1999) mit auswertbaren Signalintensitäten erfasst. Darunter befindet sich auch die Edierungsposition +476, die bei den Versuchen zur Identifikation von *cox2*-bindenden Proteinen Teil der Ködersequenz war (Knittler 2011). Sowohl diese, als auch die anderen analysierten Edierungspositionen wurden korrekt ediert, wie aus den Elektropherogrammen ersichtlich ist. Bei einer unvollständigen oder nicht erfolgten Edierung wäre ein zusätzlicher oder alleingiger *Peak* entsprechend eines Cytosins (blau) zu erwarten gewesen, ähnlich dem Elektropherogrammausschnitt der Edierungsposition +138, die sowohl im Wildtyp, als auch in *dweorg1* Mutanten partiell ediert wurde. Zusammenfassend wurde für keine der untersuchten Edierungspositionen aller Fraktionen ein Unterschied in der Edierung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Somit liegt weder im Wildtyp noch in *dweorg1* Mutanten eine Assoziation von teiledierten *cox2* Transkripten mit Polysomen vor.

4 Diskussion

Die *Pentatricopeptide repeat* Proteine bilden eine große Familie, deren Vertreter vorrangig in Landpflanzen vorkommen und in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert sind. Bis auf sehr wenige Ausnahmen sind Vertreter dieser Proteinfamilie ausschließlich in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert, wo sie in Pflanzen beispielsweise an der Photosynthese, der Pollenentwicklung, der Embryogenese und dem Energiemetabolismus beteiligt sind. Allen PPR-Proteinen gemeinsam ist die Fähigkeit, sequenzspezifisch an RNA-Moleküle zu binden, wodurch sie in der Lage sind, über nahezu alle Schritte des RNA-Metabolismus, wie Transkription, Spleißen, Edierung, Stabilisierung und Translation sämtliche physiologische Zellabläufe zu steuern (Schmitz-Linneweber und Small 2008; Fujii und Small 2011). Von den etwa 450 Vertretern in *Arabidopsis* wurde bisher nur ein kleiner Anteil näher charakterisiert. Und obwohl für diese PPR-Proteine schon diverse Funktionen und spezifische Ziel-RNA-Sequenzen beschrieben wurden, sind die exakte Funktionsweise, die molekularen Abläufe, sowie beteiligte Proteininteraktionspartner bislang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Vertreter der PPR-Proteine aus *Arabidopsis* charakterisiert. Diese Proteine, AT1G15480 und DWEORG1 wurden im Vorfeld dieser Arbeit mit einer auf der Interaktion Streptavidin-beschichteter Magnetpartikel mit Biotin-markierter RNA bzw. RNA-Protein-Komplexen basierenden Methode isoliert und identifiziert (Bolle 2008). Da als Köder-RNA in diesen Untersuchungen ein 40 Nukleotid langes *cox2* Fragment verwendet wurde, welches die Edierungsstelle +476 sowie 31 Nukleotide *downstream* und acht Nukleotide *upstream* dieser Edierungsstelle enthält, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der beiden PPR-Proteine an der RNA-Edierung angenommen. Dies bestätigte sich jedoch für beide Proteine nicht. Aufgrund des Phänotyps von *knockout* Pflanzen mit einem stark reduzierten Wachstum wurde der Fokus dieser Arbeit dann nach anfänglichen Untersuchungen auf das Protein DWEORG1 gelegt.

4.1 Phylogenie und Struktur der PPR-Proteine AT1G15480 und DWEORG1

Die Proteine AT1G15480 und DWEORG1 gehören beide der P-Unterfamilie der PPR-Proteine an, die im Gegensatz zur pflanzenspezifischen PLS-Unterfamilie auch in anderen Eukaryoten zu finden ist. PPR-Proteine der P-Unterfamilie tragen an ihrem C-Terminus keine der für die PLS-Unterfamilie charakteristischen Domänen, die in colinearer Abfolge E, E+, DYW auftreten und deren Auftreten mit der spezifische Funktion eines PPR-Proteins assoziiert ist. Bis auf eine Ausnahme (Doniwa *et al.* 2010) gehören alle bisher bekannten PPR-Proteine, die für die

RNA-Edierung verantwortlich sind, der PLS-Unterfamilie an und weisen mindestens eine E-Domäne auf (Fujii und Small 2011; Verbitskiy *et al.* 2012). Da gezeigt wurde, dass DYW-PPR-Proteine bereits in Moosen für die RNA-Edierung verantwortlich sind (Tasaki *et al.* 2010; Rudinger *et al.* 2011), stellen nach aktuellen Erkenntnissen die PPR-Proteine mit DYW-Domäne die ursprüngliche Form der PLS-Unterfamilie dar (Verbitskiy *et al.* 2012). Eine im Verlauf der Evolution steigenden Anzahl der Edierungspositionen ging einher mit einer Vervielfältigung der Gene der PPR-Proteine mit DYW-Domäne innerhalb des Genoms. Im weiteren Verlauf der Evolution der Landpflanzen kam es dann zu einem sekundären Verlust der DYW-Domäne und in Einzelfällen auch von Teilen der E+-Domäne (Rivals *et al.* 2006; Knoop und Rudinger 2010). Die potentielle Deaminase-Aktivität der DYW-Domäne (Salone *et al.* 2007) wurde dann von einem anderen Protein übernommen. Die Rekrutierung des bislang unbekanntes Edierungsenzyms erfolgt möglicherweise durch die nicht vom sekundären Verlust betroffene E-Domäne (Shikanai 2006).

Bis auf das PPR-Protein PPR596, welches die Edierung von *rps3* in Mitochondrien von *Arabidopsis* supprimiert (Doniwa *et al.* 2010), sind die bisher charakterisierten PPR-Proteine der P-Unterfamilie nicht in den Prozess der RNA-Edierung involviert. Sie sind jedoch an nahezu allen anderen Funktionen des RNA-Metabolismus', wie der Transkription, dem RNA-Spleißen, der RNA-Stabilität und der Translation beteiligt (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Die auf der Grundlage früherer Untersuchungen (Bolle 2008) angenommene Edierungsaktivität der zur P-Unterfamilie gehörenden PPR-Proteine AT1G15480 und DWEORG1 wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Interessanterweise sind jedoch gerade diese beiden Proteine putative Paraloge zum dem einzigen PPR-Proteine der P-Unterfamilie, welches an dem Prozess der RNA-Edierung beteiligt ist (Doniwa *et al.* 2010). Die Ähnlichkeit von AT1G15480 und DWEORG1 zu dem PPR-Protein PPR596 beträgt auf Aminosäureebene 64 % bzw. 43 %. Darüber hinaus ähneln sie sich auch in ihrer, bei PPR-Proteinen seltenen Gen-Struktur mit mehreren Introns. Jedoch wurde die von (Doniwa *et al.* 2010) auf der Basis von vorläufigen Versuchen vermutete Beteiligung von AT1G15480 an der partiellen Edierung der Edierungsposition *rps3eU1344SS* mittels der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SNaPshot-Analysen nicht bestätigt. Basierend auf den phylogenetischen Positionen von PPR596, AT1G15480 und DWEORG1 in *Arabidopsis*, *Oryza* und *Physcomitrella* (O'Toole *et al.* 2008) wird DWEORG1 als das ursprüngliche dieser drei Gene diskutiert, welches im Laufe der Evolution durch Genduplikationen zu der Entstehung der Gene *ppr596* und *at1g15480* führte. Vor diesem Hintergrund hätte sich die Edierungsaktivität von PPR596 erst nach der Duplikation der Gene entwickelt. Allerdings wird noch angezweifelt, ob der Einfluss auf die Edierung von PPR596 tatsächlich auf dem gleichen Mechanismus beruht, wie der von

anderen bereits identifizierten Edierungsfaktoren, oder ob es sich bei den Edierungsdefekten in den untersuchten *knockout* Pflanzen lediglich um Konsequenzen anderer Effekte auf die RNA-Prozessierung handelt (Fujii und Small 2011).

Die Genstruktur der Proteine AT1G15480 und DWEORG1 mit jeweils zwei Introns ist für die Familie der PPR-Proteine selten. Mehr als 80 % sind gänzlich intronlos; lediglich 7 % enthalten mehr als ein Intron (Lurin *et al.* 2004). Da gezeigt wurde, dass gerade evolutionär ältere PPR-Proteine mehr als ein Intron enthalten (O'Toole *et al.* 2008), ist anzunehmen, dass es sich bei *at1g15480* und *dweorg1* um Gene handelt, die sich auch innerhalb der P-Unterfamilie recht früh in der Evolution der Landpflanzen entwickelt haben. Die Positionen der Introns von *at1g15480* und *dweorg1* weisen außerdem die, für intronhaltige PPR-Proteine typische Genstruktur mit nahe dem 5'-Ende gelegenen Introns auf (O'Toole *et al.* 2008; Fujii und Small 2011). Diese Lage der Introns am 5'-Ende ist ein Merkmal intronarmer Eukaryoten (Sakurai *et al.* 2002; Mourier und Jeffares 2003) und bedingt durch den Mechanismus des Intronverlusts durch reverse Transkription. Bei diesem Prozess findet eine homologe Rekombination zwischen einer genomischen Kopie eines Gens und seiner durch reverse Transkription entstandenen intronlosen cDNA statt (Palmer und Logsdon 1991); eine Reaktion, für die bestimmte Retrotransposonen (LINE's, „*long interspersed nuclear elements*“) verantwortlich sind, die in den meisten Eukaryoten vorkommen (Kidwell und Lisch 2001; Weiner 2002).

Bei dem Protein DWEORG1 schließen sich alle neun PPR-Domänen nahezu lückenlos aneinander an, während die insgesamt sieben Domänen des Proteins AT1G15480 in zwei Blöcken mit vier bzw. drei Domänen angeordnet sind (siehe Abbildung 5). Aufgrund der nahezu identischen Genstruktur (siehe Abbildung 6) und der sehr hohen Übereinstimmung im Proteinalignment im Bereich zwischen den Blöcken zu dem entsprechenden Bereich von DWEORG1 (siehe Abbildung 7) ist es nicht ausgeschlossen, dass in diesem Abschnitt auch das Protein AT1G15480 zwei PPR-Domänen aufweist, diese jedoch nicht als solche annotiert sind. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Proteinstrukturmodelle untermauern diese Annahme. Die nicht als PPR-Domänen annotierten Aminosäurebereiche bilden ebenso wie die annotierten PPR-Motive die charakteristischen Strukturen aus (siehe Abbildung 8), bei denen eine PPR-Domäne zwei antiparallel verlaufende Helices bildet. Sich wiederholende Motive innerhalb von Proteinsequenzen wurden bislang in zahlreichen Proteinfamilien gefunden. Zu dieser zusammenfassend als *repeat*-Proteine bezeichneten Gruppe gehören beispielsweise die Ankyrin-, die Armadillo-, die WD40-, und die *Leucin-rich-repeat* Proteine, sowie die den PPR-Proteinen sehr ähnlichen TPR-Proteine (Kobe und Kajava 2001; Main *et al.*

2003; Cortajarena und Regan 2006; Couture *et al.* 2006). Allen diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie aus einer variablen Anzahl sich wiederholender, tandemartig angeordneter, 20 bis 40 Aminosäuren langer Motive bestehen. Wie auch bei den Proteinen AT1G15480 und DWEORG1 und den bisher bekannten 3D-Strukturen anderer PPR-Proteine ergeben sich daraus Proteine mit einer nonglobulären Form und einer daraus resultierenden, vergleichsweise großen Oberfläche. Nicht zuletzt ist es dieses Charakteristikum, welches den *repeat*-Proteinen, wie AT1G15480 und DWEORG1 als Vertreter der PPR-Proteine, optimale Eigenschaften als Bindepartner für Makromoleküle verleiht. Welche Mechanismen der RNA-Bindung von DWEORG1 und PPR-Proteinen im Allgemeinen zugrunde liegen, wird im Abschnitt 4.6 weiterführend diskutiert.

4.2 Ein *knockout* von *at1g15480* und *dweorg1* führt zu unterschiedlichen Phänotypen in *Arabidopsis*

PPR-Proteine sind in eine Vielzahl von Prozessierungsschritten im zellulären RNA-Metabolismus involviert. Aufgrund der hohen Relevanz dieser Abläufe führt das Fehlen auch nur eines einzigen PPR-Proteins häufig zu starken phänotypischen Veränderungen, die in Pflanzen von reduzierten Keimungsraten über Zwergenwachstum und Albinismus, bis hin zur Embryoletalität reichen (Lurin *et al.* 2004; de Longevialle *et al.* 2007; Gutierrez-Marcos *et al.* 2007; Kim *et al.* 2009; Su *et al.* 2012). Diese Effekte treten bereits beim Fehlen einzelner PPR-Proteine auf, weshalb trotz der immensen Größe der Familie der PPR-Proteine davon auszugehen ist, dass untereinander keine funktionelle Redundanz besteht und jedes Protein eine eigene, beschränkte Spezifität besitzt.

Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen von AT1G15480 und DWEORG1 in Pflanzen von *Arabidopsis* zur Ausbildung charakteristischer Phänotypen führt. Hierbei wurde für DWEORG1-Mutanten ein Phänotyp beobachtet, der sich durch ein im Vergleich zum Wildtyp stark beeinträchtigtes Wachstum auszeichnet (Abbildung 17 B und C). Dieses verzögerte Wachstum betrifft sowohl das vegetative als auch das generative Wachstum und bleibt während der gesamten Entwicklung der Pflanze bestehen. Des Weiteren ist bei DWEORG1-Mutanten auch die Keimungsrate und die Bildung von Lateralwurzeln verringert (Abbildung 16 und Abbildung 19 A und B). Derartige morphologische Veränderungen treten häufig bei Mutanten auf, bei denen Gene von, für die mitochondrialen Funktionen essentielle Proteine, ausgeschaltet wurden (Doniwa *et al.* 2010; Sung *et al.* 2010; Hammani *et al.* 2011a). Häufig sind diese Proteine direkt in die mitochondriale Elektronentransportkette involviert

(de Longevialle *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2009). Dies wurde auch für DWEORG1 bestätigt und wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Der Phänotyp der *at1g15480 knockout* Pflanzen zeichnet sich durch eine früher eintretende Infloreszenzbildung aus (siehe Abbildung 17), während Keimungsrate, Samenfertilität und Wurzelmorphologie nicht beeinträchtigt sind. Erst kürzlich wurde mit dem Protein EFS1 (*early flowering in short days*) ein weiteres PPR-Protein beschrieben, welches eine Rolle im Prozess der Blütenbildung spielt. In Übereinstimmungen mit Ergebnissen dieser Arbeit für das Protein AT1G15480 entwickeln Mutanten für das Gen *efs1* etwa zehn bis 15 Tage früher die ersten Infloreszenzen, verglichen mit dem Wildtyp (Zhang *et al.* 2011). Allerdings sind die Mechanismen, über die PPR-Proteine Einfluss auf die verfrühte Blütenentwicklung haben könnten, bislang nicht bekannt. Denkbar wäre eine Funktion als Repressor, der für die zeitliche Abstimmung der Blühinduktion innerhalb des gesamten Entwicklungsprozesses verantwortlich ist. Einen Einfluss auf die photoperiodische Bildung von Blüten hat offensichtlich auch das einzig bekannte zirkadian regulierte PPR-Protein AtC401 (Oguchi *et al.* 2004). Es enthält zwölf PPR-Domänen und zeigt Proteinkinase-Aktivität. Weiterführende Aussagen über die genaue Funktion des PPR-Proteins AtC401 für die Blütenentwicklung werden jedoch nicht gemacht, so dass es aktuell noch keinen Anhaltspunkt gibt, wie PPR-Proteine in diesen Entwicklungsprozess involviert sind. Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der Tatsache, dass der Prozess der Blütenbildung überaus komplex ist und über fünf verschiedene Wege kontrolliert wird (Srikanth und Schmid 2011) erschien eine Fokussierung in dieser Arbeit auf das Protein DWEROG1 erfolgsversprechender. Der von den entsprechenden Mutanten gezeigte Phänotyp ließ hier bereits die ersten Rückschlüsse auf eine essentielle Funktion in den Mitochondrien und möglicherweise in der Atmungskette zu. Diese werden in den folgenden Abschnitten 4.3 und 4.5 diskutiert.

