Charakterisierung der mitochondrialen RNA-Prozessierungs-Faktoren 4 und 6 in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von:

Katrin Stoll

aus Heidenheim an der Brenz

2015

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm:

Prof. Dr. Joachim Ankerhold

Erstgutachter:

Prof. Dr. Stefan Binder, Institut für Molekulare Botanik, Universität Ulm

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Anita Marchfelder, Institut für Molekulare Botanik, Universität Ulm

Tag der Promotion:

14.07.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 7

1. Einleitung 8

1.1. *Arabidopsis thaliana* besitzt ein eigenständiges mitochondriales Genom. 8

1.2. Post-transkriptionale Prozessierung mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* 9

1.3. PPR-Proteine - eine große Proteinfamilie in *A.thaliana* 12

1.4. Fragestellung 14

2. Material und Methoden 15

2.1 Material 15

2.1.1. Puffer und Lösungen 15

2.1.1.1. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit DNA 15

2.1.1.2. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA 16

2.1.1.3. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen 17

2.1.1.4. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) 19

2.1.2. Gele, Ladepuffer, Laufpuffer und Größenstandards 19

2.1.3. Nährmedien 22

2.1.3.1. Nährmedien zur Kultivierung von *A.thaliana* 22

2.1.3.2. Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien 22

2.1.4. Nukleinsäuren 23

2.1.5. Antikörper 26

2.1.6. Enzyme und Inhibitoren 26

2.1.7. Organismen 27

2.1.7.1. Bakterienstämme 27

2.1.7.2. *A.thaliana* 27

2.1.8. Präparation, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen 29

2.1.9. Software und Internettools 30

2.2. Methoden 31

2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden 31

2.2.2. Arbeiten mit DNA 31

2.2.2.1. gDNA-Extraktion aus grünem Blattgewebe 31

2.2.2.2. *Reverse-Transcription*-PCR 31

2.2.2.3. Southern-Blot-Analyse 33

2.2.2.4. Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten 34

2.2.3. Arbeiten mit RNA 34

2.2.3.1. Isolierung von Gesamt- und mitochondrialer RNA 34

2.2.3.2. DNase-Verdau 35
2.2.3.3. RNA-Ligation 35
2.2.3.4. cDNA-Synthese 36
2.2.3.5. Terminator-Exonuklease-Verdau 37
2.2.3.6. *Primer-Extension*-Analyse 37
2.2.3.7. Northern-Blot-Analyse 38
2.2.3.8. *in vitro*-Transkription 39
2.2.3.9. *Electro-Mobility-Shift-Assay* 40
2.2.4. Arbeiten mit Proteinen 41
2.2.4.1. Überexpression von rekombinanten Proteinen 41
2.2.4.2. Zellaufschluss 41
2.2.4.3. Western-Blot-Analyse 42
2.2.4.4. Färbung von Proteingelen 42
2.2.4.5. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit His-Tag 43
2.2.4.6. Gelchromatografische Aufreinigung 43
2.2.4.7. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Strep-Tag 43
2.2.5. Arbeiten mit *A.thaliana* 44
2.2.5.1. Kultivierung von *A.thaliana* 44
2.2.5.2. Kreuzen von *A.thaliana* 44
2.2.5.3. Transformation von *A.thaliana* 45
2.2.5.4. Selektion transformierter *A.thaliana*-Pflanzen 45
2.2.6. Arbeiten mit Bakterien 46
2.2.6.1. Kultivierung von *E.coli* 46
2.2.6.2. Kultivierung von *A.tumefaciens* 46
2.2.6.3. Transformation von *A.tumefaciens* 46
3. Ergebnisse 47
3.1. Untersuchung des *ccmB*-mRNA-Polymorphismus in *Arabidopsis thaliana* 47
3.1.1. Zusätzliche *ccmB*-Transkripte in L*er* 47
3.1.2. Charakterisierung der *ccmB*-Transkripte 48
3.1.3. Kartierung des *RPF4*-Lokus 49
3.1.4. Identifizierung von *RPF4* in L*er* 50
3.1.5. *RPF4*-Allele in verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen 52
3.1.6. *ccmB*-mRNA-Prozessierung durch chimäre Proteine 55
3.1.7. Einfluss von RPF4(L*er*) auf die Bildung größerer *ccmB*-Transkripte 58
3.2. Beteiligung von RPF3 und RPF6 bei der *ccmC*-mRNA-Prozessierung 61

3.2.1. Korrelation zwischen dem *ccmC*-Genotyp und dem *ccmC*-mRNA-Phänotyp 61
3.2.2. Untersuchung von *ccmC*-Vorläufertranskripten 66
3.2.3. Das Vorliegen des *ccmC*-Genotyps ist homoplasmatisch. 68
3.2.4. Nicht-funktionale *RPF3*-Allele in Lip-0, Sorbo und Ta 69
3.2.5. Ursache des Ausfalls von RPF3 in Lip-0, Sorbo und Ta 72
3.2.6. Akkumulation von *ccmC*-Vorläufermolekülen in Ta 75
3.2.7. Identifizierung von *RPF6* 77
3.2.8. *RPF6*-Allel in No-0 79
3.2.9. Nicht-funktionale *RPF6*-Allele in weiteren Ökotypen 81
3.2.10. Mögliche Gründe des Ausfalls von RPF6 in Kas-1, Ms-0, Nok-1 und Rube 83
3.2.11. RPF3 und RPF6 in Ökotypen mit nicht-korrelierendem *ccmC*-Genotyp 84
3.2.12. RPF3 und RPF6 - zwei ähnliche Proteine 86
3.2.13. Überexpression und Aufreinigung rekombinanter RPF3- und RPF6-Proteine 89
3.2.14. Bindung von RPF3 und RPF6 an die *ccmC*-mRNA 94
4. Diskussion 98
4.1. Weitere RF-ähnliche RNA PROCESSING FACTORs sind an der 5‘-Reifung mitochondrialer Transkripte in *Arabidopsis thaliana* beteiligt. 98
4.2. RPF4 vermittelt die 5‘-Reifung mehrerer *ccmB*-Transkripte. 99
4.3. RPF3 und RPF6 sind an der 5‘-Reifung unterschiedlicher *ccmC*-Transkripte beteiligt. 102
4.4. Die Co-Adaptation zwischen Mitochondrien und Kern beeinflusst die 5‘-Prozessierung der *ccmC*-mRNAs in *A.thaliana*. 105
4.5. Vermutlich verursacht eine *gain-of-function*-Mutation die Akkumulation von *ccmC*-Vorläufertranskripten in Ta. 109
4.6. Die Bindung der RPFs stromaufwärts der Prozessierungsstelle vermittelt die 5‘-Reifung der Transkripte. 110
4.7. RPF3 und RPF6 binden *in vitro* an die *ccmC*-mRNA. 112
4.8. Der N-Terminus von RPF4(L*er*) trägt einen entscheidenden Beitrag zur Funktionalität des Proteins bei 113
4.9. RPF3 und RPF6 unterscheiden sich im Wesentlichen in den terminalen Repeats. 115
4.10. Der Ausfall eines RPF scheint keine negativen Auswirkungen auf die Pflanzen zu haben. 117
5. Zusammenfassung 120
6. Literaturverzeichnis 121
7. Anhang 126
Anhang 1: Schematische Konstruktkarten 126
Anhang 2: Bestimmung neuer *ccmB*-mRNA-5‘-Enden in Col und L*er* 127
Anhang 3: *RPF4*-Allele in verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen 130

Anhang 4: Alignment von RPF4 verschiedener *A.thaliana* Ökotypen 134
Anhang 5: Expression der chimären *RPF4*-Gene 136
Anhang 6: Bestimmung von *ccmC*-mRNA-5‘-Enden in Lip-0, Sorbo und Ta 137
Anhang 7: Alignment von RPF3 verschiedener *A.thaliana* Ökotypen 140
Anhang 8: Alignment von RPF6 aus Col und No-0 142
Anhang 9: Alignment von RPF3 und RPF6 aus Col 143
Anhang 10: RPF6 in Sorbo 144
Danksagung 146
Eidesstattliche Versicherung 147
Publikationsliste 148
Lebenslauf 149

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(n)
A.thaliana	*Arabidopsis thaliana*
A.tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
BIR6	BSO-INSENSITIVE ROOTS 6
bp	Basenpaar(e)
CMS	Cytoplasmatische männliche Sterilität
Col	Columbia
CR-RT-PCR	*Circularized-Reverse-Transcription*-PCR
E.coli	*Escherichia coli*
EMSA	*Electro-Mobility-Shift-Assay*
EtBr	Ethidiumbromid
gDNA	Gesamt-DNA
gRNA	Gesamt-RNA
kDa	Kilodalton
L*er*	Landsberg *erecta*
Mbp	Megabasenpaar(e)
nt	Nukleotid(e)
OTP43	ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING DEFECT 43
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pET32a^{Strep}	pET32a mit zusätzlichem Strep-Tag
PNPase	Polynukleotid-Phosphorylase
PPR	*Pentatricopeptide Repeat*
PP2A	PROTEIN PHOSPHATASE 2A subunit 3
RF	RESTORER OF FERTILITY
RFL9	RF-like 9
rhx	*Random-Hexamer*
RPF	RNA PROCESSING FACTOR
rRPF3$^{N(His)}$	rekombinantes, N-terminal verkürztes RPF3 mit His-Tag am N-Terminus
rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$	rekombinantes, N-terminal verkürztes RPF3 mit His-Tag am N-Terminus und Strep-Tag am C-Terminus
rRPF6$^{N(His)}$	rekombinantes, N-terminal verkürztes RPF6 mit His-Tag am N-Terminus
rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$	rekombinantes, N-terminal verkürztes RPF6 mit His-Tag am N-Terminus und Strep-Tag am C-Terminus
RT	*Reverse-Transcription*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEx	Terminator-Exonuklease
UBC9	UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 9

1. Einleitung

1.1. *Arabidopsis thaliana* besitzt ein eigenständiges mitochondriales Genom.

Das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) umfasst bei einer Größe von ca. 367 Kilobasen 57 Gene. Darin enthalten sind drei rRNA-, ein mit einer Anzahl von 22 unvollständiger Satz an tRNA- sowie Protein-kodierende Gene, wobei in letztere Gruppe Gene fallen, die für Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, aber auch für Komponenten der Cytochrom c- und Häm-Biosynthese kodieren [Unseld et al. 1997]. Die mitochondrial-kodierten Gene vermitteln essentielle Eigenschaften bezüglich der Zellfunktion und damit verbunden der Lebensfähigkeit der Pflanzen. Für die komplexen Vorgänge des RNA-Metabolismus in den Mitochondrien sind allerdings mehrere hundert Kern-kodierte RNA-bindende Proteine notwendig. Dabei ist zu erwähnen, dass die meisten dieser Proteine in post-transkriptionale Prozesse involviert sind [Barkan and Small 2014, Hammani and Giegé 2014].

Im Gegensatz zum auf fünf Chromosomen organisierten Kern- und dem ringförmigen Plastiden-Genom [Sato et al. 1999] ist die Struktur des mitochondrialen Genoms noch weitestgehend ungeklärt. Die Annahme, dass das mitochondriale Genom als großes ringförmiges „Master-Chromosom“ vorliegt, welches alle Gene sowie nicht-kodierenden Bereiche beinhaltet und mit subgenomischen ringförmigen Molekülen ein Gleichgewicht bildet, konnte bislang nicht verifiziert werden. Es war lediglich möglich lineare sowie kleinere ringförmige und komplexe Moleküle nachzuweisen, die vermutlich ein Resultat von Rekombinationsereignissen oder Rekombinations-abhängiger Replikation sind [Backert and Börner 2000, Backert et al. 1997, Lonsdale et al. 1988]. In den Zellen von *A.thaliana* liegen in der Regel weniger Kopien mitochondrialer Genome als Mitochondrien vor. Als Folge davon tragen die meisten Mitochondrien vermutlich nur einen Teil des mitochondrialen Genoms. Eine Korrelation zwischen der Kopienzahl und dem Transkriptionsgrad konnte bisher nicht aufgezeigt werden [Preuten et al. 2010]. Es wird weiter angenommen, dass der Austausch von Genprodukten oder Genen zwischen einzelnen Mitochondrien durch hochfrequentierte Spaltungs- und Verschmelzungsereignisse (engl. „*fission and fusion*“) erfolgt [Logan 2006].

1.2. Post-transkriptionale Prozessierung mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana*

In *A.thaliana* sind zwei Kern-kodierte RNA-Polymerasen des T3/T7-Phagen-Typs, RPOTm und RPOTmp, für die Transkription der mitochondrialen Gene verantwortlich [Hedtke et al. 1997, Hedtke et al. 2000, Hedtke et al. 1999]. Auf Grund häufiger Rekombinationsereignisse und der komplexen Struktur des mitochondrialen Genoms entstehen die für Pflanzen typischen komplexen Transkripte [Forner et al. 2007, Mackenzie 2007]. Neben dem Vorhandensein mehrerer Promotoren pro Transkriptionseinheit [Kühn et al. 2005] ist dies auch auf diverse post-transkriptionale Reifungsprozesse, wie *cis*- und *trans*-Speißen, RNA-Editing bzw. die Bildung sekundärer 3‘- und 5‘-Enden, des Primärtranskripts zurückzuführen.

Innerhalb der Protein-kodierenden mitochondrialen Gene von *A.thaliana* sind 23 Typ II Introns bekannt [Bonen 2008]. Da die Fähigkeit des Selbst-Spleißens verloren gegangen ist, sind Kern-kodierte Proteine für das Entfernen der Introns notwendig [Falcon de Longevialle et al. 2010]. Zu diesen Proteinen zählen u.a. die *Pentatricopeptide Repeat*(PPR)-Proteine. Innerhalb dieser Gruppe konnten sowohl PPR-Proteine der P- als auch der PLS-Subfamilie als Spleißing-Faktoren identifiziert werden. Als Beispiele für PPR-Proteine, die in das *trans*-Spleißen involviert sind, wären hier ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING DEFECT 43 (OTP43) und BSO-INSENSITIVE ROOTS 6 (BIR6) zu nennen. Während OTP43 für das *trans*-Spleißen von Intron 1 der *nad1*-mRNA verantwortlich ist, vermittelt BIR6 durch die Entfernung von Intron 1 die Reifung des *nad7*-Transkripts [Falcon de Longevialle et al. 2007, Koprivova et al. 2010]. Mit NUCLEAR MATURASE 1 ist ein weiteres Protein, welches das *trans*-Spleißen von Intron 1 des *nad1*-Transkripts beeinflusst, beschrieben. Das Protein ist außerdem wichtig für das *cis*-Spleißen von *nad2* Intron 1 sowie *nad4* Intron 2 [Keren et al. 2012]. Es wird teilweise angenommen, dass viele der beteiligten Proteine das Spleißing-Ereignis durch eine RNA-Bindung innerhalb der Intronsequenz und einer damit verbundenen korrekten Intronfaltung herbeiführen [Barkan and Small 2014]. Hinweise auf diese Annahme liefert mit PPR5 ein PPR-Protein aus Mais, welches allerdings nicht in Mitochondrien sondern in Chloroplasten seine Funktion ausübt. Die vermeintliche Bindungsstelle von PPR5 liegt innerhalb des *trnG*-Introns. Es scheint, dass PPR5 hier sowohl die RNA-Stabilität als auch das Spleißen beeinflusst [Williams-Carrier et al. 2008].

Mitochondriale Transkripte können weiter positionsspezifisch durch eine Deaminierungsreaktion dahingehend modifiziert werden, dass Cytidine in Uridine überführt werden. Bislang sind 456 solcher Editing-Stellen innerhalb der mitochondrialen Transkripte beschrieben [Chateigner-Boutin and Small 2010, Giegé and Brennicke 1999]. Weiter ist bekannt, dass PPR-Proteine der PLS-Subfamilie durch eine sequenzspezifische Bindung stromaufwärts des zu editierenden Cytidins die Veränderung der mRNA herbeiführen [Barkan and Small 2014]. Mit MITOCHONDRIAL RNA EDITING FACTOR 1 konnte das erste Protein identifiziert werden, welches das Editing mitochondrialer Transkripte beeinflusst [Zehrmann et al. 2009]. In den nachfolgenden Jahren wurden weitere, in das Editing involvierte Proteine beschrieben. So ist beispielsweise OTP71 am Editing des *ccmF*$_{N2}$- und OTP72 am Editing des *rpl16*-Transkripts beteiligt [Chateigner-Boutin et al. 2013]. Neben den genannten Proteinen, die den PPR-Proteinen der PLS-Subfamilie angehören, ist mit den MULTIPLE ORGANELLAR RNA EDITING FACTORs eine weitere Proteinklasse, die zum Editing beiträgt, bekannt [Takenaka et al. 2012].

Zuletzt kann die Reifung des Primärtranskripts auch die Bildung der 3‘- und 5‘-Enden bedeuten. Bezüglich der 3‘-Enden wird angenommen, dass zwei Enzyme mit einer 3‘→5‘-Exoribonukleaseaktivität involviert sind [Perrin et al. 2004a, Perrin et al. 2004b]. Zunächst werden große Bereiche des Vorläufertranskripts durch die mitochondriale Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) stromabwärts des reifen 3‘-Endes abgebaut. Im weiteren Verlauf verdaut die RNase R Homolog 1 die noch überhängenden Nukleotide (nt). Mit MITOCHONDRIAL STABILITY FACTOR 1 konnte kürzlich ein in die 3‘-Prozessierung des mitochondrialen *nad4*-Transkripts involviertes PPR-Protein identifiziert werden. Das Protein bindet an die letzten 20 nt der *nad4*-mRNA. Vermutlich verhindert dies ein weiteres Angreifen der 3‘→5‘-Exoribonukleasen [Haïli et al. 2013]. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch schon bei der Reifung plastidärer Transkripte in Mais beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass durch die sequenzspezifische Bindung von PPR10 sowohl 3‘→5‘- als auch 5‘→3‘-Exoribonukleasen am weiteren Abbau der mRNA gehindert werden [Pfalz et al. 2009].

Im Kontext der 3‘-Prozessierung soll auch kurz der Abbau mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* thematisiert werden. Es ist beschrieben, dass Poly(A)-Anhänge mitochondrialer Transkripte den Abbau dieser induzieren, wobei die Mehrheit der Polyadenylierungen am 3’-Ende zu finden ist [Hammani and Giegé 2014]. Die bereits erwähnte PNPase scheint auf Grund ihrer 3‘→5‘-Exoribonukleaseaktivität am Abbau der markierten Transkripte beteiligt zu sein.

Dies zeigt sich etwa darin, dass die Herunterregulierung der PNPase die Akkumulation polyadenylierter Transkripte zur Folge hat [Holec et al. 2006, Perrin et al. 2004a, Perrin et al. 2004b]. Kürzlich konnte desweiteren gezeigt werden, dass auch die Poly(A)-spezifische Ribonuklease AHG2 zusammen mit einer Poly(A)-Polymerase den Poly(A)-Status mitochondrialer Transkripte beeinflusst [Hirayama et al. 2013].

Die Reifung der 5‘-Enden ist nur in Ansätzen verstanden, wobei vor allem die Bedeutung dieses Prozesses unklar ist. Mit den RNA PROCESSING FACTORs (RPFs) konnten PPR-Proteine der P-Subfamilie als wichtige Komponenten der 5‘-Prozessierung ausgemacht werden [Binder et al. 2013]. Diese Proteine scheinen aber nicht allein die Prozessierung zu bewerkstelligen. Anhaltspunkte für die Beteiligung weiterer Proteine sind neben der fehlenden enzymatischen Aktivität der PPR-Proteine der P-Subfamilie auch geringe Mengen an reifen Transkripten in Abwesenheit eines RPF. Einen Hinweis auf die Beteiligung einer bislang nicht näher beschriebenen putativen Endonuklease liefert die indirekte Analyse der Spalt-Produkte. Teilweise war es möglich sogenannte 5‘-*Leader*-Moleküle zu detektieren. Diese entstehen durch einen endonukleolytischen Schnitt neben den 5‘-reifen Transkripten und weisen ein 3‘-Ende auf, welches dem Nukleotid stromaufwärts des reifen 5‘-Endes der mRNA entspricht. Der endonukleolytische Schnitt ist vermutlich erst nach der Bindung des entsprechenden RPF an die mRNA und einer damit verbundenen Änderung der Sekundärstruktur möglich. Da wie oben erwähnt oftmals geringe Mengen reifer Transkripte auch in Abwesenheit des RPF vorliegen, scheint die Änderung der Sekundärstruktur in einem gewissen Maße auch spontan zu erfolgen [Binder et al. 2013].

Die bekannten RPFs sind teilweise RESTORER OF FERTILITY(RF)-ähnliche Proteine. RFs spielen eine entscheidende Rolle in Pflanzenspezies mit cytoplasmatischer männlicher Sterilität (CMS), wobei CMS die maternal vererbte Unfähigkeit einer zweigeschlechtlichen Pflanze zur Bildung fertiler Pollen beschreibt [Bentolila et al. 2002, Brown et al. 2003, Chase 2007, Desloire et al. 2003, Fujii and Toriyama 2008, Hu et al. 2012, Kazama and Toriyama 2003, Koizuka et al. 2003, Wang et al. 2006]. CMS wird durch chimäre, mitochondriale Gene verursacht und dient der Produktion von F_1-Hybridsamen verschiedener Getreidesorten. Um hier allerdings das Ansetzen von Samen zu gewährleisten, wird ein männlicher Elter verwendet, der im Kern ein RF-Gen trägt. In Gegenwart des RF-Gens wird die männliche Fertilität wieder hergestellt, indem die Wirkung des mitochondrialen, CMS-auslösenden Gens auf verschiedene Weisen unterdrückt wird [Chase 2007].

In *A.thaliana* wurden bislang 26 RF-ähnliche Gene identifiziert. Diese sind zum Großteil in zwei Clustern auf Chromosom 1 lokalisiert [Desloire et al. 2003]. Neben der Ähnlichkeit untereinander sind die RF-ähnlichen PPR-Proteine durch eine Vielzahl an nicht-synonymen Aminosäure(AS)-Austauschen gekennzeichnet [Fujii et al. 2011]. Kürzlich wurde CMS in Nachkommen einer Kreuzung der *A.thaliana* Ökotypen Sha und Mr-0 beobachtet. Die männliche Sterilität wird vermutlich durch die Interaktion eines offenen Leserasters im mitochondrialen Genom (Sha) mit zwei Regionen im Kerngenom (Mr-0) verursacht. Ob die RF-ähnlichen Gene in diesem Kontext eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht geklärt [Gobron et al. 2013].

1.3. PPR-Proteine - eine große Proteinfamilie in *A.thaliana*

Die bereits mehrfach erwähnten PPR-Proteine stellen eine der größten Proteinfamilien in Landpflanzen dar. In *A.thaliana* sind weit mehr als 400 solcher Proteine im Kerngenom kodiert [Lurin et al. 2004], wobei diese zum Großteil in die Mitochondrien oder Chloroplasten transportiert werden und dort den RNA-Metabolismus beeinflussen [Lurin et al. 2004].

PPR-Proteine zeichnen sich durch 35 AS lange degenerierte Motive aus, wobei Proteine mit bis zu 30 Wiederholungen dieses Motivs beschrieben sind [Small and Peeters 2000]. Die PPR-Proteine der Landpflanzen lassen sich in zwei Subfamilien einteilen. Proteine der P-Subfamilie weisen mehrere klassische 35 AS lange P-Motive auf. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Proteine der PLS-Subfamilie durch charakteristische Tripletts aus P- sowie längeren (L) und kürzeren (S) Motiven aus [Lurin et al. 2004]. Innerhalb beider Subfamilien sind Proteine beschrieben, die zusätzliche C-terminale Domänen aufweisen. So sind PPR-Proteine der P-Subfamilie bekannt, die eine *small* MutS-*related* Domäne tragen [Liu et al. 2013]. Demgegenüber zeichnen E-, E^+- oder DYW-Domänen PPR-Proteine der PLS-Subfamilie aus [Lurin et al. 2004]. Während letztgenannte Domänen den PLS-Proteinen ihre Funktion im RNA-Editing zuordnen [Chateigner-Boutin and Small 2010, Fujii and Small 2011, Yagi et al. 2013b], sind PPR-Proteine der P-Subfamilie vor allem in das Entfernen von Introns sowie in die post-transkriptionale Reifung der 5‘- und 3‘-Enden mitochondrialer sowie plastidärer Transkripte involviert [Barkan and Small 2014, Binder et al. 2013].

Die verschiedenen Aufgaben der PPR-Proteine im RNA-Metabolismus machen eine sequenzspezifische RNA-Bindung innerhalb der Organellen notwendig. Wie diese Sequenzspezifität durch die PPR-Proteine festgelegt wird, wurde kürzlich beschrieben. Durch bioinformatische Analysen konnte ein Zusammenhang zwischen den AS an Position 6 und 1‘ (Positi-

on 1 des nachfolgenden Repeats) der PPR-Motive und einem Nukleotid der vermeintlichen RNA-Bindungsstelle festgestellt werden [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a]. Auf Grund der großen Anzahl an möglichen AS-Kombinationen, die das gleiche Nukleotid definieren, sowie der Feststellung, dass oftmals mehrere Nukleotide gleich wahrscheinlich durch zwei AS-Kombinationen festgelegt werden, ist anzunehmen, dass noch weitere AS innerhalb der Repeats eine Rolle bei der RNA-Interaktion spielen. So konnte mit der AS an Position 3 einer zusätzlichen Position innerhalb der Repeats ein vermeintlicher Einfluss auf die RNA-Bindung zugeschrieben werden. Da an dieser Position allerdings oftmals AS mit hydrophoben Resten vorliegen, tritt diese AS wohl nicht in direkten Kontakt mit der RNA [Barkan and Small 2014, Yagi et al. 2013a].

Unter Anwendung des beschriebenen kombinatorischen AS-Code bezüglich der RNA-Bindung durch PPR-Proteine konnte RPF1, RPF2, RPF3 und RPF5 eine vermeintliche Bindungsstelle stromaufwärts der jeweiligen Prozessierungsstelle zugeordnet werden, wobei die Bindungsstellen zwischen 11 und 14 nt lang sind. Alle der vorhergesagten Bindungsstellen sind in der 5‘-*Leader*-Sequenz stromaufwärts der reifen 5‘-Enden lokalisiert. Der Abstand des C-terminalen Motifs der RPFs zur Prozessierungsstelle variiert dabei zwischen 29 und 84 nt [Binder et al. 2013].

1.4. Fragestellung

Die Reifung mitochondrialer Transkripte umfasst verschiedene Vorgänge, wobei die Bildung der 5‘-Enden bislang nur in Ansätzen verstanden ist. Mit den RPFs konnten PPR-Proteine der P-Subfamilie identifiziert werden, die in diesem Prozess eine wesentliche Rolle spielen. Es wird angenommen, dass die RPFs durch eine sequenzspezifische Bindung an die mRNA die 5‘-Reifung ermöglichen [Binder et al. 2013].

Im ersten Teil dieser Arbeit soll RPF4 näher untersucht werden. Diesem Protein konnte im Vorfeld eine Funktion in der Bildung von 5‘-reifen *ccmB*-Transkripten zugeordnet werden. In Landsberg *erecta* (L*er*) sowie einigen anderen Ökotypen liegen diese Transkripte zusätzlich zu den in Columbia (Col) vorhandenen Haupttranskripten vor. Auf Grundlage von Sequenzvergleichen der RPF4-Proteine aus Ökotypen mit dem L*er*- bzw. Col-typischen *ccmB*-Transkriptmuster und *in silico*-Vorhersagen bezüglich der Bindung von RPF4 an die *ccmB*-mRNA sollen erste Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche AS innerhalb des Proteins sich als bedeutend für die *ccmB*-mRNA-Prozessierung erweisen. Darüber hinaus sollen Bereiche von RPF4(L*er*) ausgemacht werden, die im Hinblick auf die Funktionalität des Proteins vermeintlich wichtige Interaktionen mit der *ccmB*-mRNA vermitteln. Zuletzt soll der Einfluss von RPF4(L*er*) auf die Generierung größerer *ccmB*-Transkripte untersucht werden.

Desweiteren soll auf die 5‘-Reifung von *ccmC*-Transkripten eingegangen werden. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass RPF3 die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte in Col beeinflusst. Im Gegensatz dazu erfolgt die *ccmC*-mRNA-Reifung in C24 unabhängig von RPF3. Ein zwischen Col und C24 unterschiedlicher Sequenzabschnitt der mitochondrialen DNA etwa 500 bp stromaufwärts des *ccmC*-Gens (*ccmC*-Genotyp) scheint ursächlich für das Auftreten der verschiedenen Transkripte zu sein [Jonietz et al. 2011]. Die Analyse verschiedener *A.thaliana* Ökotypen soll Aussagen über einen Zusammenhang des *ccmC*-Genotyps und der vorliegenden *ccmC*-Transkripte erlauben. Desweiteren soll der für die *ccmC*-mRNA-Reifung in C24 notwendige Kern-kodierte Faktor, RPF6, identifiziert und charakterisiert werden. Um Erkenntnisse darüber zu erhalten, wo RPF3 bzw. RPF6 an die *ccmC*-mRNA binden, sollen neben *in silico*-Vorhersagen auch Bindungsstudien durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Puffer und Lösungen

2.1.1.1. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit DNA

Gesamt-DNA(gDNA)-Extraktion aus grünem Blattgewebe

DNA-Extraktionspuffer:	20 ml	2 M TRIS/HCl pH 7,5
	10 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	10 ml	5 M NaCl
	155 ml	H_2O_{dd}
	nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar):	
	5 ml	20 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)

Southern-Blot-Analyse

Denaturierungslösung:	300 ml	5 M NaCl
	50 ml	10 M NaOH
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Die Lösung wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

50x Denhardt's:	10 g	Ficoll Typ 400
	10 g	Polyvinylpropyrrolidon 360
	10 g	Rinderserumalbumin
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Neutralisierungslösung:	300 ml	5 M NaCl
	250 ml	2 M TRIS/HCl pH 7,4
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Die Lösung wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

Prähybridisierungslösung:	25 ml	Formamid (deionisiert)
(frisch ansetzen)	15 ml	20x SSC
	5 ml	50x Denhardt's
	1,25 ml	20 % SDS
	50 µl	denaturierte Sperma-DNA (50 mg/ml) (*)
	3,75 ml	H_2O_{dd}

(*) Zur Denaturierung der Sperma-DNA wird diese 5 min bei 95 °C und dann auf Eis inkubiert.

20x SSC:	175,2 g	NaCl
pH 7,0	88, 2 g	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

10x TE:	100 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
pH 8,0	20 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

2.1.1.2. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA

Northern-Blot-Analyse

Die Zusammensetzungen von 50x Denhardt's, 20x SSC und 10x TE sind bei den Puffern und Lösungen für eine Southern-Blot-Analyse (siehe 2.1.1.1.) aufgeführt.