Im Gegensatz zu den Phänotypen von Mutanten für PPR-Proteine, die in Prozesse abseits der RNA-Edierung involviert sind und in der Regel drastische Phänotypen zeigen (Schmitz-Linneweber und Small 2008), ist dies für Mutanten von PPR-Proteinen, die eine Rolle in der Edierung spielen, bemerkenswerterweise überaus selten. Von den mitochondrialen Edierungsfaktoren *mef1*, *mef9*, *mef11*, *mef14* und *mef18* bis *mef22* zeigt keine Mutante einen offensichtlich veränderten Phänotyp (Zehrmann *et al.* 2009; Takenaka *et al.* 2010; Verbitskiy *et al.* 2010; Verbitskiy *et al.* 2011). Als Erklärung wird einerseits angeführt, dass bei der Identifizierung von *mef18* bis *mef22* mittels Reverser Genetik auf gesunde und robuste, homozygote T-DNA Insertionslinien selektiert wurde (Takenaka *et al.* 2010). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass auch in den *knockout* Mutanten korrekt edierte Transkripte

vorhanden sind, die unterhalb der Detektionsgrenze liegen, aber ausreichend sind, um die mitochondriale Funktion zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu reicht offensichtlich die in dieser Arbeit gezeigte, zwar deutlich verringerte, aber in geringen Mengen noch vorhandene Menge an COX2-Protein nicht aus, um die Atmungskette soweit aufrechtzuerhalten, dass das Wachstum der DWEORG1-Mutanten nicht beeinträchtigt wird.

4.3 Der Verlust von DWEORG1 führt zu Veränderungen im mitochondrialen Proteom

Die Bindung von DWEORG1 an das *cox2*-Transkript (Bolle 2008; Knittler 2011), die mitochondriale Lokalisation und der stark ausgeprägte, für mitochondriale Dysfunktionen charakteristische Phänotyp sprechen für einen Defekt in wesentlichen Prozessen der Genexpression von COX2. Die Analyse mitochondrialer Proteine der DWEORG1-Mutante bestätigte dies, nachdem zuvor ein Einfluss auf die Menge, die Stabilität und den Edierungsstatus der *cox2*-RNA ausgeschlossen wurde (siehe Abschnitt 3.6 und 3.7.). Die mittels Western-Blot gezeigte, stark verringerte Menge an COX2-Protein geht konform mit dem beobachteten Phänotyp der DWEORG1-Mutanten. Auch in anderen Organismen sind zahlreiche charakteristische Phänotypen und Auswirkungen bekannt, die auf Veränderungen in der Cytochrom-c-Oxidase Biogenese zurückzuführen sind, wie beispielsweise die Wachstumsveränderungen der NCS5-Mutante beim Mais (Newton *et al.* 1990), der SLO2-Mutante bei *Arabidopsis* (Zhu *et al.* 2012) oder der COX-VII Mutante der Hefe (Aggeler und Capaldi 1990). Beim Menschen kann ein Mangel an Cytochrom-c-Oxidase unter anderem zu Myopathien, der Ausbildung des Leigh-Syndroms oder einer Alzheimer-Erkrankung führen (Borisov 2004; Rötig *et al.* 2004).

Aufgrund der begrenzten Anzahl verfügbarer, gegen mitochondriale Proteine gerichteter Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit außerdem eindimensionale Blue Native- und zweidimensionale Blue Native/SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. Diese zeigten, dass mit dem Komplex II eine weitere Komponente der mitochondrialen Atmungskette in DWEORG1-Mutanten betroffen ist. Durch die zweidimensionale Auftrennung mitochondrialer Proteine konnte allerdings nicht näher bestimmt werden, ob nur einzelne der insgesamt acht Untereinheiten und wenn ja, welche genau betroffen sind. Insgesamt konnten zwar sowohl im Wildtyp, als auch in der DWEORG1-Mutante diverse Proteine verschiedener Komplexe der Oxidativen Phosphorylierung identifiziert werden, jedoch sind quantitative Aussagen über einzelne Proteine aufgrund der dafür wenig geeigneten Silberfärbung der Gele nicht möglich. Die Färbung mit Coomassie-Blau bietet zwar den Vorteil der Quantifizierung, ist jedoch weniger sensitiv und lieferte bei Versuchen in dieser Arbeit keine zufriedenstellenden

Ergebnisse, die auch durch die Verwendung größerer Mengen an mitochondrialem Protein nicht zu verbessern waren. Somit war eine Quantifizierung mittels dafür geeigneter Programme, die über errechnete Volumenwerte einzelner Spots Aussagen über Veränderungen der Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp ermöglichen, ausgeschlossen.

Dieser Arbeit vorrausgehende Untersuchungen zeigten, dass auch die Alternative Oxidase (AOX) in DWEORG1-Mutanten in ihrer Expression beeinflusst wird (Schmidt 2010). Im Gegensatz zu einer verminderten Menge an COX2 und Proteinen des Komplex' II ist die AOX-Menge in DWEORG1-Mutanten weitaus höher als im Wildtyp. Somit sind dort insgesamt drei wesentliche Komponenten der mitochondrialen Atmungskette unmittelbar betroffen, weswegen DWEORG1 einen essentiellen Faktor für die Funktionalität der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien darstellt.

4.3.1 Die Bedeutung von DWEORG1 für die mitochondriale Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung läuft an der inneren Membran der Mitochondrien ab und wird von mehreren Proteinkomplexen gesteuert. Vier Multienzymkomplexe, die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), die Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), die Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV), bauen dabei über die Membran einen elektrochemischen Protonengradienten auf, welcher von der ATP-Synthase (Komplex V) zur Synthese von ATP genutzt wird (Hatefi 1985). Pflanzen besitzen zusätzlich zu diesen Enzymkomplexen noch eine weitere Komponente, die AOX. Anstatt auf Komplex III und Komplex IV können Elektronen auch über die AOX abgeleitet werden. Da auf diesem Wege allerdings kein Protonengradient aufgebaut wird, wird Energie nicht in Form von ATP gespeichert, sondern in Form von Wärme abgegeben (Siedow und Umbach 1995; Finnegan *et al.* 2004). Die AOX wird bei einem bestimmten Reduktionsgrad des Ubichinons aktiviert und stabilisiert durch das Ableiten von Elektronen den Redoxzustand des Ubichinon-Pools und somit der gesamten Atmungskette (Millenaar *et al.* 1998). Damit fungiert sie als alternativer Elektronenträger, welcher die Überreduktion der mitochondrialen Elektronentransportkette verhindert und die Zelle vor der Entstehung von oxidativem Stress schützt (Lambers 1982; Maxwell *et al.* 1999).

Die stark verringerte Menge von COX2, eine der insgesamt 14 Untereinheiten des Komplexes IV, der Cytochrom-c-Oxidase, führt in DWEORG1 Mutanten zu einem Verlust der Aktivität des gesamten Komplexes, wie in spektrophotometrischen Untersuchungen gezeigt

wurde (Abbildung 31). Zwar wurden für die Versuche nicht die reine Cytochrom-c-Oxidase verwendet, sondern isolierte Mitochondrien, die weitere Enzyme und redoxaktive Proteine enthalten, jedoch zeigt ein Vergleich der Versuche mit Mitochondrien des Wildtyps und mit denaturierten mitochondrialen Proteinen, dass die Reduktionsfähigkeit in Mitochondrien von DWEORG1 Mutanten deutlich vermindert ist. Somit ist die Cytochrom-c-Oxidase abhängige Respiration stark eingeschränkt, was in der Zelle schnell zu einer Überreduktion des Ubichinon-Pools führt. Um diesem Vorgang entgegenzuwirken, wird die Expression von der AOX gesteigert, so dass der funktionelle Verlust der einen terminalen Oxidase durch die Redoxaktivität der anderen terminalen Oxidase ausgeglichen wird. Diese erhöhte Expression der AOX in DWEORG1 Mutanten wurde von Schmidt (2010) gezeigt und ist sehr wahrscheinlich kein primärer Effekt des *dweorg1 knockouts*, sondern Konsequenz der eingeschränkten Funktion der Cytochrom-c-Oxidase. Dieser Zusammenhang wurde auch in Tabak (Vanlerberghe und McIntosh 1992; Vanlerberghe und McIntosh 1994) und in *Arabidopsis* Pflanzen beobachtet, bei denen Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase runterreguliert sind (Robison *et al.* 2009). Aufgrund des Umschaltens vom Cytochrom-Weg zum alternativen respiratorischen Weg wird keine protonenmotorische Kraft über die Mitochondrienmembran aufgebaut und es kommt zu einer eingeschränkten ATP-Produktion der ATP-Synthase. Dieser Mangel an ATP ist sehr wahrscheinlich der Grund für das stark eingeschränkte Wachstum der DWEORG1 Mutanten. *Arabidopsis*-Mutanten für die Gene *slg1* und *slo2*, die beide für ein mitochondrial lokalisiertes PPR-Protein codieren, zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp wie DWEORG1-Mutanten, und ATP-Messungen ergaben jeweils einen stark verringerten ATP-Gehalt in den Pflanzen verglichen zum Wildtyp (Yuan und Liu 2012; Zhu *et al.* 2012). Auch in Mutanten von *Podospora anserina* führten Störungen des Cytochrom-Wegs zu einem starken Anstieg der AOX-Expression und zu eingeschränktem Wachstum (Scheckhuber *et al.* 2011), während in *Arabidopsis* ein alleiniger Anstieg der Menge an AOX ohne Veränderungen des Cytochrom-c-Oxidase Gehalts keine Effekte auf den Phänotyp hat (Fiorani *et al.* 2005).

In Anbetracht der Tatsache, dass Entwicklungsprozesse wie beispielsweise die Pollen- und Samenbildung, sowie die Keimung strikt von der mitochondrialen Energieversorgung abhängig sind (De Paepe *et al.* 1993; Bewley 1997), ist es erstaunlich, dass *dweorg1*-Pflanzen in den entsprechenden Entwicklungsphasen nur unwesentlich beeinträchtigt sind. Zwar sind Keimungsfähigkeit und die Entwicklung von Lateralwurzeln eingeschränkt, jedoch sind diese Phänotypen nur gering ausgeprägt. Die Effekte einer Verringerung der COX-Aktivität auf die Atmungskette sind vergleichbar mit denen in Pflanzen mit eingeschränkter Funktion der mitochondrialen ATP-Synthase (Robison *et al.* 2009). Während allerdings Mutationen

einzelner Untereinheiten oder Komponenten der ATP-Synthase und der daraus resultierende, stark verringerte ATP-Gehalt häufig zur Entwicklung eines CMS-Phänotypen mit der Unfähigkeit fertile Pollen zu bilden (Hanson und Bentolila 2004) oder einer Letalität führt (Moore *et al.* 2003), sind die Pollen der *dweorg1*- Pflanzen uneingeschränkt fertil und die Antheren normal entwickelt (3.4.3.). Da die Fertilität einer Pflanze maßgeblich von Bedeutung ist, werden möglicherweise die hierfür notwendigen zellulären Vorgänge vorrangig mit Energie versorgt. Die Aufrechterhaltung der für die Fertilität essentiellen Systeme wäre dann als letztes von einer ATP-Limitierung betroffen und die Fortpflanzung damit gesichert. Die Tatsache, dass die Expression von COX2 nicht komplett ausgeschaltet ist und die Atmungskette somit noch zu einer – wenn auch wahrscheinlich geringeren- ATP-Produktion, befähigt ist, spricht für die Theorie, dass ein gewisser Grenzwert unterschritten sein muss, damit sich die Defekte in der Energieversorgung auf fortpflanzungsrelevante Organe auswirken.

Wie BN-PAGE Analysen zeigten, ist neben dem Komplex IV auch der Komplex II, die Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase, in *dweorg1* Mutanten betroffen. Die Menge dieses Komplexes ist im Vergleich zum Wildtyp erheblich reduziert (Abbildung 32). Ob nur einzelne der insgesamt acht Untereinheiten oder mehrere gleichzeitig von der Reduktion betroffen sind, ließ sich aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von Antikörpern nicht näher bestimmen. Der Komplex II überträgt Elektronen von FADH₂, das im Citratzyklus entsteht, auf das Ubichinon in der Atmungskette, von wo die Elektronen dann auf den Komplex III, die Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase, übertragen werden. Ist der Komplex II funktionell gestört, oder wie in *dweorg1* Pflanzen in seiner Menge reduziert, wäre zu erwarten, dass der Elektronenfluss nur eingeschränkt ablaufen kann und sich ein Großteil des Ubichinonpools im oxidierten Zustand befindet. Dagegen spricht jedoch die in *dweorg1* Pflanzen nachgewiesene stark erhöhte Expression der AOX (Schmidt 2010), die durch eine Überreduktion des Ubichinons induziert wird (Millenaar *et al.* 1998) und die Zelle vor der Entstehung von oxidativem Stress schützt (Lambers 1982; Maxwell *et al.* 1999). Bei einer gleichzeitigen reduzierten Menge an Komplex II und Komplex IV wäre eine erhöhte AOX-Aktivität nicht nötig, da bereits die verringerte Aktivität von Komplex II den Elektronenfluss limitieren würde und eine durch die ebenfalls verringerte Aktivität des Komplex' IV bedingte Überreduktion des Ubichinonpools verhindert würde. In diesem Falle ließe sich die gesteigerte Expression der AOX nur dadurch erklären, dass die Reduktionsaktivität des Komplex' IV weitaus stärker ist, als die Limitierung der Elektronenzufuhr auf das Ubichinon durch den Komplex II und somit auch trotz verminderter Aktivität der Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase ein Elektronenstau bei der Übertragung der Elektronen von Komplex III auf Komplex IV entsteht.

Eine weitere und gleichsam plausiblere Erklärung liefert die Annahme, dass es sich bei der Reduktion des Komplex' II nicht um einen primären Effekt des *dweorg1 knockouts* handelt, sondern möglicherweise um eine Reaktion der Zelle, um zusätzlich zum Elektronenabfluss über die AOX der Überreduktion der Atmungskette und der Entstehung von ROS entgegenzuwirken. In CYTc- Mutanten von *Arabidopsis*, bei denen das Gen für das Cytochrom c funktionell zerstört wurde, wurde ebenfalls eine leichte Verringerung des Komplex' II bei gleichzeitiger, starker Instabilität des Komplex' IV beobachtet (Welchen *et al.* 2012). In der Annahme, dass in *dweorg1* Pflanzen die ATP-Synthese der oxidativen Phosphorylierung eingeschränkt ist, spielt bei der verringerten Menge der Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase möglicherweise auch die eingeschränkte, allosterische Aktivierung des Komplex II durch ATP (Huang *et al.* 2010) eine Rolle.