Denaturierungslösung:	500 µl	Dimethylsulfoxid
(frisch ansetzen)	195 µl	40 % Glyoxal
	50 µl	20x PB pH 6,5
	255 µl	H_2O_{dd}

Die Lösung wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

Methylenblaulösung:	0,4 g	Methylenblau
	167 ml	3 M Na-Acetat pH 5,2
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Prähybridisierungslösung:	20 ml	Formamid (deionisiert)
(frisch ansetzen)	10 ml	20x SSPE
	4 ml	50x Denhardt's
	200 µl	20 % SDS
	40 µl	denaturierte Sperma-DNA (50 mg/ml) (*)
	6 ml	H_2O_{dd}

(*) Zur Denaturierung der Sperma-DNA wird diese 5 min bei 95 °C und dann auf Eis inkubiert.

20x SSPE:	210,4 g	NaCl
pH 7,4	27,6 g	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
	6,72 g	Ethylendiamintetraacetat
	ad 1 l	H_2O_{dd}

***in vitro*-Transkription**

RNA-Elutionspuffer:	3,85 g	NH_4OAc
pH 5,0	0,04 g	Ethylendiamintetraacetat
	ad 100 ml	H_2O_{dd}
	nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar):	
	500 µl	20 % SDS

***Electro-Mobility-Shift-Assay* (EMSA)**

10x EMSA-Puffer:	25 mg	Heparin
	500 µl	0,5 M Na_3PO_4 pH 8,0
	40 µl	5 M NaCl
	4 µl	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 1 ml	H_2O_{dd}
10 mM PMSF:	10 µl	100 mM PMSF in Isopropanol
(frisch ansetzen)	90 µl	H_2O_{dd}

2.1.1.3. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen

Western-Blot-Analyse

Blockierungslösung:	1,25 g	Magermilchpulver
(frisch ansetzen)	ad 25 ml	1x TTBS
Chemilumineszenz-Lösung:		
(frisch ansetzen)		
Lösung I	1 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,5
	100 µl	Luminol
	44 µl	p-Cumarsäure
Lösung II	1 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,5
	6,5 µl	30 % Wasserstoffperoxid
Lösung I + Lösung II	ad 10 ml	H_2O_{dd}
Transferpuffer:	11,26 g	Glycin
	2,42 g	TRIS
	200 ml	Methanol
	ad 1 l	H_2O_{dd}
10x TTBS:	300 ml	5 M NaCl
pH 8,0	100 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
	590 ml	H_2O_{dd}
	nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar):	
	10 ml	Tween 20

Färbung von Proteingelen

Färbelösung:	98 ml	Lösung A
(frisch ansetzen)	2 ml	Lösung B (Zugabe unter Rühren)
	25 ml	Methanol
Fixierlösung:	60 ml	Methanol
(frisch ansetzen)	15 ml	100 % Essigsäure
	75 ml	H_2O_{dd}

Lösung A für Färbelösung**:**	100 g	Ammoniumsulfat
	20 ml	85 % ortho-Phosphorsäure
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Die Lösung wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

Lösung B für Färbelösung**:**	1 g	Coomassie G 250
(in steriler Flasche)	ad 20 ml	H_2O_{dd}

<u>Aufreinigung von Proteinen</u>

1x His-Elutionspuffer:	1,7 g	Imidazol
	12 ml	5 M NaCl
	500 µl	1 M $MgCl_2$
	400 µl	1 M HEPES pH 7,5
	ad 99 ml	H_2O_{dd}

Der Puffer wird steril filtriert.

	kurz vor dem Gebrauch:	
	1 ml	1 M Dithiothreitol

1x His-Lysispuffer:	0,14 g	Imidazol
	3 ml	5 M NaCl
	1 ml	2 M TRIS/HCl pH 7,5
	100 µl	Triton X-100
	ad 99 ml	H_2O_{dd}

Der Puffer wird steril filtriert.

	kurz vor dem Gebrauch:	
	1 ml	1 M Dithiothreitol

1x His-Waschpuffer:	0,48 g	Imidazol
	12 ml	5 M NaCl
	2,5 ml	2 M TRIS/HCl pH 8,2
	1 ml	> 99,5 % Glycerin
	500 µl	1 M $MgCl_2$
	ad 100 ml	H_2O_{dd}

Der Puffer wird steril filtriert.

Natrium-Phosphat-Puffer:	60 ml	5 M NaCl
pH 8,0	50 ml	1 M Phosphatpuffer pH 8,0
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

1 M Phosphatpuffer:	84,3 g	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
pH 8,0	4,14 g	$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

1x Regenerationspuffer	24 mg	Hydroxy-Azophenyl-Benzoesäure
	10 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
	3 ml	5 M NaCl
	200 µl	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 100 ml	H_2O_{dd}

Der Puffer wird steril filtriert.

1x Strep-Elutionspuffer	535 mg	Desthiobiotin
	10 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
	3 ml	5 M NaCl
	200 µl	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 100 ml	H_2O_{dd}

Der Puffer wird steril filtriert.

1x Strep-Waschpuffer	10 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
	3 ml	5 M NaCl
	200 µl	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 100 ml	H_2O_{dd}

Der Puffer wird steril filtriert.

2.1.1.4. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*)

Bleaching-Lösung:	5 ml	12 % Natriumhypochlorid
(frisch ansetzen)	1 ml	Triton X-100
	94 ml	H_2O_{dd}

2.1.2. Gele, Ladepuffer, Laufpuffer und Größenstandards

Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese für eine Northern-Blot-Analyse erfolgt mit 1x PB, wobei ein Agarosegel ohne Ethidiumbromid (EtBr) verwendet wird. Ansonsten wird 1x TAE eingesetzt.

1 % Agarosegel:	1,5 g	Agarose
	150 ml	1x TAE oder 1x PB
	optional:	
	7,5 µl	EtBr

10x DNA-Ladepuffer:	Spatelspitze	Bromphenolblau
	5 ml	50 % Glycerin
	5 ml	1x TAE

10x RNA-Ladepuffer:	Spatelspitze	Bromphenolblau
	5 ml	> 99,5 % Glycerin
	440 µl	20x PB
	4,56 ml	H_2O_{dd}

20x PB:	35,6 g	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
pH 6,5	31,2 g	$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

50x TAE:	242 g	TRIS
pH 8,3	100 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	44 ml	100 % Essigsäure
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

<u>Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese</u>

6 % PAA-Gel:	12,62 g	Harnstoff
Verwendung für *Primer-Extension*-Analyse und *in vitro*-Transkription	4,5 ml	Rotiphorese® Gel 40 (1:19)
	3 ml	10x TBE
	ad 30 ml	H_2O_{dd}
	unmittelbar vor dem Gießen:	
	112,5 µl	10 % Ammoniumperoxodisulfat
	22,5 µl	TEMED

8 % PAA-Gel:	8 ml	Rotiphorese® Gel 40 (1:19)
Verwendung für EMSA (Angaben für 2 Gele)	4 ml	10x TBE
	28 ml	H_2O_{dd}
	unmittelbar vor dem Gießen:	
	400 µl	10 % Ammoniumperoxodisulfat
	40 µl	TEMED

EMSA-Ladepuffer	Spatelspitze	Bromphenolblau
	581 µl	86 % Glycerin
	ad 1 ml	H_2O_{dd}

3x PAA-Ladepuffer:	Spatelspitze	Bromphenolblau
	Spatelspitze	Xylencyanol
	9,8 ml	Formamid (deionisiert)
	200 µl	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0

10x TBE:	180 g	TRIS
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Der Puffer wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

Als Größenstandard dient der **pGem®-Marker**. Zur Herstellung des Markers wird der pGem®-Vektor (Promega) verwendet, der durch Einzelverdaue mit *Hinf*I, *Rsa*I und *Sin*I in Fragmenten definierter Länge vorliegt. Die Fragmente werden erst durch die Calf Intestine Alkaline Phosphatase dephosphoryliert und dann am 5'-Ende mit [γ-^{32}P]-ATP markiert (siehe 2.2.3.6.).

SDS-Gelelektrophorese

10 % SDS-Sammelgel:	5 ml	UT_{4x}
(Angaben für 4 Gele)	2 ml	Rotiphorese® Gel 40 (1:19)
	13 ml	H_2O_{dd}
	unmittelbar vor dem Gießen:	
	200 µl	10 % Ammoniumperoxodisulfat
	30 µl	TEMED
10 % SDS-Trenngel:	20 ml	LT_{2x}
(Angaben für 4 Gele)	10 ml	Rotiphorese® Gel 40 (1:19)
	10 ml	H_2O_{dd}
	unmittelbar vor dem Gießen:	
	400 µl	10 % Ammoniumperoxodisulfat
	30 µl	TEMED
LT_{2x}:	181,71 g	TRIS
pH 8,85	ad 990 ml	H_2O_{dd}
	nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar):	
	10 ml	20 % SDS
UT_{4x}:	60,6 g	TRIS
pH 6,8	ad 980 ml	H_2O_{dd}
	nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar):	
	20 ml	20 % SDS
2x SDS-Ladepuffer:	Spatelspitze	Bromphenolblau
	1,25 ml	UT_{4x}
	1 ml	> 99,5 % Glycerin
	1 ml	20 % SDS
	500 µl	1 M Dithiothreitol
	ad 5 ml	H_2O_{dd}
10x SDS-Laufpuffer:	144 g	Glycin
pH 8,5	30,3 g	TRIS
	ad 950 ml	H_2O_{dd}
	nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar):	
	50 ml	20 % SDS

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

2.1.3. Nährmedien

2.1.3.1. Nährmedien zur Kultivierung von *A.thaliana*

Anzucht auf Erde:	0,63 g	Osmocote® Extract® Mini (Scotts® Deutschland GmbH)
	800 ml	Anzuchterde (Ökohum GmbH)
	200 ml	Vermiculit 2-3 mm Körnung (Isola-Mineralwolle-Werke GmbH)
MS-Medium:	5 g	Saccharose
pH 5,7	4,4 g	MURASHIGE & SKOOG MEDIUM (Including Gamborg B5 Vitamins)
	0,5 g	MES
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Um MS-Agar herzustellen werden pro 500 ml Medium 8 oder 15 g Microagar verwendet. Nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar) kann der MS-Agar mit den in Tabelle 1 zusammengestellten Zusätzen versetzt werden.

Tabelle 1: Verwendete Zusätze des MS-Agars. Es ist die jeweilige Endkonzentration sowie das benötigte Volumen pro ml MS-Medium angegeben

Zusatz	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]	Zugabe in 1 ml [µl]
BASTA®	10	10	1
Cefotaxin	100	200	2
Hygromycin	50	50	1
Kanamycin	50	30	0,6

0,1 % Topagar:	40 mg	Microagar
	ad 40 ml	H_2O_{dd}

Der Topagar wird 20 min autoklaviert (121 °C, 1 bar).

2.1.3.2. Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Infiltrationsmedium:	20 g	Saccharose
pH 6,0-8,0	200 µl	Silwet L-77
(frisch ansetzen)	ad 400 ml	H_2O_{dd}
LB-Medium:	10 g	NaCl
pH 7,5	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Zur Herstellung von LB-Agar werden pro 500 ml LB-Medium zusätzlich 10 g Microagar eingewogen. Dem LB-Medium oder -Agar können nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar) die in Tabelle 2 aufgeführten Antibiotika zugesetzt werden.

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika als Zusätze des LB-Mediums. Es ist die jeweilige Endkonzentration sowie das benötigte Volumen pro ml LB-Medium angegeben

Antibiotikum	**Stammlösung** [mg/ml]	**Endkonzentration** [µg/ml]	**Zugabe in 1 ml** [µl]
Ampicillin	50	100	2
Carbenicillin	100	100	1
Kanamycin	50	30	0,6

2.1.4. Nukleinsäuren

Nukleotide

Nachfolgend sind die benötigten Nukleotide zusammengefasst (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Nukleotide.

Nukleotid	**Hersteller**
dNTP und **NTP Set** (4x 25 µmol)	Thermo Scientific
Radionukleotide: [γ-^{32}P]-ATP, [α-^{32}P]-dCTP, [α-^{32}P]-UTP	je nach Verfügbarkeit PerkinElmer oder Hartmann Analytic

Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Oligonukleotide werden i.d.R. von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 4: Verwendetet Oligonukleotide. Die Sequenz ist von 5'→3' angegeben. Nukleotide, die an die DNA binden sind in Großbuchstaben geschrieben.

Oligonukleotid	**Sequenz** (5'→3')
Atccb2-NS.H	GCA GCA GTT TAG TGT ATA AGC
Atccb2-NS.R	CCT TCT TTC TAA TTC CTC CTA
Atccb2-1	GGT GTG GAG GAG AAG ATC AG
Atccb2-3	CAA TTT CGG TCT CGA TTA G
Atccb2-6	GTC GTC TCA TTT CCT TAC TTC
Atccb2-7	CAA ACT GTG CAC ACT ACG AG
Atccb2-10	TAC GCT TAC TAA AAG ACT GAC
Atccb2-12	TCG CTA GCA AAA GCT AAG C
Atccb3.EMSA.Col.2	taa tac gac tca cta tag gga gaA ATA AAT GTT GTG ATG
Atccb3.EMSA.Col.3	ATT TCA TGT TCA GTC ATC ACA A
Atccb3.EMSA.C24.2	taa tac gac tca cta tag gga gaG TAG CGA TGT TTG ACG
Atccb3.EMSA.C24.3	ATC GAT CAA CTC ATC GTC
Atccb3-Mega3'nah	TGG GAG CAT TAG CCGT ATC TGG TAC A
Atccb3-Mega5'fern	TCT TAC GCC GAT CGA TAT CGA TCA ACT C
Atccb3-Mega5'mittel	TCG TAG TCA GAC AGC AAT TCC AGT AGC TCC
Atccb3-Mega5'nah	CTT GTG CGT GGC ACT CCT TGC T
Atccb3QPCR.3	AAA CAC ATG AAC TCT TAG TAT CCG AAG
Atccb3QPCR.4	CAT TTC ATG TTC AGT CAT CAC AAC
Atccb3QPCR.5	CGA TGG TAT CTG TGT TTT GAT CC
Atccb3QPCR.6	GGA AAG TGG CTC AAA ACG C
Atccb3-3	TGT TCT GGA AAC ACG TCT TC
Atccb3-12	GTA CAA GGA AAG TGG CTC AAA ACG CC
Atccb3-21	GGA AGT TAG CAA AGT TAG ACA AG
Atccb3-22	GCC ACG GCT ATA AAC AC
At1g62590-kompl.H2	tcg agc ggc gcg ccC GAT ACA TCG GAA CGA ATC
At1g62590-kompl.R2	cga gtt ttt aat taa CCC TCA CAA GAA GAG ATG G
At1g62680-kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cTT GAG TCT GAG TTT ATG TGT ATT GG
At1g62680-kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa CGA TTT GAT TTC TTC TCA AGC
At1g62720-kompl.H2	tcg agc ggc gcg ccC CAT ATC CAG AAG AAC CAG C
At1g62720-kompl.R	ctt cga gtt tga att cCC ACT CTT CTG TAC AAT ACA CTC C
At1g62910Col.Teil1	GGT TTA TAT CCC ATT TCG ACC
At1g62910Col.Teil2	GGT ATG GAA CTC TTC CGC
At1g62910-kompl.H	agg cgc gcC TCG TAC AGT CGT ACT TGC GGA
At1g62910-kompl.R2	tgg gtc tta att aAT GCT CGA TTC CTT CCT CGC A
At1g62910Konstrukt4.Col	TTT CAG CGC ATT GAT TGA TGC
At1g62910Konstrukt4.Ler	TCG TAC AAT TTC TCA GCC
At1g62910Konstrukt7.Col	ACC TAC AGC TCC CTC ATA AGT TGC C
At1g62910Konstrukt7.Ler	AAG ATG ATG AAA CTC GGC
At1g62910Ler.kompl.1	atg cag tcg agc ggc gcg ccA AGT TTG GAG AAG ACT TAC G
At1g62910Ler.Teil1.1	CTG TTT GAA AAC CAT TTG GGC
At1g62910Ler.Teil2	AGG ATT TCT GAT GCC G
At1g62910Ler.1	TGG AAG AGG CCC ATC TTC
At1g62910Ler.2	GTC GTA CAA TTT CTC AGC C
At1g62910Ler.3	GCT TCA GAA GCA GTG GC
At1g62910Ler.6	GCA GGG AAG GTG GAA G
At1g62910Ler.7	CCT TCC ATC ATT GAG TTC AGC

At1g62910Ler.8	TGG TTG ACA CCC TCT GGC
At1g62910Ler.9	ATC TGC TTA GCC TCA CCA AGG
At1g62910Ler.10	TGC TTG AGA AGA ATA TCA ACC CTG
At1g62910Ler.11	TAA GTA TAG TGA TTA TGA GGC
At1g62915-kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cTG CTA TTT ATC TCA TTT TCA GTA TC
At1g62915-kompl.R	tgg gtc tta att aaG TTT GTC CAG CCA CAC AC
At1g62930.A	TCG CTC CTC AAT GGG TAC TGC CA
At1g62930.B	GGT TGA CAC CCT CTG GCA ACC A
At1g62930.C	CCA AAT CAA TAT CAC CTC TC
At1g62930.D	GAA GCT TGT AGA GGC TGA G
At1g62930.G	GAC AAG TTG TGT TCA TTT AGG
At1g62930.H	CGC GAG ATC CCT CCG TCT TCA AGG
At1g62930.I	CCT GAT ATC ATT GTA GTG TAA ATT A
At1g62930-kompl.H	atg cag tcg agc ggc gcg ccC CTG AAC AAA AGA GAC ATT AAC TGA AC
At1g62930-kompl.H2	atg cag tcg agc ggc gcg ccG CAA GTG TTG TTC TTC CGT C
At1g62930-kompl.R	gac ttc gag ttt aat taa ttC GAA CCG ACA AAT TGT TTG TC
At1g62930-kompl.R2	gac ttc gag ttt aat taa ttT CGA ATA AGG AGC GTG GTC
At1g62930.R	CGA TCA ATC AGT CGA ATA AGG AGC GTG GT
At1g62930UEx.H2	atg cag tcg agc gga tcc GCT CAG CTG AGG AAA GCT TCT C
At1g62930UEx.R2	gag ttt ctc gag tta ttt ttc gaa ctg cgg gtg gct cca agc gct AGA CAG CAT TTC CAG ATA GC
At1g63070-kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cTA TTG GTT ATT TCT AAA CGC AGT C
At1g63070-kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa GCT TGT ACA TAG ATG ATC TCT TTG ATC
At1g63080-kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cGG GGT AAT TAG AAA ACT CAG TG
At1g63080-kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa GTT ACA GCT GGT TTT CTT AAA CC
At1g63120.A	AAT GAG TTT CAC CAG AAG ACT CCT CG
At1g63120.B	AAC GAA GTC CAT TTA AGG CCT G
At1g63130.B	ACC ATC CGG TCA ACT AAA GCC ACT G
At1g63130.C	ACA AGG GAA AAT AGA GCC TGG
At1g63130Col.1	CCC AGA AAC TGC AAT GGC
At1g63130.D	CCA ATG CTG TCT CTA CCT TCC C
At1g63130.E	TGG TTT CTG ATG GTG TGC TTC CCG
At1g63130.H	TCA GTG ATT TTG GAA GAA ACC CCA ATC AGC
At1g63130.J	TCA GGA TTT TGT AGG AAA GG
At1g63130.K	ATC AGG CCT TAA ATG GAC TTC G
At1g63130-kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cGG GCT TCT TTA GAA TAG TCG AC
At1g63130-kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa TCT TAA ATA TCG ACA TTT ATG TCG
At1g63130-kompl.R1	ctt cga gtt ttt aat taa AAA CCG AGC ATT GCG TAG
At1g63130.R	GAT TCA CCT CAC GAT CCT CTT CTC TCG AGG
At1g63130UEx.H	tcg agc gga tcc TGT GGA ACT GCT CCT CCT TCC
At1g63130UEx.R	gag ttt gtc gac TTA AGA AAG CAT CTT GAG AAA GC
At1g63130UEx.R1	gag ttt gtc gac tta ttt ttc gaa ctg cgg gtg gct cca agc gct AGA AAG CAT CTT GAG AAA GC
At4g27960_1	TCA CAA TTT CCA AGG TGC TG
At4g27960_2	TCA TCT GGG TTT GGA TCC GT
At18S-Adapter.H3	CTT ATT GGC GCA TAC CAC GGT GG
At18S-Adapter.R4	CCT AGC TCC CCG AGA ACA ACG TTC GA
BASTA.H	ATG AGC CCA GAC GAC GCC
BASTA.R	TCA AAT CTC GGT GAC GGG CAG

CER449403.H	TGA TTC CAG CGG GTA GGC ATG ACC
CER449403.R	CGA AAC ATT CAA AAA GTG GTT ATG GGA GAG
CER454331.H	GGG ACC GTT AAT TAA CGG AG
CER454331.R	AAG TGA GAG CTA CCA GAT CCG
CER454594.H	TTG TTT CCT TTA CCG ACG C
CER454594.R	TAA AAA ATG ACG GGA CGA
CER460528.H	CAA TGA TTT GGT GGG TCA AGA GTC AAG AC
CER460528.R	GCA AAA GTC ATT ACG GAC AAT ACC AAA CG
CER460534.H	CAA TGA TTT GGT GGG TCA AGA GTC AAG AC
CER460534.R	GCA AAA GTC ATT ACG GAC AAT ACC AAA CG
Chr.1 3377847.H	GCA ATA GTT TTG AAA TTT GAG GG
Chr.1 3377847.R	ACA AAT TCT AGC TGC CGT GC
Chr.5 7877109.H	GAG TTC CAT TGT TTG ATA CGG
Chr.5 7877109.R	CCA TTT TCG TGT TTC AGG G
Oligo(dT)	TTT TTT TTT TTT TTT TT
pETanti	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GCA GC
pETsense	CCG CTG CTG CTA AAT TCG AAC GCC
pET32a.Strep.rück	gag ttt gtc gac tta ttt ttc gaa ctg cgg gtg gct cca agc gct GAG CTC GAA TTC GGA TCC
PP2A At1g13320_1(PDF2)	TAA CGT GGC CAA AAT GAT GC
PP2A At1g13320_2(PDF2)	GGT CTC CAC AAC CGC TTG GT
***Random-Hexamer* (rhx)**	NNN NNN (N = A,C,G oder T)
RPF3_6Chimär.H2	TAC AAC TCC CTC ATA AGA TGC C
RPF3_6Chimär.R2	ACT CAA ACA TGT GCT TGG CC
RS	CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
T7prom	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T7term	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
UBC9-H.2	CTA CTT CAT GTA GCG CAG GAC
US	GTA ACG CCA GGG TTT TCC C

2.1.5. Antikörper

Nachfolgend ist der in dieser Arbeit verwendete Antikörper aufgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Antikörper mit Puffer.

Antikörper	Puffer	Hersteller
His-Tag® Antibody HRP Conjugate	1:1000 in 5 % Alkali-soluble Casein	Novagen

2.1.6. Enzyme und Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme werden von Thermo Scientific und im Fall von *Pac*I von New England Biolabs bezogen. Doppelverdaue unter Beteiligung von *Pac*I werden in 1x Tango Puffer von Thermo Scientific durchgeführt. Alle weiteren Enzyme und Inhibitoren können Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Enzyme und Inhibitoren mit dem jeweiligen Puffer. (*) hier nicht verwendet, sondern 5x Green GoTaq® G2 Reaktionspuffer; (**) die Polymerase liegt bereits im Puffer vor

Enzym/Inhibitor	Puffer	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	10x Puffer für CIAP	Thermo Scientific
GoTaq® G2 DNA-Polymerase	5x Green GoTaq® G2 Reaktionspuffer	Promega
M-MLV Reverse Transkriptase	5x M-MLV RT Puffer	Promega
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H(-) Point Mutant	5x M-MLV RT Puffer	Promega
***Pfu* DNA-Polymerase**	*Pfu* 10x Reaktionspuffer (*)	Thermo Scientific
2x Phusion Flash PCR Master Mix	(**)	Thermo Scientific
RevertAid Reverse Transkriptase	5x Reaktionspuffer	Thermo Scientific
RiboLock™ RNase Inhibitor	-	Thermo Scientific
RQ1 RNase-Free DNase	10x RQ1 RNase-Free DNase Reaktionspuffer	Promega
Terminator™-Exonuklease	10x Terminator™ Reaktions-puffer A	Epicentre Biotechnologies
T4 DNA-Ligase	10x Reaktionspuffer für T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific
T4 Polynukleotidkinase	10x PNK Reaktionspuffer A	Thermo Scientific
T4 RNA-Ligase	10x Reaktionspuffer für T4 RNA-Ligase	Thermo Scientific
T7 RNA-Polymerase	5x Transkriptionspuffer	Thermo Scientific

2.1.7. Organismen

2.1.7.1. Bakterienstämme

In Tabelle 7 sind die verwendeten Bakterienstämme sowie deren Herkunft aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme und deren Herkunft.

Stamm	Quelle
Agrobacterium tumefaciens (*A. tumefaciens*) **GV2260**	Deblaere et al. 1985
Escherichia coli (*E.coli*) **BL21-AI™**	Invitrogen
E. coli **DH5α**	Stratagene GmbH

2.1.7.2. *A.thaliana*

Nachfolgender Tabelle können die in dieser Arbeit untersuchten *A.thaliana* Ökotypen sowie deren geografische Herkunft entnommen werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Verwendete *A.thaliana* Ökotypen und deren geografische Herkunft (http://arabidopsis.org/index.jsp)**.**

Ökotyp	Herkunft
Col	Columbia (USA)
C24	Laborstamm
Alc-0	Alcala de Henares (Spanien)
Bay-0	Bayreuth (Deutschland)
Bl-1	Bologna (Italien)
Bla-1	Blanes/Gerona (Spanien)
Bla-10	Blanes/Gerona (Spanien)
Blh-1	Bulhary (Tschechische Republik)
Bur-0	Burren (Irland)
Cal	Calver (England)
Can-0	Kanarische Inseln (Spanien)
Co	Coimbra (Portugal)
Ct-1	Catania (Italien)
Cvi	Kap Verde
Di-1	Dijon (Frankreich)
Di-G	Dijon (Frankreich)
Edi-0	Edinburgh (Schottland)
Ei	Eibergen (Niederlande)
Ema-1	East Malling (England)
En-1	Enkheim/Frankfurt (Deutschland)
Est	Estland
Gre-0	Greenville, MI (USA)
Kas-1	Kashmir (Indien)
Kn-0	Kaunas (Litauen)
Kondara	Khurmatov (Tadschikistan)
La-1	Landsberg/Warthe (Deutschland)

Ökotyp	Herkunft
L*er*	Landsberg (Deutschland)
Lip-0	Lipowiec/Chrzanow (Polen)
Lz-0	Lezoux (Frankreich)
Mh-1	Mühlen (Polen)
Ms-0	Moskau (Russland)
Mt-0	Martuba/Cyrenaika (Lybien)
Nd	Niederzenz (Deutschland)
No-0	Halle (Deutschland)
Nok-1	Noordwijk (Niederlande)
Oy-1	Oystese (Norwegen)
Pa-2	Palermo (Italien)
Pi-2	Pitztal/Tirol (Österreich)
Ri-0	Richmond/B.C. (Kanada)
Rld-2	Rschew (Russland)
Rube	Rubezhnoe (Ukraine)
Sah-0	Sierra Alhambra (Spanien)
Sha	Pamiro-Alay (Tadschikistan)
Sorbo	Sorbo (Tadschikistan)
St-0	Stockholm (Schweden)
Stw-0	Stobowa/Orel (Russland)
Ta	Tabor (Tschechische Republik)
Te	Tenala (Finnland)
Tsu-1	Tsushima (Japan)
Van-0	University of B.C. (Kanada)
Ws	Wassilewskija (Russland)
Yo-0	Yosemite National Park (USA)

Desweiteren wird folgende Col-Mutante verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete Col-Mutante und deren Genotyp.

Col-Mutante	Genotyp
SAIL_18E04 (*rpf3-1*)	T-DNA-Insertion in At1g62930 (*RPF3*)

Im Rahmen dieser Arbeit werden die in Tabelle 10 aufgelisteten F_1-Pflanzen untersucht. Der Tabelle können auch die jeweils zur Genotypisierung verwendeten Primer entnommen werden.

Tabelle 10: Verwendete F_1-Pflanzen. Die jeweiligen Primer zur Genotypisierung sind angegeben.

F_1-Pflanze	Primer zur Genotypisierung
F_1 Kas-1 x Col	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Lip-0 x Col	CER449403.H + CER449403.R
F_1 Lip-0 x C24	Chr.5 7877109.H + Chr.5 7877109.R
F_1 Lip-0 x Ms-0	CER454594.H + CER454594.R
F_1 Lip-0 x *rpf3-1*	CER449403.H + CER449403.R
F_1 Lip-0 x Sorbo	CER454331.H + CER454331.R
F_1 Lip-0 x Ta	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ms-0 x Col	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ms-0 x No-0	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ms-0 x Rube	CER449403.H + CER449403.R
F_1 Ms-0 x Ta	CER454594.H + CER454594.R
F_1 No-0 x Ms-0	CER460534.H + CER460534.R
F_1 No-0 x Rube	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Nok-1 x Col	CER454331.H + CER454331.R
F_1 Rube x Col	CER454331.H + CER454331.R
F_1 Rube x Lip-0	CER454331.H + CER454331.R
F_1 Rube x Ms-0	CER449403.H + CER449403.R
F_1 Rube x No-0	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Sorbo x Col	CER460528.H + CER460528.R
F_1 Sorbo x C24	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Sorbo x Lip-0	CER454331.H + CER454331.R
F_1 Sorbo x *rpf3-1*	Chr.1 3377847.H + Chr.1 3377847.R
F_1 Sorbo x Ta	CER454331.H + CER454331.R
F_1 Ta x Col	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ta x C24	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ta x Kas-1	CER449403.H + CER449403.R
F_1 Ta x Lip-0	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ta x *rpf3-1*	CER460534.H + CER460534.R
F_1 Ta x Rube	CER454594.H + CER454594.R
F_1 Ta x Sorbo	CER454331.H + CER454331.R

2.1.8. Präparation, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen

Folgende Hilfsmittel werden in dieser Arbeit zur Präparation, Aufreinigung sowie Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen verwendet.

Präparation von Nukleinsäuren

NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	Macherey-Nagel
RNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen
Spectrum™ Plant Total RNA Kit	Sigma-Aldrich

Aufreinigung von Nukleinsäuren und Proteinen

Amicon Ultra-0,5 ml 30 K	Millipore
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich
Gravity flow *Strep*-Tactin® Sepharose® column 1 ml	IBA GmbH
illustra™ NAP™-5 Column	GE Healthcare
Protino® Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel
SPIN-X® Centrifuge Tube filters	costar
Superdex™ 200 5/150 GL	GE Healthcare

Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen

Amersham Hybond™-N	GE Healthcare
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare
Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System	GE Healthcare
Biodyne® A 0,45 µm	PALL Life Science
DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit F-416	Biozym Scientific GmbH
Light-Cycler® 480 Real-Time PCR Maschine	Roche
Roti®-Nanoquant	Carl Roth GmbH
Roti®-PVDF	Carl Roth GmbH

2.1.9. Software und Internettools

In dieser Arbeit werden nachfolgend aufgeführte Software und Internettools verwendet.

Tabelle 11: Software/Internettools und Verwendungszweck.

Software/Internettools	Verwendung u.a.
Basic Local Alignments Search Tool (NCBI) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Vergleich von DNA-Sequenzen
CHROMAS LITE	Darstellung von Sequenzchromatogrammen
CLC DNA Workbench 6	Erstellung von Genkarten
CLUSTALW (Multiple Sequence Alignment) http://www.genome.jp/tools/clustalw/	Vergleich mehrerer Aminosäure(AS)-Sequenzen
ExPASy http://www.expasy.org	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen
LIGHT-CYCLER 480 Software	Auswertung *Real-Time quantitative* RT-PCR
SIGNAL SALK http://signal.salk.edu	Sequenzen von *A.thaliana* Ökotypen
TargetP 1.1 Server www.cbs.dtu.dk/Services/TargetP	Bestimmung der subzellulären Lokalisations-sequenz von Proteinen
The Arabidopsis Information Research (TAIR) http://arabidopsis.org/index.jsp	Herkunft von *A.thaliana* Ökotypen, DNA-Sequenzen von *A.thaliana*

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Auf folgende molekularbiologische Standardmethoden soll nicht näher eingegangen werden:

- Klonierung (Restriktionsverdau, DNA-Ligation, Transformation von *E.coli* durch Elektroporation)
- Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen
- Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren bzw. Proteinen
- Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Die Methoden wurden in Anlehnung an Arbeiten wie „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ durchgeführt [Sambrook and Russel 2001].

2.2.2. Arbeiten mit DNA

2.2.2.1. gDNA-Extraktion aus grünem Blattgewebe

Das Vorgehen erfolgt in Anlehnung an Edwards et al. 1991. Zur Extraktion von gDNA werden 2 kleine Blätter oder 4-5 Keimlinge in 600 µl DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und mechanisch zerkleinert. Nach einer weiteren Zugabe von 600 µl DNA-Extraktionspuffer wird die Probe gevortext und bei 16.000 g für 5 min abzentrifugiert. 900 µl Überstand werden mit der gleichen Menge an Isopropanol versetzt, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 16.000 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet in 200 µl H_2O_{dd} aufgenommen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 16.000 g wird nochmals eine Isopropanol-Fällung durchgeführt. Das DNA-Pellet wird im Anschluss für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50-60 µl H_2O_{dd} aufgenommen.

2.2.2.2. *Reverse-Transcription*-PCR

Bei einer *Reverse-Transcription*(RT)-PCR wird als *Template* cDNA verwendet. Im Folgenden werden zwei in dieser Arbeit angewandte RT-PCRs erläutert.

Circularized-RNA-Reverse-Transcription-PCR

Die *Circularized-RNA-Reverse-Transcription*-PCR (CR-RT-PCR) zeichnet sich dadurch aus, dass zur cDNA-Synthese 5‘-3‘-zirkulare RNA-Moleküle, welche aus einer Behandlung mit der T4 RNA-Ligase (siehe 2.2.3.3.) entstammen, verwendet werden. Die cDNA-Synthese wird entweder mit einem Gen-spezifischen Primer oder mit *Random-Hexamer*(rhx)-Primern durchgeführt (Abbildung 1). Die CR-RT-PCR stellt eine Möglichkeit dar prozessierte 5‘- und 3‘-Enden mitochondrialer mRNA-Moleküle zu bestimmen. Transkripte aus der Transkriptionsinitiation können mit dieser Methode dagegen nicht analysiert werden, da sie eine 5‘-Tri-Phosphat-Gruppe tragen [Forner et al. 2007].

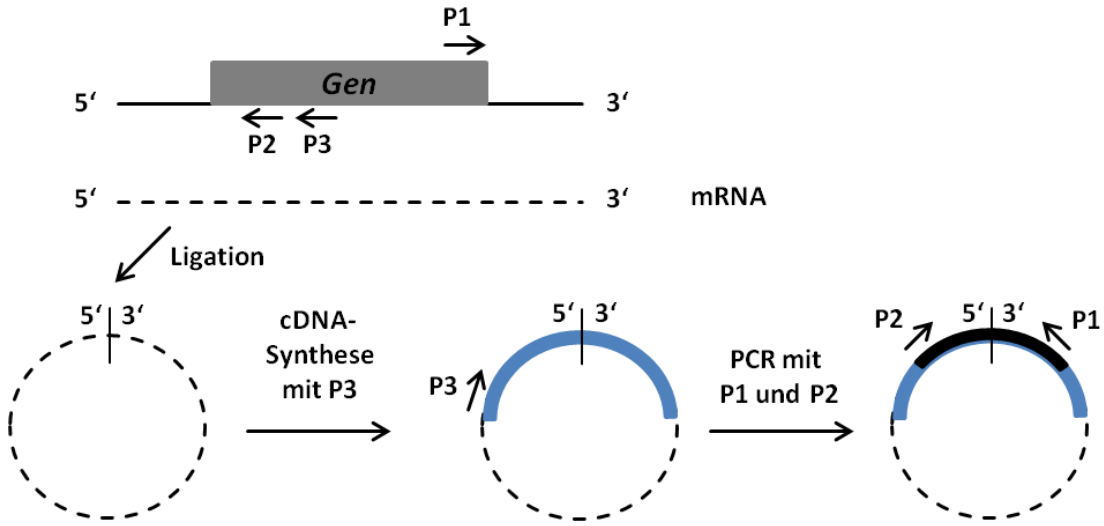


Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer CR-RT-PCR zur Analyse einer mitochondrialen mRNA. P1-P3: verschiedene Primer. Darstellung nach [Forner et al. 2007].

Real-Time quantitative RT-PCR

Bei dieser RT-PCR werden DNase-verdaute RNA-Proben (siehe 2.2.3.2.) zur cDNA-Synthese herangezogen. Die Analyse erfolgt mit dem DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit F-416 im Light-Cycler 480 (Roche), wobei jeweils nach Herstellerprotokoll vorgegangen wird. Die Messung wird je Probe in vier technischen Replikaten durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wird die LIGHT-CYCLER 480 Software herangezogen. Die relativen Transkriptmengen werden in Bezug auf die zwei Referenzgene *UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 9* (UBC9, At4g27960) und *PROTEIN PHOSPHATASE 2A subunit 3* (PP2A, At1g13320) gemessen [Czechowski et al. 2005].

2.2.2.3. Southern-Blot-Analyse

Im Vorfeld werden 12 µg gDNA in einem Endvolumen von 220 µl über einen Zeitraum von 4 h verdaut, wobei die Zugabe des Enzyms sukzessive erfolgt. Der Ansatz wird mit Ethanol gefällt und das DNA-Pellet in 20 µl H_2O_{dd} aufgenommen.

Gellauf und Blot

Die DNA-Proben werden mit 2,5 µl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein mit EtBr gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich werden mittig 20 µl GeneRuler™ 1 kb DNA-Marker geladen. Der Gellauf erfolgt in 1x TAE bei 160 V für 4-6 h. Das Gel wird unter UV-Licht betrachtet, 10-20 min in 0,125 M HCl geschwenkt und kurz mit H_2O_{dd} gewaschen. Im Anschluss wird das Gel für jeweils 30 min mit der Denaturierungs- bzw. der Neutralisierungslösung inkubiert, wobei zwischen den Inkubationsschritten kurz mit H_2O_{dd} gewaschen wird.

Die Übertragung der gDNA auf die Amersham Hybond™-N Membran erfolgt durch einen Kapillar-Blot. Im Vorfeld wird die Membran zuerst in H_2O_{dd} und dann in 10x SSC eingeweicht. Zusätzlich werden sechs Whatman®-Papiere mit 10x SSC befeuchtet. Der Aufbau des Blots kann Abbildung 2 entnommen werden. Als Laufpuffer dient 10x SSC. Der DNA-Transfer erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Blot-Abbau wird die Membran 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wird die DNA durch die Bestrahlung mit UV-Licht auf der Membran fixiert.



Abbildung 2: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus für eine Southern-Blot-Analyse. Der DNA-Transfer erfolgt durch einen Kapillar-Blot. Hybond™-N: Amersham Hybond™-N.

Prähybridisierung

Die Membran wird in eine Tüte überführt und über Nacht mit 50 ml frisch angesetzter Prähybridisierungslösung unter leichtem Schwenken bei 42 °C inkubiert.

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wird eine DNA-Sonde verwendet, wobei zuerst 25 ng Sonden-DNA mit 1x TE pH 8,0 auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt werden. Die DNA wird 5 min bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis gelagert. Zur Markierung der DNA wird das Rediprime™ II Random Prime Labeling System unter Einsatz von 50 µCi [α-^{32}P]-dCTP verwendet, wobei der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert wird. Die Reaktion wird mit 5 µl 0,2 M Ethylendiamintetraacetat abgestoppt. Der Ansatz wird mit H_2O_{dd} auf 500 µl aufgefüllt und auf eine illustra™ NAP™-5 Column geladen. Der Durchfluss wird verworfen und die markierte Sonden-DNA mit 750 µl H_2O_{dd} eluiert. Die Sonden-DNA wird 5 min bei 95 °C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und zur Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Tüte wird zugeschweißt und über Nacht bei 42 °C unter leichtem Schwenken inkubiert.

Waschen

Das Abwaschen unspezifisch gebundener Sonden-DNA erfolgt mit 1x SSC + 0,1 % SDS. Die Membran wird erst bei Raumtemperatur und dann abhängig von der Signalstärke bei 55 bis 60 °C mit dem Puffer inkubiert. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgt durch das Auflegen eines Amersham Hyperfilm™ MP.

2.2.2.4. Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Die Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Produkten erfolgt kommerziell bei der 4baselab GmbH, der LGC Genomics GmbH oder der SEQLAB GmbH. Zur Auswertung der Chromatogramme wird die Software CHROMAS LITE herangezogen.

2.2.3. Arbeiten mit RNA

2.2.3.1. Isolierung von Gesamt- und mitochondrialer RNA

Zur Extraktion von Gesamt-RNA (gRNA) werden entweder Blätter von ca. 2-3 Wochen alten Pflanzen oder 14 Tage alte Keimlinge verwendet. Das Blattmaterial wird zunächst unter Verwendung von flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Die Isolierung der gRNA erfolgt

mit dem Spectrum™ Plant Total RNA Kit. Abweichend vom Herstellerprotokoll wird zweimal mit 50 µl H_2O_{dd} eluiert.

Zur Isolierung mitochondrialer RNA aus Zellsuspensionskultur wird der RNeasy Plant Mini Kit verwendet.

2.2.3.2. DNase-Verdau

Um DNA-Verunreinigungen in einer RNA-Probe zu beseitigen, wird folgender Ansatz zum Verdau von x µg gRNA verwendet:

Verdau von x µg gRNA :		
	x µg	gRNA
	x µl	10x RQ1 RNase-Free DNase Reaktionspuffer
	x µl	RQ1 RNase-Free DNase (1 U/µl)
	0,2x µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	ad 10x µl	H_2O_{dd}

Der Ansatz wird für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt durch eine saure Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung. Das RNA-Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und in 15-20 µl H_2O_{dd} aufgenommen. Um den Erfolg des DNase-Verdaus zu überprüfen, wird 1 µl der RNA-Probe in einer PCR als *Template* eingesetzt. Als Primer eignen sich solche, die in einer nachfolgenden RT-PCR verwendet werden.

2.2.3.3. RNA-Ligation

Um zirkuläre mRNA-Moleküle, wie sie für eine CR-RT-PCR-Analyse benötigt werden (siehe 2.2.2.2.), zu erhalten, werden 4-6 µg gRNA mit nachfolgenden Komponenten versetzt:

RNA-Ligationsansatz :		
	4-6 µg	gRNA
	3 µl	Dimethylsulfoxid
	3 µl	10x Reaktionspuffer für T4 RNA-Ligase
	3 µl	Rinderserumalbumin (1 mg/ml)
	1 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	1 µl	T4 RNA-Ligase (10 U/µl)
	ad 30 µl	H_2O_{dd}

Die RNA-Ligation erfolgt über Nacht bei 15 °C im Wasserbad. Zur Aufreinigung wird eine saure Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Das RNA-Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und in H_2O_{dd} aufgenommen, wobei das Aufnahmevolumen u.a. davon abhängt welcher Primer für eine nachfolgende cDNA-Synthese (siehe 2.2.3.4.) verwendet wird.

2.2.3.4. cDNA-Synthese

M-MLV Reverse Transkriptase oder M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H(-) Point Mutant

Zu Beginn werden zu 16 bzw. 15 µl gRNA 1 µl rhx- (100 µM) bzw. 2 µl Oligo(dT)-Primer (100 µM) pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 72 °C, werden die Proben auf Eis gelagert und mit folgenden Komponenten versetzt:

Ansatz cDNA-Synthese :	17 µl	gRNA + Primer denaturiert
	5 µl	5x M-MLV RT Puffer
	1,25 µl	dNTPs (10 mM)
	0,75 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase oder M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H(-) Point Mutant (200 U/µl)

Die cDNA-Synthese erfolgt unter Verwendung der M-MLV Reversen Transkriptase bei 37 (rhx-Primer) oder bei 42 °C (Oligo(dT)-Primer) für 60 min. Wird die M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H(-) Point Mutant zur cDNA-Synthese herangezogen, wird der Ansatz erst 10 min bei Raumtemperatur und dann 60 min bei 45 °C inkubiert. Das Abstoppen der cDNA-Synthese erfolgt jeweils durch 5 µl 1 M NaOH. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz durch 5 µl 1 M HCl neutralisiert. Zur Aufreinigung der cDNA wird der GenElute™ PCR Clean-Up Kit verwendet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wird zweimal mit 50 µl H_2O_{dd} eluiert. Die cDNA wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

RevertAid Reverse Transkriptase

Zunächst werden 11,5 bzw. 10,5 µl gRNA mit 1 µl rhx- (100 µM) bzw. 2 µl Oligo(dT)-Primer (100 µM) versetzt. Die Proben werden 5 min bei 72 °C und dann 5 min auf Eis inkubiert. Zur cDNA-Synthese wird folgender Ansatz verwendet:

Ansatz cDNA-Synthese:	12,5 µl	gRNA + Primer denaturiert
	5 µl	5x Reaktionspuffer
	2 µl	dNTPs (10 mM)
	0,5 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	1 µl	RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Der Ansatz wird erst 10 min bei Raumtemperatur und dann 60 min bei 42 °C inkubiert. Wird die cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern durchgeführt, entfällt die zehnminütige Inkubation

bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird mit 5 µl 1 M NaOH abgestoppt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch 5 µl 1 M HCl neutralisiert. Die Aufreinigung der cDNAs erfolgt mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit, wobei abweichend zum Herstellerprotokoll zweimal mit 50 µl H_2O_{dd} eluiert wird. Die cDNA wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5. Terminator-Exonuklease-Verdau

Ein Terminator-Exonuklease(TEx)-Verdau ermöglicht es RNA-Moleküle mit einem 5‘-Mono- von solchem mit einem 5‘-Tri-Phosphat zu unterscheiden, da nur Erstgenannte abgebaut werden.

Zum Verdau wird folgender Ansatz verwendet:

Verdau von x µg gRNA:		
	x µg	gRNA
	0,2x µl	10x Terminator Reaktionspuffer A
	0,1x µl	Terminator™-Exonuklease (1 U/µl)
	0,05x µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	ad 2x µl	H_2O_{dd}

Der Verdau erfolgt bei 30 °C für 60 min und wird durch eine saure Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung aufgereinigt. Das RNA-Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und in H_2O_{dd} aufgenommen.

2.2.3.6. *Primer-Extension*-Analyse

Durch die Aktivität der T4 Polynukleotidkinase wird im ersten Schritt die 5‘-OH-Gruppe eines genspezifischen Primers mit [γ-^{32}P]-ATP markiert.

Markierungs-Ansatz:		
	3 µl	[γ-^{32}P]-ATP (10 µCi/µl)
	2 µl	10x PNK Reaktionspuffer A
	1 µl	Primer (20 µM)
	1 µl	T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl)
	13 µl	H_2O_{dd}

Der Ansatz wird für 60 min bei 37 °C inkubiert, mit 480 µl H_2O_{dd} versetzt und auf eine illustra™ NAP™-5 Column geladen. Der Durchfluss wird verworfen und der markierte Primer mit 500 µl H_2O_{dd} eluiert.

Die sich anschließende cDNA-Synthese erfolgt analog zu 2.2.3.4., wobei im Vorfeld pro Reaktion 300.000-450.000 cpm Primer auf 2 µl eingeengt werden. Die aufgereinigten cDNAs werden auf 8 µl eingeengt und mit 4 µl 3x PAA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard für die

anschließende Elektrophorese wird der mit [γ-^{32}P]-ATP markierte pGem®-Marker verwendet (siehe 2.1.2.). Es sollte darauf geachtet werden, dass der pGem®-Marker und die Proben eine in etwa gleich starke Aktivität aufweisen. Die Proben und der pGem®-Marker werden 5 min bei 80 °C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert und auf ein PAA-Gel geladen. Die Elektrophorese wird in 1x TBE für 2-3 h bei 1100 V, 200 mA und 13 W durchgeführt. Das Auflegen eines Amersham Hyperfilm™ MP ermöglicht die Visualisierung der Verlängerungsprodukte.

2.2.3.7. Northern-Blot-Analyse

Im Vorfeld werden je Probe 10-15 µg gRNA sowie von einer Probe zusätzlich 5 µg gRNA (Färbegel) auf 1 µl eingeengt. Zur Denaturierung werden die gRNAs 1 min mit 20 µl frisch hergestellter Denaturierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert, 1 min durch Auf- und Abpipettieren gelöst und für 1 h bei 55 °C inkubiert. Nach der Denaturierung werden die Proben 5 min auf Eis gelagert.

Gellauf und Blot

Die RNA-Proben werden mit 2,5 µl 10x RNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel geladen. Der Gellauf erfolgt in 1x PB zunächst bei 100 V für 15 min und dann bei 120 V für 2-3 h, wobei mit Hilfe einer Pumpe der Puffer in der Kammer kontinuierlich durchmischt wird.

Der für das Färbegel vorgesehene Teil des Gels wird abgetrennt, 30 min in 50 mM NaOH deglyoxiliert, 20 min in 5x PB neutralisiert und für 30 min gefärbt, wobei 15 µl EtBr in den Puffer gegeben werden. Das Gel wird in 5x PB entfärbt und unter UV-Licht betrachtet.

Der restlichte Teil des Gels wird unbehandelt für den nachfolgenden Kapillar-Blot verwendet. Hierbei wird die gRNA über Nacht bei 4 °C auf eine Biodyne® A 0,45 µm Membran übertragen. Als Laufpuffer dient 20x SSC. Der Blot-Aufbau kann Abbildung 3 entnommen werden. Nach dem Blot wird die Membran zur Fixierung der RNA mit UV-Licht bestrahlt, unmittelbar danach in kochendes 20 mM TRIS/HCl pH 8,0 überführt (Deglyoxilierung) und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Membran wird erneut in 20 mM TRIS/HCl pH 8,0 geschwenkt, kurz abgetropft und in eine Tüte überführt. Optional kann die Membran nach diesem Schritt bei -20 °C aufbewahrt werden.

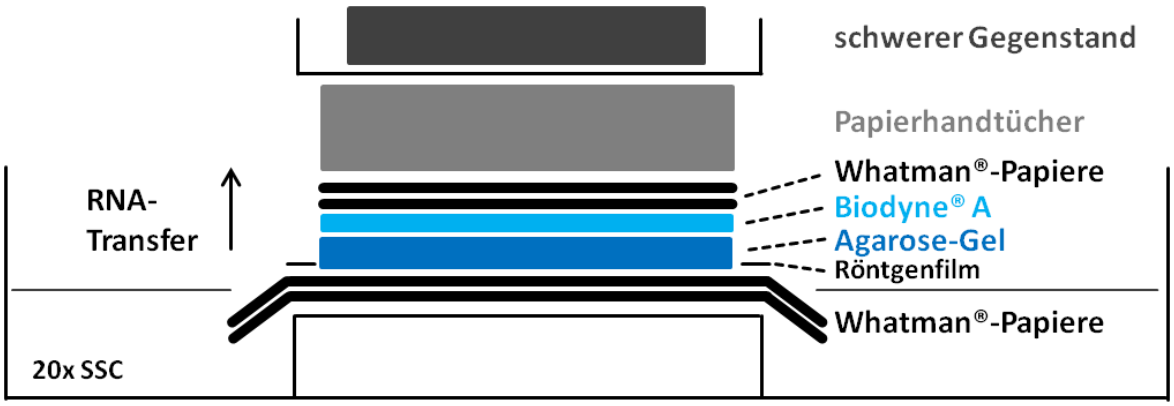


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus für eine Northern-Blot-Analyse. Der RNA-Transfer erfolgt durch einen Kapillar-Blot. Biodyne® A: Biodyne® A 0,45 µm.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Membran wird mit 40 ml frisch angesetzter Prähybridisierungslösung unter leichtem Schwenken über Nacht bei 42 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgt analog zur Southern-Blot-Analyse (siehe 2.2.2.3.).

Waschen

Um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen wird die Membran abhängig von der Signalstärke nacheinander mit 2x SSC + 0,1 % SDS, 1x SSC + 0,1 % SDS, 0,3x SSC + 0,1 % SDS und 0,1x SSC + 0,1 % SDS gewaschen. Gegebenenfalls werden die Puffer vor der Inkubation auf 65 °C erwärmt. Die Visualisierung der Transkripte erfolgt durch das Auflegen eines Amersham Hyperfilm™ MP.

Ladekontrolle

Als Ladekontrolle wird die Membran 15 min mit 15 % (v/v) Essigsäure und 3-5 min mit der Methylenblaulösung inkubiert. Zum Entfärben wird die Membran mehrmals in H_2O_{dd} geschwenkt.

2.2.3.8. *in vitro*-Transkription

Für eine *in vitro*-Transkription ist es notwendig, dass die zu transkribierende DNA glatte Enden aufweist. Da die verwendete GoTaq® G2 DNA-Polymerase keine glatten Enden erzeugt, wird nach erfolgter PCR der Ansatz mit der *Pfu* DNA-Polymerase versetzt und für 30 min bei

37 °C inkubiert. Weiter muss sichergestellt werden, dass sich stromaufwärts der zu transkribierenden DNA ein T7-Promotor befindet.

Die *in vitro*-Transkription erfolgt bei 37 °C für 1,5 h. Neben ATP, CTP, GTP und UTP wird auch [α-^{32}P]-UTP für die Transkription eingesetzt.

Transkriptions-Ansatz:		
	200-300 ng	DNA mit glatten Enden
	4 µl	5x Transkriptionspuffer
	2 µl	100 mM Dithiothreitol
	2 µl	NTPs (ATP, CTP, GTP 5 mM; UTP 1 mM)
	2 µl	[α-^{32}P]-UTP (10 µCi/µl)
	2 µl	T7 RNA-Polymerase (20 U/µl)
	1 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	ad 20 µl	H_2O_{dd}

Der Ansatz wird auf 100 µl H_2O_{dd} aufgefüllt, mit Ethanol gefällt und auf ein PAA-Gel geladen. Durch das Auflegen eines Amersham Hyperfilm™ MP wird die Laufweite des Transkripts im PAA-Gel ermittelt. Das Transkript wird ausgeschnitten und über Nacht in 360 µl RNA-Elutionspuffer inkubiert. Durch die Verwendung einer SPIN-X® Säule mit anschließender Ethanol-Fällung wird das Transkript aufgereinigt und in 25 µl H_2O_{dd} aufgenommen.

2.2.3.9. *Electro-Mobility-Shift-Assay*

Um die RNA-Bindung von Proteinen zu untersuchen, wird folgender Ansatz verwendet:

Ansatz EMSA:		
	4 µl	$tRNA^{Weizen}$ (0,5 ng/µl)
	2 µl	10x EMSA-Puffer
	1,6 µl	50 mM Dithiothreitol
	1 µl	10 mM PMSF
	0,8 µl	1 mg/ml Rinderserumalbumin
	0,5 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
	+	Protein
	+	[α-^{32}P]-UTP markiertes Transkript
	ad 20 µl	H_2O_{dd}

Zu Beginn werden der 10x EMSA-Puffer, das [α-^{32}P]-UTP markierte Transkript (siehe 2.2.3.8.) sowie die $tRNA^{Weizen}$ mit dem entsprechenden Volumen an H_2O_{dd} für 5 min bei 80 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die weiteren Komponenten dazu pipettiert, wobei die Proteinzugabe als letztes erfolgt. Die Proben werden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 1 µl > 99,5 % Glycerin und 2 µl EMSA-Laufpuffer versetzt und auf ein 8 % PAA-Gel geladen. Als Laufpuffer dient 1x TBE. Die Elektrophorese erfolgt unter Küh-

lung bei 60 V für 30 min und dann bei 80 V für ca. 3 h. Das Gel wird auf ein Whatman®-Papier überführt, in Frischhaltefolie eingewickelt und mit einem Amersham Hyperfilm™ MP exponiert.

2.2.4. Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1. Überexpression von rekombinanten Proteinen

Die Überexpression rekombinanter Proteine erfolgt in *E.coli* BL21-AI™. Am ersten Tag werden 5 ml LB-Medium (+ Antibiotika) mit einem Klon oder 50 µl Glycerinstock angeimpft (Vorkultur 1). Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 200 rpm und 37 °C. Am nächsten Tag wird die Vorkultur 2 mit 30 µl Vorkultur 1 pro ml LB-Medium angeimpft, wobei außerdem pro ml LB-Medium 0,01 g Glukose zugesetzt werden. Die Kultur wird über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Zum Ansetzen der Hauptkultur werden pro ml LB-Medium (+ Antibiotika) 10 µl Vorkultur 2 zugegeben. Die Kultur wird bis zum Erreichen einer $O.D._{600nm}$ = 0,4 bei 37 °C und dann für 20 min bei der Überexpressions-Temperatur inkubiert. Es folgt die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 1 µl 1 M IPTG und 10 µl 20 % Arabinose pro ml Hauptkultur. Die Kultur wird für weitere 4 h inkubiert und durch eine Zentrifugation bei 5.100 rpm (Allegro™ 25 R Centrifuge, TS-5.1-500) (50 ml Hauptkultur) bzw. 4.500 rpm (BECKMAN J2-21 M/E Centrifuge, JLA-10.500) (> 50 ml Hauptkultur) und 4 °C für 20 min geerntet. Abhängig von der nachfolgenden Aufreinigung wird das Zellpellet in 1x His-Lysispuffer (His-Tag-Aufreinigung, siehe 2.2.4.5.) oder 1x Strep-Waschpuffer (Strep-Tag-Aufreinigung, siehe 2.2.4.7.) aufgenommen. Das Aufnahmevolumen richtet sich nach der Größe der Hauptkultur, wobei die Zellpellets kleinerer Ansätze tendenziell in mehr Puffer aufgenommen werden als dies bei größeren Ansätzen der Fall ist.

2.2.4.2. Zellaufschluss

Der Zellausschluss erfolgt in 1x His-Lysispuffer oder 1x Strep-Waschpuffer (siehe 2.2.4.1.) durch Ultraschall. Die Zellsuspension wird unter Eiskühlung 30 s konstant bei 20-30 Hz beschallt. Nach einer Regeneration von 1,5 min wird der Vorgang so lange wiederholt bis die vormals milchige Zellsuspension einen Farbumschlag ins Klare zeigt. Es folgt eine Zentrifugation bei 5.100 rpm (Allegro™ 25 R Centrifuge, TS-5.1-500) (50 oder 200 ml Hauptkultur) bzw. 4.500 rpm (BECKMAN J2-21 M/E Centrifuge, JLA-10.500) (> 200 ml Hauptkultur) bei 4 °C für 20 min. Das Zelllysat wird gegebenenfalls in 2 ml Reaktionsgefäßen bei 14.000 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] für 5 min und 4 °C erneut zentrifugiert. Optional wird das Lysat unter Verwendung

eines 0,45 µm Filters filtriert. Ein kleiner Teil des Zellpellets wird mit Hilfe einer Pipettenspitze abgenommen, in 1x His-Lysispuffer oder 1x Strep-Waschpuffer inkl. 1 % SDS überführt und bei 70 °C aufgekocht.

2.2.4.3. Western-Blot-Analyse

Zur Übertragung von Proteinen auf die Roti®-PVDF Membran wird ein *Semi-Dry*-Blot angewandt. Im Vorfeld wird die Membran equilibriert, indem sie nacheinander für 30 s in Methanol, für 2 min in H_2O_{dd} und dann in Transferpuffer geschwenkt wird. Zusätzlich werden vier Whatman®-Papiere in Transferpuffer eingeweicht. Der Blot-Aufbau kann Abbildung 4 entnommen werden. Der Protein-Transfer erfolgt bei 4 °C, 400 mA und 300 V für 2 h 15 min oder über Nacht bei 4 °C, 20 mA und 35 V. Im Anschluss wird die Membran in 1x TTBS gewaschen und kann bei 4 °C gelagert werden. Erfolgt zeitnah eine His-Tag-Detektion, entfällt dieser Schritt.

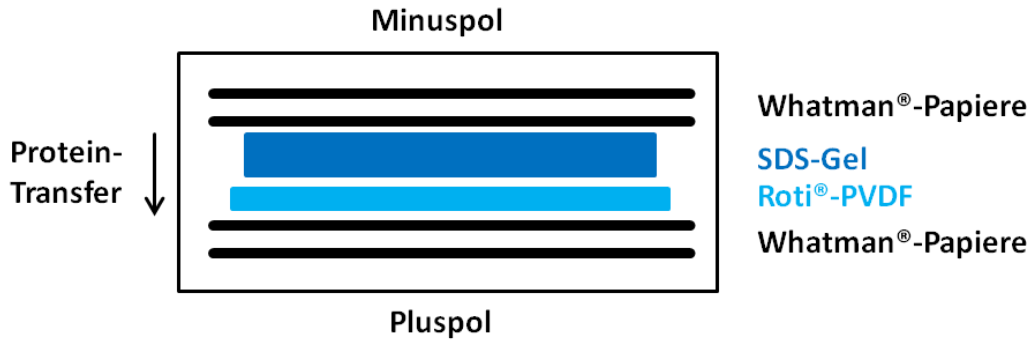


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus für eine Western-Blot-Analyse. Der Protein-Transfer erfolgt durch einen *Semi-Dry*-Blot.

His-Tag-Detektion

Die His-Tag-Detektion erfolgt bei Raumtemperatur. Die Membran wird 1 h unter leichtem Schwenken in der Blockierungslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TTBS für jeweils 10 min wird die Membran 1 h mit dem His-Tag Antikörper inkubiert. Die Membran wird erneut dreimal gewaschen und für 1 min mit der Chemilumineszenz-Lösung inkubiert. Zur Detektion wird ein Amersham Hyperfilm™ MP aufgelegt.