4.4 DWEORG1, ein Regulator der mitochondrialen ROS Homöostase?

Neben der Bedeutung für die Atmungskette spielt der mitochondriale Komplex II auch eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von ROS und der damit verbundenen Regulierung von stress- und abwehrassoziierten Genen (Gleason *et al.* 2011). Es wurde gezeigt, dass *dsr1*- Mutanten von *Arabidopsis*, bei denen das Gen für die Untereinheit SDH1-1 des Komplex' II ausgeschaltet wurde, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Rhizoctonia solani*, dem virulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und dem Pilzpathogen *Alternaria brassiciola* besteht. Dieser Effekt wird auf die ebenfalls in *dsr1*- Mutanten beobachtete verminderte Produktion von mitochondrialen ROS (mROS) zurückgeführt, da mROS über verschiedene Mechanismen direkt oder als Signalgeber an der Pathogenabwehr beteiligt sind (Mellersh *et al.* 2002; Huckelhoven 2007; Kumar *et al.* 2009). Die Tatsache, dass in *dweorg1*-Pflanzen nicht nur die Atmungskette und der Komplex II und IV, sondern damit verbunden mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Produktion von mROS erheblich beeinträchtigt ist, könnte die Erklärung liefern, weshalb bisher vielfach eine Transkriptionsänderung des *dweorg1*- Gens als Antwort auf verschiedene Pflanzenpathogene festgestellt wurde. Eine Änderung auf Transkriptebene von *dweorg1* wurde nach der Infektion mit Geminiviren (Ascencio-Ibanez *et al.* 2008), mit dem Wurzelknöllchensymbionten *Bradyrhizobium* und dem virulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Cartieaux *et al.* 2008) sowie mit dem biotrophen Pilz *Golovinomyces orontii* (Chandran *et al.* 2010) beobachtet. In Übereinstimmung mit den Effekten auf die Pathogenabwehr in *dsr1*- Mutanten sprechen diese Ergebnisse auch für die Beteiligung von DWEORG1 an der mROS-Produktion und den damit assoziierten Prozessen. Aufgrund einer reduzierten

Respiration in den Mitochondrien wird möglicherweise durch eine erhöhte mROS-Produktion ein permanenter Stress in der Zelle erzeugt, der dann als Signalgeber für die Einleitung verschiedener Abwehrreaktion sorgt. Die Lokalisation von DWEORG1 in den Mitochondrien, die Bedeutung für die Funktionalität der Komplexe II und IV, sowie die von Schmidt (2010) in *dweorg1*- Mutanten gezeigte stark erhöhte Expression der AOX, die als Marker für eine mitochondriale, retrograde Antwort in Pflanzen gilt (Maxwell *et al.* 1999), sprechen für eine Funktion von DWEORG1 in der Regulation der mitochondrialen ROS Homöostase; wahrscheinlich im Zusammenhang mit abiotischem und biotischem Stress. Eine Funktion in der Abwehr und/oder der Stresstoleranz, sowie der damit verbundenen retrograden Signalgebung wurde bisher nur für wenige PPR-Proteine gezeigt. Hierzu gehört GUN1, ein chloroplastidäres PPR-Protein, welches unter Anderem in die retrograde Signalweiterleitung und die Antwort auf photooxidativen Stress involviert ist (Cottage *et al.* 2008; Cottage *et al.* 2010), das mitochondriale Protein PPR40, das als funktioneller Link zwischen dem mitochondrialen Elektronentransport und der Stressantwort auf abiotische Faktoren agiert (Zsigmond *et al.* 2008), sowie das ebenfalls in den Mitochondrien lokalisierte Protein PGN (Laluk *et al.* 2011). Neben einer stark erhöhten Sensitivität von *pgn*-Mutanten gegenüber nekrotrophen Infektionen ist außerdem, ähnlich zu den *dweorg1*-Mutanten, die Expression diverser, für den Elektronentransport relevanter Gene beeinflusst. Darunter auch COX2 und einige Untereinheiten der AOX. Der Effekt der *pgn*-Mutation auf den mROS-Metabolismus wurde darüber hinaus mittels eines histochemischen Nachweises von Wasserstoffperoxid in Keimlingen bestätigt. Diese experimentelle Bestätigung der veränderten mROS-Homöostase steht für die *dweorg1*- Mutante noch aus, würde aber wichtige Hinweise auf die Funktion von DWEORG1 geben. Diese liegt möglicherweise in einer Regulation der stressinduzierten Expression von Transkripten, die für die Aufrechterhaltung und Anpassung der mROS-Homöostase verantwortlich sind. Die in *dweorg1*-Mutanten veränderten Expressionen der für die Atmungskette relevanten Proteine, wie der AOX, sowie von Bestandteilen des Komplex' II und IV ließen sich dann durch eine durch die Abwesenheit von DWEORG1 bedingte Fehlregulation des mROS-Metabolismus' erklären.

4.5 Die Funktion von DWEORG1 im mitochondrialen RNA-Metabolismus

PPR-Proteine sind in Pflanzen in eine Vielzahl von Prozessen des RNA-Metabolismus' involviert. Auch Proteine, die wie DWEORG1 an der Translation beteiligt sind, wurden bereits charakterisiert. Hierzu zählt zum Beispiel das Protein CRP1, welches in den Chloroplasten für die Translation der *petA* mRNA notwendig ist und diese durch die Bindung an der 5'-UTR der Ziel-RNA aktiviert und reguliert (Schmitz-Linneweber *et al.* 2005). Übereinstimmend mit den

Ergebnissen dieser Arbeit, in der gezeigt wurde, dass in *dweorg1*-Mutanten die Bindung der *cox2*-mRNA an die Polysomen beeinträchtigt ist, wurde auch für weitere PPR-Proteine die Beteiligung an der Translation in Verbindung mit einer Polysomenassoziation beschrieben (Barkan 1993; Uyttewaal *et al.* 2008; Hammani *et al.* 2011a). Zumindest in Chloroplasten erfüllen dabei die PPR-Proteine häufig eine duale Funktion: die der Translationsaktivierung und die der RNA-Stabilisierung (Stern *et al.* 2010). Für die Erfüllung beider Funktionen sorgt die Fähigkeit der PPR-Proteine, sowohl als sequenzspezifische Barriere gegen Nukleasen zu agieren, als auch die Befähigung, RNA-Moleküle zu remodellieren und so auf die Genexpression Einfluss zu nehmen (Prikryl *et al.* 2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in *dweorg1*-Pflanzen die Translation von *cox2* zwar erheblich beeinträchtigt ist, die Menge an Transkript, ebenso wie die weitere Prozessierung allerdings unbeeinflusst blieb. Eine auf die Translation beschränkte Funktion ohne Beteiligung an der Transkription und/oder der Stabilität wurde auch für das PPR-Protein PTCD3 gezeigt, welches in Mitochondrien von Säugetieren vorkommt und dort mit der kleinen Untereinheit der Ribosomen assoziiert ist (Davies *et al.* 2009). Ein *knockout* des entsprechenden Gens bewirkt eine deutlich niedrigere Expression mehrerer mitochondrial codierter Proteine, sowie eine deutlich verringerte Aktivität der Komplexe III und IV und eine niedrigere Respirationsrate ohne eine Beeinflussung der entsprechenden Transkripte. Die genaue Funktion von PTCD3 für den RNA-Metabolismus ist nicht geklärt. In Anbetracht der in *dweorg1*-Mutanten verringerten Bindung der *cox2* mRNA an die Polysomen handelt es sich bei DWEORG1 ähnlich wie bei PTCD3 möglicherweise um einen ribosomenassoziierten Aktivator oder Regulator, der für eine korrekte und effiziente Translation verantwortlich ist. Auch denkbar ist die Funktion als RNA-bindendes Protein, welches mit bestimmten Sequenzen der Ziel-RNA interagiert, diese eventuell strukturell modifiziert, um dann die Ribosomen für die Translation zu rekrutieren. Eine derartige Modellierung der Struktur der Ziel-RNA, die zu einer Aktivierung der Translation führt, wurde bereits für das Protein PPR10 gezeigt (Prikryl *et al.* 2011). Für die Bindung und die strukturellen Modifikationen spielen die PPR-Domänen eine wesentliche Rolle (siehe hierzu auch Abschnitt 4.6). Die Bindung von PPR10 erfolgt unmittelbar in der Nähe der Shine-Dalgarno-Sequenz, einem Sequenzabschnitt, der als ribosomale Bindestelle dient, allerdings nicht in Mitochondrien vorkommt. Möglicherweise erfüllen aber konservierte Bereiche mit bisher unbekanntem Funktionen im 5'-Bereich mitochondrialer Transkripte in höheren Pflanzen (Pring *et al.* 1992) eine ähnliche Funktion. Eine Bindung an die 5'-UTR der chloroplastidären *petL* mRNA wurde auch für das zur P-Unterfamilie gehörende PPR-Protein PGR3 nachgewiesen (Cai *et al.* 2011). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für DWEORG1 wurde außerdem gezeigt, dass die Polysomenassoziation des *petL* Transkripts in

pgr3-3 Mutanten beeinträchtigt ist (Cai *et al.* 2011). Das Protein PGR3 ist somit für die Aktivierung der *petL* Translation verantwortlich ist, ohne einen Einfluss auf die Prozessierung oder die Abundanz des *petL* Transkripts zu haben (Yamazaki *et al.* 2004).

Da die mitochondriale Genexpression zum großen Teil auf Ebene der Translation gesteuert wird (Giegé *et al.* 2005), sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass es sich bei DWEORG1 um einen Teil eines Komplexes zur Reifung des *cox2* Transkripts handelt, der zusammen mit anderen, bisher unbekanntem Faktoren für die Bindung der mRNA an die Polysomen und die Steuerung des Translationsprozesses verantwortlich ist. Leider ist bislang kein Antikörper gegen DWEORG1 verfügbar, so dass eine direkte Assoziation mit den Polysomen, wie sie bereits für andere PPR-Proteine gezeigt wurde (Uyttewaal *et al.* 2008; Hammani *et al.* 2011a) nicht bestätigt werden konnte. Ein Nachweis der Bindung von DWEORG1 an die Polysomen könnte wichtige Hinweise darauf geben, welchen Einfluss das Protein auf die Translation hat und welche Mechanismen dieser Steuerung zugrunde liegen. Aktuell bleibt somit die Frage bestehen, ob DWEORG1 als polysomenassoziiertes Protein indirekt als ein Teil eines großen RNA-Reifungskomplexes agiert oder ob es direkt mit der Translationsmaschinerie interagiert.

4.6 Wie erkennt und bindet DWEORG1 seine(n) Liganden?

Die Bindung von DWEORG1 an ein 40 Nukleotide langes Teilstück des ersten Exons der *Arabidopsis cox2*-Sequenz wurde mehrfach unter Anwendung verschiedener experimenteller Ansätze nachgewiesen (Bolle 2008; Knittler 2011). Trotz dieser Bindung an die putative *cis*-Sequenz einer Edierungsposition konnte für das DWEORG1-Protein keine Beteiligung an der Edierung nachgewiesen werden. Daher stellt sich die Frage, weshalb DWEORG1 innerhalb dieses Sequenzbereichs bindet und welche Abschnitte als Erkennungsmotive fungieren. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, wie die Bindung von PPR-Proteinen an ihre(n) Liganden erfolgt.

Über den Mechanismus, wie PPR-Proteine ihre Ziel-RNA erkennen und welche Nukleotide oder Sequenzbereiche hierfür notwendig sind, ist bislang wenig bekannt. Für diverse PPR-Proteine, wie beispielsweise die plastidär lokalisierten Proteine CRP1, PPR4 und PPR5 aus Mais wurden RNA-Liganden mittels Immunopräzipitation und anschließender Analyse der gebundenen RNA biochemisch identifiziert (Schmitz-Linneweber *et al.* 2005; Schmitz-Linneweber *et al.* 2006; Beick *et al.* 2008). Hierbei wurde gezeigt, dass die Bindung von CRP1 im Bereich des 5'-UTR's, die Bindung von PPR4 und PPR5 an Introns der Ziel-RNA erfolgt.

Jedoch scheinen keine nachweisbaren Gemeinsamkeiten in der Sequenz oder der sekundären Struktur der Ziel-RNA zu bestehen. Auch für PPR-Proteine, die in die RNA-Edierung involviert sind, wurde bisher kein allgemeingültiges Erkennungsmotiv identifiziert. Allerdings wurden für einzelne PPR-Proteine mit multiplen Ziel-RNAs übereinstimmende Sequenzen gefunden, die für die Erkennung dieser eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. So wurden für OTP87 *cis*-Elemente mit insgesamt 14 identischen Nukleotiden identifiziert, die für die Bindung an zwei verschiedenen Edierungspositionen in den Genen *nad7* und *atp1* ausreichend sind (Hammani *et al.* 2011a). Und auch die PPR-Proteine LOI1 und SLO1 sind in der Lage, mehrere Edierungsstellen zu erkennen, die in den Bereichen -25/+3 um das zu edierende Cytidin eine hohe Nukleotididentität aufweisen (Sung *et al.* 2010; Tang *et al.* 2010; Verbitskiy *et al.* 2010). Die Frage, weshalb DWEORG1, als ein in die Translation von *cox2* involvierter Faktor, an einen Sequenzbereich bindet, der innerhalb des codierenden Abschnitts des Gens liegt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht hinreichend beantwortet werden. Von den bisher bekannten, als Translationsaktivatoren wirkenden PPR-Proteine ist bekannt, dass diese vorrangig an regulatorische Bereiche innerhalb der 5'-UTR binden, wo sie vermutlich gemeinsam daran beteiligt sind, das Genprodukt zu seinem Bestimmungsort in den Mitochondrien zu leiten (Zerges 2000). Für das PPR-Protein PPR10, welches unter anderem an der Translationsaktivierung beteiligt ist, wurde gezeigt, dass es an verschiedenen Regionen zwischen zwei Genen bindet und dort durch eine Modellierung der Sekundärstruktur Einfluss auf Stabilität und Translation der jeweiligen Transkripte hat (Prikryl *et al.* 2011). Vermutlich wirkt DWEORG1 über ähnliche Mechanismen, wobei eine Bindung an weitere Sequenzbereiche noch zu bestätigen ist. Bislang wurde eine Bindung lediglich für ein 40 Nukleotid-langes Fragment mit den putativen *cis*-Elementen einer *cox2*-Edierungsposition bewiesen (Bolle 2008; Knittler 2011). Bei Versuchen mit einer mittels *in vitro* Transkription synthetisierten RNA bestehend aus der *cox2* 5'-UTR von *Arabidopsis*, dem Exon1, dem Intron und dem Exon2 der *cox2*-Sequenz aus *Zea mays*, sowie der 3'-UTR aus *Arabidopsis* wurde allerdings keine Bindung des heterolog expremierten DWEORG1 bestätigt. Dieses Ergebnis schließt eine Bindung von DWEORG1 an regulatorische Elemente allerdings nicht aus. Sequenzunterschiede im *cox2*-Gen von *Arabidopsis* und Mais, welche möglicherweise auch die Bildung der korrekten Sekundärstruktur verhindern, sowie eine fehlende posttranskriptionale Prozessierung des *in vitro* hergestellten Transkripts, beeinträchtigen eventuell die Möglichkeit zur Erkennung und Bindung von DWEORG1 an die Ziel-RNA (Knittler 2011). Weiterführende Versuche mit verschiedenen *cox2*-Transkripten könnten hier Aufschluss über die Erkennungssequenzen von DWEORG1 geben.

Nach aktuellem Stand wird davon ausgegangen, dass mindestens zwei PPR-Domänen für die Bindung eines RNA-Moleküls notwendig sind, wobei die Affinität mit der Anzahl der PPR-Domänen steigt (Nakamura et al. 2003; Kobayashi et al. 2011). Die für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren befinden sich bisherigen Studien zufolge im Bereich des Übergangs zweier benachbarter PPR-Domänen (Small und Peeters 2000; Stern et al. 2004; Fujii et al. 2011; Kobayashi et al. 2011). Diese fünf, nach (Kobayashi *et al.* 2011) für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren wurden mittels bioinformatischer Analysen im Rahmen dieser Arbeit auch in den Proteinen AT1G15480 und DWEORG1 übereinstimmend als RNA-bindend klassifiziert. Ihre im 3D-Modell gezeigte, nach außen gerichtete Orientierung und lineare Anordnung der Aminosäurereste begünstigen eine gemeinsame Erkennung und/oder Bindung des Zielliganden an das PPR-Protein. In der Abbildung 38 sind die PPR-Domänen P3 und P4 des Proteins DWEORG1 aus der Abbildung 8 A, Abschnitt 3.1.2 vergrößert dargestellt und die fünf Aminosäuren, die möglicherweise in die Bindung des Proteins an den RNA-Liganden involviert sind, hervorgehoben und nummeriert (Kobayashi *et al.* 2011).

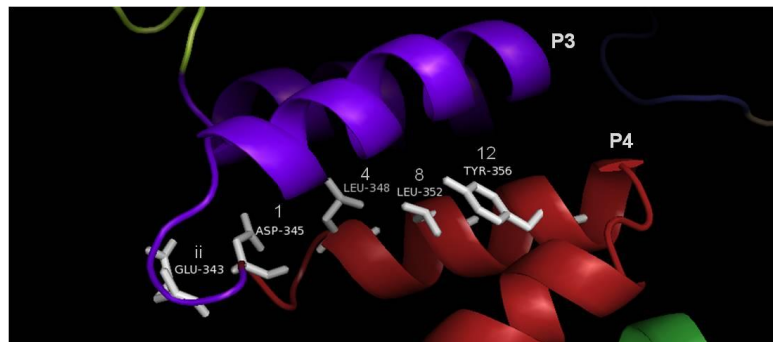


Abbildung 38: Vergrößerte Darstellung der PPR Domänen P3 und P4 des Proteins DWEORG1. Die Seitenketten der Aminosäuren, die möglicherweise an der RNA Interaktion beteiligt sind (Kobayashi *et al.* 2011), sind als weiße *sticks* dargestellt, entsprechend nummeriert und mit dem jeweiligen Dreibuchstabencode versehen. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL erstellt.

Nach (Kobayashi *et al.* 2011) sind für die Bindung eines PPR-Proteins an seinen Liganden die Aminosäuren „ii“, 1, 4, 8 und 12 verantwortlich, die auf zwei aneinander angrenzende PPR-Motive verteilt sind. Wie postuliert, liegen auch im Falle der PPR-Domänen P3 und P4 des Proteins AT3G15590 die genannten Aminosäuren nach außen gerichtet in einer Linie, was eine gemeinsame Erkennung und/oder Bindung eines Makromoleküls begünstigt. Bei den Aminosäuren handelt es sich um Glutamat, Aspartat, Leucin und Tyrosin. Somit handelt es sich um Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften in Bezug auf Polarität und pK-Wert. Nach (Kobayashi *et al.* 2011) hängt die Affinität der Aminosäure zu ihrem Liganden

maßgeblich von den Eigenschaften der Aminosäuren ab. Eine allgemeingültige Regel für die Bindungsaktivität lässt sich nicht ableiten, jedoch scheinen saure Aminosäuren in Kombination mit basischen oder neutralen Aminosäuren die Bindung zu begünstigen (Kobayashi *et al.* 2011).