2.2.4.4. Färbung von Proteingelen

Das SDS-Gel wird für 1 h mit der Fixierlösung und dann für mindestens 3 h mit der Färbelösung leicht schwenkend inkubiert. Nach der Färbung wird das SDS-Gel mehrmals mit H_2O_{dd}

gewaschen. Zum Trocknen wird das Gel für ca. 10 min in 6 % Glycerin geschwenkt und im Anschluss zwischen zwei in 6 % Glycerin getränkte Cellophanblätter eingeschweißt.

2.2.4.5. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit His-Tag

Die Aufreinigung wird bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt und erfolgt abhängig vom Volumen des Zelllysats in mehreren 2 ml Reaktionsgefäßen. Pro Reaktionsgefäß werden 150-200 µl Protino® Ni-NTA Agarose vorgelegt. Die Agarose wird bei 9.675 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] für 5 min abzentrifugiert, mit 500 µl 1x His-Waschpuffer versetzt und 5 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 9.675 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] für 5 min wird der Überstand vorsichtig abgenommen und der Waschschritt zweimal wiederholt. Die Agarose wird mit 1,8 ml Lysat versetzt und 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 9.675 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] für 5 min und das dreimalige Waschen der Agarose mit je 300 µl 1x His-Waschpuffer, wobei die Inkubation zwischen den Waschschritten 10 min beträgt. Zur Elution der rekombinanten Proteine wird die Agarose 15 min mit 100 µl 1x His-Elutionspuffer unter leichtem Schwenken inkubiert und dann bei 9.675 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] für 5 min abzentrifugiert. Der Schritt wiederholt sich zweimal, sodass drei Eluate erhalten werden.

Im Anschluss können die Eluate unter Verwendung von Amicon® Ultra-0,5 ml 30 K aufkonzentriert werden. Dazu wird das Säulchen zunächst mit 500 µl 1x His-Elutionspuffer beladen und bei 9.675 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] und 4 °C abzentrifugiert. Nach und nach werden die Eluate in aufsteigender Konzentration auf das Säulchen pipettiert und abzentrifugiert.

2.2.4.6. Gelchromatografische Aufreinigung

Die gelchromatogratische Aufreinigung der aufkonzentrierten Eluate aus der His-Tag-Aufreinigung erfolgt mit Superdex™ 200 5/150 GL im Natrium-Phosphat-Puffer. Die erhaltenen Fraktionen werden analog zu 2.2.4.5. mit Amicon® Ultra-0,5 ml 30 K aufkonzentriert.

2.2.4.7. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Strep-Tag

Die Aufreinigung erfolgt bei 4 °C durch Gravitation mit der Gravity flow *Strep*-Tactin® Sepharose® column 1 ml. Die Säule wird zunächst mit 2 ml 1x Strep-Waschpuffer equilibriert. Vor dem Laden von max. 10 ml Lysat wird dieses bei 14.000 rpm [BECKMAN GS-15R, F3602] für 5 min abzentrifugiert. Nachdem das Lysat die Säule vollständig durchlaufen hat, wird letztere fünfmal mit 1 ml 1x Strep-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgt in drei Schritten durch 0,8, dann 1,4 und zuletzt 0,8 ml 1x Strep-Elutionspuffer. Zur

Regeneration der Säule werden dreimal 5 ml Regenerationspuffer verwendet, wobei ein Farbumschlag von gelb nach rot erfolgt. Um den Regenerationspuffer wieder zu entfernen, wird die Säule zweimal mit 4 ml 1x Strep-Waschpuffer gewaschen. Die vollständig entfärbte Säule wird mit 2 ml 1x Strep-Waschpuffer überschichtet, verschlossen und bei 4 °C gelagert.

Die Aufkonzentrierung der Eluate erfolgt analog zu 2.2.4.5., wobei zum Benetzten der Säulchen 1x Strep-Elutionspuffer verwendet wird.

2.2.5. Arbeiten mit *A.thaliana*

2.2.5.1. Kultivierung von *A.thaliana*

Die Kultivierung von *A.thaliana* erfolgt auf Erde oder MS-Platten. Samen von *A.thaliana* sind bei 4 °C gelagert.

Nach der Aussaat auf Erde werden die Töpfchen oder Wannen für 1-2 Tage bei 4 °C inkubiert. Dies soll ein möglichst gleichzeitiges Keimen aller Samen gewährleisten. Nach dieser Vernalisationsphase erfolgt die Kultivierung bei 21 °C (relative Luftfeuchtigkeit 50 %, Lichtmenge 80-140 µmol/m^2s) und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h/8 h.

Vor dem Ausbringen auf MS-Platten werden die Samen einer Oberflächensterilisation unterzogen. Die Samen werden dazu 5 min mit 70 % Ethanol inkubiert und dann 5 min mit H_2O_{dd} gewaschen. Es folgt die Zugabe der Bleaching-Lösung. Nach 20 min werden die Samen dreimal mit H_2O_{dd} gewaschen, mit 0,1 % Topagar vermischt und gleichmäßig auf den MS-Platten verteilt. Die Platten werden unter den oben genannten Bedingungen kultiviert.

2.2.5.2. Kreuzen von *A.thaliana*

Auf Grund dessen, dass *A.thaliana* überwiegend selbstbefruchtend ist muss bei einer Kreuzung die Selbstbefruchtung des Eizell-Donors unterbunden werden. Idealerweise sollten die Infloreszenzen des Eizell-Donors zum Zeitpunkt der Präparation mindestens 6 cm hoch sein. Zunächst werden alle Blüten mit sichtbarem Stempel, kleine Knospen und Nebentriebe entfernt. Es können nur solche Blüten zum Kreuzen herangezogen werden, die noch geschlossen sind, bei denen sich aber schon die weißen Kronblätter andeuten. Mit einer spitzen Pinzette wird die Blüte geöffnet und von den Staubblättern befreit. Zwei Tage später werden vom Pollen-Donor Blüten mit einer Pinzette abgenommen und über den präparierten Stempel gestreift. Die fremd-bestäubte Pflanze wird bis zur Samenreife weiterkultiviert.

2.2.5.3. Transformation von *A.thaliana*

Die Transformation von *A.thaliana* mittels *Floral Dip* erfolgt in Anlehnung an die Veröffentlichung Clough and Bent 1998.

Im Vorfeld werden pro Konstrukt, das in *A.thaliana* transformiert werden soll, 8-12 Töpfchen mit 4-5 Pflanzen ausgebracht. Die Pflanzen (T_0-Generation) werden so lange kultiviert bis die Primärinfloreszenzen ca. 10 cm hoch sind. Etwa eine Woche vor der Transformation werden die Primärinfloreszenzen direkt über der Rosette abgeschnitten. Dies hat die Bildung der Sekundärinfloreszenzen zur Folge. Zwei Tage vor der Transformation werden pro Konstrukt zwei 5 ml *A.tumefaciens*-Vorkulturen angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Dem Medium wird neben Carbenicillin (Resistenzgen auf dem Helfer-Plasmid) das entsprechende Antibiotikum zur Selektionierung auf das Transformations-Plasmid zugesetzt. Einen Tag vor der Transformation wird mit den zwei Vorkulturen eine 200 ml Hauptkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgt wieder bei 28 °C unter Schütteln. Am Tag der ersten Transformation werden von den etwa 10 cm hohen Sekundärinfloreszenzen der T_0-Generation alle Blüten mit Kronblättern und alle Schoten entfernt. Desweiteren wird die Hauptkultur für 20 min bei 4.500 rpm [BECKMAN J2-21 M/E Centrifuge, JLA-10.500] und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml Infiltrationsmedium aufgenommen und in das restliche Medium überführt. Die zuvor präparierten T_0-Pflanzen werden für etwa 3-5 s kopfüber in das Infiltrationsmedium getaucht, waagrecht in eine Wanne gelegt, mit einer Haube abgedeckt und 24 h bei gedämpftem Licht inkubiert. Nach 4-6 Tagen wird die zweite Transformation durchgeführt. Das Vorgehen erfolgt analog zur ersten Transformation, wobei von den T_0-Pflanzen keine Blüten etc. entfernt werden. Die Pflanzen werden in Fotoschutztaschen eingepackt und bis zur Samenreife (T_1-Generation) weiterkultiviert.

2.2.5.4. Selektion transformierter *A.thaliana*-Pflanzen

Die Selektionierung transformierter *A.thaliana*-Pflanzen (T_1-Generation) erfolgt in Abhängigkeit des Transformations-Plasmids entweder in einer Wanne mit Anzuchterde oder auf MS-Platten. Eine Selektion auf Erde ist nur möglich, wenn das Transformationsplasmid ein Resistenzgen gegen das Herbizid Basta® (Wirkstoff: 120 mg/l Glufosinat-Ammonium; Bayer CropScience Deutschland GmbH) trägt. Die T_1-Pflanzen werden bis zum Zweiblattstadium kultiviert und dann dreimal im Abstand von 4 Tagen mit dem Herbizid (300 µl Basta® in 500 ml H_2O_{dd}) besprüht. Findet die Selektionierung auf MS-Platten statt, wird dem Agar neben

dem entsprechenden Zusatz zur Selektion auf das Transformations-Plasmid auch Carbenicillin (Resistenzgen auf Helfer-Plasmid) zugesetzt.

2.2.6. Arbeiten mit Bakterien

2.2.6.1. Kultivierung von *E.coli*

E.coli wird in LB-Medium unter Schütteln (200 rpm) oder auf LB-Agar bei 37 °C kultiviert.

2.2.6.2. Kultivierung von *A.tumefaciens*

A.tumefaciens wird in LB-Medium unter Schütteln (200 rpm) oder auf LB-Agar bei 28 °C kultiviert.

2.2.6.3. Transformation von *A.tumefaciens*

Die kompetenten *A.tumefaciens* GV2260 Zellen sind bei -80 °C gelagert und werden langsam auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA in maximal 10 µl werden die Zellen 5 min auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff und dann 5 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Vorgang dient dazu, dass sich in der Bakterienmembran lokal Poren bilden und das Plasmid aufgenommen werden kann. Es folgt die Zugabe von 1 ml LB-Medium und eine Inkubation für 2-4 h bei 28 °C unter Schütteln. Die Zellsuspension wird auf LB-Platten, die Carbenicillin und ein Antibiotikum abhängig vom Transformations-Plasmid enthalten, ausplattiert und bei 28 °C für 2-3 Tage inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung des *ccmB*-mRNA-Polymorphismus in *Arabidopsis thaliana*

3.1.1. Zusätzliche *ccmB*-Transkripte in L*er*

In einer vorangegangenen Analyse mitochondrialer Transkripte wurde ein *ccmB*-mRNA-Polymorphismus zwischen den *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) Ökotypen Columbia (Col) und Landsberg *erecta* (L*er*) festgestellt. Der Polymorphismus zeigt sich durch zusätzliche *ccmB*-Transkripte in L*er* mit 5'-Enden bei -231 und -200 (Position relativ zum Translations-Startkodon; Abbildung 5) [Forner et al. 2008]. In einer CR-RT-PCR-Analyse mit den Primern Atccb2-3 und Atccb2-6 (P7 und P5 in Abbildung 5) repräsentieren PCR-Produkte von etwa 310 und 340 Basenpaaren (bp) die beschriebenen Transkripte (Abbildung 7A, Produkte 2a und 2b). Die Haupttranskripte in Col weisen 5'-Enden bei -140 und -347/346 auf (Abbildung 5) [Forner et al. 2007]. Die entsprechenden CR-RT-PCR-Produkte sind ca. 260 bzw. 470 bp groß (Abbildung 7A, Produkte 1 und 3). Alle beschriebenen *ccmB*-Transkripte besitzen ein 3'-Ende bei +81 (Position relativ zum Translations-Stoppkodon; Abbildung 5) [Forner et al. 2008, Forner et al. 2007].

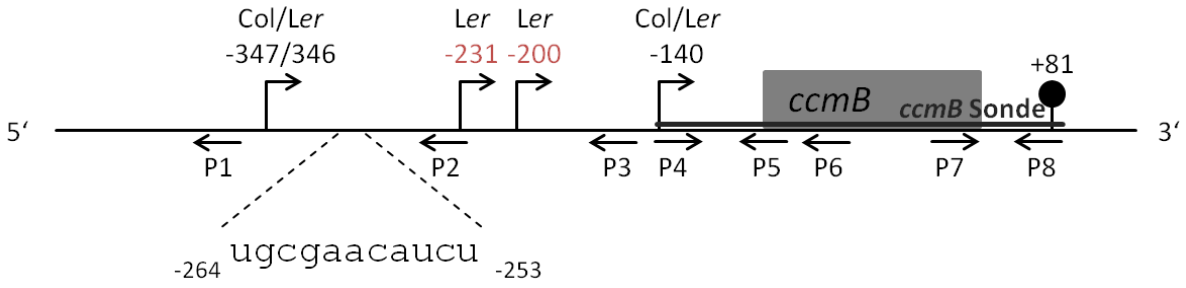


Abbildung 5: Schematische Genkarte von *ccmB*. Der hellgraue Kasten stellt das Leseraster des *ccmB*-Gens dar. 5'-Enden der *ccmB*-Transkripte sind durch abgewinkelte Pfeile, das 3'-Ende der *ccmB*-Transkripte ist durch einen ausgefüllten Kreis dargestellt. Die Position der 5'-Enden ist relativ zum Translations-Startkodon und die des 3'-Endes relativ zum Translations-Stoppkodon angegeben. Die waagrechte dunkelgraue Linie kennzeichnet die Lage der *ccmB*-Sonde. Die relative Lage der Primer ist durch waagrechte Pfeile kenntlich gemacht. Die Nukleotide der vorhergesagten Bindungsstelle von RPF4 im Bereich von -264 bis -253 sind angegeben. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. P1: Atccb2-12. P2: Atccb2-7. P3: Atccb2-10. P4: Atccb2-NS.H. P5: Atccb2-6. P6: Atccb2-1. P7: Atccb2-3. P8: Atccb2-NS.R.

Das Auftreten unterschiedlicher *ccmB*-Transkripte in Col und L*er* zeigt sich auch in einer *Primer-Extension*-Analyse (Abbildung 6). In beiden Ökotypen werden Verlängerungsprodukte detektiert, denen 5'-Enden bei -140 bzw. -347/346 zugeordnet werden können (Abbildung 6, jeweils Spur b, Signale 1 und 3). Desweiteren treten in L*er* vier zusätzliche Produkte von ca. 240-290 Nukleotiden (nt) zwischen den oben genannten auf (Abbildung 6, L*er* Spur b, Signale

2 i bis 2 iiii). Zwei dieser Signale korrelieren mit den zuvor beschriebenen *ccmB*-Transkripten mit 5‘-Enden bei -200 und -231 (Abbildung 6, L*er* Spur b, Signale 2 ii und 2 iiii). In Col und L*er* deutet ein ca. 520 nt langes Produkte auf ein weiteres *ccmB*-Transkript hin (Abbildung 6, Signal 4). Durch die Verwendung des Primers Atccb2-12 (P1 in Abbildung 5), der stromaufwärts des 5‘-Endes bei -347/346 liegt, konnte dieses Transkript in einer CR-RT-PCR erfasst werden. Das Transkript weist in Col ein 5‘-Ende bei -495 und in L*er* bei -492 auf. Beide Transkripte besitzen ein 3‘-Ende bei +81 (Anhang 2A + D). Die Sequenzierung zusätzlicher CR-RT-PCR-Produkte ergab in Col 5‘-Enden bei -589 (Anhang 2B) und im Bereich von -635 bis -637 (Anhang 2C). In L*er* konnte ein weiteres *ccmB*-Transkript mit einem 5‘-Ende bei -569 erfasst werden (Anhang 2E). Das 3‘-Ende der *ccmB*-Transkripte liegt jeweils bei +81 bzw. +83 (L*er* Transkript mit 5‘-Ende bei -569) (Anhang 2). Diese neu charakterisierten *ccmB*-Transkripte können jedoch keinem Signal in der *Primer-Extension*-Analyse zugeordnet werden.

Das Auftreten zusätzlicher *ccmB*-Transkripte in L*er* konnte durch eine *Primer-Extension*-Analyse verifiziert werden, wobei hier vier weitere Verlängerungsprodukte den zwei aus der CR-RT-PCR ermittelten 5‘-Enden gegenüberstehen.

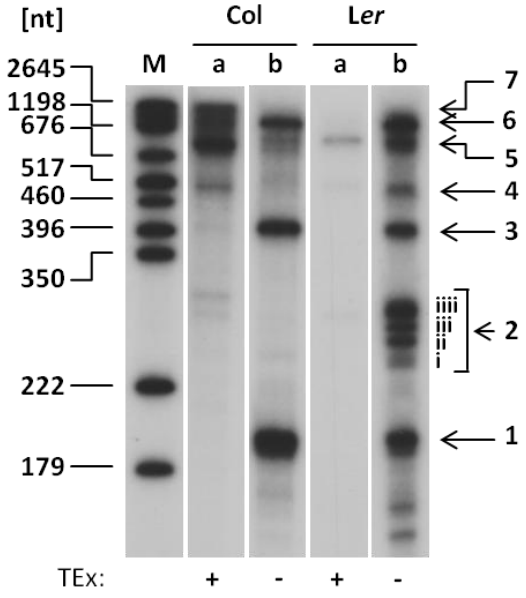


Abbildung 6: Primäre und sekundäre *ccmB*-Transkripte. *Primer-Extension*-Analyse mit Terminator-Exonuklease (TEx) behandelter (+) und unbehandelter (-) mitochondrialer RNA von Col und L*er*. Zur cDNA-Synthese wurden jeweils 5 µg mitochondriale RNA sowie der Primer Atccb2-1 (P6 in Abbildung 5) verwendet. Die relative Lage von Atccb2-1 kann Abbildung 5 entnommen werden. Es wurde ein 6 %iges PAA-Gel verwendet. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen Verlängerungsprodukte (1: ca. 200 nt, 2: ca. 240-290 nt, 3: ca. 400 nt, 4: ca. 520 nt, 5: ca. 800 nt, 6: ca. 1200 nt, 7: ca. 2600 nt). Am linken Rand sind die Größen der DNA-Fragmente des pGem® Markers (M) in Nukleotiden (nt) angegeben.

3.1.2. Charakterisierung der *ccmB*-Transkripte

Der Ursprung der *ccmB*-Transkripte kann entweder in der Transkriptionsinitiation (primäre Transkripte) oder in der post-transkriptionalen Prozessierung (sekundäre Transkripte) liegen. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wird der unterschiedliche Phosphorylierungsgrad der Transkripte am 5‘-Ende ausgenutzt. Primäre Transkripte tragen ein Tri-, se-

kundäre Transkripte dagegen ein Mono-Phosphat am 5‘-Ende. Werden die verschiedenen Transkripte einer Terminator-Exonuklease(TEx)-Behandlung unterzogen, kommt es zum Abbau aller Transkripte mit einem 5‘-Mono-Phosphat. Lediglich primäre Transkripte bleiben erhalten. Eine *Primer-Extension*-Analyse mit TEx-behandelten und unbehandelten Proben macht deutlich, dass sowohl die Haupttranskripte in Col und L*er* als auch die zusätzlichen Transkripte in L*er* durch post-transkriptionale Prozessierung entstehen, da bei den TEx-behandelten Proben auf der entsprechenden Höhe keine Signale mehr auftreten (Abbildung 6, jeweils Spur a, Signale 1-3). Welchen Ursprung das Transkript mit einem 5‘-Ende bei -495 (Col) bzw. bei -492 (L*er*) hat kann nicht eindeutig festgestellt werden, da lediglich in Col nach der TEx-Behandlung ein Signal bei etwa 520 nt detekiert wird (Abbildung 6, Col Spur a, Signal 4). Es zeigt sich weiter, dass die Transkripte mit weiter stromaufwärts liegenden 5‘-Enden vermutlich bei der Transkriptionsinitiation gebildet werden, wobei die entsprechenden Signale jeweils (wieder) nur in Col klar detektiert werden können (Abbildung 6, Col Spur a, Signale 5, 6 und 7). Ein Ursprung in der Transkriptionsinitiation wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass diese Transkripte bislang durch eine CR-RT-PCR-Analyse nicht erfasst werden konnten.

In Vorarbeiten wurden reziproke Kreuzungen zwischen Col and L*er* betrachtet. Dabei konnte in einer CR-RT-PCR-Analyse gezeigt werden, dass in beiden F_1-Pflanzen ein PCR-Muster, welches dem in L*er* ähnelt, auftritt [Forner et al. 2008]. Dies weist erstens auf eine biparentale Vererbung des *ccmB*-mRNA-Polymorphismus hin. Die Ursache des Polymorphismus ist folglich auf einen Unterschied des Kern-Genoms zwischen Col und L*er* zurückzuführen. Zweitens deutet sich an, dass der L*er*-*ccmB*-mRNA-Phänotyp dominant gegenüber dem von Col ist. Dies zeigt sich darin, dass bereits ein einfacher Chromosomensatz von L*er* ausreicht, um die L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte zu generieren.

Die beschriebenen Analysen weisen darauf hin, dass die zusätzlichen *ccmB*-Transkripte in L*er* ein Resultat der post-transkriptionalen Prozessierung darstellen. Die Bildung dieser Transkripte beruht weiter auf einem im Kerngenom von L*er* kodierten Faktor.

3.1.3. Kartierung des *RPF4*-Lokus

Um den Genbereich in L*er*, der für das Auftreten der *ccmB*-Transkripte mit 5‘-Enden bei -231 und -200 verantwortlich ist, zu lokalisieren, wurde auf eine bereits vorhandene *Mapping*-Population aus F_2-Pflanzen der reziproken Kreuzungen Col x L*er* und L*er* x Col zurückgegriffen

[Hölzle et al. 2011]. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die insgesamt 198 F_2-Pflanzen bezüglich ihrer *ccmB*-Transkripte charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der *ccmB*-mRNA-Polymorphismus auf ein in Col nicht-funktionsfähiges, Kern-kodiertes Gen zurückzuführen ist [Daten Angela Hölzle und Stefan Binder; unveröffentlicht]. Im weiteren Verlauf wird dieses Gen als *RNA PROCESSING FACTOR 4* (*RPF4*) bezeichnet.

Die Kartierung des *RPF4*-Lokus erfolgte ebenfalls in Vorarbeiten und soll hier nur kurz beschrieben werden. Durch die Verwendung von Insertion/Deletion-Markern war es möglich den Genort von *RPF4* auf Chromosom 1 festzulegen und hier auf einen Bereich zwischen 23,25 und 23,80 Megabasenpaare (Mbp) einzuengen. Um den *RPF4*-Lokus weiter einzugrenzen, wurden im weiteren Verlauf mehrere rekombinante Inbred-Linien herangezogen [Lister and Dean 1993]. Dadurch war es möglich den Lokus auf den Bereich zwischen 23,25 und 23,33 Mbp festzulegen [Daten Angela Hölzle, Christian Jonietz und Stefan Binder; unveröffentlicht].

In obigem Lokus befinden sich u.a. die drei Gene At1g62910, At1g62914 und At1g62930 sowie das Pseudogen At1g62860 [Lurin et al. 2004], welche für *Pentatricopeptide Repe*at(PPR)-Proteine der P-Subfamilie kodieren. Da alle in der Vergangenheit identifizierten RPFs dieser Subfamilie der PPR-Proteine angehören [Binder et al. 2013, Hauler et al. 2013, Hölzle et al. 2011, Jonietz et al. 2010, Jonietz et al. 2011, Stoll et al. 2014], wurden die drei Gene At1g62910, At1g62914 und At1g62930 zunächst als beste Kandidaten für *RPF4* in Betracht gezogen. Das Pseudogen At1g62860 wurde nicht weiter untersucht.

3.1.4. Identifizierung von *RPF4* in L*er*

Eine erste Untersuchung der Kandidatengene bezüglich ihrer Funktion in der *ccmB*-mRNA-Prozessierung erfolgte wieder in Vorarbeiten. Um letztendlich *RPF4* zu identifizieren, wurden die Leseraster sowie die 5‘- und 3‘-flankierenden Bereiche (inklusive der 5‘- und 3‘-UTR) der drei Kandidatengene At1g62910, At1g62914 und At1g62930 mit Gesamt-DNA (gDNA) von L*er* und den Primerpaaren At1g62910Ler-kompl.1/At1g62910-kompl.R2, At1g62915-kompl.H /At1g62915-kompl.R und At1g62930-kompl.H/At1g62930-kompl.R amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit *Pac*I und *Asc*I verdaut, in pMDC123 kloniert (Anhang 1A, oben) [Curtis and Grossniklaus 2003] und stabil mittels *Floral Dip* in Col transformiert. Zur Selektionierung transformierter Pflanzen wurden diese auf Erde ausgebracht und mit dem Herbizid Basta® behandelt.

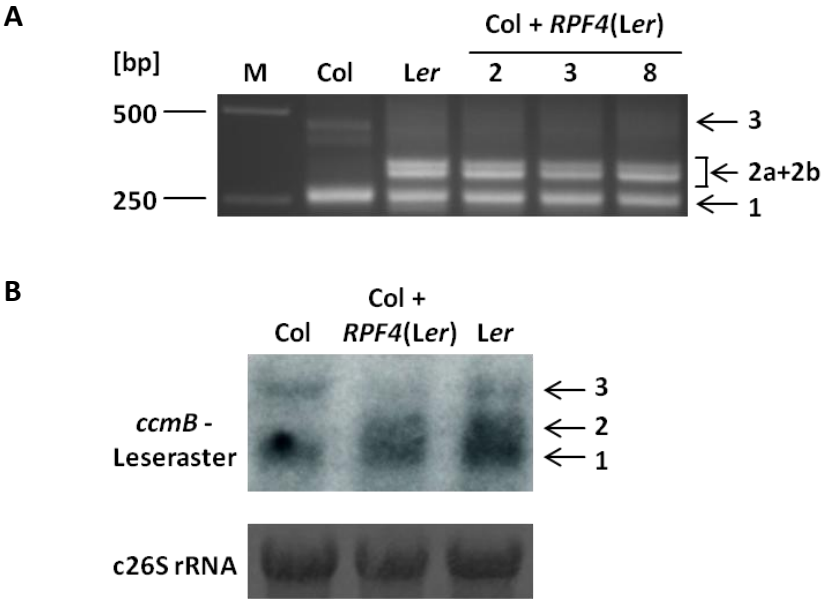


Abbildung 7: Identifizierung von *RPF4*. A: CR-RT-PCR-Analyse der *ccmB*-Transkripte. Die untersuchten Pflanzen sind oberhalb des Bildausschnitts angegeben. Als Primer wurden Atccb2-3 und Atccb2-6 (P7 und P5 in Abbildung 5) verwendet. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen aufgetretene PCR-Produkte (1: ca. 260 bp, 2a: ca. 310 bp, 2b: ca. 340 bp, 3: ca. 470 bp). Am linken Rand sind die Größen der DNA-Fragmente des GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (M) in Basenpaaren (bp) angegeben. **B:** Northern-Blot-Analyse der *ccmB*-Transkripte. Die eingesetzte Sonde deckt das Leseraster von *ccmB* ab und wurde mit den Primern Atccb2-NS.H und Atccb2-NS.R (P4 und P8 in Abbildung 5) amplifiziert. Es wurden jeweils 10 µg gRNA von Col, Col + At1g62910(L*er*) (Col + *RPF4*(L*er*)) und L*er* verwendet und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen drei Transkripte (1: ca. 850 nt, 2: ca. 950 nt, 3: ca. 1050 nt). Die Ladekontrolle erfolgte durch eine Methylenblaufärbung der RNA, exemplarisch ist die angefärbte cytosolische 26S rRNA (c26S rRNA) abgebildet.

Die selektionierten T_1-Pflanzen wurden anhand einer CR-RT-PCR-Analyse mit den Primern Atccb2-3 und Atccb2-6 (P7 und P5 in Abbildung 5) auf die vorhandenen *ccmB*-Transkripte untersucht. Col-Pflanzen, die mit den Genen At1g62914(L*er*) bzw. At1g62930(L*er*) transformiert wurden, zeigen ein PCR-Muster wie in Col (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die Gene At1g62914(L*er*) und At1g62930(L*er*) nicht für RPF4 kodieren. Im Gegensatz dazu wurde in den mit At1g62910(L*er*) transformierten Col-Pflanzen ein CR-RT-PCR-Muster wie in L*er* erhalten. Es zeigen sich PCR-Produkte von ca. 310 und 340 bp, die das Vorhandensein von *ccmB*-Transkripten mit 5‘-Enden bei -200 und -231 andeuten (Abbildung 7A, Col + *RPF4*(L*er*), Produkte 2a und 2b) [Daten Christian Jonietz und Stefan Binder; unveröffentlicht]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Ergebnis in einer Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer DNA-Sonde gegen das *ccmB*-Leseraster bestätigt werden. In Col, Col + At1g62910(L*er*) und L*er* werden *ccmB*-Transkripte einer Länge von ca. 850 und 1050 Nukleotiden (nt) detektiert (Abbildung 7B, Transkripte 1 und 3). Diese Signale können *ccmB*-Transkripten mit 5‘-Enden bei -140 bzw. -347/346 zugeordnet werden. In L*er* sowie Col + At1g62910(L*er*) liegt noch ein weiteres *ccmB*-Transkript von ca. 950 nt vor (Abbildung 7B, L*er* und Col + *RPF4*(L*er*), Transkript 2). Die Größe des *ccmB*-Transkripts deckt sich mit den bisherigen Analysen, wobei

abhängig von der angewandten Methode ein (Northern-Blot-Analyse; Abbildung 7B, Transkript 2), zwei (CR-RT-PCR-Analyse; Abbildung 7A, Produkte 2a und 2b) oder vier (*Primer-Extension*-Analyse; Abbildung 6, Signale 2 i bis 2 iiii) zusätzliche(s) Transkript(e) in L*er* auftreten.

Anhand der beschriebenen Analysen kann gefolgert werden, dass die Bildung der L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte in unmittelbarem Zusammenhang mit dem At1g62910-Allel aus L*er* steht. Das Gen At1g62910(L*er*) kodiert folglich für RPF4(L*er*), ein PPR-Protein der P-Subfamilie bestehend aus 15 Repeats. Nachfolgend wird At1g62910(L*er*) in *RPF4*(L*er*) umbenannt.