Bei den Zielliganden von PPR-Proteinen handelt es sich vermutlich nicht nur um RNA-Moleküle, sondern auch um weitere Proteine, die zusammen mit den PPR-Proteinen in einem Komplex an der Prozessierung beteiligt sind. Dass die gleiche Faltung und gleiche, sich wiederholende Motife unterschiedliche Liganden binden können, wurde bereits für mehrere *repeat*-Proteine gezeigt. So sind beispielsweise die 16 bis 28 *Leucin-rich-repeat* Domänen des *Toll-like* Rezeptors von Säugetieren in der Lage, sowohl Proteine, Lipoproteine und Lipopeptide, als auch Nukleinsäuren zu binden (Gay und Gangloff 2007). Bislang ist nicht geklärt, ob und wie PPR-Proteine in die Rekrutierung von RNA-Prozessierungsfaktoren beteiligt sind. Denkbar ist die Bildung eines ternären Komplexes, ähnlich dem des *CSL-Notch-Mastermind*-Komplexes des *Notch*-Signalweges (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999). Hier bindet das NotchIC-Rezeptorprotein über seine insgesamt sieben, in Tandems angeordnete Ankyrin-Motive an den DNA-bindenden Transkriptionsfaktor CSL, wodurch wiederum erst die Bindung des Transkriptions-Coaktivators *Mastermind* ermöglicht wird (Nam *et al.* 2006; Wilson und Kovall 2006). Dieser Coaktivator erkennt also nur einen Komplex aus NotchIC und CSL und nicht die Einzelproteine. Möglicherweise werden derartige ternäre Komplexe auch bei der Regulation der Genexpression durch PPR-Proteine gebildet. Eine durch die Bindung von PPR-Proteinen verursachte Veränderung der Sekundärstruktur, wie für PPR10 gezeigt (Prikryl *et al.* 2011), könnte die Voraussetzung für eine Assoziation weiterer Cofaktoren sein, wodurch dann ein prozessierungsaktiver Komplex entsteht. Die Fähigkeit zur Bindung multipler RNA-Sequenzen und eventuell sogar von Proteinen ist also mit großer Wahrscheinlichkeit Resultat der Wiederholung mehrerer, tandemartig angeordneter PPR-Domänen. Bei einer postulierten Beteiligung von mindestens zwei PPR-Domänen an der Bindung von RNA und einer durchschnittlichen Anzahl von zwölf PPR-Domänen in einem PPR-Protein (Lurin *et al.* 2004) wäre rechnerisch eine Interaktion mit mehreren, möglicherweise auch unterschiedlichen Liganden realisierbar. Unter den *repeat*-Proteinen sind diverse Vertreter bekannt, die mit Hilfe einer gleichzeitigen Bindung unterschiedlicher Liganden an mehrere *repeat*-Motive diese erst zu einem funktionellen Komplex zusammenbringen. Das Protein HOP (*Hsp organizing protein*) weist mehrere, mit den PPR-Domänen eng verwandten TPR-Domänen auf, von denen eines mit Hsp70 assoziiert, während zeitgleich das Hsp90 mit einem anderen TPR-Motiv eine Bindung eingeht. Auf der Basis der TRP-Motive stellt HOP damit eine physikalische Bindung zwischen den beiden

Chaperonen Hsp70 und Hsp90 her und beeinflusst dadurch auch die Aktivität der beiden Proteine (Johnson *et al.* 1998).

Alleine in *Arabidopsis* wurden 5669 PPR-Motive identifiziert (Kobayashi *et al.* 2011). Die Befähigung der unterschiedlichen PPR-Domänen zur Bindung jeweilig spezifischer Liganden wird vermutlich, ähnlich wie bereits für TPR-Proteine und Ankyrin-*repeat* Proteine gezeigt, durch „Hypervariationen“ innerhalb der *repeat*-Motive gewährleistet (Magliery und Regan 2005). Hierbei sind unterschiedliche Aminosäuren an hypervariablen Positionen für die Bindung unterschiedlicher Liganden verantwortlich, während die Grundstruktur der einzelnen Domänen wenig variabel ist. Hierdurch erklärt sich auch der evolutionäre Erfolg von *repeat*-Proteinen: Im Gegensatz zur Bildung neuer komplexer Sekundärstrukturen *de novo* können große, stabile Proteine mit einer immensen Kapazität zur Erfüllung vielfältiger Aufgaben in zellulären Abläufen durch einfache Duplikationsprozesse generiert werden (Main *et al.* 2003).

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei mitochondriale PPR-Proteine, AT1G15480 und DWEORG1 näher charakterisiert, wobei der Schwerpunkt aufgrund des für eine mitochondriale Dysfunktion typischen Phänotyps auf dem Protein DWEORG1 lag. Die Bindung von beiden PPR-Proteinen an ein 40 Nukleotid langes *cox2*-Fragment mit den putativen *cis*-Elementen einer Edierungsposition wurde bereits im Vorfeld nachgewiesen (Bolle 2008; Knittler 2011). Da keine Beteiligung an dem Prozess der RNA-Edierung besteht, und das Protein DWEORG1 als Faktor identifiziert wurde, der an der Translation von *cox2* beteiligt ist, sollten weitere Untersuchungen folgen. Diese sollten klären, ob eine Bindung auch an weitere Sequenzbereiche, wie beispielsweise die 5'-UTR, erfolgt, wie für andere, in Translationsprozesse involvierte PPR-Proteine mehrfach gezeigt wurde (Uyttewaal *et al.* 2008; Hammani *et al.* 2011a). Im Zusammenhang mit der Steuerung der Translation durch DWEORG1 sollte auch die beeinflusste Änderung in der Polysomenassoziation des *cox2* Transkripts in *dweorg1*-Mutanten durch weitere Methoden, wie Western-Blot Analysen bestätigt werden. Die Generierung von Antikörpern gegen DWEORG1 wäre außerdem hilfreich, um die vermutete Assoziation des Proteins mit den Polysomen zu verifizieren.

Eine grundsätzliche Frage ist, ob DWEORG1 an der ROS Homöostase in den Mitochondrien beteiligt ist und inwiefern die Auswirkungen auf die mitochondriale Atmungskette und des mitochondrialen Proteoms in *dweorg1* Mutanten Konsequenzen dieser Funktion sind. Hier sind weitere Untersuchungen zwingend notwendig, um eindeutig zu klären, ob es sich bei

der veränderten Expressionen der für die Atmungskette relevanten Proteine, wie der AOX, sowie von Bestandteilen des Komplexes II und IV wirklich um einen primären Effekt des *dweorg1 knockouts* oder um Resultate der durch die Abwesenheit von DWEORG1 bedingten Fehlregulation des mROS-Metabolismus' handelt. Versuche wie etwa eine histochemische Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zum Nachweis von Wasserstoffperoxid in Keimlingen von *dweorg1*-Mutanten könnten darüber Aufschluss geben. Eine mögliche Beteiligung von DWEORG1 an der mROS Homöostase bzw. der Abwehr und/oder der Stresstoleranz gegenüber vor allem biotischer Faktoren könnten außerdem mit Hilfe von Pathogeninfektionen und dem Aussetzen der Pflanzen verschiedener Stressbedingungen, wie Licht-, Kälte- und Salzstress untersucht werden.

Differenziertere Aussagen über die Funktion von DWEORG1 ließen sich außerdem treffen, wenn bekannt wäre, mit welchen weiteren Proteinen Interaktionen bestehen. Bisher sind allerdings derartige Interaktionspartner für kein PPR-Protein bekannt, und auch bisherige Untersuchungen mittels *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen gaben keinen Aufschluss über Proteine, die zusammen mit DWEORG1 agieren (Knittler 2011). Aufgrund der Relevanz der Interaktionspartner von PPR-Proteinen zur Aufklärung ihrer Funktion sollten weitere Untersuchungen folgen, um die Proteine zu identifizieren, die für die Katalyse der Reaktionen verantwortlich sind, sowie von weiteren Komponenten eines möglichen Prozessierungskomplexes. Denkbar sind hier weitere Hefe-basierte Systeme mit alternativen Transkriptionsfaktoren und Systeme, die auch für den Nachweis Liganden-abhängiger Interaktionen geeignet sind, sowie Methoden der Immunpräzipitation.

5 Zusammenfassung

Die PPR-Proteine bilden eine große Genfamilie, die vorrangig in Höheren Pflanzen vorkommt und in den Chloroplasten und Mitochondrien in nahezu alle Schritte der Genexpression involviert sind. Darüber hinaus erfüllen sie auch weitere Funktionen in der Embryogenese, dem Wachstum und der Entwicklung, sowie der retrograden Signaltransduktion (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Sie sind aufgrund ihrer Struktur in der Lage, RNA zu binden, besitzen selbst nach aktuellem Stand allerdings keine katalytischen Eigenschaften. Daher liegt die Vermutung nahe, dass sie selbst zusammen mit weiteren Proteinen Teil größerer Komplexe sind, und ihre Bindung an die RNA der Beginn einer Kette weiterer biologischer Prozesse ist. Bei den PPR-Proteinen AT1G15480 und DWEORG1, die im Vorfeld dieser Arbeit als *cox2* mRNA-bindende Proteine identifiziert wurden (Bolle 2008; Knittler 2011), handelt es sich der Struktur und der phylogenetischen Position nach um evolutionär ältere PPR-Proteine, die sich in ihrer Aminosäuresequenz, der Abfolge der charakteristischen PPR-Domänen und ihrer bioinformatisch errechneten Tertiärstruktur stark ähneln. Proteinmodelle sowie *in silico* Analysen, sprechen für die Bindung von RNA-Molekülen in bestimmten Bereichen der von den PPR-Domänen ausgebildeten α -Helices.

Trotz der Bindung an ein 40 Nukleotid langes *cox2*-Fragment mit einer Edierungsposition und den entsprechenden putativen *cis*-Elementen sind beide Proteine mit einer in dieser Arbeit nachgewiesenen mitochondrialen Lokalisation nicht an der RNA-Edierung beteiligt.

Die für die beiden Gen *at1g15480* und *dweorg1* in dieser Arbeit etablierten homozygoten T-DNA Insertionsmutanten weisen einen deutlichen Phänotyp auf, der sich durch eine verfrühte Blütenbildung und bei der *dweorg1* Mutante durch eine stark verzögerte Entwicklung und die Reduzierung der Keimfähigkeit und der Lateralwurzelbildung äußert; einem für mitochondriale Dysfunktion klassischen Phänotyp. Die nähere Charakterisierung von DWEORG1 zeigte, dass es sich bei diesem Protein um einen für die Translation von *cox2* essentiellen Faktor handelt, der möglicherweise durch Bindungen an die Ziel-RNA und eine Remodellierung dieser die Translation aktiviert oder verstärkt, ohne allerdings die Prozessierung oder die Abundanz des *cox2* Transkripts zu beeinflussen. Eine in *dweorg1*-Mutanten beeinträchtigte Bindung der *cox2* mRNA an die Polysomen weist zusätzlich auf eine für die Translation essentielle Rolle von DWEORG1 hin. Die verminderte Expression von COX2 und die damit verbundene verminderte Aktivität des Komplex' IV sprechen für eine erhebliche Störung der mitochondrialen Atmungskette, was im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp steht.

Untersuchungen des mitochondrialen Proteoms von *dweorg1*-Pflanzen mittels ein- und zweidimensionaler BN-PAGE zeigen außerdem, dass mindestens auch der Komplex II der mitochondrialen Atmungskette in *dweorg1*-Mutanten quantitativ verringert ist. Die Lokalisation von DWEORG1 in den Mitochondrien, die Bedeutung für die Funktionalität der Komplexe II und IV, sowie die von Schmidt (2010) in *dweorg1*- Mutanten gezeigte stark erhöhte Expression der AOX, die als Marker für eine mitochondriale, retrograde Antwort in Pflanzen gilt (Maxwell *et al.* 1999), sprechen für eine mögliche Rolle von DWEORG1 in der Regulation der mitochondrialen ROS Homöostase.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass DWEORG1 für die Zelle und in der Atmungskette multiple Funktionen erfüllt, die sich unmittelbar auf die damit verbundenen Prozesse auswirken. Inwiefern es sich dabei um direkte oder indirekte Effekt einer Missregulation der mitochondrialen ROS Homöostase handelt, kann zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht konkretisiert werden.

6 Summary

Pentatricopeptide repeat proteins form a large family of proteins predominantly found in the plant kingdom. The functions of PPR proteins have extremely wide implications going from embryogenesis to development and retrograde signaling. At the cellular level, their function is mostly related to organelle RNA processing or post-transcriptional gene regulation. They lack catalytic activity, but their structure enables them to act as sequence-specific RNA-binding adaptors capable of directing effector enzymes to defined sites on mRNA molecules. Prior to this work two PPR-Proteins, AT1G15480 and DWEORG1, were identified that bind to a 40-bp RNA sequence of the mitochondrial *cox2* gene containing one editing site. These proteins were further characterized. They were shown to be quite similar in gene and protein structure and in their tertiary structure that is composed of α -helices, being characteristic for PPR-proteins. The 3-D models of the proteins as well as *in silico* analysis identified certain aminoacids putatively involved in ligand binding.

Prior to this work binding of DWEORG1 and AT1G15480 to a 40-bp RNA sequence of the mitochondrial *cox2* gene containing one editing site was shown (Bolle 2008; Knittler 2011). However, RNA editing of the *cox2* transcript was unaffected in T-DNA insertion lines for *at1g15480* and *dweorg1*; 408 editing sites in 36 RNAs were also edited in *dweorg1* mutants.

While T*Dat1g15480* exhibited an early flowering phenotype, the *dweorg1* mutant showed strong reduction in growth, germination and in formation of lateral roots. In mitochondria of *dweorg1* mutants, transcription and transcript abundance of *cox2* were unaffected, but a strong decrease in COX2 protein was observed. Additionally *cox2* mRNA was associated with polysomes isolated from the Col-0 wild type, but not from *dweorg1* mutants. These results indicate that the *dweorg1* gene expresses a PPR-protein that binds *cox2* mRNA and is required for its translation. The decreased expression of COX2 and the lowered activity of the complex IV as a result of the *dweorg1 knockout* lead to a massive disruption of the mitochondrial respiration which is in line with the observed phenotype.

In addition to the disturbance of the complex IV, two-dimensional blue-native/SDS-PAGE on mitochondria of the *dweorg1* mutant also indicate a reduced amount of the complex II of the mitochondrial respiratory chain. The mitochondrial localization, the importance of DWEORG1 for the formation of the complexes II and IV and the increased amount of the alternative oxidase (Schmidt 2010) as a marker for mitochondrial retrograde signaling in plants (Maxwell *et al.* 1999) favor the assumption that DWEORG1 might be involved in mitochondrial ROS homeostasis.