3.1.5. *RPF4*-Allele in verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen

In früheren CR-RT-PCR-Analysen verschiedener *A.thaliana* Ökotypen konnten, neben L*er*, noch in weiteren Ökotypen die L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte beobachtet werden (Tabelle 12). Um herauszufinden, wann ein At1g62910- als ein funktionsfähiges *RPF4*-Allel in Erscheinung tritt, wurde das entsprechende Allel in L*er* und Col sowie in einigen Ökotypen mit dem L*er*- (En-1, Pi-2) bzw. dem Col-*ccmB*-mRNA-Phänotyp (Sha, Sorbo, Tsu-1, Ws) unter Verwendung der Primer At1g62910Ler.kompl.1 und At1g62910-kompl.R2 amplifiziert und anschließend mit At1g62910Ler.1, At1g62910Ler.2, At1g62910Ler.3 und At1g62910Ler.6 sequenziert (Anhang 3) [Daten teilweise Christian Jonietz und Stefan Binder; unveröffentlicht]. Die entsprechenden Aminosäure(AS)-Sequenzen weisen kleine Insertionen bzw. Deletionen innerhalb der ersten 60 Positionen sowie teilweise AS-Austausche im Vergleich zum funktionalen RPF4(L*er*) auf (Anhang 4). Bei näherer Betrachtung der Sequenzen treten mehrere Positionen mit konsistentem Unterschied zwischen den verschiedenen Proteinen auf (Anhang 4). Konsistent soll in diesem Zusammenhang bedeuten, dass alle Ökotypen mit dem Col-*ccmB*-mRNA-Phänotyp die identische AS aufweisen. An der gleichen Position ist in den Ökotypen mit dem L*er*-*ccmB*-mRNA-Phänotyp eine andere, innerhalb dieser Gruppe allerdings identische AS kodiert. Eine Anhäufung solcher konsistenter Unterschiede kann im Bereich der Repeats 1 und 2 sowie im Bereich von Repeat 7 bis 10 beobachtet werden. Lediglich zwei dieser Unterschiede befinden sich an Position 1 (Repeat 2 und 9), der neben Position 6 eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit der RNA zugeschrieben wird [Barkan et al. 2012]. Zusätzlich tritt ein konsistenter Unterschied an Position 3 (Repeat 1), welche die Bindung vermutlich indirekt beeinflusst, auf [Yagi et al. 2013a]. Ab Repeat 11 sind die verschiedenen RPF4-Proteine dagegen na-

hezu identisch. In dieser Region treten nur vereinzelt nicht-konsistente Variationen auf (Anhang 4).

Die bisherigen Ausführungen lassen vermuten, dass der C-Terminus im Gegensatz zum restlichen Protein nicht spezifisch für das Auftreten eines funktionalen RPF4-Proteins ist.

Tabelle 12: Verteilung von 5'-Enden der *ccmB*-mRNAs in verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen. Die verwendeten Daten entstammen teilweise den Arbeiten [Forner et al. 2008] und [Steinhilber 2010].

L*er* *ccmB*-mRNA-Phänotyp (*ccmB*-Transkripte mit 5'-Enden bei -231/200)	**Col *ccmB*-mRNA-Phänotyp** (keine *ccmB*-Transkripte mit 5'-Enden bei -231/200)	Literatur
L*er*, Di-1, En-1, La-1, Pi-2	Col, C24, Bay-0, Bl-1, Bla-10, Cal, Can-0, Co, Cvi, Di-G, Ei, Ema-1, Est, Kas-1, Kondara, Mt-0, No-0, Oy-1, Sha, Sorbo, Su-0, Tsu-1, Van-0, Ws, Yo-0	[Forner et al. 2008]
Ct-1	Bur-0, Blh-1	[Steinhilber 2010]
Edi-0	Gre-0, Kn-0, Lip-0, Ms-0, Nok-1, Pa-2, Ri-0, Te	

Um weitere Erkenntnisse darüber zu erhalten, warum das At1g62910-Allel aus L*er* in der *ccmB*-mRNA-Prozessierung eine entscheidende Rolle spielt, das entsprechende Allel aus Col, aber nicht, wurde die vermeintliche Bindungsstelle des RPF4-Proteins auf dem *ccmB*-Vorläufer-Transkript lokalisiert. In Anlehnung an die Annahme, dass die AS an Position 6 und 1' (Position 1 des nachfolgenden Repeats) der Repeats die Interaktion mit einem Nukleotid der mRNA vermitteln [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a], bindet RPF4 im Bereich von -264 bis -253 (Position relativ zum Translations-Startkodon) an die *ccmB*-mRNA, d.h. stromaufwärts der prozessierten 5'-Enden (Abbildung 5; Abbildung 8). Eine Bindung stromaufwärts der Prozessierungsstelle wird auch bei den bereits beschriebenen RPFs angenommen [Binder et al. 2013]. Laut der Vorhersage ist der N-terminale Teil von RPF4(L*er*), d.h. der Bereich vor Repeat 4 Position 6, nicht an der RNA-Bindung beteiligt. Die relevanten AS-Paare der restlichen Repeats weisen bezüglich der Interaktion mit der *ccmB*-mRNA eine hohe Übereinstimmung mit dem beschriebenen Code auf (Abbildung 8A).

Im Gegensatz dazu weist die Vorhersage auf eine wesentlich schwächere Interaktion zwischen RPF4(Col) und der *ccmB*-mRNA im Bereich von -264 bis -253 hin. Es liegt an lediglich sechs Interaktionsstellen eine hohe Übereinstimmung mit dem beschriebenen Code vor, wobei dies vor allem auf die Interaktionen der C-terminalen Repeats mit der *ccmB*-mRNA zutrifft. Die Interaktionen der relevanten AS-Paare im restlichen Protein mit den Nukleotiden

der vermeintlichen Bindungsstelle zeigen dagegen nur eine geringe oder keine Übereinstimmung bezüglich des Codes (Abbildung 8B).



Abbildung 8: Vorhergesagte Bindung von RPF4(L*er*) (A) und RPF4(Col) (B) an die *ccmB*-mRNA. Die AS an Position 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) der 15 Repeats sind im Einbuchstabencode angegeben. Es ist die Interaktion mit Nukleotiden der *ccmB*-mRNA im Bereich von -264 bis -253 (Position relativ zum Translations-Startkodon) dargestellt. Die Übereinstimmung mit dem in Barkan et al. 2012 und Yagi et al. 2013a beschriebenen Code der Interaktion zwischen den AS an Position 6 sowie 1‘ der PPR-Motive und einem Nukleotid der RNA ist angegeben: hohe Übereinstimmung (:), geringe Übereinstimmung (.), keine Übereinstimmung (x). Die Vorhersage der Bindungsstelle erfolgte freundlicher Weise durch Ian Small.

Das vermeintliche Ausbleiben einer Interaktion von RPF4(Col) mit der *ccmB*-mRNA ist möglicherweise auf ein Threonin im Repeat 4 an Position 6 bzw. auf ein Serin im Repeat 10 ebenfalls an Position 6 zurückzuführen (Abbildung 8B). Die beschriebenen AS-Austausche sind allerdings nicht in allen Col-Typ-Proteinen vorhanden. So weist das RPF4-Protein aus Tsu-1 analog zum Protein aus L*er* ein Asparagin in Repeat 4 Position 6 auf. Ein ähnliches Bild tritt auch im Repeat 10 auf. Hier besitzen drei der Col-Typ-Proteine wie die L*er*-Typ-Proteine ein Asparagin (Anhang 4). Dies lässt vermuten, dass in beiden Repeats die vorliegende AS an Position 6 nicht entscheidend für eine funktionsfähige *ccmB*-mRNA-Prozessierung ist. Zusätzlich zeigt sich, dass die relevanten AS im mittleren Teil von RPF4(Col) und die vorliegenden Nukleotide der *ccmB*-mRNA nur eine geringe Übereinstimmung mit dem Code aufweisen. Der Unterschied zum funktionsfähigen RPF4(L*er*) ist hier durch zwei Aspartate (Repeat 7 Position 1, Repeat 9 Position 1) und ein Asparagin (Repeat 8 Position 1) bedingt (Abbildung 8). Von den genannten AS ist lediglich das Aspartat im Repeat 9 konsistent in allen Col-Typ-Proteinen vorhanden. An den beiden anderen Positionen weisen die Col-Typ-Proteine teilweise die gleichen AS wie die L*er*-Typ-Proteine auf (Anhang 4).

Die *in silico*-Analysen deuten an, dass RPF4(L*er*) im Gegensatz zu RPF4(Col) ein hohes Interaktionsvermögen mit der *ccmB*-mRNA aufweist. Die veränderten AS zwischen RPF4(L*er*) und RPF4(Col) scheinen aber nicht in allen Fällen entscheidend für die *ccmB*-mRNA-Prozessierung zu sein. Weiter liegt die Vermutung nahe, dass die C-Termini von RPF4(L*er*) und RPF4(Col) in

ähnlicher Weise mit der *ccmB*-mRNA interagieren. Trotz der bisherigen Erkenntnisse, bleibt es schwierig AS oder Bereiche von RPF4(L*er*) auszumachen, die entscheidend für die Funktionalität des Proteins bei der *ccmB*-mRNA-Prozessierung sind.

3.1.6. *ccmB*-mRNA-Prozessierung durch chimäre Proteine

Mit dem Ziel weitere Hinweise darüber zu erhalten, welche Bereiche die Funktionalität von RPF4(L*er*) vermitteln, wurden chimäre *RPF4*-Gene auf der Grundlage der *RPF4*-Allele aus L*er* und Col erzeugt. Die ersten chimären *RPF4*-Gene wurden so konstruiert, dass das Col-Allel von 5‘ nach 3‘ sukzessive durch das L*er*-Allel ersetzt wird (*RPF4*-c6, *RPF4*-c4, *RPF4*-c1). Mit weiteren chimären *RPF4*-Genen wurde nur auf den vermeintlich nicht in die RNA-Bindung involvierten Bereich des Proteins vor Repeat 4 Position 6 fokussiert (*RPF4*-c7, *RPF4*-c2). Außerdem wurde ein chimäres *RPF4*-Gen (*RPF4*-c8) erzeugt, welches lediglich die dem Bereich von Repeat 4 Position 6 bis Repeat 8 Position 1 entsprechende Nukleotidsequenz aus *RPF4*(Col) enthält (Abbildung 9A).

Tabelle 13: Verwendete Primer zur Klonierung chimärer *RPF4*-Gene.

	PCR 5‘-Bereich	**PCR 3‘-Bereich**	**Überlapp-PCR**
***RPF4*-c6**	Bereich aus ***RPF4*(L*er*)**: At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910Col.Teil1	Bereich aus ***RPF4*(Col)**: At1g62910Ler.Teil2 + At1g62910-kompl.R2	At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910-kompl.R2
***RPF4*-c4**	Bereich aus ***RPF4*(L*er*)**: At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910Konstrukt4.Ler	Bereich aus ***RPF4*(Col)**: At1g62910Konstrukt4.Col + At1g62910-kompl.R2	At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910-kompl.R2
***RPF4*-c1**	Bereich aus ***RPF4*(L*er*)**: At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910Ler.Teil1.1	Bereich aus ***RPF4*(Col)**: At1g62910Col.Teil2 + At1g62910-kompl.R2	At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910-kompl.R2
***RPF4*-c7**	Bereich aus ***RPF4*(Col)**: At1g62910-kompl.H + At1g62910Konstrukt7.Col	Bereich aus ***RPF4*(L*er*)**: At1g62910Konstrukt7.Ler + At1g62910-kompl.R2	At1g62910-kompl.H At1g62910-kompl.R2
***RPF4*-c2**	Bereich aus ***RPF4*(Col)**: At1g62910-kompl.H + At1g62910Col.Teil1	Bereich aus ***RPF4*(L*er*)**: At1g62910Ler.Teil2 + At1g62910-kompl.R2	At1g62910-kompl.H At1g62910-kompl.R2
***RPF4*-c8**	Bereich aus ***RPF4*-c6**: At1g62910Konstrukt4.Ler + At1g62910Ler.kompl.1	Bereich aus ***RPF4*(L*er*)**: At1g62910Konstrukt4.Col + At1g62910-kompl.R2	At1g62910Ler.kompl.1 + At1g62910-kompl.R2

Zur Erzeugung der chimären Gene wurde eine Überlapp-PCR-Strategie angewandt, wobei zunächst die entsprechenden Bereiche der *RPF4*-Allele wie in Tabelle 13 aufgeführt amplifiziert wurden. Die Produkte der Überlapp-PCR wurden mit *Pac*I und *Asc*I verdaut, in pMDC123 kloniert (Anhang 1A, oben) [Curtis and Grossniklaus 2003] und stabil mittels *Floral Dip* in Col transformiert. Die Selektionierung transformierter Pflanzen erfolgte auf Erde durch

das Herbizid Basta®. Um das Vorhandensein des Transformationskonstrukts nachzuweisen, wurde eine PCR mit den Primern RS und At1g62910Ler.6 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression der chimären Gene nachgewiesen. Dazu wurde aus DNase-verdauter gRNA unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern cDNA hergestellt und eine RT-PCR mit den Primern At1g62930Ler.7 und At1g62910Ler.11 (*RPF4*-c6, *RPF4*-c8), At1g62910Ler.7 und At1g62910Ler.8 (*RPF4*-c4, *RPF4*-c1) bzw. At1g62910Ler.9 und At1g62910Ler.10 (*RPF4*-c4, *RPF4*-c1) durchgeführt (Anhang 5).

Zur Analyse der *ccmB*-Transkripte in den transformierten Pflanzen wurde eine CR-RT-PCR mit den Primern Atccb2-3 und Atccb2-6 (P7 und P5 in Abbildung 5) durchgeführt (Abbildung 9B). Die aufgetretenen PCR-Produkte weisen darauf hin, dass lediglich in Col + *RPF4*-c1 die L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte vorliegen. Das chimäre Protein RPF4-c1 ist folglich dazu in der Lage die *ccmB*-Transkripte vergleichbar wie RPF4(L*er*) zu prozessieren. Die Veränderung der Sequenz von RPF4(L*er*) ab Repeat 11 Position 6 in die entsprechenden AS von RPF4(Col) führt daher zu keinem Funktionsverlust bezüglich der *ccmB*-mRNA-Prozessierung (Abbildung 9A + B, RPF4-c1). Diese Beobachtung korreliert mit der nahezu identischen AS-Sequenz von RPF4(L*er*) und RPF4(Col) ab Repeat 11 (Anhang 4). Im Gegensatz dazu resultiert die zusätzliche Veränderung der L*er*- in die Col-Sequenz vor Repeat 11 Position 6 in einem Funktionsverlust der chimären Proteine. Diese sind folglich nicht mehr dazu in der Lage die Prozessierung der *ccmB*-Transkripte vergleichbar wie RPF4(L*er*) zu beeinflussen (Abbildung 9A + B, RPF4-c4 und RPF4-c6). Dies lässt vermuten, dass der Bereich vor Repeat 11 Position 6, in den die gehäuften Sequenzunterschiede zwischen RPF4(L*er*) und RPF4(Col) fallen (Anhang 4), wichtig für die Funktionalität von RPF4(L*er*), ist.

Der Austausch der L*er*-Sequenz vor Repeat 4 Position 6 hat ein Ausbleiben der L*er*-typischen *ccmB*-mRNA-Prozessierung zur Folge (Abbildung 9A + B, RPF4-c2). Ein gleiches Bild tritt auf, wenn die Sequenz vor Repeat 2 Position 6 aus RPF4(Col) mit den restlichen AS aus RPF4(L*er*) kombiniert wird (Abbildung 9A + B, RPF4-c7). Folglich scheint der N-Terminus, welcher mehrere konsistente Unterschiede zwischen den Col- und L*er*-Typ-Proteinen ausweist (Anhang 4), eine wesentliche Rolle für die Funktionalität des Proteins zu spielen. Dies widerspricht allerdings der oben getroffenen Annahme, dass die Bindung von RPF4(L*er*) allein durch die relevanten AS der Repeats 4 bis 15 vermittelt wird (Abbildung 8A).

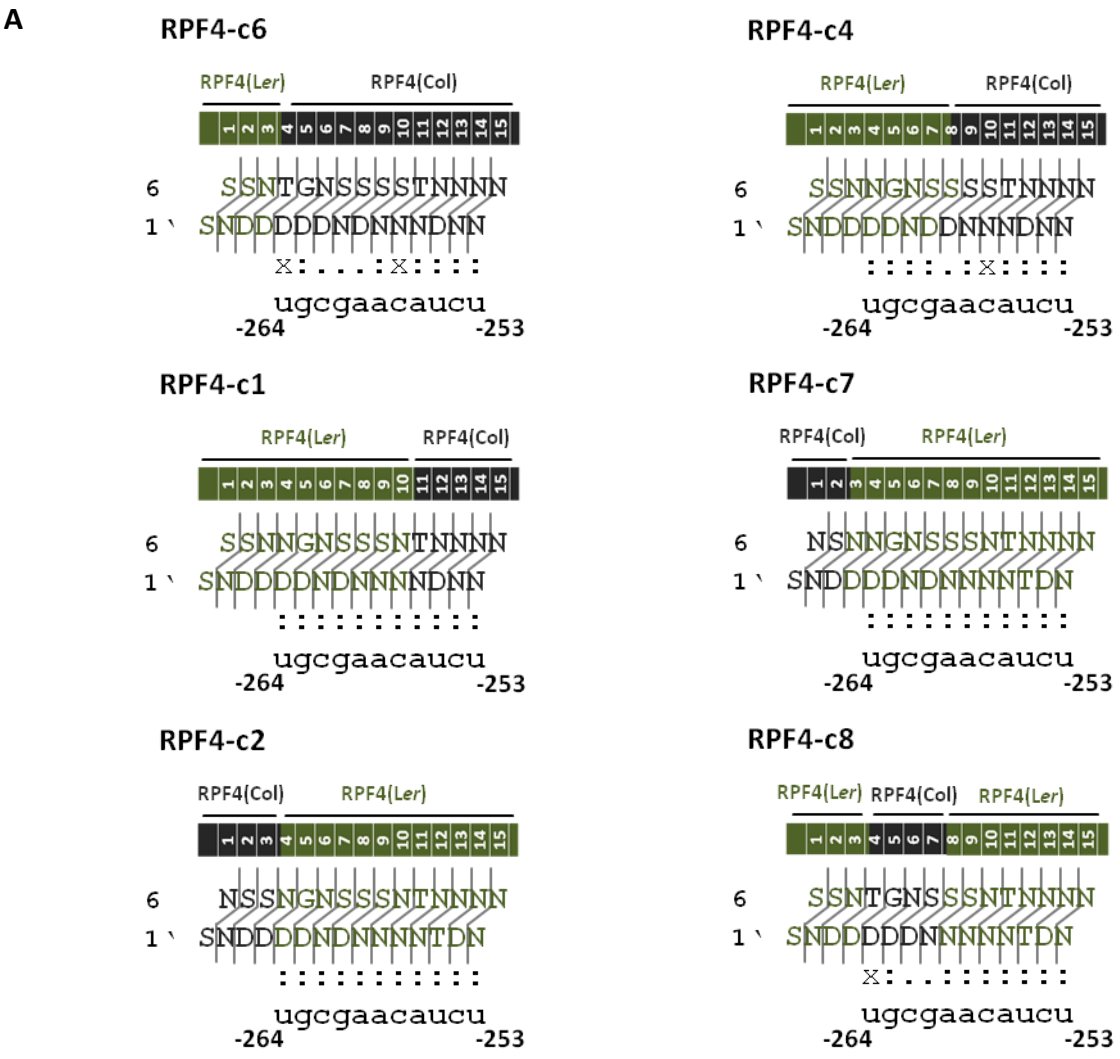


Abbildung 9: Funktionalität der chimären RPF4-Proteine bezüglich der *ccmB*-mRNA-Prozessierung. A: Vorhergesagtes Bindungsvermögen der chimären Proteine an die *ccmB*-mRNA. Die chimären Proteine setzen sich aus Teilen von RPF4(L*er*), in grün dargestellt, und Teilen von RPF4(Col), in dunkelgrau dargestellt, zusammen. Weitere Angaben können Abbildung 8 entnommen werden. **B:** CR-RT-PCR-Analyse der *ccmB*-Transkripte. Die untersuchten Pflanzen sind oberhalb des Bildausschnitts angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

Auf der Grundlage, dass wahrscheinlich sowohl der Bereich vor Repeat 4 Position 6 als auch die Repeats 8 bis 10 wichtig für die Funktionalität von RPF4(L*er*) sind, wurde mit RPF4-c8 ein chimäres Protein erzeugt, welches lediglich die AS zwischen Repeat 4 Position 6 und Repeat 8 Position 1 aus RPF4(Col) aufweist (Abbildung 9A, RPF4-c8). Die Abwesenheit der L*er*-typischen PCR-Produkte in Col + *RPF4*-c8 zeigt an, dass der in RPF4-c8 bezüglich RPF4(L*er*) veränderte Abschnitt einen wesentlichen Beitrag zur Funktionalität des Proteins, d.h. vermutlich zur Bindung an die *ccmB*-mRNA, beiträgt. Diese Annahme korreliert mit einer Anhäu-

fung an konsistenten Unterschieden zwischen den RPF4-Proteinen im betrachteten Bereich (Anhang 4).

Zusammenfassend lässt sich aus den Analysen der chimären Proteine festhalten, dass die AS ab Repeat 11 Position 6 vermutlich nicht spezifisch für die Funktion von RPF4(L*er*) sind. Im Gegensatz dazu scheint das restliche Protein wichtig für die *ccmB*-mRNA-Prozessierung zu sein. Dies beinhaltet auch den N-Terminus von RPF4(L*er*), welcher entgegen der vorhergesagten Bindung, vermutlich eine wesentliche Rolle für die Aktivität des Proteins spielt.

3.1.7. Einfluss von RPF4(L*er*) auf die Bildung größerer *ccmB*-Transkripte

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass RPF4(L*er*) an der Bildung von *ccmB*-Transkripten mit 5‘-Enden bei -231 und -200 beteiligt ist. Um auf der Grundlage der chimären Proteine sowie Col + *RPF4*(L*er*) einen vermeintlichen Einfluss von RPF4(L*er*) auf die Bildung weiterer *ccmB*-Transkripte zu untersuchen, wurden drei CR-RT-PCR-Analysen durchgeführt (Abbildung 10; Abbildung 11), wobei 5‘-Primer verwendet wurden, die stromaufwärts des 5‘-Endes bei -140 binden. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden die Analysen mit mehreren transformierten Col-Pflanzen pro Konstrukt durchgeführt.

Mit der ersten Primerkombination (Atccb2-3/Atccb2-10, P7/P3 in Abbildung 5) werden in L*er* sowie in Col + *RPF4*-c1 und Col + *RPF4*(L*er*) PCR-Produkte von ca. 170 und ca. 200 bp erhalten (Abbildung 10A und Abbildung 11A, Produkt 2). Diese repräsentieren die L*er*-spezifischen *ccmB*-Transkripte mit 5‘-Enden bei -200 und -231. Zusätzlich tritt in allen Proben ein etwa 310 bp großes PCR-Produkt auf, welches mit *ccmB*-Transkripten, die ein 5‘-Ende bei -347/346 aufweisen, korreliert (Abbildung 10A und Abbildung 11A, Produkt 3). Die Funktionalität von RPF4-c1 wird durch diese PCR reproduziert. Ob RPF4(L*er*) allerdings einen Einfluss auf die Bildung weiterer *ccmB*-Transkripte hat, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden.

Durch die Verwendung von Atccb2-7 (P2 in Abbildung 5) als 5‘-Primer werden nur solche PCR-Produkte generiert, die mit *ccmB*-Transkripten korrelieren, deren 5‘-Ende stromaufwärts der L*er*-typischen Enden liegt. In allen Proben treten hier zwei PCR-Produkte auf. Dabei repräsentiert das etwa 230 bp große PCR-Produkt das *ccmB*-Transkript mit einem 5‘-Ende bei -347/346 (Abbildung 10B und Abbildung 11B, Produkt 3). Das schwach detektierbare PCR-Produkt bei ca. 380 bp korreliert mit den neu bestimmten *ccmB*-5‘-Enden bei -495 in Col bzw. bei -492 in L*er* (Abbildung 10B und Abbildung 11B, Produkt 4; Anhang 2A

+ D). Da in allen Proben die gleichen PCR-Produkte erscheinen, kann mit dieser PCR kein Einfluss von RPF4(L*er*) auf weitere *ccmB*-Transkripte festgestellt werden.

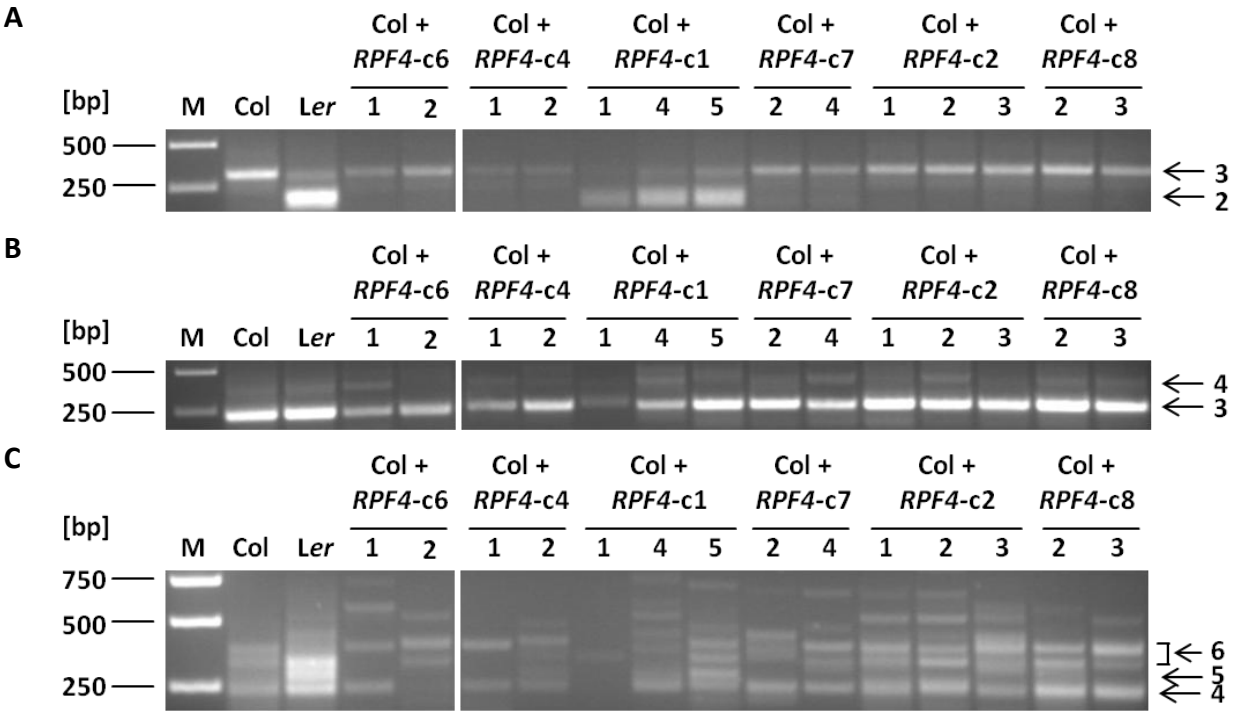


Abbildung 10: Untersuchung größerer *ccmB*-Transkripte (I). CR-RT-PCR-Analysen der *ccmB*-Transkripte. Die untersuchten Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Als Primer wurden Atccb2-3 und Atccb2-10 **(A)**, Atccb2-7 **(B)** bzw. Atccb2-12 **(C)** (P7, P3, P2 und P1 in Abbildung 5) verwendet. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen aufgetretene PCR-Produkte, wobei diese teilweise die in Abbildung 7A markierten PCR-Produkten widerspiegeln (PCR-Produkte 2 und 3). Die weiteren PCR-Produkte in Col und L*er* korrelieren mit Transkripten mit 5'-Enden wie unter 3.1.1. beschrieben und in Anhang 2 dargestellt. Gekennzeichnete PCR-Produkte mit der gleichen Zahl repräsentieren das gleiche Transkript. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

Die letzte CR-RT-PCR detektiert nur dann PCR-Produkte, wenn *ccmB*-Transkripten mit einem 5'-Ende stromaufwärts von -347/346 vorliegen. Die PCR-Muster der mit den chimären *RPF4*-Genen transformierten Col-Pflanzen können nur teilweise dem von L*er* oder dem von Col zugeordnet werden und sind auch innerhalb der Gruppen heterogen. Lediglich ein ca. 250 bp großes PCR-Produkt, welches dem Produkt 4 der vorherigen PCR entspricht, tritt in allen Proben auf (Abbildung 10C, Produkt 4). Weiter können bei einigen Proben zusätzliche PCR-Produkte vergleichbarer Größe wie in Col detektiert werden (Abbildung 10C, Produkt 6).

Anders als in den vorangegangenen CR-RT-PCR-Analysen zeigen die mit *RPF4*-c1 oder *RPF4*(L*er*) transformierten Col-Pflanzen nicht das PCR-Muster wie L*er* (Abbildung 10C; Abbildung 11C). Die erhaltenen PCR-Muster in Col + *RPF4*-c1 unterscheiden sich auch zusätzlich von dem in Col. Das chimäre Protein RPF4-c1 beeinflusst folglich in anderer Weise die *ccmB*-mRNA-Prozessierung, als dies in Col oder L*er* der Fall ist. Im Gegensatz dazu tritt bei Col und

Col + *RPF4*(L*er*) ein nahezu identisches Muster auf (Abbildung 11C). Dies lässt vermuten, dass RPF4(L*er*) keinen Einfluss auf die Bildung größerer *ccmB*-Transkripte ausübt, da ein Vorhandensein des funktionalen RPF4-Proteins nicht zu einer Veränderung der Transkripte in Col führt.

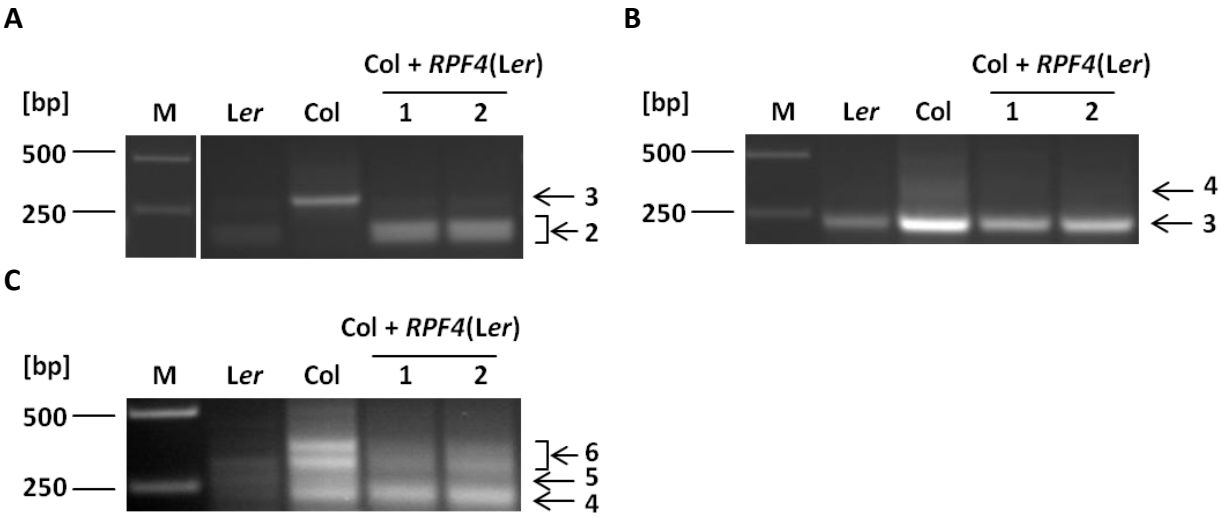


Abbildung 11: Untersuchung größerer *ccmB*-Transkripte (II). CR-RT-PCR-Analysen der *ccmB*-Transkripte. Die untersuchten Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 10 entnommen werden.

Die Analysen zeigen, dass RPF4(L*er*) lediglich in die Entstehung von *ccmB*-Transkripten mit 5'-Enden im Bereich von -231/200 involviert ist und keinen Einfluss auf die Bildung größerer *ccmB*-Transkripte hat. Weiter kann RPF4-c1 RPF4(L*er*) zwar bezüglich der Bildung der L*er*-typischen Transkripte ersetzen, doch scheinen die Proteine einen unterschiedlichen Einfluss auf größere *ccmB*-Transkripte zu haben.

3.2. Beteiligung von RPF3 und RPF6 bei der *ccmC*-mRNA-Prozessierung

3.2.1. Korrelation zwischen dem *ccmC*-Genotyp und dem *ccmC*-mRNA-Phänotyp

Bereits in früheren Analysen konnte ein *ccmC*-mRNA-Polymorphismus zwischen den Ökotypen Col und C24 beobachtet werden. So liegen in Col *ccmC*-Transkripte mit einem 5‘-Ende bei -484/482 (Position relativ zum Translations-Startkodon) vor (Abbildung 12) [Forner et al. 2007]. Im Gegensatz dazu weisen die Transkripte in C24 ein 5‘-Ende weiter stromabwärts bei -391/390 auf (Abbildung 12) [Forner et al. 2008]. Die 3‘-Enden liegen in beiden Ökotypen bei -47/46. Um die Ursache des mRNA-Polymorphismus aufzuzeigen, wurden reziproke Kreuzungen zwischen Col und C24 etabliert und die F_1-Pflanzen auf die vorhandenen *ccmC*-Transkripte untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Auftreten der verschiedenen Transkripte auf Unterschiede in der mitochondrialen DNA zurückzuführen ist [Forner et al. 2008]. Die mitochondriale DNA von Col und C24 weist viele Unterschiede innerhalb einer 66 bp langen Sequenz etwa 500 bp stromaufwärts der 5‘-Enden auf (Abbildung 12). Basierend auf diesen Sequenzvariationen wurden verschiedene mitochondriale *ccmC*-Genotypen definiert [Moison et al. 2010], wobei im weiteren Verlauf die unterschiedlichen Sequenzen stromaufwärts der 5‘-Enden als der Col- bzw. C24-*ccmC*-Genotyp bezeichnet werden. Demgegenüber sollen die vorhandenen Transkripte den Col- bzw. C24-*ccmC*-mRNA-Phänotyp festlegen.

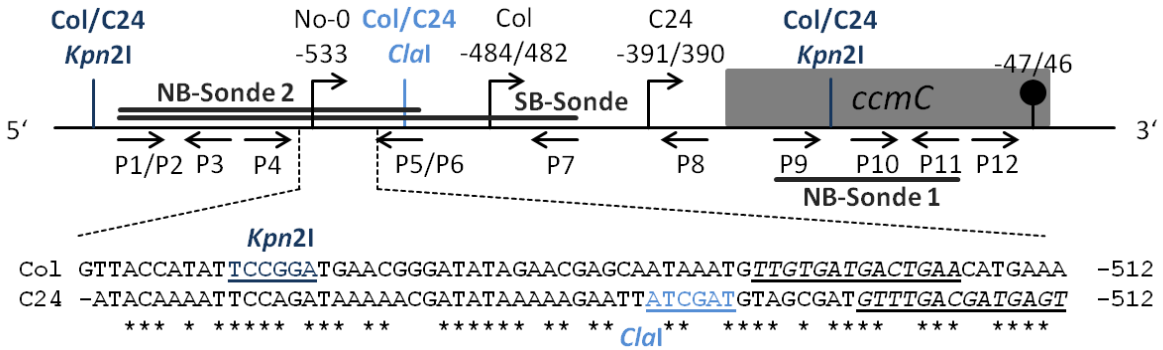


Abbildung 12: Schematische Genkarte von *ccmC*. Der hellgraue Kasten stellt das Leseraster des *ccmC*-Gens dar. 5‘-Enden der *ccmC*-Transkripte sind durch abgewinkelte Pfeile, das 3‘-Ende ist durch einen ausgefüllten Kreis dargestellt. Die Position der 5‘-Enden ist relativ zum Translations-Startkodon und die des 3‘-Endes relativ zum Translations-Stoppkodon angegeben. Die waagrechten dunkelgrauen Linien kennzeichnen die Lage der Southern-Blot(SB)- und Northern-Blot(NB)-Sonde(n). Die relative Lage der Primer ist durch waagrechte Pfeile kenntlich gemacht. Die stromaufwärts liegende Sequenz, welche sich zwischen Col und C24 unterscheidet, ist angegeben. Die vermeintlichen Bindungsstellen von RPF3 (an Col *ccmC*-Sequenz) und RPF6 (an C24 *ccmC*-Sequenz) sind in schwarz unterstrichen und kursiv geschrieben. *Kpn*2I-Schnittstellen sind in dunkelblau als senkrechte Linien oder unterstrichen, die *Cla*I-Schnittstellen sind in hellblau als senkrechte Linie oder unterstrichen kenntlich gemacht. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. P1: Atccb3-12. P2: Atccb3QPCR.6. P3: Atccb3QPCR.5. P4: Atccb3QPCR.3. P5: Atccb3-Mega5‘fern. P6: Atccb3QPCR.4. P7: Atccb3-Mega5‘mittel. P8: Atccb3-Mega5‘nah. P9: Atccb3-22. P10: Atccb3-Mega3’nah. P11: Atccb3-21. P12: Atccb3-3.

Die bisherigen Ausführungen lassen einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen 5‘-Enden der *ccmC*-mRNAs und den *ccmC*-Genotypen vermuten. Um eine solche Korrelation aufzuzeigen, wurden von insgesamt 51 *A.thaliana* Ökotypen der *ccmC*-mRNA-Phänotyp und der *ccmC*-Genotyp bestimmt.

In einer vorangegangenen Analyse mitochondrialer mRNA-Polymorphismen wurden bereits 26 *A.thaliana* Ökotypen auf die vorliegenden *ccmC*-Transkripte untersucht. Dabei konnten in acht Ökotypen *ccmC*-Transkripte wie in Col und in den restlichen Ökotypen auch die bei C24 vorliegenden kürzeren *ccmC*-Transkripte detektiert werden [Stoll et al. 2013]. Analog zu diesen Untersuchungen wurden weitere Ökotypen bezüglich ihrer *ccmC*-Transkripte durch eine CR-RT-PCR-Analyse charakterisiert [Daten teilweise Christian Jonietz und Stefan Binder]. In der Mehrzahl der Fälle konnte entweder der Col- oder der C24-*ccmC*-mRNA-Phänotyp festgestellt werden (Tabelle 14). Daneben wurden auch PCR-Muster erhalten, die keinem der beiden Referenz-Ökotypen zuzuordnen sind (siehe unten).

Tabelle 14: Ermittelter *ccmC*-Genotyp und *ccmC*-mRNA-Phänotyp in 51 *A.thaliana* Ökotypen. Der *ccmC*-Genotyp wurde wie im Text beschrieben bestimmt. In allen Ökotypen wurde entweder der Col- (Col) oder der C24-*ccmC*-Genotyp (C24) ermittelt. Die Analyse des *ccmC*-mRNA-Phänotyps erfolgte anhand einer CR-RT-PCR-Analyse, hierbei wurden neben den Col- (Col) bzw. C24-typischen PCR-Produkten (C24), teilweise von Col bzw. C24 abweichende (anders) PCR-Muster erhalten. Die verwendeten Daten entstammen teilweise Vorarbeiten, Steinhilber 2010 und Stoll et al. 2013.

Ökotyp	*ccmC*-Genotyp	*ccmC*-mRNA-Phänotyp	Ökotyp	*ccmC*-Genotyp	*ccmC*-mRNA-Phänotyp	Ökotyp	*ccmC*-Genotyp	*ccmC*-mRNA-Phänotyp
Col	Col	Col	**Ema-1**	C24	C24	**Oy-1**	C24	C24
C24	C24	C24	**En-1**	C24	C24	**Pa-2**	C24	C24
Alc-0	C24	C24	**Est**	Col	Col	**Pi-2**	Col	Col
Bay-0	Col	Col	**Gre-0**	Col	Col	**Ri-0**	C24	C24
Bl-1	Col	Col	**Kas-1**	C24	anders	**Rld-2**	C24	C24
Bla-1	Col	Col	**Kn-0**	C24	C24	**Rube**	C24	anders
Bla-10	Col	Col	**Kondara**	C24	C24	**Sah-0**	C24	C24
Blh-1	C24	C24	**La-1**	C24	C24	**Sha**	C24	C24
Bur-0	C24	C24	**Ler**	Col	Col	**Sorbo**	Col	C24
Cal	C24	C24	**Lip-0**	Col	anders	**St-0**	C24	C24
Can-0	C24	C24	**Lz-0**	C24	C24	**Stw-0**	C24	C24
Co	C24	C24	**Mh-1**	C24	C24	**Ta**	Col	anders
Ct-1	C24	C24	**Ms-0**	C24	anders	**Te**	C24	C24
Cvi	C24	C24	**Mt-0**	Col	Col	**Tsu-1**	C24	C24
Di-1	C24	C24	**Nd**	C24	C24	**Van-0**	C24	C24
Edi-0	C24	C24	**No-0**	C24	anders	**Ws**	C24	C24
Ei	C24	C24	**Nok-1**	C24	anders	**Yo-0**	Col	Col

Um den vorliegenden *ccmC*-Genotyp zu bestimmen, wurde sich eine nur in der Col-Sequenz vorhandenen *Kpn*2I-Schnittstelle zu Nutze gemacht (Abbildung 12). Mittels einer PCR unter Verwendung der Primer Atccb3-12 und Atccb3-Mega5'fern (P1 und P5 in Abbildung 12) mit anschließendem *Kpn*2I-Verdau des PCR-Produkts werden im Fall des Col-*ccmC*-Genotyps 179 und 80 bp große Fragmente erhalten. Liegt der C24-*ccmC*-Genotyp vor, wird dagegen bei der nachfolgenden Elektrophorese nur das unverdaute 259 bp große PCR-Produkt detektiert.

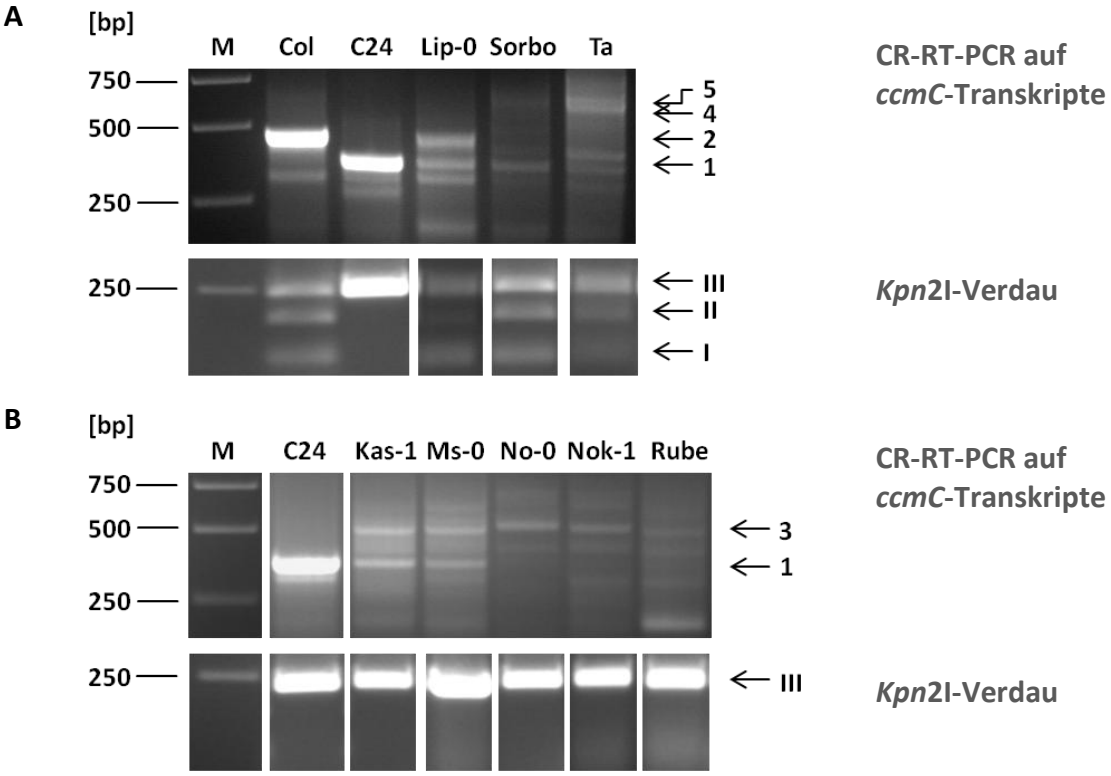


Abbildung 13: Bestimmung der *ccmC*-Genotypen und *ccmC*-mRNA-Phänotypen in ausgewählten *A.thaliana* Ökotypen. Die untersuchten Ökotypen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Die *ccmC*-Genotypen und *ccmC*-mRNA-Phänotypen weiterer Ökotypen können Tabelle 14 entnommen werden. Um den *ccmC*-Genotyp zu bestimmen, wurde wie im Text beschrieben verfahren. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen das unverdaute PCR-Produkt (III: 259 bp), sowie die nach erfolgtem Verdau erhaltenen Fragmente (I: 80 bp, II: 179 bp). Zur Analyse des *ccmC*-mRNA-Phänotyps wurde eine CR-RT-PCR mit den Primern Atccb3-3 und Atccb3-Mega5'nah (P12 und P8 in Abbildung 12) durchgeführt. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen die PCR-Produkte in C24 (1: ca. 380 bp), Col (2: ca. 470 bp), No-0 (3: ca. 520 bp) sowie Ta (4: ca. 660 bp, 5: ca. 720 bp). Die gekennzeichneten PCR-Produkte treten teilweise auch in anderen Ökotypen auf. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden. **A:** Die Ökotypen (außer C24) weisen den Col-*ccmC*-Genotyp (unten), aber einen von Col abweichenden *ccmC*-mRNA-Phänotyp (oben) auf. **B:** Die Ökotypen weisen den C24-*ccmC*-Genotyp (unten), aber einen von C24 abweichenden *ccmC*-mRNA-Phänotyp (oben) auf. Erstveröffentlichung in [Stoll et al. 2015].

Durch die Betrachtung der 51 Ökotypyen wurde eine ausgeprägte Korrelation zwischen dem vorhandenen *ccmC*-Genotyp und *ccmC*-mRNA-Phänotyp festgestellt (Tabelle 14). Lediglich im Fall von Sorbo treten bei Vorhandensein des Col-*ccmC*-Genotyps *ccmC*-Transkripte in Erscheinung, die denen aus C24 ähneln (Abbildung 13A, Produkt 1) [Stoll et al. 2013]. Die Sequenzierung des entsprechenden PCR-Produkts bestätigte in Sorbo das Vorhandensein von

Transkripten mit einem 5‘-Ende bei -391. Das 3‘-Ende liegt bei -47 (Anhang 6C). Daneben weisen Lip-0 und Ta zwar den *ccmC*-Genotyp von Col, aber ein zu Col unterschiedliches CR-RT-PCR-Muster auf (Abbildung 13A). In Lip-0 werden PCR-Produkte erhalten, die denen aus C24 und Col ähneln (Abbildung 13A, Produkte 1 und 2). Dies weist darauf hin, dass die vorliegenden Transkripte die in C24 bzw. Col beschriebenen 5‘-Enden aufweisen. Diese Annahme konnte durch eine Sequenzierung bestätigt werden, wobei 5‘-Enden bei -389 und -484 ermittelt wurden. Die dazugehörigen 3‘-Enden liegen jeweils bei -46 (Anhand 6A + B). Das PCR-Muster in Ta deutet dagegen auf das Vorhandensein größerer *ccmC*-Vorläufer-Transkripte hin (Abbildung 13, Produkte 4 und 5). Anhand einer CR-RT-PCR mit dem bezüglich Atccb3-Mega5‘nah weiter stromaufwärts liegenden 5‘-Primer Atccb3-Mega5’fern (P5 in Abbildung 12) war es möglich die 5‘-Enden der zwei Vorläufer-Transkripte bei -674 und -733 zu definieren. Die 3‘-Enden beider Transkripte liegen bei -46 (Anhang 6D + E).

Desweiteren wurden in den Ökotypen Kas-1, Ms-0, No-0, Nok-1 und Rube, die den C24-*ccmC*-Genotyp tragen, von C24 abweichende PCR-Muster erhalten. Es treten jeweils nur schwache PCR-Produkte unterschiedlicher Größe auf, die darauf hindeuten, dass in den betrachteten Ökotypen kaum *ccmC*-Transkripte vorliegen (Abbildung 13B). In No-0 zeigt sich bei etwa 520 bp ein schwaches, distinktes PCR-Produkt, dem ein 5‘-Ende bei -533 zugewiesen wurde (Abbildung 13B, Produkt 3) [Daten Christian Jonietz und Stefan Binder; unveröffentlicht].

Zur Verifizierung der CR-RT-PCR-Daten wurde mit den genannten Ökotypen eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt, wobei eine DNA-Sonde gegen das *ccmC*-Leseraster verwendet wurde (Abbildung 12, NB-Sonde 1). Die auftretenden Transkripte weisen in C24 ein Länge von ca. 1100 und in Col von ca. 1200 nt auf, wobei die 5‘-Enden bei -391/390 bzw. -484/482 liegen (Abbildung 14, Transkripte 2 und 3) [Jonietz et al. 2011]. Analog zu den CR-RT-PCR-Analysen liegt in Sorbo ein, allerdings nur in geringen Mengen vorhandenes, *ccmC*-Transkript vor, das dem in C24 ähnelt (Abbildung 13A, Produkt 1; Abbildung 14A, Transkript 2). Gleichfalls tritt auch in Lip-0 ein Transkript der gleichen Größe wie in C24 auf. Weiter kann in Lip-0 analog zu den CR-RT-PCR-Daten das Col-typische *ccmC*-Transkript detektiert werden (Abbildung 13A, Produkte 1 und 2; Abbildung 14A, Transkripte 2 und 3). Das Transkriptmuster in Ta unterscheidet sich grundlegend von dem in Col oder C24. Es werden zwar auch Signale in der Größenordnung der reifen *ccmC*-Transkripte erhalten, zusätzlich treten aber zwei Vorläufermoleküle sowie eine kleinere RNA-Spezies in Erscheinung (Abbildung 14A, Trans-

kripte 2 und 3, 5 und 6 sowie 1), wobei die in Ta neu bestimmten 5‘-Enden der *ccmC*-mRNAs keinem Signal zugeordnet werden können. In No-0 wird eine RNA bei etwa 1300 nt detektiert. Diese korreliert mit *ccmC*-Transkripten, die ein 5‘-Ende bei -533 aufweisen (Abbildung 13B, Produkt 3; Abbildung 14B, Transkript 4). Die Northern-Blot-Analyse zeigt weiter, dass in Kas-1 und Ms-0 geringe Mengen an reifen *ccmC*-Transkripten vorliegen. Dies ist in No-0, Nok-1 und Rube nicht der Fall (Abbildung 14B). Desweiteren werden in allen Ökotypen, die den C24-*ccmC*-Genotyp, aber ein von C24 abweichendes *ccmC*-Transkriptmuster zeigen, kleinere RNA-Spezies sowie ein etwa 2600 nt großes Vorläufermolekül detektiert. Ein Auftreten solcher Transkripte wird auch teilweise in Lip-0, Sorbo und Ta beobachtet (Abbildung 14, Transkripte 1 und 7).

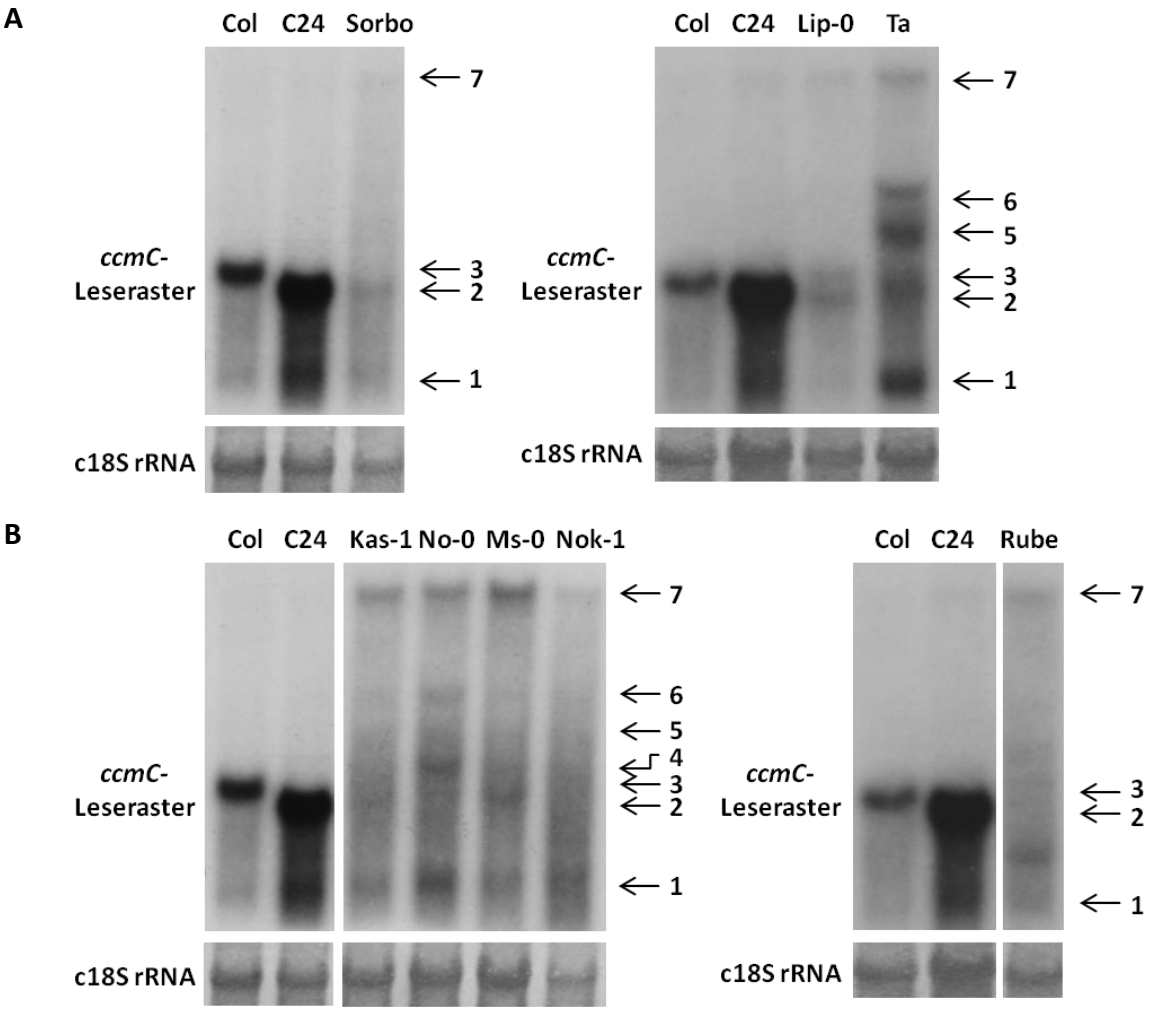


Abbildung 14: Northern-Blot-Analyse der *ccmC*-Transkripte in Ökotypen mit dem Col- (A) bzw. C24-*ccmC*-Genotyp (B). Die eingesetzte Sonde deckt einen Teil des *ccmC*-Leserasters ab und wurde mit den Primern Atccb3-22 und Atccb3-21 (P9 und P11 in Abbildung 12) amplifiziert. Es wurden jeweils 15 µg gRNA der oberhalb der Bildausschnitte angegebenen Ökotypen verwendet und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen detektierte Transkripte (1: ca. 700 nt, 2: ca. 1100 nt, 3: ca. 1200 nt, 4: ca. 1300 nt, 5: ca. 1600 nt, 6: ca. 1800 nt, 7: ca. 2600 nt). Die Ladekontrolle erfolgte durch eine Methylenblaufärbung der RNA, exemplarisch ist die angefärbte cytosolische 18S rRNA (c18S rRNA) abgebildet. Erstveröffentlichung in [Stoll et al. 2015].

Die Analysen lassen den Schluss zu, dass eine Korrelation zwischen dem vorliegenden *ccmC*-Genotyp und den auftretenden *ccmC*-Transkripten besteht. Diskrepanzen zum erwarteten Transkriptmuster deuten auf einen Defekt in der *ccmC*-mRNA-Prozessierung in den entsprechenden Ökotypen hin.

3.2.2. Untersuchung von *ccmC*-Vorläufertranskripten

Der Defekt in der *ccmC*-mRNA-Prozessierung in den oben genannten Ökotypen resultiert in einer mehr oder minder starken Anhäufung von Vorläufermolekülen (Abbildung 14, Transkripte 5, 6 und 7).

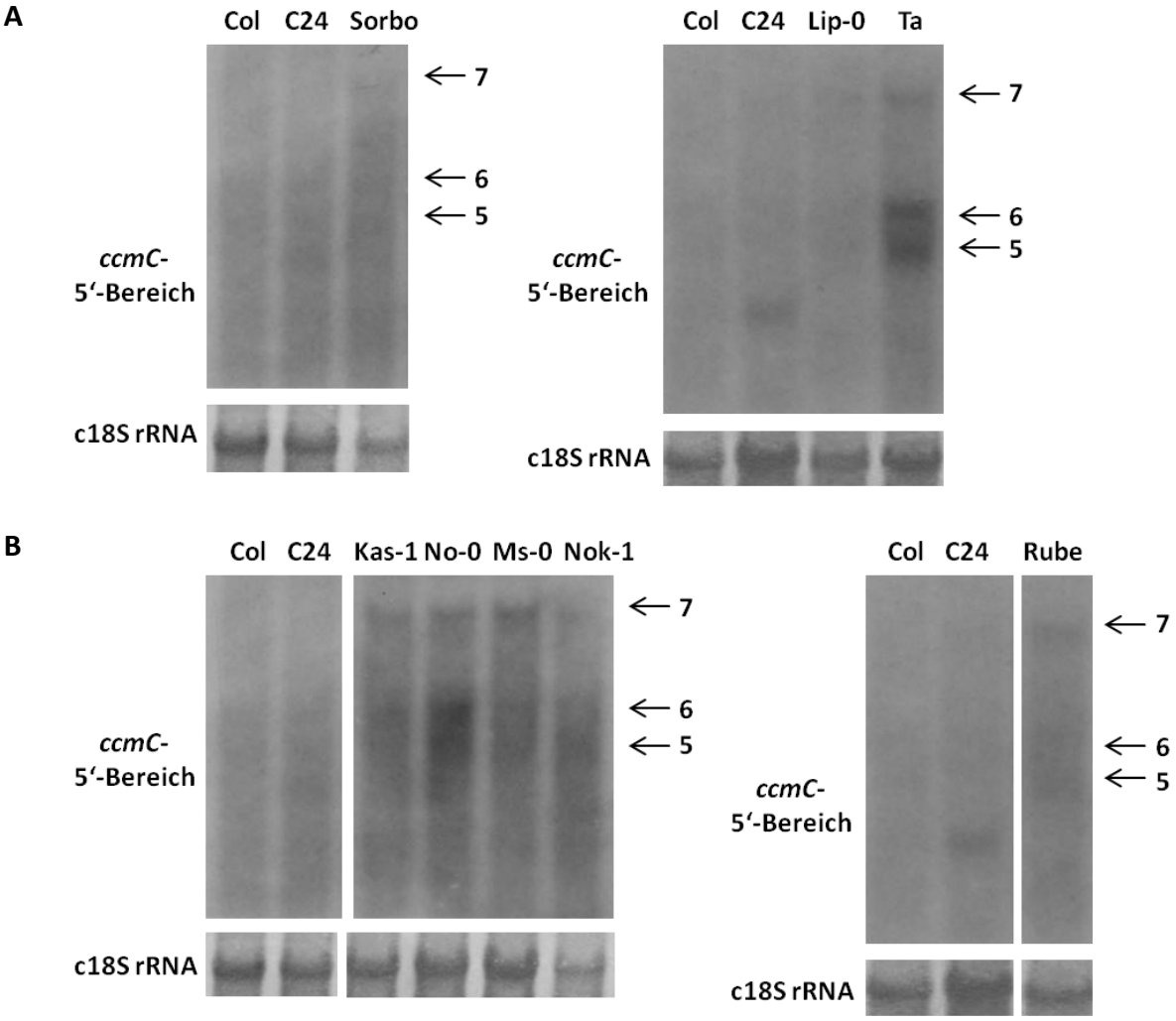


Abbildung 15: Northern-Blot-Analyse zur Detektion 5'-verlängerter *ccmC*-Transkripte in Ökotypen mit dem Col- (A) bzw. C24-*ccmC*-Genotyp (B). Die eingesetzte Sonde umspannt den zwischen Col und C24 diskriminierenden Bereich und wurde mit den Primern Atccb3-12 und Atccb3-Mega5'fern (P1 und P5 in Abbildung 12) amplifiziert. Weitere Angaben können Abbildung 14 entnommen werden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Transkripte 5'-verlängert sind. Um dies zu überprüfen, wurde in einer weiteren Northern-Blot-Analyse eine DNA-Sonde verwendet, die den zwischen Col und C24 diskriminierenden Bereich umspannt sowie stromaufwärts der 5'-

Enden in Col und C24 bindet (Abbildung 12, NB-Sonde 2). In Col und C24 werden keine 5‘-verlängerten Transkripte detektiert. Im Gegensatz dazu treten in den anderen Ökotypen Transkripte einer Größe von ca. 1600, ca. 1800 und 2600 nt auf, wobei dies vor allem bei Ta und No-0 stark ausgeprägt ist (Abbildung 15, Transkripte 5, 6 und 7). Transkripte gleicher Größe wurden bereits unter Verwendung einer DNA-Sonde gegen das *ccmC*-Leseraster erhalten (Abbildung 14, Transkripte 5, 6 und 7). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die detektierten *ccmC*-Transkripte 5‘-verlängert sind.

Um Aussagen über die Menge an *ccmC*-Vorläufermolekülen im Vergleich zu Col bzw. C24 treffen zu können, wurde eine *Real-Time quantitative* RT-PCR (siehe 2.2.2.2.) durchgeführt. Repräsentativ für die Ökotypen mit dem Col-*ccmC*-Genotyp wurden die Transkripte in Sorbo analysiert. Unter Verwendung der Primer Atccb3QPCR.3 und Atccb3QPCR.4 (P4 und P6 in Abbildung 12) kann in Sorbo die neunfache Menge an Vorläufermolekülen relativ zu Col ausgemacht werden (Abbildung 12; Abbildung 16A). Eine analoge Analyse wurde auch mit No-0 (Ökotyp mit dem C24-*ccmC*-Genotyp) durchgeführt, wobei Primer verwendet wurden, die stromaufwärts des 5‘-Endes bei -533 binden (Abbildung 12). Anhand der erhaltenen Daten ist die Transkriptmenge der *ccmC*-Vorläufer in No-0 gegenüber C24 dreifach erhöht (Abbildung 16B).