7 Literaturverzeichnis

- Abdelnoor RV, Yule R, Elo A, Christensen AC, Meyer-Gauen G, Mackenzie SA (2003)** Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. Proc Natl Acad Sci U S A 100:5968-5973
- Adams KL, Palmer JD (2003)** Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. Mol Phylogenet Evol 29:380-395
- Aggeler R, Capaldi RA (1990)** Yeast cytochrome c oxidase subunit VII is essential for assembly of an active enzyme. Cloning, sequencing, and characterization of the nuclear-encoded gene. J Biol Chem 265:16389-16393
- AGI (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796-815
- Alexander MP (1969)** Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain Technol 44:117-122
- Alexander MP (1980)** A versatile stain for pollen, fungi, yeast, and bacteria. Stain Technol 55:13-18
- Allen JF (2003)** The function of genomes in bioenergetic organelles. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358:19-37; discussion 37-18
- Allen JO et al. (2007)** Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize. Genetics 177:1173-1192
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977)** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proceedings of the National Academy of Sciences 74:5350-5354
- Andersson SG et al. (1998)** The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature 396:133-140
- Andrés C, Lurin C, Small ID (2007)** The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression Physiol. Plant. 129:14-22
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999)** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284:770-776
- Ascencio-Ibanez JT et al. (2008)** Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. Plant Physiol 148:436-454
- Aubourg S, Boudet N, Kreis M, Lecharny A (2000)** In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. Plant Mol Biol 42:603-613
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA (1997)** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. Trends Genet 13:152-156
- Backert S, Borner T (2000)** Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.). Curr Genet 37:304-314
- Baerenfaller K et al. (2008)** Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. Science 320:938-941
- Baginsky S, Hennig L, Zimmermann P, Grussem W (2010)** Gene expression analysis, proteomics, and network discovery. Plant Physiol 152:402-410
- Balk J, Pilon M (2011)** Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. Trends in Plant Science 16:218-226
- Barkan A (1988)** Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. EMBO J 7:2637-2644
- Barkan A (1993)** Nuclear Mutants of Maize with Defects in Chloroplast Polysome Assembly Have Altered Chloroplast RNA Metabolism. Plant Cell 5:389-402
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, 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 13:3170-3181

- Beick S, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Jensen B, Barkan A (2008)** The Pentatricopeptide Repeat Protein PPR5 Stabilizes a Specific tRNA Precursor in Maize Chloroplasts. Mol. Cell. Biol. 28:5337-5347
- Bernard P, Couturier M (1992)** Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J Mol Biol 226:735-745
- Bewley JD (1997)** Seed Germination and Dormancy. Plant Cell 9:1055-1066
- Binder S, Brennicke A (1993)** Transcription initiation sites in mitochondria of *Oenothera berteriana*. J Biol Chem 268:7849-7855
- Binder S, Brennicke A (2003)** Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 358(1429):181-188; discussion 188-189
- Binder S, Hölzle A, Jonietz C (2010)** RNA Processing and RNA Stability in Plant Mitochondria. In: Kempken F (ed) *Plant Mitochondria*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York, pp 107-130
- Binder S, Marchfeld A, Brennicke A (1994)** RNA editing of tRNAPhe and tRNACys in mitochondria of *Oenothera berteriana* is initiated in precursor molecules. Mol Gen Genet 244:67-74
- Birnboim HC, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523
- Birtic S, Kranner I (2006)** Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds. Phytochem Anal 17:144-148
- Blatch GL, Lassel M (1999)** The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. Bioessays 21:932-939
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. ELECTROPHORESIS 8:93-99
- Bolle N (2008)** RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Bonen L (2008)** Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. Mitochondrion 8:26-34
- Bonen L (2010)** RNA Splicing in Plant Mitochondria. In: Kempken F (ed) *Plant Mitochondria*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York
- Boore JL (1999)** Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research 27:1767-1780
- Borisov VB (2004)** Mutations in respiratory chain complexes and human diseases. Ital J Biochem 53:34-40
- Bouchez D, Camilleri C, Caboche M (1993)** A binary vector based on basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316:1188-1193
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003)** Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. Nature 422:433-438
- Bowsher CG, Tobin AK (2001)** Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids. J Exp Bot 52:513-527
- Boyes DC et al. (2001)** Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. Plant Cell 13:1499-1510
- Bradford MM (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
- Brennicke A, Grohmann L, Hiesel R, Knoop V, Schuster W (1993)** The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. FEBS Lett 325:140-145
- Bruhs A, Kempken F (2010)** RNA editing in plant mitochondria. In: Kempken F (ed) *Plant Mitochondria*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York, pp 157-175

- Bullock W, Fernandez J, Short J (1987)** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques 5:376-378
- Cai W, Okuda K, Peng L, Shikanai T (2011)** PROTON GRADIENT REGULATION 3 recognizes multiple targets with limited similarity and mediates translation and RNA stabilization in plastids. Plant J 67:318-327
- Cartieaux F et al. (2008)** Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 leads to complex transcriptome changes. Mol Plant Microbe Interact 21:244-259
- Castandet B, Choury D, Bégu D, Jordana X, Araya A (2010)** Intron RNA editing is essential for splicing in plant mitochondria. Nucleic Acids Research 38:7112-7121
- Cermakian N, Ikeda TM, Miramontes P, Lang BF, Gray MW, Cedergren R (1997)** On the evolution of the single-subunit RNA polymerase. J Mol Evol 45:671-681
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994)** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802-805
- Chandran D, Inada N, Hather G, Kleindt CK, Wildermuth MC (2010)** Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. Proc Natl Acad Sci U S A 107:460-465
- Chang CC, Sheen J, Bligny M, Niwa Y, Lerbs-Mache S, Stern DB (1999)** Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. Plant Cell 11:911-926
- Chapdelaine Y, Bonen L (1991)** The wheat mitochondrial gene for subunit *l* of the NADH dehydrogenase complex: a trans-splicing model for this gene-in-pieces. Cell 65:465-472
- Chase CD (2007)** Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. Trends Genet 23:81-90
- Chateigner-Boutin AL, Small I (2011)** Organellar RNA editing. Wiley Interdiscip Rev RNA 2:493-506
- Chaw SM, Shih AC, Wang D, Wu YW, Liu SM, Chou TY (2008)** The mitochondrial genome of the gymnosperm *Cycas taitungensis* contains a novel family of short interspersed elements, Bpu sequences, and abundant RNA editing sites. Mol Biol Evol 25:603-615
- Chen HC, Stern DB (1991)** Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. J Biol Chem 266:24205-24211
- Cho Y, Qiu YL, Kuhlmann P, Palmer JD (1998)** Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. Proc Natl Acad Sci USA 95:14244-14249
- Clifton SW et al. (2004)** Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. Plant Physiol 136:3486-3503
- Coffin JW, Dhillon R, Ritzel RG, Nargang FE (1997)** The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein. Curr Genet 32:273-280
- Colombo B, Felicetti L, Baglioni C (1965)** Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in rabbit reticulocytes. Biochem Biophys Res Commun 18:389-395
- Cortajarena AL, Regan L (2006)** Ligand binding by TPR domains. Protein Sci 15:1193-1198
- Cottage A, Mott EK, Kempster JA, Gray JC (2010)** The *Arabidopsis* plastid-signalling mutant *gun1* (*genomes uncoupled1*) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development. Journal of Experimental Botany 61:3773-3786
- Cottage AJ et al. (2008)** *GUN1 (GENOMES UNCOUPLED1)* Encodes a Pentatricopeptide Repeat (PPR) Protein Involved in Plastid Protein Synthesis-Responsive Retrograde Signaling to the Nucleus. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B (eds). Springer Netherlands, pp 1202-1205
- Couture JF, Collazo E, Trievel RC (2006)** Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. Nat Struct Mol Biol 13:698-703

- Covello PS, Gray MW (1989)** RNA editing in plant mitochondria. Nature 341:662-666
- Covello PS, Gray MW (1992)** Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome *c* oxidase (*cox2*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. EMBO J 11:3815-3820
- Covello PS, Gray MW (1993)** On the evolution of RNA-editing. Trends Genet 9:265-268
- Czakó M, Wilson J, Yu X, Márton L (1993)** Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 12:603-606
- D'Andrea LD, Regan L (2003)** TPR proteins: the versatile helix. Trends Biochem Sci 28:655-662
- D'Errico I, Gadaleta G, Saccone C (2004)** Pseudogenes in metazoa: Origin and features. Briefings in Functional Genomics & Proteomics 3:157-167
- Damm B, Willmitzer L (1988)** Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. Mol. Gen. Genet. 213:15-20
- Davies SM et al. (2009)** Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. FEBS Lett 583:1853-1858
- De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y (2005)** Genome duplication and the origin of angiosperms. Trends Ecol Evol 20:591-597
- de Longevialle AF et al. (2008)** The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of plastid *ycf3* intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 56:157-168
- de Longevialle AF et al. (2007)** The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial *nad1* Intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 19:3256-3265
- de Longevialle AF, Small ID, Lurin C (2010)** Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles. Mol Plant 3:691-705
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1997)** T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. Plant J 11:15-29
- De Paepe R, Forchioni A, Chetrit P, Vedel F (1993)** Specific mitochondrial proteins in pollen: presence of an additional ATP synthase beta subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 90:5934-5938
- Ding YH, Liu NY, Tang ZS, Liu J, Yang WC (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 18:815-830
- Dombrowski S, Hoffmann M, Guha C, Binder S (1999)** Continuous primary sequence requirements in the 18-nucleotide promoter of dicot plant mitochondria. J Biol Chem 274:10094-10099
- Doniwa Y, Ueda M, Ueta M, Wada A, Kadowaki KI, Tsutsumi N (2010)** The involvement of a PPR protein of the P subfamily in partial RNA editing of an *Arabidopsis* mitochondrial transcript. Gene 454:39-46
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res 16:6127-6145
- Dyall S, Brown M, Johnson P (2004)** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. Science 304:253-257
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991)** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19:1349
- Emanuel C, Weihe A, Graner A, Hess WR, Borner T (2004)** Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. Plant J 38:460-472
- Eubel H, Braun HP, Millar AH (2005)** Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. Plant Methods 1:11

- Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP (2004)** Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* 134:1450-1459
- Eubel H, Jansch L, Braun HP (2003)** New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* 133:274-286
- Eubel H, Millar AH (2009)** Systematic monitoring of protein complex composition and abundance by blue-native PAGE. *Cold Spring Harb Protoc* 2009:pdb prot5221
- Fey J, Marechal-Drouard L (1999)** Expression of the two chloroplast-like tRNA(Asn) genes in potato mitochondria: mapping of transcription initiation sites present in the trnN1-trnY-nad2 cluster and upstream of trnN2. *Curr Genet* 36:49-54
- Filée J, Forterre P (2005)** Viral proteins functioning in organelles: a cryptic origin? *Trends Microbiol* 13:510-513
- Finnegan PM, Soole KL, Umbach AL (2004)** Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. In: Day DA, Millar AH, Whelan J (eds) *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 163–230
- Fiorani F, Umbach AL, Siedow JN (2005)** The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiol* 139:1795-1805
- Fisk DG, Walker MB, Barkan A (1999)** Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J* 18:2621-2630
- Forner J, Weber B, Thuss S, Wildum S, Binder S (2007)** Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucleic Acids Res* 35:3676-3692
- Fujii S, Bond CS, Small ID (2011)** Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1723-1728
- Fujii S, Small I (2011)** The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytol* 191:37-47
- Gay NJ, Gangloff M (2007)** Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 76:141-165
- Gheysen G, Villarreal R, Van Montagu M (1991)** Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev* 5:287-297
- Giegé P, Brennicke A (1999)** RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15324-15329
- Giegé P, Sweetlove L, Leaver C (2003)** Identification of mitochondrial protein complexes in *Arabidopsis* using two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:133-144
- Giegé P, Sweetlove LJ, Cognat V, Leaver CJ (2005)** Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1497-1512
- Gleason C et al. (2011)** Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10768-10773
- Gray MW (1999)** Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Gene Develop* 9:678-687
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999)** Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481
- Gray MW, Lang BF (1998)** Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. *Trends Microbiol* 6:1-3
- Gray MW, Lang BF, Burger G (2004)** Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet* 38:477-524
- Grewe F, Viehoveer P, Weisshaar B, Knoop V (2009)** A trans-splicing group I intron and tRNA-hyperediting in the mitochondrial genome of the lycophyte *Isoetes engelmannii*. *Nucleic Acids Res* 37:5093-5104

- Groth-Malonek M, Pruchner D, Grewe F, Knoop V (2005)** Ancestors of trans-splicing mitochondrial introns support serial sister group relationships of hornworts and mosses with vascular plants. Mol Biol Evol 22:117-125
- Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH, Grienenberger JM (1989)** RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. Nature 341:660-662
- Gutierrez-Marcos JF et al. (2007)** empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. Plant Cell 19:196-210
- Hall TA (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp 41
- Hammani K et al. (2011a)** The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of nad7 and atp1 transcripts in Arabidopsis mitochondria. J Biol Chem 286:21361-21371
- Hammani K, Gobert A, Hleibieh K, Choulier L, Small I, Giege P (2011b)** An Arabidopsis dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. Plant Cell 23:730-740
- Hammani K, Okuda K, Tanz SK, Chateigner-Boutin AL, Shikanai T, Small I (2009)** A study of new Arabidopsis chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. Plant Cell 21:3686-3699
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166:557-580
- Hanson MR, Bentolila S (2004)** Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. Plant Cell 16 Suppl.:154-169
- Hatefi Y (1985)** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu Rev Biochem 54:1015-1069
- Hedtke B, Börner T, Weihe A (1997)** Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. Science 277:809-811
- Hedtke B, Börner T, Weihe A (2000)** One RNA polymerase serving two genomes. EMBO Rep 1:435-440
- Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG, Borner T (2002)** Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. Plant J 30:625-637
- Heineman WR, Kuwana T (1973)** Charge distribution in electron transport components: cytochrome c and cytochrome c oxidase mixtures. Biochem Biophys Res Commun 50:892-900
- Henshaw EC (1968)** Messenger RNA in rat liver polyribosomes: evidence that it exists as ribonucleoprotein particles. J Mol Biol 36:401-411
- Henze K, Martin W (2001)** How do mitochondrial genes get into the nucleus? Trends Genet 17:383-387
- Herman L, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1990)** Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. Mol Gen Genet 224:248-256
- Hess WR, Borner T (1999)** Organellar RNA polymerases of higher plants. Int Rev Cytol 190:1-59
- Hiesel R, Combettes B, Brennicke A (1994)** Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the Bryophyta. Proc Natl Acad Sci USA 91:629-633
- Hiesel R, Wissinger B, Schuster W, Brennicke A (1989)** RNA editing in plant mitochondria. Science 246:1632-1634
- Hihlal E, Braumann I, van den Berg M, Kempken F (2011)** Suitability of Vader for transposon-mediated mutagenesis in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol 77:2332-2336
- Hoch B, Maier RM, Appel K, Igloi GL, Kössel H (1991)** Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. Nature 353:178-180

- Holec S, Lange H, Kuhn K, Alioua M, Borner T, Gagliardi D (2006)** Relaxed transcription in Arabidopsis mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol Cell Biol* 26:2869-2876
- Huang S, Taylor NL, Narsai R, Eubel H, Whelan J, Millar AH (2010)** Functional and composition differences between mitochondrial complex II in Arabidopsis and rice are correlated with the complex genetic history of the enzyme. *Plant Mol Biol* 72:331-342
- Huckelhoven R (2007)** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45:101-127
- Ikeda TM, Gray MW (1999)** Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol Biol* 40:567-578
- Inouye S, Tsuji FI (1994)** *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* 341:277-280
- Jansch L, Krufft V, Schmitz UK, Braun HP (1996)** New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J* 9:357-368
- Janska H, Sarria R, Woloszynska M, Arrieta-Montiel M, Mackenzie SA (1998)** Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10:1163-1180
- Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO (1998)** Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* 273:3679-3686
- Jones A (2000)** Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Tibs* 5:225-230
- Jonietz C, Forner J, Holzle A, Thuss S, Binder S (2010)** RNA PROCESSING FACTOR2 is required for 5' end processing of nad9 and cox3 mRNAs in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22:443-453
- Jorgensen R, Snyder C, Jones JDG (1987)** T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Molecular and General Genetics MGG* 207:471-477
- Joyce PBM, Gray MW (1989)** Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 17:5461-5476
- Kaleikau EK, Andre CP, Walbot V (1992)** Structure and expression of the rice mitochondrial apocytochrome b gene (cob-1) and pseudogene (cob-2). *Curr Genet* 22:463-470
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002)** GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7:193-195
- Kempken F, Mullen JA, Pring DR, Tang HV (1991)** RNA editing of sorghum mitochondrial *atp6* transcripts changes 15 amino acids and generates a carboxy-terminus identical to yeast. *Curr Genet* 20:417-422
- Kidwell MG, Lisch DR (2001)** Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55:1-24
- Kim S-R et al. (2009)** Rice OGR1 encodes a pentatricopeptide repeat-DYW protein and is essential for RNA editing in mitochondria. *The Plant Journal* 59:738-749
- Klein M, Binder S, Brennicke A (1998)** Purification of Mitochondria from Arabidopsis. In: Martínez-Zapater JM, Salinas J (eds) Arabidopsis protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey
- Klodmann J, Senkler M, Rode C, Braun HP (2011)** Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiol* 157:587-598
- Kmiec B, Woloszynska M, Janska H (2006)** Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr Genet* 50:149-159
- Knittler K (2011)** Funktionelle Analyse von mitochondrialen PPR-Proteinen und ihrer Interaktionspartner. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Knoop V (2004)** The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Curr Genet* 46:123-139