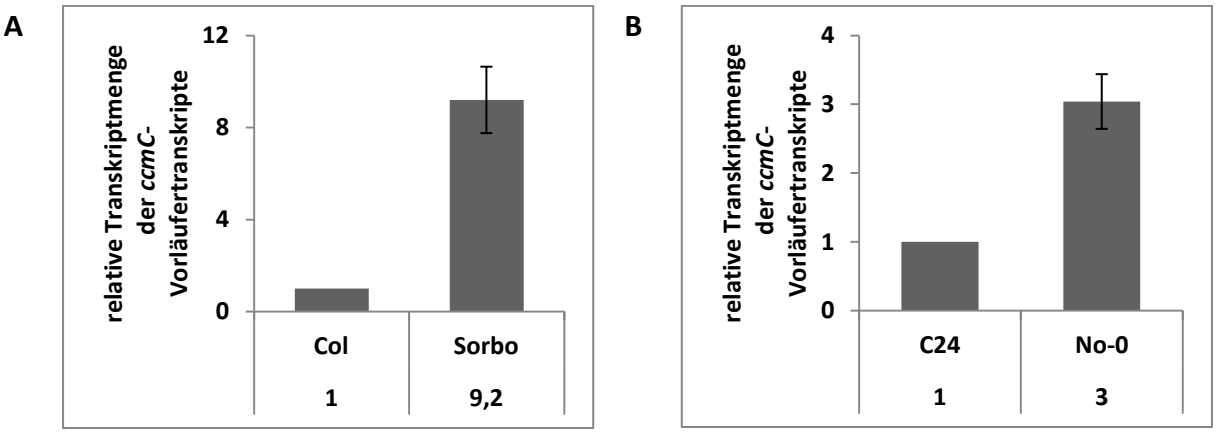


Abbildung 16: Quantitative Analyse der *ccmC*-Vorläufermoleküle in Sorbo (A) und No-0 (B). A: Es ist die gemittelte Transkriptmenge aus zwei biologischen Replikaten (acht technische Replikate) relativ zu Col (willkürlich 1) angegeben. Als Primer wurden Atccb3QPCR.3 und Atccb3QPCR.4 (P4 und P6 in Abbildung 12) verwendet. Das generierte PCR-Produkt weist eine Größe von 95 bp auf. **B:** Es ist die Transkriptmenge eines biologischen Replikats (vier technische Replikate) relativ zu C24 (willkürlich 1) angegeben. Als Primer wurden Atccb3QPCR.6 und Atccb3QPCR.5 (P2 und P3 in Abbildung 12) verwendet. Das generierte PCR-Produkt weist eine Größe von 65 bp auf.

Die Analysen weisen darauf hin, dass die vorhandenen *ccmC*-Vorläufermoleküle 5‘-verlängert sind und damit das Resultat einer stark verminderten 5‘-Prozessierung darstellen.

3.2.3. Das Vorliegen des *ccmC*-Genotyps ist homoplasmatisch.

Die beiden Ökotypen Lip-0 und Sorbo besitzen gemäß der bisherigen Daten den Col-*ccmC*-Genotyp, weisen aber *ccmC*-Transkripte ähnlicher Größe wie in C24 auf (Abbildung 13A, Produkt 1; Abbildung 14A, Transkript 2), wobei in Lip-0 das 5'-Ende des entsprechenden Transkripts bei -389 und in Sorbo bei -391 liegt (Anhang 6A + C). Dies wirft die Frage auf, ob in Lip-0 und Sorbo nur der Col-*ccmC*-Genotyp vorliegt oder ob die beiden Ökotypen auch substöchiometische Mengen einer (anderen) mitochondrialen Konformation, hier die des C24-*ccmC*-Genotyps, aufweisen [Arrieta-Montiel et al. 2009]. Diese Annahme könnte auch den durchweg unvollständigen *Kpn*2I-Verdau erklären (Abbildung 13A, unten).

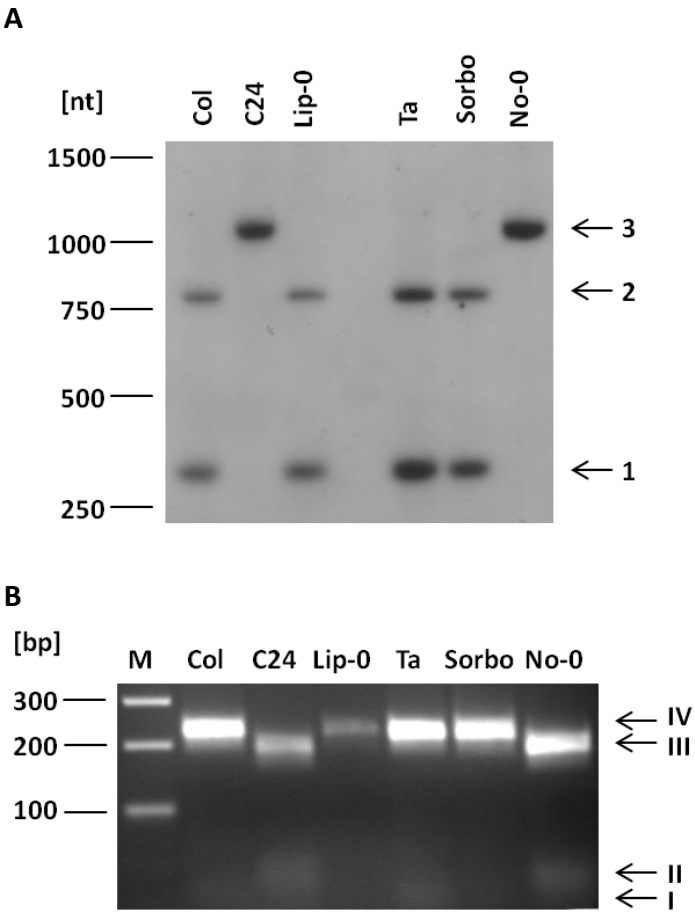


Abbildung 17: Bestimmung des *ccmC*-Genotyps. Die untersuchten Ökotypen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. **A:** Southern-Blot-Analyse. Die eingesetzte Sonde umspannt den zwischen Col und C24 diskriminierenden Bereich stromaufwärts der reifen *ccmC*-5'-Enden und wurde mit den Primern Atccb3-12 und Atccb3-Mega5'mittel (P1 und P7 in Abbildung 12) amplifiziert. Es wurden jeweils 12 µg gDNA mit *Kpn*2I verdaut und in einem 1 %iges Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen detektierte DNA-Fragmente (1: ca. 300 nt, 2: ca. 800 nt, 3: ca. 1100 nt). Am linken Rand sind die Größen der DNA-Fragmente des GeneRuler ™ 1 kb DNA Ladder (M) in Nukleotiden (nt) angegeben. Erstveröffentlichung in [Stoll et al. 2015]. **B:** *Cla*I-Verdau. Um den *ccmC*-Genotyp zu bestimmen, wurde wie im Text beschrieben verfahren. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen nach dem Verdau (theoretisch) erhaltene Fragmente (I: 12 bp, II: 36 bp, III: 211 bp, IV: 247 bp). Am linken Rand sind die Größen der DNA-Fragmente des 1 kb Plus DNA Ladder (M) in Basenpaaren (bp) angegeben.

Um sicherzustellen welcher *ccmC*-Genotyp vorliegt, wurde eine Southern-Blot-Analyse mit *Kpn*2I-verdauter gDNA durchgeführt. Lediglich bei Vorhandensein des Col-*ccmC*-Genotyps erfolgt ein Schnitt in der zwischen Col und C24 diskriminierenden Sequenz stromaufwärts der 5'-Enden der *ccmC*-mRNA. Durch die Wahl einer Sonde, die diesen Bereich überspannt (Abbildung 12, Sonde SB), ist es möglich zwischen den beiden *ccmC*-Genotypen zu unterscheiden. Neben Lip-0 und Sorbo wurden auch der *ccmC*-Genotyp von Ta und No-0 be-

stimmt. In Letztgenanntem wird in der Southern-Blot-Analyse wie auch in C24 ein DNA-Fragment von ca. 1100 nt detektiert (Abbildung 17A, Fragment 3). Dies stimmt mit einer erwarteten Größe von 1138 nt (NC_001284, C24) überein und zeigt den C24-*ccmC*-Genotyp an. In den anderen Ökotypen treten keine Signale bei ca. 1100 nt auf. Im Gegensatz dazu werden in Col sowie Lip-0, Sorbo und Ta zwei DNA-Fragmente von etwa 300 und 800 nt detektiert (Abbildung 17A, Fragmente 1 und 2). Solche DNA-Fragmente werden nur bei Vorhandensein des Col-*ccmC*-Genotyps erwartet. Die drei Ökotypen weisen demnach im Gegensatz zu No-0 den Col-*ccmC*-Genotyp auf.

Desweiteren wurde in den genannten Ökotypen der *ccmC*-Genotyp über einen *Cla*I-Verdau bestimmt. Analog zur Bestimmung des Genotyps mittels *Kpn*2I-Verdau (Abbildung 13) wird nach erfolgter PCR mit Atccb3-12 und Atccb3-Mega5'fern (P1 und P5 in Abbildung 12) das PCR-Produkt verdaut, wobei es nur bei Vorhandensein des C24-*ccmC*-Genotyps zu einem (zusätzlichen) Schnitt im PCR-Produkt kommt (Abbildung 12). Auf Grund einer weiteren Schnittstelle in dem zu Atccb3-Mega5'fern komplementären Sequenzabschnitt werden im Fall des Col-*ccmC*-Genotyps ein 247 sowie ein 12 bp großes Fragment erwartet. Zumindest das Fragment von 247 bp kann bei Lip-0, Sorbo und Ta klar detektiert werden (Abbildung 17B, Fragment III). Im Unterschied dazu treten bei Vorhandensein des C24-*ccmC*-Genotyps ein 211, ein 36 sowie ein 12 bp großes Fragment in Erscheinung. Lediglich in No-0 kann analog zu C24 der C24-*ccmC*-Genotyp anhand des Auftretens der entsprechenden Signale erfasst werden (Abbildung 17B, Fragmente I, II und IV).

Diese Analysen bestätigen, dass Lip-0, Sorbo und Ta der Col-*ccmC*-Genotyp tragen. Das zusätzliche Vorhandensein des C24-*ccmC*-Genotyps kann in den Ökotypen anhand der gezeigten Daten ausgeschlossen werden. Weiter wurde der C24-*ccmC*-Genotyp in No-0 verifiziert.

3.2.4. Nicht-funktionale *RPF3*-Allele in Lip-0, Sorbo und Ta

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der RNA PROCESSING FACTOR 3 (RPF3) wichtig für die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte mit einem 5'-Ende bei -484/482 in Col ist [Jonietz et al. 2011]. Die nicht-funktionale *ccmC*-mRNA-Prozessierung in Lip-0, Sorbo und Ta legt daher nahe, dass in diesen Ökotypen defekte *RPF3*-Allele vorliegen. Um dies nachzuweisen, wurden zunächst Kreuzungen der genannten Ökotypen mit Col bzw. *rpf3-1* als Pollen-Donor durchgeführt. Da das mitochondriale Genom maternal vererbt wird, sollten die F_1-Pflanzen das mitochondriale Genom des Eizell-Donors, im vorliegenden Fall von Lip-0, Sorbo oder Ta,

aufweisen. Der *ccmC*-Genotyp der F_1-Pflanzen ist also durch Lip-0, Sorbo bzw. Ta bestimmt. Desweiteren besitzen die Pflanzen je einen Chromosomensatz beider Parental-Pflanzen, wobei durch *rpf3-1* ein funktionsloses *RPF3*-Allel eingebracht wird.

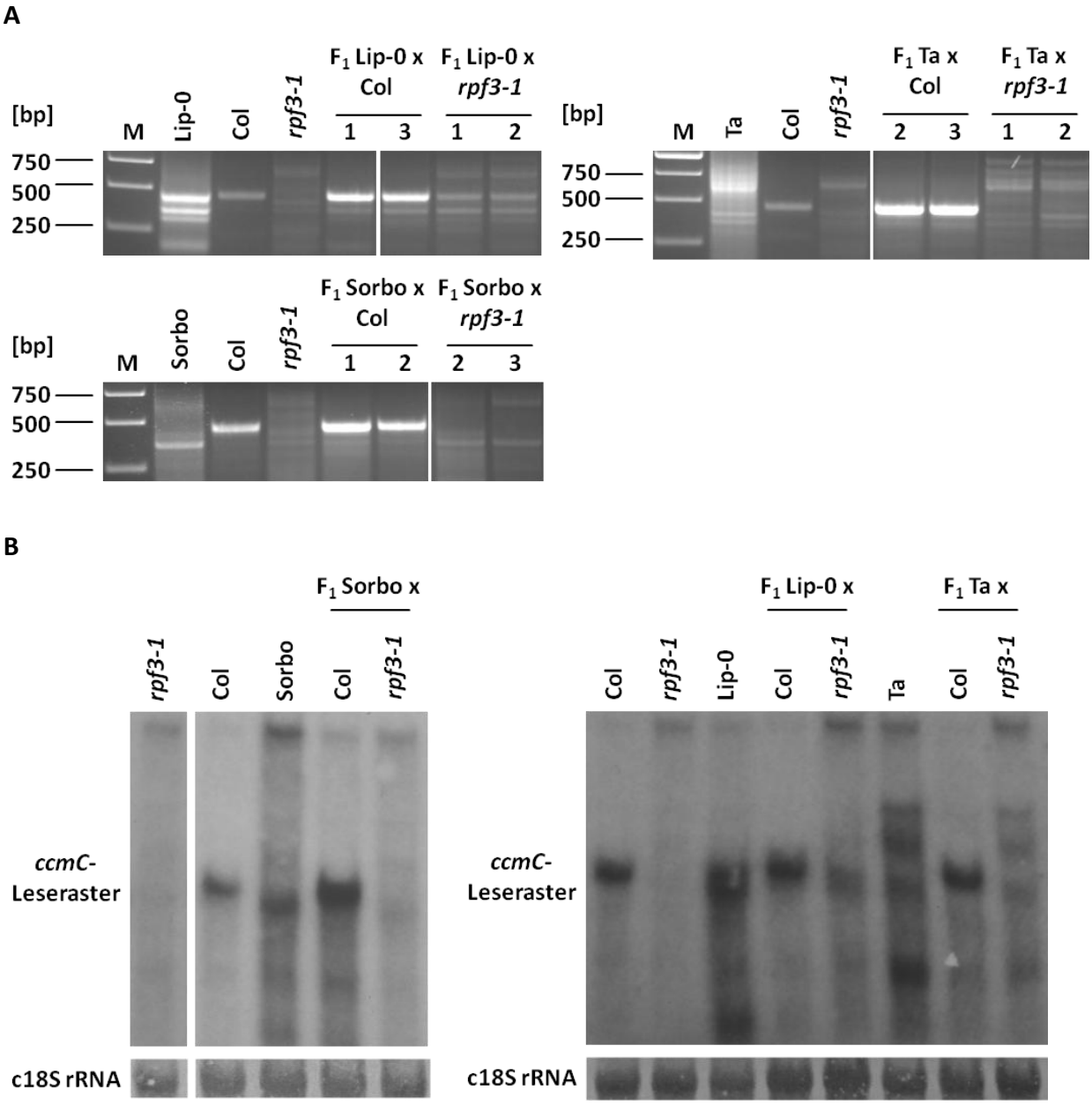


Abbildung 18: Die *ccmC*-mRNA-Prozessierung wird lediglich durch ein intaktes *RPF3*-Allel wieder hergestellt. Analyse der *ccmC*-Transkripte in F_1-Pflanzen aus Kreuzungen von Lip-0, Sorbo und Ta mit Col bzw. *rpf3-1*. **A:** CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Von jeder Kreuzung wurden zwei F_1-Pflanzen betrachtet. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden. **B:** Northern-Blot-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Es wurden jeweils 12 µg gRNA der oberhalb der Bildausschnitte angegebenen Pflanzen verwendet und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Weitere Angaben können Abbildung 14 entnommen werden. Erstveröffentlichung in [Stoll et al. 2015].

Das *ccmC*-Transkriptmuster der F_1-Pflanzen erlaubt es Rückschlüsse auf die *RPF3*-Allele in Lip-0, Sorbo und Ta zu ziehen. Anhand einer CR-RT-PCR wird jeweils deutlich, dass nur in den F_1-Pflanzen, die einer Kreuzung mit Col entstammen, eine *ccmC*-mRNA-Prozessierung analog

zu Col möglich ist (Abbildung 18A, F_1 Lip-0, Sorbo oder Ta x Col). Dagegen liegt in den F_1-Pflanzen mit *rpf3-1* als Pollendonor weiterhin ein Defekt in der Reifung der *ccmC*-Transkripte vor (Abbildung 18A, F_1 Lip-0, Sorbo oder Ta x *rpf3-1*). Diese Pflanzen tragen folglich zwei mehr oder minder defekte *RPF3*-Allele. Das Ergebnis wurde zusätzlich durch eine Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer DNA-Sonde gegen das *ccmC*-Leseraster bestätigt. Lediglich in den F_1-Pflanzen, die einer Kreuzung mit Col entstammen, werden ausschließlich Transkripte auf Höhe der reifen Col-typischen *ccmC*-Transkripte detektiert (Abbildung 18B, F_1 Lip-0, Sorbo oder Ta x Col). Die anderen F_1-Pflanzen weisen dagegen ein ähnliches Muster wie der jeweilige Eizell-Donor auf (Abbildung 18B, F_1 Lip-0, Sorbo oder Ta x *rpf3-1*).

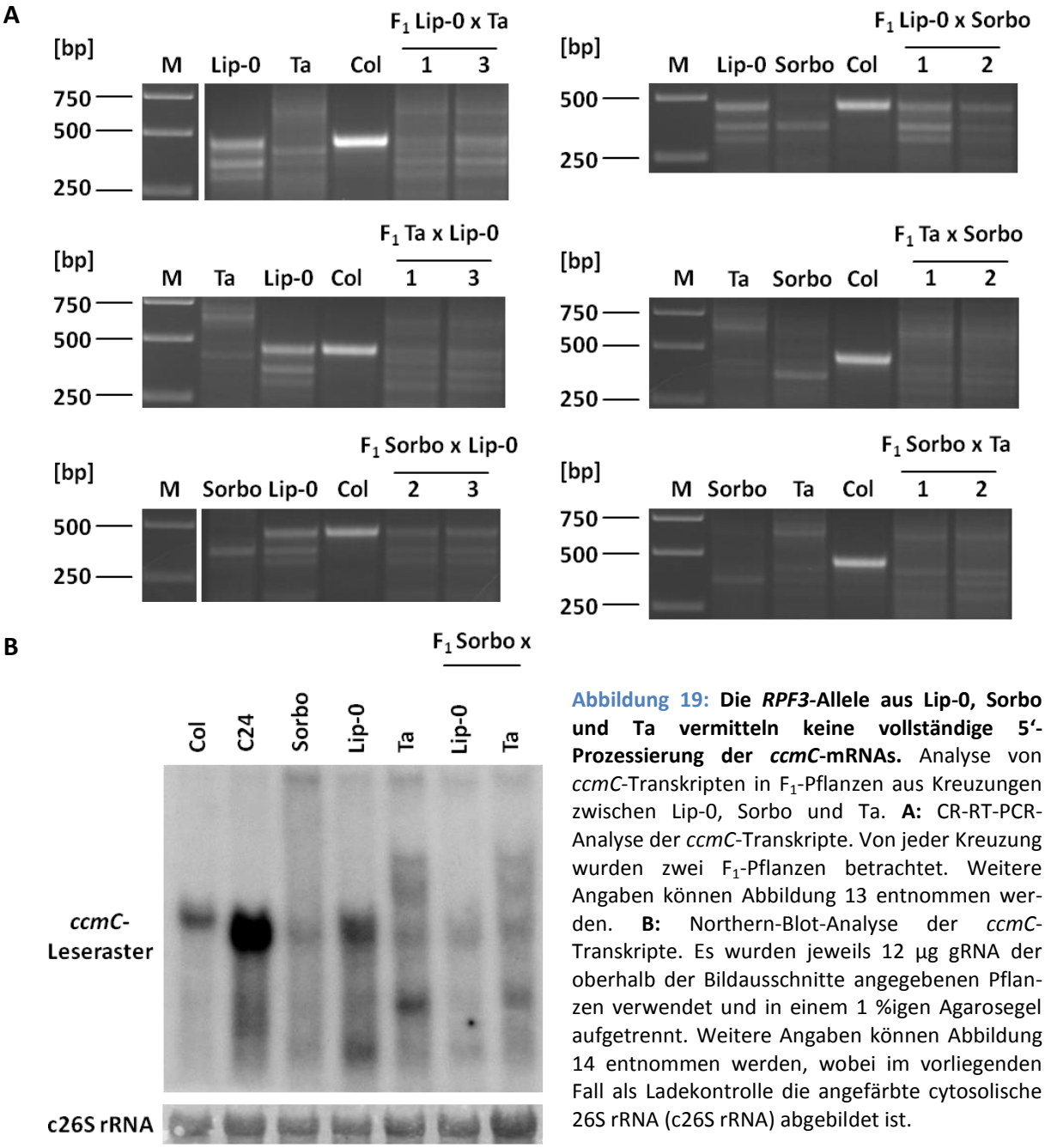


Abbildung 19: Die *RPF3*-Allele aus Lip-0, Sorbo und Ta vermitteln keine vollständige 5'-Prozessierung der *ccmC*-mRNAs. Analyse von *ccmC*-Transkripten in F_1-Pflanzen aus Kreuzungen zwischen Lip-0, Sorbo und Ta. **A:** CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Von jeder Kreuzung wurden zwei F_1-Pflanzen betrachtet. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden. **B:** Northern-Blot-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Es wurden jeweils 12 µg gRNA der oberhalb der Bildausschnitte angegebenen Pflanzen verwendet und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Weitere Angaben können Abbildung 14 entnommen werden, wobei im vorliegenden Fall als Ladekontrolle die angefärbte cytosolische 26S rRNA (c26S rRNA) abgebildet ist.

Im weiteren Verlauf wurden F_1-Pflanzen aus Kreuzungen zwischen Lip-0, Sorbo und Ta auf ihr Vermögen zur Bildung von *ccmC*-Transkripten untersucht. Anhand von CR-RT-PCR-Analysen wird deutlich, dass auch diese F_1-Pflanzen nicht dazu in der Lage sind (ausschließlich) reife *ccmC*-Transkripte zu bilden. Dagegen treten vielmehr PCR-Muster auf, die auf ein intermediäres Transkriptmuster bezüglich der Parental-Pflanzen schließen lassen (Abbildung 19A). Im Fall von F_1 Sorbo x Lip-0 und F_1 Sorbo x Ta wurden die Ergebnisse zusätzlich durch eine Northern-Blot-Analyse bestätigt. Unter Verwendung einer DNA-Sonde gegen das *ccmC*-Leseraster werden in den F_1-Pflanzen analog zur CR-RT-PCR-Analyse intermediäre Transkriptmuster erhalten (Abbildung 19B, F_1 Sorbo x Lip-0 oder Ta).

Zusammenfassend zeigt sich, dass in Lip-0, Sorbo und Ta defekte *RPF3*-Allele vorliegen, die nicht oder nur in verminderter Weise dazu in der Lage sind die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte zu vermitteln. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Allele sich untereinander nicht funktional ersetzen können und der vorliegende Defekt in der *ccmC*-mRNA-Prozessierung allelisch ist.

3.2.5. Ursache des Ausfalls von RPF3 in Lip-0, Sorbo und Ta

Um Hinweise darüber zu erhalten, warum in Lip-0, Sorbo und Ta defekte *RPF3*-Allele vorliegen, wurden die Allele mit At1g62930-kompl.H und At1g62930-kompl.R (Lip-0, Ta) bzw. mit At1g62930.H und At1g62930.R (Sorbo) amplifiziert und mit At1g62930.B, At1g62930.D und At1g62930.I (*RPF3*(Lip-0)) bzw. mit At1g62930.B und At1g62930.G (*RPF3*(Sorbo)) bzw. mit At1g62930.B, At1g62930.C und At1g62930.I (*RPF3*(Ta)) sequenziert. Die Sequenzen von *RPF3*(Lip-0) und *RPF3*(Ta) sind unter den *Accession Numbers* LN555007 und LN555008 im *European Nucleotide Archive* öffentlich zugänglich.

Zusätzlich wurde auch das *RPF3*-Allel aus C24 amplifiziert und sequenziert [Daten Christian Jonietz und Stefan Binder]. Die Sequenz von *RPF3*(C24) ist unter der *Accession Number* LN555006 im *European Nucleotide Archive* öffentlich zugänglich. Das *RPF3*-Allel aus C24 ist dazu in der Lage die *ccmC*-mRNA-Prozessierung im Col-Hintergrund zu vermitteln. Dies zeigt sich in Kreuzungen von Lip-0, Sorbo und Ta mit C24 als Pollen-Donor, aber auch anhand einer Komplementation von *rpf3-1* mit dem *RPF3*-Allel aus C24. Im ersten Fall wird mit einer CR-RT-PCR in den F_1-Pflanzen einzig das Col-spezifische PCR-Produkt detektiert (Abbildung 20A, F_1 Lip-0, Sorbo oder Ta x C24). Dies weist auf eine funktionale *ccmC*-mRNA-Prozessierung

hin. Zur Komplementation von *rpf3-1* wurde das *RPF3*-Allel aus C24 unter Verwendung von At1g62930-kompl.H2 und At1g62930-kompl.R amplifiziert, mit *Asc*I und *Pac*I verdaut, in pMDC100 kloniert (Anhang 1A, unten) [Curtis and Grossniklaus 2003] und stabil in *rpf3-1* transformiert. Die Selektionierung transformierter Pflanzen erfolgte auf MS-Platten mit Kanamycin und wurde durch eine PCR mit den Primern US und At1g62930.C verifiziert. Die Charakterisierung der T_1-Pflanzen bezüglich vorhandener *ccmC*-Transkripte zeigt, dass *RPF3*(C24) das entsprechende Allel aus Col funktional ersetzen kann. Sowohl in einer CR-RT-PCR- als auch in einer Northern-Blot-Analyse treten die Col-typischen Signale auf (Abbildung 20B, *rpf3-1* + *RPF3*(C24)).

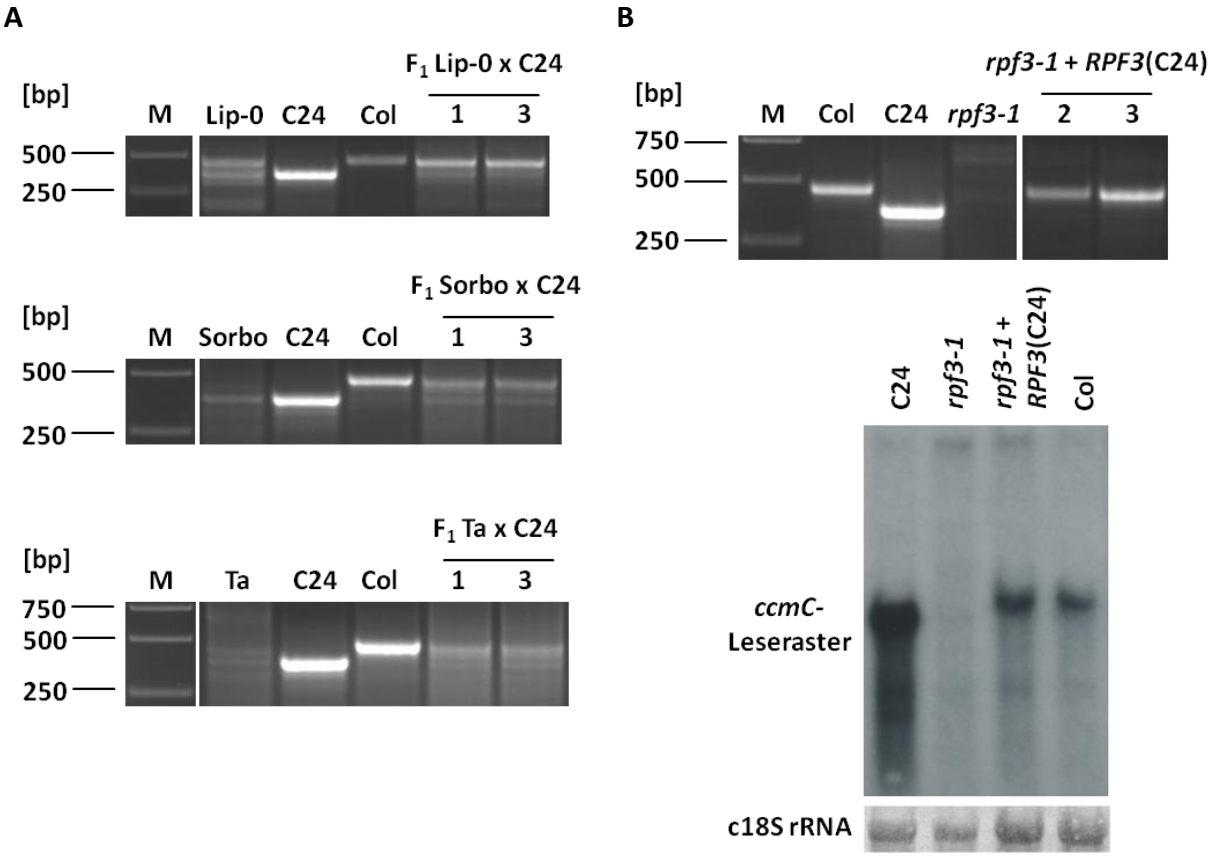


Abbildung 20: Das *RPF3*-Allel aus C24 ist funktional. A: CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte in F_1-Pflanzen aus Kreuzungen von Lip-0, Sorbo und Ta mit C24. Die betrachteten Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden. **B:** Komplementation von *rpf3-1* mit *RPF3*(C24). Die Untersuchung der transformierten Pflanzen erfolgte durch eine CR-RT-PCR- (oben) sowie eine Northern-Blot-Analyse (unten), wobei in Letzterer je Probe 12 µg gRNA verwendet und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt wurden. Weitere Angaben können Abbildung 13 und Abbildung 14 entnommen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse der *RPF3*-Allele aus C24, Lip-0, Sorbo und Ta zeigt viele Unterschiede zu veröffentlichten Sequenzen (http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php). Desweiteren treten Unterschiede zwischen den sequenzierten Allelen und der Referenz-Sequenz aus Col auf [The Arabidopsis Genome Initiative 2000]. Der gravierendste Un-

terschied kann bei Sorbo festgestellt werden. Hier liegt ein Nukleotid-Austausch an Position 439 (Position relativ zum Start-ATG, A = +1) vor, wobei ein G(Col) durch ein T(Sorbo) ersetzt ist. Dadurch wird ein Kodon für Glutamat am Ende von Repeat 2 in ein Stoppkodon überführt (Anhang 7).