- Knoop V (2011)** When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences. Cell Mol Life Sci 68:567-586
- Knoop V, Rudinger M (2010)** DYW-type PPR proteins in a heterolobosean protist: plant RNA editing factors involved in an ancient horizontal gene transfer? FEBS Lett 584:4287-4291
- Knoop V, Volkmar U, Hecht J, Grewe F (2010)** Mitochondrial Genome Evolution in the Plant Lineage. In: Kempken F (ed) *Plant Mitochondria*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York pp 3-29
- Kobayashi K et al. (2011)** Identification and characterization of the RNA binding surface of the pentatricopeptide repeat protein. Nucl. Acids Res. (2011) doi: [10.1093/nar/gkr1084](https://doi.org/10.1093/nar/gkr1084)
- Kobe B, Kajava AV (2001)** The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr Opin Struct Biol 11:725-732
- Koncz C, Schell J (1986)** The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Mol Gen Genet 204:383-396
- Kotchoni SO, Jimenez-Lopez JC, Gachomo EW, Seufferheld MJ (2010)** A new and unified nomenclature for male fertility restorer (RF) proteins in higher plants. PLoS One 5:e15906
- Krause K, Lopes de Souza R, Roberts DG, Dieckmann CL (2004)** The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. Mol Biol Cell 15:2674-2683
- Kubo T, Mikami T (2007)** Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. Physiologia Plantarum 129:6-13
- Kubo T, Newton KJ (2008)** Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. Mitochondrion 8:5-14
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, Itchoda N, Estiati N, Mikami T (2000)** The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA (Cys)(GCA). Nucl Acids Res 28:2571-2576
- Kühn K, Weihe A, Börner T (2005)** Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in Arabidopsis. Nucleic Acids Res 33:337-346
- Kumar R, Marechal-Drouard L, Akama K, Small I (1996)** Striking differences in mitochondrial tRNA import between different plant species. Mol Gen Genet 252:404-411
- Kumar V, Parkhi V, Kenerley CM, Rathore KS (2009)** Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. Planta 230:277-291
- Kyhse-Andersen J (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10:203-209
- Laluk K, Abuqamar S, Mengiste T (2011)** The Arabidopsis mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance. Plant Physiol 156:2053-2068
- Lamattina L, Gonzalez D, Gualberto J, Grienenberger JM (1993)** Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. Eur J Biochem 217:831-838
- Lambers H (1982)** Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. Physiologia Plantarum 55:478-485
- Lämmler UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Leister D (2005)** Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. Trends Genet 21:655-663

- Li Y, Rosso MG, Strizhov N, Viehoveer P, Weisshaar B (2003)** GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. Bioinformatics 19:1441-1442
- Li Y, Rosso MG, Viehoveer P, Weisshaar B (2007)** GABI-Kat SimpleSearch: an *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. Nucleic Acids Res 35:D874-878
- Liere K, Börner T (2010)** Transcription in Plant Mitochondria. In: Kempken F (ed) *Plant Mitochondria*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York
- Liere K, Weihe A, Börner T (2011)** The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. J Plant Physiol 168:1345-1360
- Linke B, Börner T (2005)** Mitochondrial effects on flower and pollen development. Mitochondrion 5:389-402
- Liu SL, Zhuang Y, Zhang P, Adams KL (2009)** Comparative analysis of structural diversity and sequence evolution in plant mitochondrial genes transferred to the nucleus. Mol Biol Evol 26:875-891
- Liu YG, Whittier RF (1995)** Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. Genomics 25:674-681
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001)** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25:402-408
- Lohse M, Drechsel O, Bock R (2007)** OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. Curr Genet 52:267-274
- Lonsdale DM, Hodge TP, Fauron CMR (1984)** The physical map of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. Nucleic Acids Res 12:9249-9261
- Lu B, Hanson MR (1996)** Fully edited and partially edited nad9 transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria. Nucleic Acids Res 24:1369-1374
- Lu Y, Li C, Wang H, Chen H, Berg H, Xia Y (2011)** AtPPR2, an *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat protein, binds to plastid 23S rRNA and plays an important role in the first mitotic division during gametogenesis and in cell proliferation during embryogenesis. Plant J 67:13-25
- Lupold DS, Caoile AG, Stern DB (1999)** Genomic context influences the activity of maize mitochondrial *cox2* promoters. Proc Natl Acad Sci USA 96:11670-11675
- Lurin C et al. (2004)** Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. Plant Cell 16:2089-2103
- Lynch M, Conery JS (2000)** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. Science 290:1151-1155
- Mackenzie S, McIntosh L (1999)** Higher plant mitochondria. Plant Cell 11:571-585
- Magliery TJ, Regan L (2005)** Sequence variation in ligand binding sites in proteins. BMC Bioinformatics 6:240
- Maier RM, Zeltz P, Kössel H, Bonnard G, Gualberto JM, Grienenberger JM (1996)** RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. Plant Mol Biol 32:343-365
- Main ER, Jackson SE, Regan L (2003)** The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus. Curr Opin Struct Biol 13:482-489
- Manickavelu A, Kambara K, Mishina K, Koba T (2007)** An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. Colloids Surf B Biointerfaces 54:254-258
- Manthey GM, McEwen JE (1995)** The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. Embo J 14:4031-4043

- Manthey GM, Przybyla-Zawislak BD, McEwen JE (1998)** The Saccharomyces cerevisiae Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. Eur J Biochem 255:156-161
- Maréchal-Drouard L, Small I, Weil JH, Dietrich A (1995)** Transfer RNA import into plant mitochondria. Methods Enzymol 260:310-327
- Marienfeld J, Unseld M, Brennicke A (1999)** The mitochondrial genome of Arabidopsis is composed of both native and immigrant information. Trends Plant Science 4:495-502
- Matsumoto S, Ito Y, Hosoi T, Takahashi Y, Machida Y (1990)** Integration of Agrobacterium T-DNA into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. Mol Gen Genet 224:309-316
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999)** The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 96:8271-8276
- Mayerhofer R et al. (1991)** T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. EMBO J 10:697-704
- McArthur CR, Clark-Walker GD (1983)** Mitochondrial DNA size diversity in the *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. Current Genetics 7:29-35
- Mellersh DG, Foulds IV, Higgins VJ, Heath MC (2002)** H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. Plant J 29:257-268
- Menges M, Murray JAH (2002)** Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. The Plant Journal 30:203-212
- Meyer EH et al. (2009)** Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night. Plant Physiol 151:603-619
- Michel F, Lang BF (1985)** Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. Nature 316:641-642
- Millar AH, Eubel H, Jansch L, Kruff V, Heazlewood JL, Braun HP (2004)** Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. Plant Mol Biol 56:77-90
- Millenaar FF, Benschop JJ, Wagner AM, Lambers H (1998)** The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. Plant Physiol 118:599-607
- Moore RC et al. (2003)** Genetic and Functional Analysis of DD44, a Sex-Linked Gene From the Dioecious Plant *Silene latifolia*, Provides Clues to Early Events in Sex Chromosome Evolution. Genetics 163:321-334
- Mourier T, Jeffares DC (2003)** Eukaryotic intron loss. Science 300:1393
- Muallem A, Hall DO (1982)** Ascorbate as a substrate for photoproduction of hydrogen by photosystem I of chloroplasts. Plant Physiol 69:1116-1120
- Muise RC, Hauswirth WW (1992)** Transcription in maize mitochondria: effects of tissue and mitochondrial genotype. Curr Genet 22:235-242
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, H E (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51:263-273
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497
- Naithani S, Saracco SA, Butler CA, Fox TD (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 14:324-333
- Nakamura T, Meierhoff K, Westhoff P, Schuster G (2003)** RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. Eur. J. Biochem. 270:4070-4081
- Nam Y, Sliz P, Song L, Aster JC, Blacklow SC (2006)** Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. Cell 124:973-983

- Nathans D, Smith HO (1975)** Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. Annu Rev Biochem 44:273-293
- Newton KJ, Knudsen C, Gabay-Laughnan S, Laughnan JR (1990)** An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. Plant Cell 2:107-113
- Ni M, Dehesh K, Tepperman JM, Quail PH (1996)** GT-2: In Vivo Transcriptional Activation Activity and Definition of Novel Twin DNA Binding Domains with Reciprocal Target Sequence Selectivity. The Plant Cell Online 8:1041-1059
- Notsu Y et al. (2002)** The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. Mol Genet Genomics 268:434-445
- Nugent JM, Palmer JD (1991)** RNA-mediated transfer of coxII from the mitochondrion to the nucleus during lowering plant evolution. Cell 66:473-481
- O'Toole N et al. (2008)** On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. Mol Biol Evol 25:1120-1128
- Oguchi T, Sage-Ono K, Kamada H, Ono M (2004)** Genomic structure of a novel Arabidopsis clock-controlled gene, AtC401, which encodes a pentatricopeptide repeat protein. Gene 330:29-37
- Ohshima K, Hattori M, Yada T, Gojobori T, Sakaki Y, Okada N (2003)** Whole-genome screening indicates a possible burst of formation of processed pseudogenes and Alu repeats by particular L1 subfamilies in ancestral primates. Genome Biol 4:R74
- Okuda K et al. (2009)** Pentatricopeptide Repeat Proteins with the DYW Motif Have Distinct Molecular Functions in RNA Editing and RNA Cleavage in Arabidopsis Chloroplasts. The Plant Cell Online 21:146-156
- Okuda K, Shikanai T (2012)** A pentatricopeptide repeat protein acts as a site-specificity factor at multiple RNA editing sites with unrelated cis-acting elements in plastids. Nucleic Acids Res
- Oldenburg DJ, Bendich AJ (2001)** Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5' protein. J Mol Biol 310:549-562
- Pakendorf B, Stoneking M (2005)** Mitochondrial DNA and human evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet 6:165-183
- Palmer JD, Herbon LA (1987)** Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. Curr Genet 11:565-570
- Palmer JD, Logsdon JM, Jr. (1991)** The recent origins of introns. Curr Opin Genet Dev 1:470-477
- Peeters NM et al. (2000)** Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. J Mol Evol 50:413-423
- Perrin R et al. (2004)** Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3' ends of *atp9* mRNAs in arabidopsis mitochondria. J Biol Chem Epub ahead of print
- Perry RP, Kelley DE (1968)** Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes. J Mol Biol 35:37-59
- Pfalz J, Bayraktar OA, Prikryl J, Barkan A (2009)** Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. The EMBO journal 28:2042-2052
- Poot M et al. (1996)** Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. J Histochem Cytochem 44:1363-1372
- Prikryl J, Rojas M, Schuster G, Barkan A (2011)** Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. Proc Natl Acad Sci U S A 108:415-420
- Prince VE, Pickett FB (2002)** Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. Nat Rev Genet 3:827-837

- Pring DR, Mullen JA, Kempken F (1992)** Conserved sequence blocks 5' to start codons of plant mitochondrial genes. *Plant Mol Biol* 19:313-317
- Punta M et al. (2012)** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40:D290-D301
- Rahman A, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S (2001)** Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of Arabidopsis roots. *Plant Cell Physiol* 42:301-307
- Ringel R, Sologub M, Morozov YI, Litonin D, Cramer P, Temiakov D (2011)** Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478:269-273
- Rivals E, Bruyere C, Toffano-Nioche C, Lecharny A (2006)** Formation of the Arabidopsis pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* 141:825-839
- Robison MM, Ling X, Smid MPL, Zarei A, Wolyn DJ (2009)** Antisense Expression of Mitochondrial ATP Synthase Subunits OSCP (ATP5) and γ (ATP3) Alters Leaf Morphology, Metabolism and Gene Expression in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 50:1840-1850
- Rode C, Senkler M, Klodmann J, Winkelmann T, Braun HP (2011)** GelMap-a novel software tool for building and presenting proteome reference maps. *J Proteomics* 74:2214-2219
- Rodriguez-Moreno L et al. (2011)** Determination of the melon chloroplast and mitochondrial genome sequences reveals that the largest reported mitochondrial genome in plants contains a significant amount of DNA having a nuclear origin. *BMC Genomics* 12:424
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B (2003)** An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 53:247-259
- Rötig A et al. (2004)** Molecular diagnostics of mitochondrial disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1659:129-135
- Rudinger M, Szovenyi P, Rensing SA, Knoop V (2011)** Assigning DYW-type PPR proteins to RNA editing sites in the funariid mosses *Physcomitrella patens* and *Funaria hygrometrica*. *Plant J* 67:370-380
- Rüdinger M, Polsakiewicz M, Knoop V (2008)** Organellar RNA editing and plant-specific extensions of pentatricopeptide repeat proteins in jungermanniid but not in marchantiid liverworts. *Mol Biol Evol* 25:1405-1414
- Saha D, Prasad AM, Srinivasan R (2007)** Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Biochem* 45:521-534
- Saiki RK et al. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sakurai A et al. (2002)** On biased distribution of introns in various eukaryotes. *Gene* 300:89-95
- Salone V et al. (2007)** A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett* 581:4132-4138
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab Press
- Samson F et al. (2002)** FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of Arabidopsis thaliana T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res* 30:94-97
- Sane AP, Stein B, Westhoff P (2005)** The nuclear gene HCF107 encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial psbH gene in Arabidopsis. *Plant J* 42:720-730
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Saraste M (1999)** Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488-1493

- Satoh M, Kubo T, Mikami T (2006)** The Owen mitochondrial genome in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): possible mechanisms of extensive rearrangements and the origin of the mitotype-unique regions. Theor Appl Genet 113:477-484
- Satoh M, Kubo T, Nishizawa S, Estiati A, Itchoda N, Mikami T (2004)** The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. Mol Genet Genomics 272:247-256
- Schagger H, von Jagow G (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166:368-379
- Schagger H, von Jagow G (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Anal Biochem 199:223-231
- Scheckhuber CQ et al. (2011)** Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the aging model *Podospora anserina*. PLoS One 6:e16620
- Scheffler IE (2002a)** Biogenesis. In: Mitochondria. John Wiley & Sons, Inc., pp 48-140
- Scheffler IE (2002b)** Structure and Morphology. In: Mitochondria. John Wiley & Sons, Inc., pp 15-47
- Schmidt TM (2010)** Funktionelle Charakterisierung zweier mitochondrialer PPR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Schmitz-Linneweber C, Small I (2008)** Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. Trends Plant Sci 13:663-670
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A (2005)** RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. Plant Cell 17:2791-2804
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE, Williams-Voelker PM, Kroeger TS, Vichas A, Barkan A (2006)** A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast rps12 pre-mRNA. Plant Cell 18:2650-2663
- Schnable PS, Wise RP (1998)** The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Science 3:175-180
- Schuster W, Brennicke A (1987)** Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA? EMBO J 6:2857-2863
- Schuster W, Brennicke A (1988)** Interorganellar sequence transfer: plant mitochondrial DNA is nuclear, is plastid, is mitochondrial. Plant Sci 54:1-10
- Schuster W, Hiesel R, Isaac PG, Leaver CJ, Brennicke A (1986)** Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria. Nucleic Acids Res 14:5943-5954
- Shadel GS (2004)** Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease. Trends Genet 20:513-519
- Shikanai T (2006)** RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. Cell Mol Life Sci 63:698-708
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962)** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. J Cell Comp Physiol 59:223-239
- Siedow JN, Umbach AL (1995)** Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. Plant Cell 7:821-831
- Small ID, Isaac PG, Leaver CJ (1987)** Stoichiometric differences in DNA molecules containing the atpA gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial genome diversity in maize. EMBO J 6:865-869
- Small ID, Peeters N (2000)** The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. Trends Biochem Sci 25:46-47
- Smith BJ (2002)** Quantification of Proteins on Polyacrylamide Gels

- The Protein Protocols Handbook. In: Walker JM (ed). Humana Press, pp 237-242
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517
- Srikanth A, Schmid M (2011)** Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cell Mol Life Sci 68:2013-2037
- Stegemann S, Bock R (2006)** Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. Plant Cell 18:2869-2878
- Stern DB, Dyer TA, Lonsdale DM (1982)** Organization of the mitochondrial ribosomal RNA genes of maize. Nucleic Acids Res 10:3333-3340
- Stern DB, Goldschmidt-Clermont M, Hanson MR (2010)** Chloroplast RNA metabolism. Annu Rev Plant Biol 61:125-155
- Stern DB, Gruissem W (1987)** Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. Cell 51:1145-1157
- Stern DB, Hanson MR, Barkan A (2004)** Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system. Trends Plant Sci 9:293-301
- Stern DB, Palmer JD (1984)** Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 81:1946-1950
- Su N et al. (2012)** Disruption of a rice pentatricopeptide repeat protein causes a seedling-specific albino phenotype and its utilization to enhance seed purity in hybrid rice production. Plant Physiol 159:227-238
- Suarez MD, Revzin A, Narlock R, Kempner ES, Thompson DA, Ferguson-Miller S (1984)** The functional and physical form of mammalian cytochrome c oxidase determined by gel filtration, radiation inactivation, and sedimentation equilibrium analysis. J. Biol. Chem. 259:13791-13799
- Sugiyama Y et al. (2005)** The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. Mol Genet Genomics 272:603-615
- Sung TY, Tseng CC, Hsieh MH (2010)** The SLO1 PPR protein is required for RNA editing at multiple sites with similar upstream sequences in Arabidopsis mitochondria. Plant J
- Syrový I, Hodný Z (1991)** Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 569:175-196
- Takenaka M (2011)** Identifying specific trans-factors of RNA editing in plant mitochondria by multiplex single base extension typing. Methods Mol Biol 718:151-161
- Takenaka M, Brennicke A (2007)** RNA editing in plant mitochondria: Assays and biochemical approaches. In: RNA Editing, p 439
- Takenaka M, Brennicke A (2009)** Multiplex single-base extension typing to identify nuclear genes required for RNA editing in plant organelles. Nucleic Acids Res 37:e13
- Takenaka M, Verbitskiy D, Zehrmann A, Brennicke A (2010)** Reverse genetic screening identifies five E-class PPR proteins involved in RNA editing in mitochondria of Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 285:27122-27129
- Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, Kugelman M, Hartel B, Brennicke A (2012)** Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. Proc Natl Acad Sci U S A im Druck
- Tang J, Kobayashi K, Suzuki M, Matsumoto S, Muranaka T (2010)** The mitochondrial PPR protein LOVASTATIN INSENSITIVE 1 plays regulatory roles in cytosolic and plastidial isoprenoid biosynthesis through RNA editing. Plant J 61:456-466
- Tasaki E, Hattori M, Sugita M (2010)** The moss pentatricopeptide repeat protein with a DYW domain is responsible for RNA editing of mitochondrial ccmF_c transcript. Plant J 62:560-570
- Terribilini M et al. (2007)** RNABindR: a server for analyzing and predicting RNA-binding sites in proteins. Nucleic Acids Res 35:W578-584

- Thompson DA, Ferguson-Miller S (1983)** Lipid and subunit III depleted cytochrome c oxidase purified by horse cytochrome c affinity chromatography in lauryl maltoside. Biochemistry 22:3178-3187
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W (2004)** Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. Nat Rev Genet 5:123-135
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76:4350-4354
- Uchida M, Ohtani S, Ichinose M, Sugita C, Sugita M (2011)** The PPR-DYW proteins are required for RNA editing of rps14, cox1 and nad5 transcripts in *Physcomitrella patens* mitochondria. FEBS Lett 585:2367-2371
- Ullmann A, Jacob F, Monod J (1967)** Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J Mol Biol 24:339-343
- Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997)** The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. Nat Genet 15:57-61
- Uyttewaal M et al. (2008)** PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. J Mol Biol 375:626-636
- Vanin EF (1985)** Processed pseudogenes: characteristics and evolution. Annu Rev Genet 19:253-272
- Vanlerberghe GC, McIntosh L (1992)** Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. Plant Physiol 100:1846-1851
- Vanlerberghe GC, McIntosh L (1994)** Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. Plant Physiol 105:867-874
- Vaughn JC, Mason MT, Sper-Whitis GL, Kuhlmann P, Palmer JD (1995)** Fungal origin by horizontal transfer of a plant mitochondrial group I intron in the chimeric *coxI* gene of *Peperomia*. J Mol Evol 41:563-572
- Verbitskiy D, Hartel B, Zehrmann A, Brennicke A, Takenaka M (2011)** The DYW-E-PPR protein MEF14 is required for RNA editing at site matR-1895 in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 585:700-704
- Verbitskiy D, Merwe JAVd, Zehrmann A, Härtel B, Takenaka M (2012)** The E-Class PPR Protein MEF3 of *Arabidopsis thaliana* Can Also Function in Mitochondrial RNA Editing With an Additional DYW Domain. Plant and Cell Physiology 53:358-367
- Verbitskiy D, Zehrmann A, van der Merwe JA, Brennicke A, Takenaka M (2010)** The PPR protein encoded by the LOVASTATIN INSENSITIVE 1 gene is involved in RNA editing at three sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 61:446-455
- von Heijne G (1986)** Why mitochondria need a genome. FEBS Lett 198:1-4
- Wang L, Brown SJ (2006)** BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. Nucleic Acids Res 34:W243-248
- Wang L, Huang C, Yang MQ, Yang JY (2010)** BindN+ for accurate prediction of DNA and RNA-binding residues from protein sequence features. BMC Syst Biol 4 Suppl 1:S3
- Wang YH (2008)** How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? J Biochem Tech 1:11-20
- Wank H, SanFilippo J, Singh RN, Matsuura M, Lambowitz AM (1999)** A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group II intron RNA. Mol Cell 4:239-250
- Weihe A (2004)** The Transcription of Plant Organelle Genomes
Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles. In: Daniell H, Chase C (eds). Springer Netherlands, pp 213-237
- Weiner AM (2002)** SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. Curr Opin Cell Biol 14:343-350

- Weisberger AS, Wolfe S, Armentrout S (1964)** Inhibition of protein synthesis in mammalian cell-free systems by chloramphenicol. *J Exp Med* 120:161-181
- Welchen E, Hildebrandt TM, Lewejohann D, Gonzalez DH, Braun H-P (2012)** Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817:990-1001
- Wharton DC, Tzagoloff A (1967)** Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. In: Ronald W. Estabrook MEP (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 245-250
- Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A (2008)** Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14:1930-1941
- Williams PM, Barkan A (2003)** A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J* 36:675-686
- Wilson JJ, Kovall RA (2006)** Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* 124:985-996
- Yamada K et al. (2003)** Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. *Science* 302:842-846
- Yamazaki H, Tasaka M, Shikanai T (2004)** PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in Arabidopsis. *Plant J* 38:152-163
- Yang AJ, Mulligan RM (1993)** Distribution of maize mitochondrial transcripts in polysomal RNA: evidence for non-selectivity in recruitment of mRNAs. *Curr Genet* 23:532-536
- Yin C, Richter U, Borner T, Weihe A (2009)** Evolution of phage-type RNA polymerases in higher plants: characterization of the single phage-type RNA polymerase gene from *Selaginella moellendorffii*. *J Mol Evol* 68:528-538
- Youle RJ, Karbowski M (2005)** Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:657-663
- Young DA, Allen RL, Harvey AJ, Lonsdale DM (1998)** Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced. *Mol Gen Genet* 260:30-37
- Yuan H, Liu D (2012)** Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in Arabidopsis. *Plant J*
- Zehrmann A, Verbitskiy D, van der Merwe JA, Brennicke A, Takenaka M (2009)** A DYW domain-containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 21:558-567
- Zerges W (2000)** Translation in chloroplasts. *Biochimie* 82:583-601
- Zhang J, Xing J, Dong J (2011)** Construction of RNAi vector for flower-related gene and verifications of the mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers of Agriculture in China* 5:333-337
- Zhu Q et al. (2012)** SLO2, a mitochondrial PPR protein affecting several RNA editing sites, is required for energy metabolism. *Plant J*
- Zoschke R, Kupsch C, Schmitz-Linneweber C (2010)** RNA editing in plant mitochondria. In: Kempken F (ed) *Plant Mitochondria*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York, pp 177-203
- Zsigmond L et al. (2008)** Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 146:1721-1737
- Zupan JR, Zambryski P (1995)** Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. *Plant Physiol* 107:1041-1047

8 Anhang

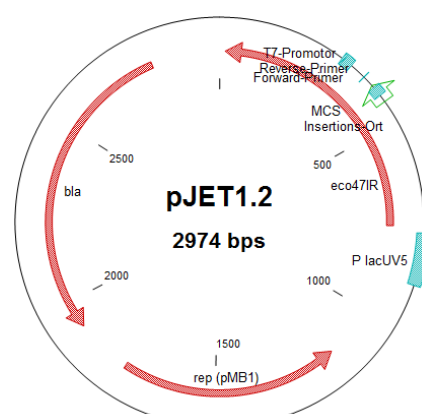
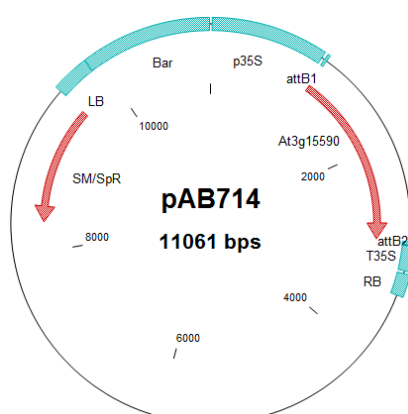
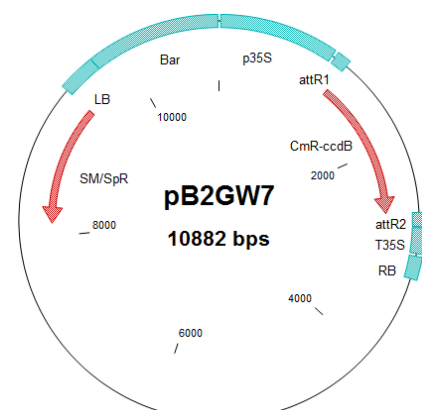
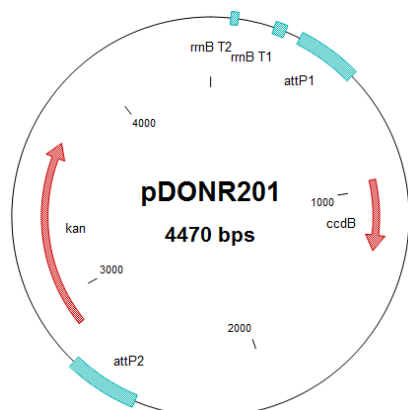
Tabelle A 1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Angegeben sind deren interne Bezeichnungen, ihre Sequenz und ihre Spezifität.

Oligonukleotid	Sequenz	Spezifität
FK482	AAGGCATGATTAGTTCCACAAATC	COX2
FK492	ATGGCTGAGGCTGATGATATTC	Aktin2
FK493	GCACAGTGTGAGACACACC	Aktin2
FK587	GTAATCCAATTCGGCTAAGCGGC	Neomycinphosphotransferase III,fwd
FK588	CCGTCGATACTATGTTATACGCC	Neomycinphosphotransferase III,rev
FK671	GAAAATGATTGTTCTAAAATGGTTATT	At cox2 exon 1
NB878	CTTGCATTATAGGTGTAGCTGCG	A.thaliana cox2 5`CDS.reverse
NB956	GTAATACGACTCACTATAGGGCTGCTTTTAGGAG AGTGATCTG	T7-Promotor sequenz+ A.thaliana cox2 5'UTR (-200 vor ATG)
AB1088	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Lbal
CW1123	AATTCTCCGGTCTGCGTATGAG	A. thaliana At1g42970, fwd; qRT-PCR
CW1124	TTCGCCACTGTCTCTCTCTAA	A. thaliana At1g42970, rev; qRT-PCR
AB1331	AATGTTGACAGAGGGAATCCC	Screening FLAG_465F03 LP
AB1332	CCGAGGATAAAACATGTTTGC	Screening FLAG_465F03 RP
AB1333	ACACATTGTCTGCCTTCATCC	Screening GABI_188B06 LP
AB1334	GCAGTTTGAGTTCACAGAGGC	Screening GABI_188B06 RP
AB1373	TCACGGTTGGGGTTTCTAC	RB4. Right border Primer für screening von FLAG Linien
AB1374	CGTGTGCCAGGTGCCAC	LB4. Left border Primer für screening von FLAG Linien.
AB1375	ATATTGACCATCATACTCATTGC	LB. Screening FLAG lines; Alternative zu 1374
AB1376	GTGGATTGATGTGATATCTCC	RB. Screening FLAG lines; Alternative zu 1373
AB1381	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG	o2588, Screening GABI-Kat, 680bp mit 1382
AB1382	GAAGGCGGAAACGACAATCTG	o3269, Screening GABI-Kat, 680bp mit 1381
AB1453	GATAACGTGAAGGCTAAGATCC	qRT PCR ubq11 Fwd 145bp mit AB1454
AB1454	GGAGGACCAAGTGAAGAGTAGA	qRT PCR ubq11 Rev 145 bp mit AB1453
AB1455	GGAAAGGATACCAACCGTAAAG	qRT PCR At1g15480 (FLAG) Fwd 147bp mit AB1456
AB1456	AAGCCGACAAGCATAATCTCTC	qRT PCR At1g15480 (FLAG) Rev 147bp mit AB1456
AB1457	GATGTACCAGAGGGAGTTGTTG	qRT PCR At3g15590 (GABI-Kat) Fwd 145bp mit AB1458
AB1458	ATTCGTACAGCTCAGATTGACC	qRT PCR At1g15590 (GABI-Kat) Rev 145bp mit AB1457
AB1463	TCGGCTTATCTGTCTCAGTCG	P6a2atp1
AB1464	GATTCTAATGTGATGAAAGC	Pgb2atp1
AB1465	CTTGA ACTATATCATAAACTGATCT	ccb206-up

AB1466	CTTGAAACTAATCGAGACCG	ccb206-rev
AB1467	TGAGAGATGTTGAAGGGG	Cobup
AB1468	CTAGTAGTAAGCAATCCGCC	Cobrev
AB1469	ATACCATGTTCTGATGGTGG	cox3a/-F
AB1470	AAACCATGAAAGCCTGTTGC	cox3b/-R
AB1471	ACGTACATAGCTGTTCCAGC	nad1-F
AB1472	TAATTACTAGACCGACCCGC	nad1-R
AB1473	GCCTTTCTAGGAGCATTACG	nad1-up
AB1474	TTAAGGAAGCCATTGAAAGG	nad1-rev
AB1475	GAGACAAAGAAAGATCAAGGC	PGAN4
AB1476	AGCAATGATCTTCTTTAGATCG	PGBN4
AB1477	ATGTTAGAACATTTCTGTGAATG	nad4-up1
AB1478	CTCCTATAATAATGAACATAGGGA	nad4-rev1
AB1479	GAACATACAGGGAATTGGAG	nad4-up2
AB1480	CCAACAAGAAAAGGTATAAATATG	nad4-rev2
AB1481	CCTTCACTTTTAGCTTTGAATTAC	orfx-up1
AB1482	CTCTTCACGAACCTGTACAATC	orfx-rev1
AB1483	TCATTACGAAGATGTATCAG	Rpl5a
AB1484	AGTCTCATCTTGTGTGTTGG	Rpl5b
AB1943	CAACCCGAGATGTTAGAAGG	Atp9a
AB1944	TTGCTTTATGAGACTGAATGG	Atp9b
AB1945	AGCGTGTCTGTTGTAATG	ccb203-up
AB1946	ATACGTTCTACGGACCGATG	ccb203-rev
AB1947	ACAAGAAACAACCACCAGCG	Ccb382a
AB1948	TCCTTTCAGGATAAAGCGGC	Ccb382b
AB1949	GAAGGAACCGGACTTTTGAC	Ccb382up
AB1950	CGGGCTTCTATTGCTACG	Ccb382rev
AB1951	GAGAAGCCAACTCGAACGG	Ccb452up1
AB1952	CGCACATAAGCCGCCGGGTCGC	Ccb452rev1
AB1953	CCACCCAGCAGTAATGGTG	Ccb452up2
AB1954	GTGCCTTGACGCGCCGAGCCAC	Ccb452rev2
AB1955	GGGTTGAAGTTTAGACCGC	matRup1
AB1956	CTATCTCTGATCGAGCTTG	matRrev1
AB1957	GGATCGAGGTATCATTAGCC	matRup2
AB1958	CTTGTTGAGGTTGACCG	matRrev2
AB1959	CGGAATTTTCACCTATTTTATC	nad3-up
AB1960	GAAGCACCCCTTTCCATTC	nad3-rev
AB2024	GCCACTTCCCCTTCAGTTGCTG	Atp4up

AB2025	CCGCTCTTCTGAGAGCATGAAC	Atp4rev
AB2026	TCAAAGACCAGAAGCTACGC	Ccb256a
AB2027	CAAGATACGGGTTGAGAAGG	Ccb256b
AB2028	GAAAGCAGAATTCGTTCCGG	Nad2-up1
AB2029	CCCACATATGAAAAGGAACTG	Nad2-rev1
AB2030	GTTACAGCATTCTTTCTATTGC	Nad2-up2
AB2031	GATATGAACTGAGTGCCATTTG	Nad2-rev2
AB2032	ATTATTTCTATTTTAGGTATTCCGG	Nad4L-F
AB2033	TTCTACAGCAATAGTACCTCG	Nad4L-R
AB2034	CATCCATAAGTAGCTTGGTCC	Nad5a
AB2035	CGATGACCCTCTTTAGATCG	Nad5b
AB2036	GATATGATGATTGGTTAATACTTCTG	Nad5-up
AB2037	AACTACTCACTATCAAAATGAAAG	Nad5-rev
AB2038	GATACTTTCTGTTTTGTCGAGC	Nad6-up
AB2039	CTCATTATAGTCCTCCTAAAATC	Nad6-rev
AB2040	CGAAGAGCAGCACCTTACGA	Nad7-up
AB2041	CTATCTATCCACCTCTCCAAACACAA	Nad7-rev
AB2042	GACGACTAGGAAAAGGCA	Nad7-up2
AB2043	AACATTACACCACTGAATCCC	Nad7-R
AB2060	GCTAGCATGTTTGCTCTTTCCAAGGT	At1g15480 Klonierung GFP-Vektor, FWD, <i>NheI</i>
AB2061	GGTACCAATCAAGGAGATCCGAGAGAG	At1g15480 Klonierung GFP-Vektor, REV, <i>KpnI</i>
AB2062	CCACTAGTATGTATTCGCTTTGAGGAT	At3g15590 Klonierung GFP-Vektor, FWD, <i>SpeI</i>
AB2063	GGTACCATATGTCAAGTAAAACAGAC	At3g15590 Klonierung GFP-Vektor, REV, <i>KpnI</i>
AB2090	GGA CCT CGA GAA TTC TCA A	35S Promotor von pOL GFPS65C
AB2091	TTT GTG CCC ATT AAC ATC AC	GFP von pOL GFPS65C
AB2112	GGACATCAATGGTATCGGAC	qRT PCR cox2 Fwd, 160bp mit AB2113
AB2113	GAGTTTTGGCTGGTACAACC	qRT PCR cox2 Rev, 160bp mit AB2112
AB2122	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGA AGGAGATAGAACCATGTATTCGCTTTGAGGAT	Gateway attB-region + Shine-Dalgarno. At3g15590 FWD
AB2123	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAT ATGTCAAGTAAAACAGACACTGG	Gateway attB-region. At3g15590 REV
AB2216	TGGAAAGATCGGAACATGGG	nad9-F
AB2217	GGATCATCATAGCGTACTTGG	nad9-R
AB2218	GGTCGATTAAGAGCGCAGC	Rpl16up
AB2219	CGACCACTGAACAACTTGG	Rpl16rev
AB2220	GGGTCAAATGTTGGAACCTCG	rps3-up
AB2221	CGTTTCGGATATAGCACGTCTCC	rps3-rev2
AB2222	GGCACGAAAAGGAAATCCG	rps3-up2

AB2223	GAGCGGGACTTATTTTGG	rps3-rev
AB2224	AGGGACGCAATGCGGC	PGArps4
AB2225	GGCGGCATCCCCTCTTAG	Rps4rev
AB2226	CGACCTATTGCTTCGCATCC	Rps4up
AB2227	GAGTGACTACGCCGATC	PGBrps4
AB2228	GGTAGAGAAGAAAAACGGCG	Rps12up
AB2229	CCGGAATTCCCATCAAATC	Rps12rev
AB2230	GGGAGTAATGACCGGCACAC	Seqprimer At3g15590, 1185bp compl
AB2231	CCCAACCACTCCCACAACCTG	Seqprimer At3g15590, 618bp compl
AB2364	CATCATTCCGTGGCGTTATC	SM/SpR von pB2GW (278 bp with AB2365)
AB2365	GCACTACATTTGCTCATCG	SM/SpR von pB2GW (278 bp with AB2364)
pJET1 Fw	GCCTGAACACCATATCCATCC	pJET1 Forward Sequencing Primer 451-471
pJET1 Rev	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC	pJET1 Reverse Sequencing Primer



Fortsetzung nächste Seite

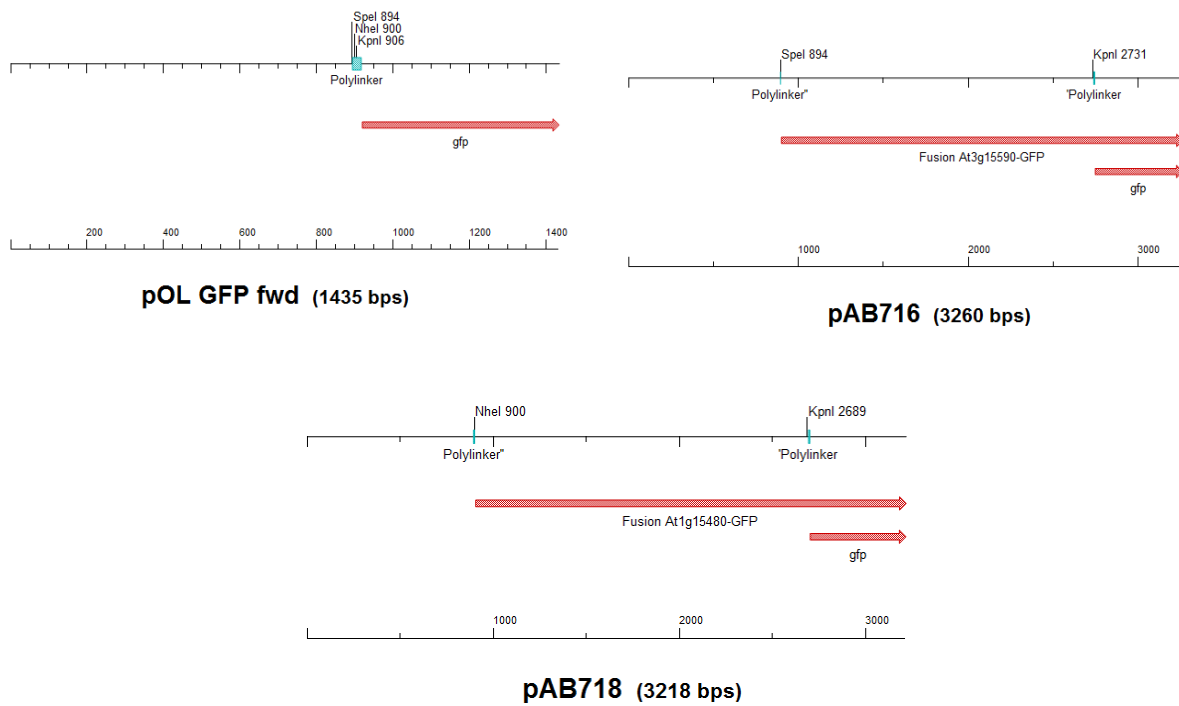


Abbildung A 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

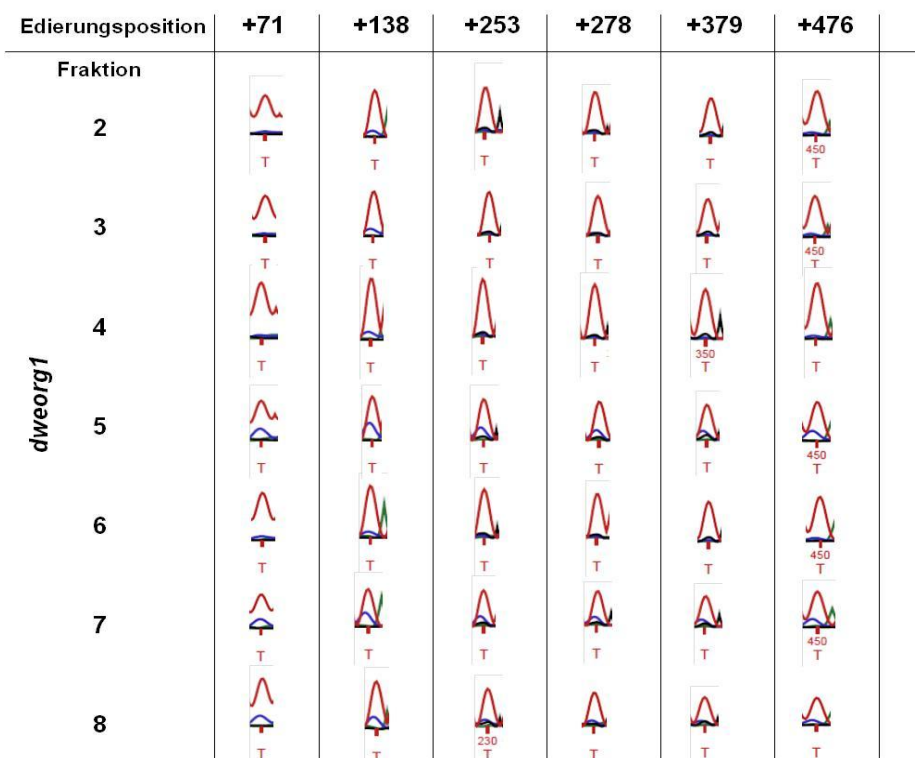
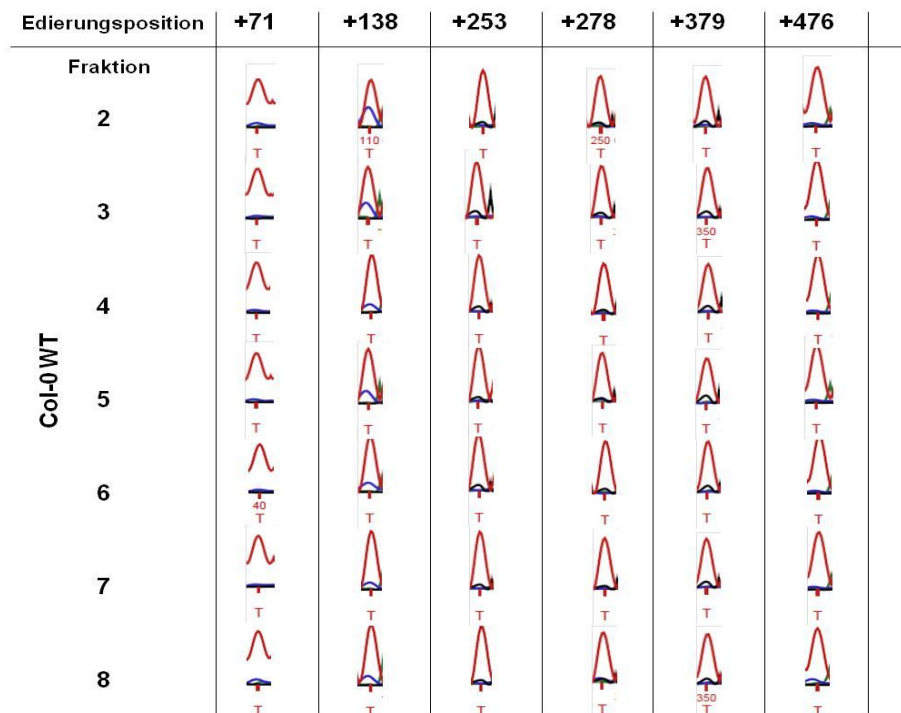


Abbildung A 2: Analyse der RNA-Edierung des *cox2*-Transkripts aus Polysomen von Wildtyp- und *dweorg1* Pflanzen. Elektropherogramme von sechs Edierungspositionen des *cox2*-Transkripts aus den Polysomenfraktionen zwei bis acht. Die Edierungsposition +138 ist partiell ediert.

9 Publikationen und Kongressbeiträge

9.1 Publikationen

Bruhs A, Breitmeier N, Knittler K, Kempken F (2012) DWEORG1, a P type pentatricopeptide repeat protein is required for translation of the mitochondrial COX2 protein from *Arabidopsis thaliana*. (In prep.)

Bruhs A, Kempken F (2011) RNA editing in plant mitochondria. In: KEMPKEN F (ed) Plant Mitochondria. Springer Verlag, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp157-176

Kempken F, Bolle N, Bruhs A (2009) Higher plant *in organello* systems as a tool to establish a model for RNA editing. *Endocytobiosis Cell Res* 19:1-10

9.2 Kongressbeiträge

Bruhs A, Bolle N, Kempken F (2011) A pentatricopeptiderepeat protein from *A. thaliana* is involved in posttranscriptional processes in mitochondria. 24. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Wermelskirchen-Dabringhausen (POSTER)

Bruhs A, Schmidt T, Kempken F (2010) A pentatricopeptiderepeat protein from *Arabidopsis thaliana* influences translation of the mitochondrial *cox2* mRNA. ISE Meeting, Tromsø, Norwegen (VORTRAG)

Bruhs A, Bolle N, Kempken F (2009) Towards identification of RNA-protein complexes and their role for site-specific RNA editing in mitochondria of higher plants. XIII. Annual Meeting of the German Section of the International Society for Endocytobiology, Berlin, pp5 & Leopoldina Symposium Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria, Berlin, pp31 (POSTER)

Bruhs A, Kempken F (2009) Yeast three-hybrid assay for identification of editing site binding peptides. Gordon Research Conference on RNA Editing, Galveston, Texas, USA (POSTER)

Bruhs A, Bolle N, Kempken F (2008) Towards the RNA editing mechanism in higher plants. 21. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Wermelskirchen-Dabringhausen (POSTER)

Bruhs A, Kempken F (2008) Towards identification of *cox2* RNA-protein complexes using yeast three-hybrid analyses. XII. Jahrestagung der Deutschen Sektion der Internationalen Gesellschaft für Endocytobiologie, München (POSTER)

10 Danksagung

Eine Vielzahl von Personen hat auf ganz unterschiedliche, aber immer hilfreiche Art und Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Für diese Unterstützung möchte ich mich bedanken.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Frank Kempken, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung, seine Unterstützung und vor allem für sein Vertrauen in meine Arbeit danken. Des Weiteren bedanke ich mich dafür, dass er mir stets die Freiheit gelassen hat, eigene Ideen umzusetzen. Bedanken möchte ich mich außerdem dafür, dass er mir die Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen ermöglicht hat.

Mein Dank gilt allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung „Botanische Genetik und Molekularbiologie“! Darunter Abhishek für seine Hilfe bei der Erstellung der Proteinstrukturen, Elkbir für sein stets aufmunterndes „Guten Morgen“, Krisztina für ihr offenes Ohr und ihre rege Anteilnahme an Freud und Leid, Hanna für die Aufrechterhaltung von Recht und Ordnung im Labor und viele lustige Stunden und Linda für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit und insbesondere für ihre offene und herzliche Art und die vielen hilfreichen Gespräche über Laboralltag und alles, was darüber hinausgeht! Steffi, René, Kathi und Tolke danke ich für die schöne Zeit in „meinem“ Labor, in der wir gemeinsam den Geheimnissen der PPR-Proteine auf den Grund gegangen sind.

Für die Bereitstellung von Geräten und den einen oder anderen fachlichen Rat danke ich dem ZBM und allen Abteilungen des Botanischen Instituts. Für die Hilfe jenseits von PCR und Western-Blot während der letzten Jahre danke ich der Werkstatt des Biozentrums, dem Sekretariat und Petra Kohrt.

Bei Dr. Mizuki Takenaka bedanke ich mich für die Durchführung der SNaPshot-Analysen. Für die Bereitstellung von Antikörpern danke ich Dr. Géraldine Bonnard.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Lieben! Ich danke meiner Familie für ihre immerwährende liebevolle und vorbehaltlose Unterstützung. Auf diese Weise haben sie wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

... mein größter Dank gilt Nils. Für alles.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anika Bruhs
 Geburtsdatum: 27.11.1981
 Geburtsort: Heide (Holstein)
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1988-1992 Grundschule Wesseln Grundschule
 1992-2001 Nordsee Gymnasium Büsum Gymnasium, Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Studium

2001-2004 Bachelorstudium „Biologie der Organismen“ an der Universität Osnabrück
 2004 Anfertigung der Bachelorarbeit mit dem Titel „Sexuelle Selektion beim Europäischen Nerz *Mustela lutreola* (Linné, 1761) unter besonderer Berücksichtigung der Verwandtenerkennung“
 2004-2006 Masterstudium „Biologie der Zellen“ an der Universität Osnabrück
 2006 Anfertigung der Masterarbeit mit dem Titel „Molekulare und zellbiologische Analyse eines Thioredoxins aus *Arabidopsis thaliana* (At4g29670) mit unbekannter Funktion“
 seit 2007 Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Betreuung von Prof. Dr. Frank Kempken in der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie am Botanischen Institut

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden 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 anderen Stellen im Rahmen eines Prüfungsverfahrens an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel oder an einer anderen Hochschule vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

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

Kiel, der

.....

Anika Bruhs