Der Vergleich der anderen Allele mit dem Allel aus Col zeigt, dass hier zwar auch Nukleotid-Austausche vorliegen, nichts desto trotz aber zu 94 % (C24), 95 % (Lip-0) bzw. 96 % (Ta) identische AS kodiert sind. Unterschiedliche AS können u.a. an den für die Interaktion mit der RNA vermeintlich wichtigen Positionen 3, 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) innerhalb der Repeats ausgemacht werden (Anhang 7) [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a]. Da diese Unterschiede allerdings teilweise auch im funktionalen RPF3(C24) auftreten, kann anhand dieser Daten die Ursache der beeinträchtigten Funktionalität von RPF3(Lip-0) und RPF3(Ta) nicht ermittelt werden.

Desweiteren wurde die Expression von *RPF3* in Lip-0, Sorbo und Ta im Vergleich zu Col und *rpf3-1* untersucht. Dazu wurde DNase-verdaute gRNA zunächst unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Die anschließende RT-PCR wurde mit den Primern At1g62930.D und At1g62930.I durchgeführt, wobei ein PCR-Produkt von ca. 600 bp erwartet wird. In Sorbo und Ta werden etwa gleich starke Produkte wie in Col detektiert (Abbildung 21). Dies weist auf eine mit Col vergleichbare Expressionsstärke von *RPF3* in den beiden Ökotypen hin. Im Gegensatz dazu zeigt sich in Lip-0 eine leicht verminderte Expression, wohingegen in *rpf3-1* keine Expression von *RPF3* festgestellt werden kann (Abbildung 21).

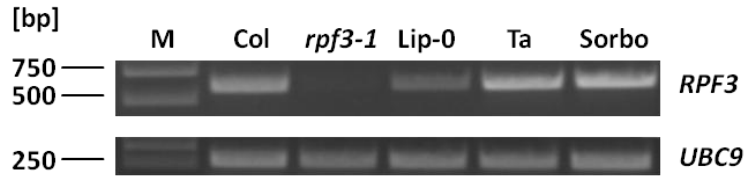


Abbildung 21: Expression von *RPF3*. Die Analyse erfolgte in den oberhalb der Bildausschnitte angegebenen Ökotypen und *rpf3-1*. Zur Einstellung der cDNAs wurde eine RT-PCR bezüglich *UBC9* (unten) mit den Primern UBC9-H.2 und At4g27960_2 durchgeführt. Hierbei wird ein PCR-Produkt von ca. 290 bp erwartet. Die RT-PCR bezüglich *RPF3* (oben) erfolgte mit den angeglichenen cDNA-Mengen unter Verwendung von At1g62930.D und At1g62930.I. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 600 bp. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass für den Defekt von RPF3 in Sorbo ein Stoppkodon am Ende von Repeat 2 ursächlich ist. Im Gegensatz dazu bleibt bislang unklar, ob die beeinträchtige *ccmC*-mRNA-Prozessierung in Lip-0 und Ta auf Unterschiede in der Nukleotidsequenz oder eine verminderte Expression von *RPF3* zurückzuführen ist.

3.2.6. Akkumulation von *ccmC*-Vorläufermolekülen in Ta

Das Transkriptmuster von Ta unterscheidet sich wie bereits erwähnt grundlegend von dem in Col. Im Gegensatz zu reifen *ccmC*-Transkripten reichern sich in Ta größere Vorläufermoleküle an (Abbildung 14A, Transkripte 5, 6 und 7). Es stellt sich die Frage, ob RPF3(Ta) die Anhäufung dieser Vorläufer vermittelt oder ein bislang nicht bekannter Kern-kodierter Faktor für die eventuell vorgeschalteten Reifungsschritte der *ccmC*-Transkripte verantwortlich ist. In beiden Fällen kann entweder eine *gain-of-function*- oder eine *loss-of-function*-Mutation ursächlich für die Akkumulation der *ccmC*-Vorläufertranskripte sein.

Um erste Erkenntnisse über die Ursache der angehäuften *ccmC*-Vorläufertranskripte zu erhalten, wurden F_1-Pflanzen reziproker Kreuzungen zwischen Ta und *rpf3-1* herangezogen. Zur Analyse der größeren *ccmC*-Transkripte wurde eine CR-RT-PCR mit den Primern Atccb3-3 und Atccb3-Mega5'fern (P12 und P5 in Abbildung 12) durchgeführt, wobei Letzterer stromaufwärts des reifen 5'-Endes von Col bindet. In Ta werden gegenüber *rpf3-1* zusätzliche PCR-Produkte von ca. 450 sowie ca. 600 bp erhalten (Abbildung 22, Produkte 6 und 7). Diese korrelieren mit den in Ta detektierten ca. 1600 und ca. 1800 nt langen *ccmC*-Transkripten der Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer Sonde gegen das *ccmC*-Leseraster (Abbildung 14A, Transkripte 5 und 6). Bei der Betrachtung der *ccmC*-Transkripte in den F_1-Pflanzen beider Kreuzungen zeigt sich, dass in diesen Pflanzen ebenfalls die Ta-typischen PCR-Produkte auftreten (Abbildung 22). Dies legt nahe, dass das Auftreten der *ccmC*-Vorläufertranskripte vermutlich biparental vererbt wird und somit ein Kern-kodierter Faktor die Akkumulation der größeren *ccmC*-Transkripte beeinflusst. Desweiteren scheint die Information zur Generierung der größeren Transkripte dominant vererbt zu werden. Dies weist darauf hin, dass das involvierte Protein eine *gain-of-function*-Mutation trägt.

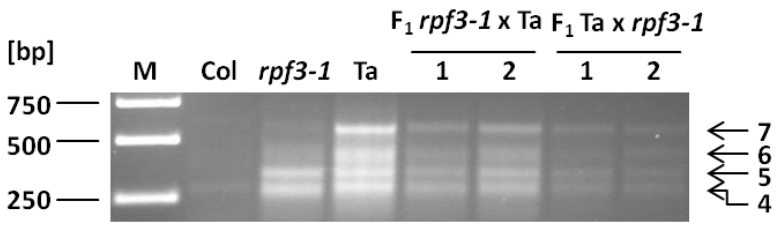


Abbildung 22: Das Auftreten der *ccmC*-Vorläufermoleküle wird biparental vererbt. CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte mit den Primern Atccb3-3 und Atccb3-Mega5'fern (P12 und P5 in Abbildung 12) in F_1-Pflanzen der Kreuzungen *rpf3-1* x Ta und Ta x *rpf3-1*. Die betrachteten Pflanzen sind oberhalb des Bildausschnitts angegeben. Die Pfeile am rechten Rand kennzeichnen aufgetretene PCR-Produkte (4: ca. 260 bp, 5: ca. 320 bp, 6: ca. 450 bp, 7: ca. 600 bp). Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

Mit dem Ziel Aussagen darüber treffen zu können, ob es sich bei diesem Faktor um RPF3(Ta) handelt oder nicht, wurden im weiteren Verlauf 23 Pflanzen der F_2-Generation Ta x *rpf3-1* bezüglich der vorliegenden *ccmC*-Transkripte anhand einer CR-RT-PCR-Analyse charakterisiert. Ist ein zusätzliches Protein involviert, wird erwartet, dass ¾ der F_2-Pflanzen den *rpf3-1*- und ¼ der F_2-Pflanzen den Ta-*ccmC*-mRNA-Phänotyp zeigen. Beeinflusst allerdings RPF3(Ta) in einer gewissen Art und Weise die beobachtete Akkumulation der *ccmC*-Vorläufertranskripte, sollten ¾ der F_2-Pflanzen die Ta- und ¼ der F_2-Pflanzen die *rpf3-1*-typischen *ccmC*-Transkripte aufweisen. Von den F_2-Pflanzen zeigt nur eine Pflanze ein mit *rpf3-1* vergleichbares Bandenmuster (Abbildung 23, unten, Pflanze 15). Diese Aufspaltung widerspricht der Annahme eines neben RPF3(Ta) zusätzlich involvierten Proteins und deutet im Gegensatz dazu darauf hin, dass RPF3(Ta) ursächlich für das Auftreten der größeren *ccmC*-Transkripte ist.

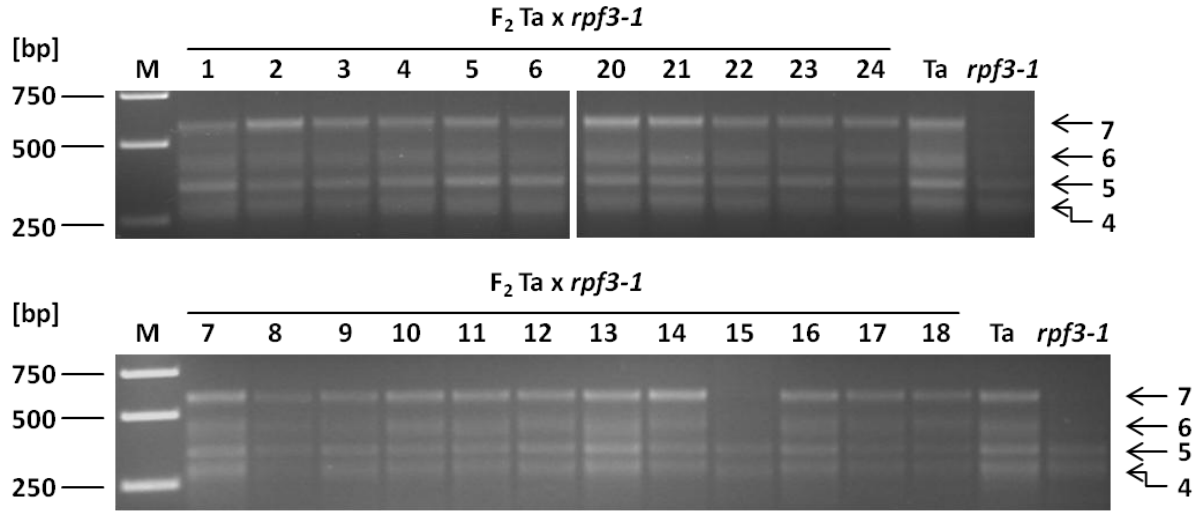


Abbildung 23: Die Anhäufung von Vorläufertranskripten scheint durch *RPF3*(Ta) verursacht zu werden. CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte in F_2-Pflanzen der Kreuzung Ta x *rpf3-1*. Die betrachteten Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 22 entnommen werden.

Wenn RPF3(Ta) tatsächlich die Akkumulation der Vorläufermoleküle beeinflusst, sollte es in *rpf3-1* bei Anwesenheit von RPF3(Ta) zur Bildung dieser Transkripte kommen. Um dies zu überprüfen, wurde das *RPF3*-Allel aus Ta unter Verwendung der Primer At1g62930-kompl-H und At1g62930-kompl.R amplifiziert, mit *Asc*I sowie *Pac*I verdaut, in pMDC100 kloniert (Anhang 1A, unten) [Curtis and Grossniklaus 2003] und stabil in *rpf3-1* transformiert. Zur Selektion transformierter Pflanzen wurde sich die durch pMDC100 vermittelte Kanamycin-Resistenz zu Nutze gemacht. Zusätzlich wurde anhand einer PCR mit RS und At1g62930.J die Integration der T-DNA ins Kerngenom überprüft.

Die Analyse der *ccmC*-Transkripte zeigt, dass in den mit RPF3(Ta) transformierten Pflanzen das gleiche PCR-Muster auftritt wie in *rpf3-1* (Abbildung 24, *rpf3-1* + *RPF3*(Ta)). Die zuvor getroffene Annahme einer Akkumulation größerer *ccmC*-Transkripte bei Anwesenheit von RPF3(Ta) kann anhand dieser Analyse somit nicht festgestellt werden.

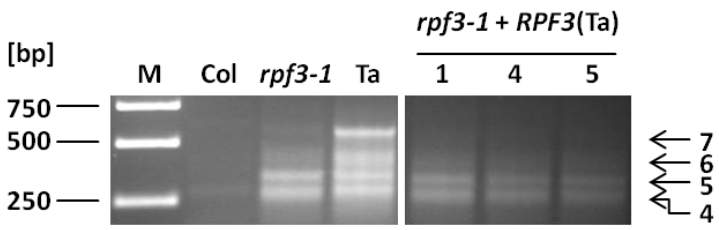


Abbildung 24: Komplementation von *rpf3-1* mit *RPF3*(Ta). CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Die betrachteten Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 22 entnommen werden.

In Ta kommt es zur Akkumulation größerer *ccmC*-Transkripte. Was ursächlich für das Auftreten dieser Moleküle ist, kann aus den bisherigen Analysen nicht eindeutig erfasst werden.

3.2.7. Identifizierung von *RPF6*

RPF3 ist wie zuvor erwähnt an der Bildung von reifen *ccmC*-Transkripten in Ökotypen, die den Col-*ccmC*-Genotyp tragen, beteiligt. Im Gegensatz dazu konnte in früheren Analysen gezeigt werden, dass ein *Knockout* von *RPF3* die Prozessierung der *ccmC*-Transkripte im C24-Hintergrund (C24-*ccmC*-Genotyp) nicht negativ beeinflusst [Jonietz et al. 2011]. Die Transkriptreifung in C24 erfolgt damit unabhängig von RPF3.

In Vorarbeiten wurden Kreuzungen zwischen No-0 und Col bzw. *rpf3-1* durchgeführt. Die Analyse der *ccmC*-Transkripte in den F_1-Pflanzen zeigte, dass jeweils ähnliche Transkripte wie in C24 gebildet werden [Daten Christian Jonietz und Stefan Binder]. Dies bestätigt zunächst die obigen Ausführungen einer von RPF3 unabhängigen *ccmC*-mRNA-Reifung in Ökotypen mit dem C24-*ccmC*-Genotyp. Desweiteren weist das Ergebnis aber darauf hin, dass das Kerngenom von Col das Potential dazu aufweist *ccmC*-Transkripte ausgehend vom C24-*ccmC*-Genotyp zu prozessieren. Um den zur Prozessierung von *ccmC*-Transkripten des C24-*ccmC*-Genotyps erforderlichen Kernfaktor, der nachfolgend RNA PROCESSING FACTOR 6 (RPF6) bezeichnet wird, zu lokalisieren, wurde zunächst eine F_2 No-0 x Col *Mapping*-Population mit 144 Pflanzen etabliert. Die Phänotypisierung der Pflanzen zeigte, dass in der Tat ein Kern-kodierter Faktor ursächlich für die Bildung von *ccmC*-Transkripten in No-0 bzw. C24 ist [Stutzer 2011].

Um den *RPF6*-Lokus zu kartieren, wurden Insertion/Deletion-Marker, die das ganze Genom von *A.thaliana* abdecken, herangezogen. Unter Verwendung der F_2-Pflanzen mit dem No-0-Phänotyp zeigte sich, dass auf den Chromosomen 2 bis 5 eine nahezu gleichmäßige Verte-

lung des Col- bzw. des No-0-Genotyps vorliegt. Im Gegensatz dazu wurde auf Chromosom 1 eine 100 %ige Kopplung des No-0-Genotyps am *RPF2*-Lokus bei 23,20 Mbp ausgemacht [Stutzer 2011]. *RPF2* liegt in einem Cluster von Genen, die für RESTORER OF FERTILITY(RF)-ähnliche PPR Proteine kodieren. In diesem Cluster befindet sich neben dem *RPF2*- auch der *RPF3*-Lokus [Jonietz et al. 2011, Jonietz et al. 2010].

Es liegt die Vermutung nahe, dass auch RPF6 zu den RF-ähnlichen PPR-Proteinen zählt. In einer ersten Analyse wurden daher acht Gene, die für RF-ähnliche PPR-Proteine kodieren, als mögliche Kandidaten für RPF6 in Betracht gezogen. Zunächst wurden diese Gene inklusive ihrer 5‘- bzw. 3‘-flankierenden Regionen unter Verwendung von Col gDNA amplifiziert (Tabelle 15), mit *Pac*I und *Asc*I bzw. *EcoR*I und *Asc*I (At1g62720) verdaut und in pMDC123 kloniert (Anhang 1A, oben) [Curtis and Grossniklaus 2003]. Die stabile Integration der Konstrukte in No-0 erfolgte im Anschluss durch einen *Floral Dip*. Transformierte Pflanzen wurden durch das Besprühen mit dem Herbizid Basta® sowie einer PCR mit den Primern BASTA.H und BASTA.R identifiziert.

Tabelle 15: Amplifikation der Kandidatengene inklusive der 5‘-und 3‘-flankierenden Regionen.

	Primer	**5‘-flankierender Bereich** (inklusive 5‘-UTR)	**3‘-flankierender Bereich** (inklusive 3‘-UTR)
At1g62590	At1g62590-kompl.H2 + At1g62590-kompl.R2	702 bp	344 bp
At1g62680	At1g62680-kompl.H + At1g62680-kompl.R	687 bp	1578 bp
At1g62720	At1g62720-kompl.H2 + At1g62720-kompl.R	903 bp	665 bp
At1g62910	At1g62910-kompl.H + At1g62910-kompl.R2	487 bp	416 bp
At1g62914	At1g62915-kompl.H + At1g62915-kompl.R	617 bp	913 bp
At1g63070	At1g63070-kompl.H + At1g63070-kompl.R	1688 bp	344 bp
At1g63080	At1g63080-kompl.H + At1g63080-kompl.R	451 bp	1595 bp
At1g63130	At1g63130-kompl.H + At1g63130-kompl.R	1134 bp	1400 bp

Um im Anschluss festzustellen, welches dieser Gene tatsächlich für RPF6 kodiert, wurden die vorhandenen *ccmC*-Transkripte in mehreren T_1-Pflanzen je Konstrukte über eine CR-RT-PCR analysiert. Dabei konnte nach dem Einbringen von sieben Kandidatengenen (At1g62590, At1g62680, At1g62720, At1g62910, At1g62914, At1g63070 und At1g63080) keine Verände-

rung des PCR-Musters gegenüber den untransformierten No-0-Pflanzen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die *ccmC*-mRNA-Prozessierung ist folglich weiterhin fehlerhaft. Im Gegensatz dazu treten in den No-0-Pflanzen, die das Gen At1g63130 aus Col tragen, PCR-Produkte der gleichen Größe wie in C24 auf (Abbildung 25A, No-0 + *RPF6*(Col)). Dies lässt vermuten, dass wie in C24 *ccmC*-Transkripte mit einem 5'-Ende bei -391/390 gebildet werden. Die *ccmC*-Transkripte wurden zusätzlich anhand einer Northern-Blot-Analyse charakterisiert. Dabei konnte analog zur CR-RT-PCR gezeigt werden, dass die mit dem At1g63130(Col)-Allel transformierten No-0-Pflanzen dazu in der Lage sind reife *ccmC*-Transkripte wie in C24 zu generieren (Abbildung 25B, No-0 + *RPF6*(Col)).

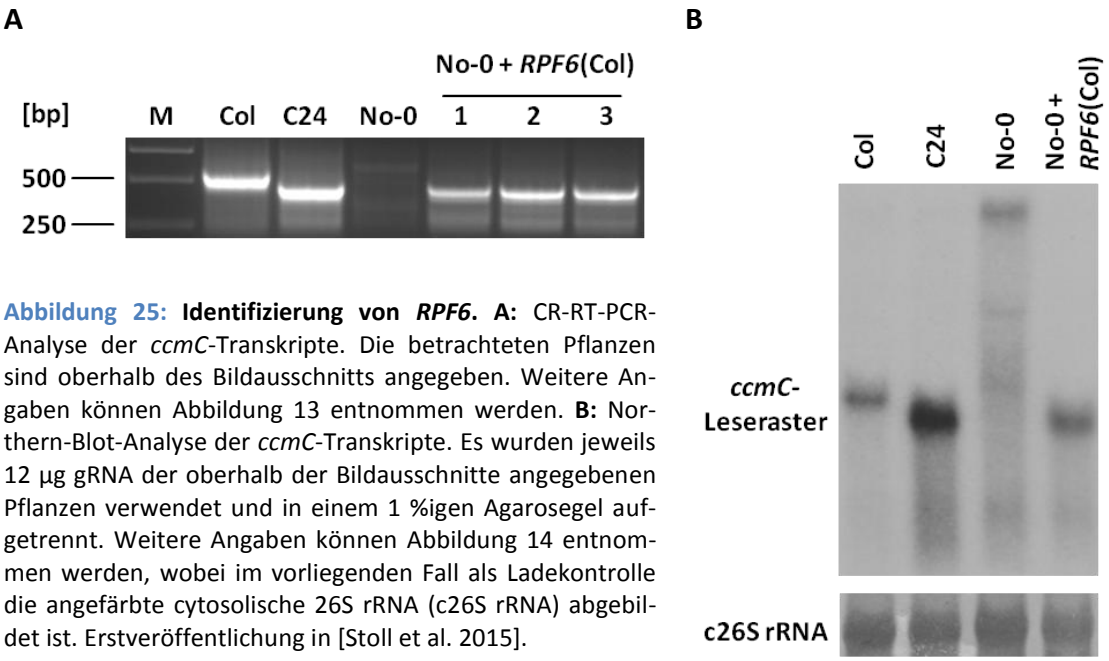


Abbildung 25: Identifizierung von *RPF6*. A: CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Die betrachteten Pflanzen sind oberhalb des Bildausschnitts angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden. **B:** Northern-Blot-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Es wurden jeweils 12 µg gRNA der oberhalb der Bildausschnitte angegebenen Pflanzen verwendet und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Weitere Angaben können Abbildung 14 entnommen werden, wobei im vorliegenden Fall als Ladekontrolle die angefärbte cytosolische 26S rRNA (c26S rRNA) abgebildet ist. Erstveröffentlichung in [Stoll et al. 2015].

Die Analysen zeigen, dass sich der *RPF6*-Lokus auf dem unteren Arm von Chromosom 1 in einem Cluster von Genen, die für RF-ähnliche PPR-Proteine kodieren, befindet. Mit At1g63130 konnte das Gen, welches für RPF6 kodiert, identifiziert werden. Dieses Gen wird im weiteren Verlauf mit *RPF6* bezeichnet.

3.2.8. *RPF6*-Allel in No-0

Mit dem Ziel eine Antwort darauf zu erhalten, warum das *RPF6*-Allel aus No-0 funktionslos im Hinblick auf die *ccmC*-mRNA-Prozessierung ist, wurden zunächst verschiedene PCR-Analysen bezüglich des *RPF6*-Allels und dessen näherer Umgebung durchgeführt. Dabei wurde in No-0 eine etwa 200 bp große Insertion stromaufwärts von *RPF6*, nahe des Leserasters von At1g63120 identifiziert (Abbildung 26B, PCR I). Eine PCR mit Primern, die weiter stromabwärts binden, erbrachte in No-0 im Gegensatz zu Col kein PCR-Produkt (Abbildung

26B, PCR II). Auch unter Verwendung anderer Primerkombinationen konnten in No-0 in diesem Bereich keine PCR-Produkte generiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher bleibt die Struktur stromaufwärts des *RPF6*-Allels in No-0 unklar (Abbildung 26A, Fragezeichen). Im Gegensatz dazu war es möglich einen Teil des Leserasters von *RPF6* zu amplifizieren, wobei in Col und No-0 Produkte gleicher Größe erhalten wurden (Abbildung 26B, PCR III). Desweiteren wurde in No-0 eine Deletion stromabwärts des Leserasters von *RPF6* beobachtet (Abbildung 26B, PCR IV). Diese scheint aber irrelevant für die Funktion von RPF6 zu sein, da sie auch in Ökotypen mit einer intakten *ccmC*-mRNA-Prozessierung auftritt (http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php).

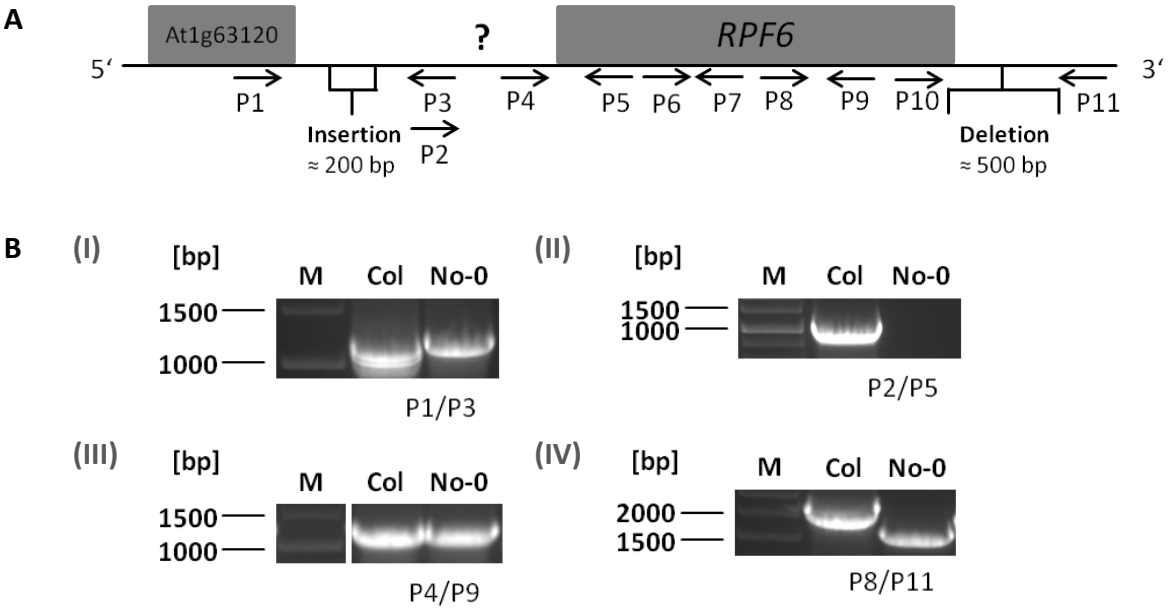


Abbildung 26: Struktur des *RPF6*-Allels in No-0. A: Schematische Genkarte von *RPF6* in No-0. Die hellgrauen Kästen stellen die Leseraster von *RPF6* sowie des stromaufwärts liegenden Gens At1g63120 dar. Eine Insertion stromaufwärts sowie eine Deletion stromabwärts von *RPF6*(No-0) sind eingezeichnet. Ein bislang unklarer Sequenzabschnitt ist durch ein ? gekennzeichnet. Die relative Lage der Primer ist durch waagrechte Pfeile kenntlich gemacht. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. P1: At1g63120.A. P2: At1g63130.K. P3: At1g63120.B. P4: At1g63130.H. P5: At1g63130Col.1. P6: At1g63130.A. P7: At1g63130.B. P8: At1g63130.C. P9: RPF3_6Chimär.R2. P10: At1g63130.J. P11: At1g63130-kompl.R1. **B:** PCR-Analysen in No-0 und Col bezüglich *RPF6*. Die jeweils verwendeten Primerpaare sind unterhalb der PCR-Bilder angegeben. In Col werden PCR-Produkte einer Größe von ca. 1200 bp (I), ca. 1150 bp (II), ca. 1200 bp (III) und ca. 2100 bp (IV) erwartet. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

Um weitere Einblicke in die Struktur des *RPF6*-Allels in No-0 zu erhalten, wurden das Leseraster sowie die 3‘- und 5‘-flankierenden Regionen anhand der PCR-Produkte aus Ansatz III und IV (Abbildung 26) sowie eines durch At1g63130.J und At1g63130-kompl.R1 (P10 und P11 in Abbildung 26) amplifizierten DNA-Fragments (Ansatz V) mittels Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierung erfolgte mit At1g63130.B und RPF3_6Chimär.R2 (Ansatz III), At1g63130.C (Ansatz IV) bzw. At1g63130-kompl.R1 (Ansatz V) (P7, P9, P8 und P11 in Abbildung 26).

Anhand der Sequenz-Analysen konnten bereits zuvor veröffentlichte Sequenzunterschiede, wie die Deletion stromabwärts von *RPF6*, zwischen No-0 (no_0.v7c.sdi) und Col (nc_003070) reproduziert werden [Gan et al. 2011, The Arabidopsis Genome Initiative]. Ein Vergleich des *RPF6*-Leserasters von Col und No-0 zeigt, dass zwischen den Allelen beider Ökotypen zwar einige Nukleotid-Austausche vorliegen, aber zu etwa 94 % identische AS kodiert sind. Die ermittelte Sequenz von *RPF6*(No-0) ist unter der *Accession Number* LN555009 im *European Nucleotide Archive* öffentlich zugänglich. Eine Häufung verschiedener AS zwischen den RPF6-Proteinen zeigt sich vor allem zwischen Repeat 12 und 15. Hier treten unterschiedliche AS u.a. an den für die RNA-Bindung vermeintlich wichtigen Positionen 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) auf. Teilweise liegen auch unterschiedliche AS an Position 3 vor (Anhang 8). Dieser Position wird ein indirekter Einfluss auf die RNA-Bindung zugeschieben [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a].

Die Analysen lassen keine eindeutige Aussage zu, worin der Defekt des *RPF6*-Allels in No-0 begründet ist. Es können lediglich strukturelle Unterschiede stromaufwärts des Allels sowie einzelne Nukleotid-Austausche verstärkt im C-terminalen Teil von *RPF6* festgestellt werden, wobei allerdings unklar bleibt, ob diese ausschlaggebend für die Funktion des Proteins sind.

3.2.9. Nicht-funktionale *RPF6*-Allele in weiteren Ökotypen

Anhand der Charakterisierung von insgesamt 51 *A.thaliana* Ökotypen bezüglich des *ccmC*-Genotyps und *ccmC*-mRNA-Phänotyps wurde deutlich, dass neben No-0 auch die Ökotypen Kas-1, Ms-0, Nok-1 und Rube zwar den C24-*ccmC*-Genotyp aufweisen, aber nicht dazu in der Lage sind reife *ccmC*-Transkripte analog zu C24 zu generieren (Abbildung 13B; Abbildung 14B).

Um zunächst festzustellen, ob es die mitochondriale Konfiguration der Ökotypen prinzipiell zulässt, dass *ccmC*-Transkripte mit einem 5‘-Ende bei -391/390 gebildet werden, wurden analog zum Vorgehen mit No-0 (siehe 3.2.7.) Kreuzungen mit Col durchgeführt. Anhand einer CR-RT-PCR-Analyse wurden die F_1-Pflanzen auf die vorhandenen *ccmC*-Transkripte untersucht. Dabei konnte durchweg ein PCR-Produkt von ca. 380 bp, wie es auch in C24 auftritt, beobachtet werden (Abbildung 27, F_1 Kas-1, Ms-0, Nok-1 oder Rube x Col). Folglich erlaubt es das mitochondriale Genom von Kas-1, Ms-0, Nok-1 und Rube, dass reife *ccmC*-Transkripte gebildet werden. Demgegenüber scheinen die Ökotypen aber analog zu No-0 defekte *RPF6*-Allele aufzuweisen.

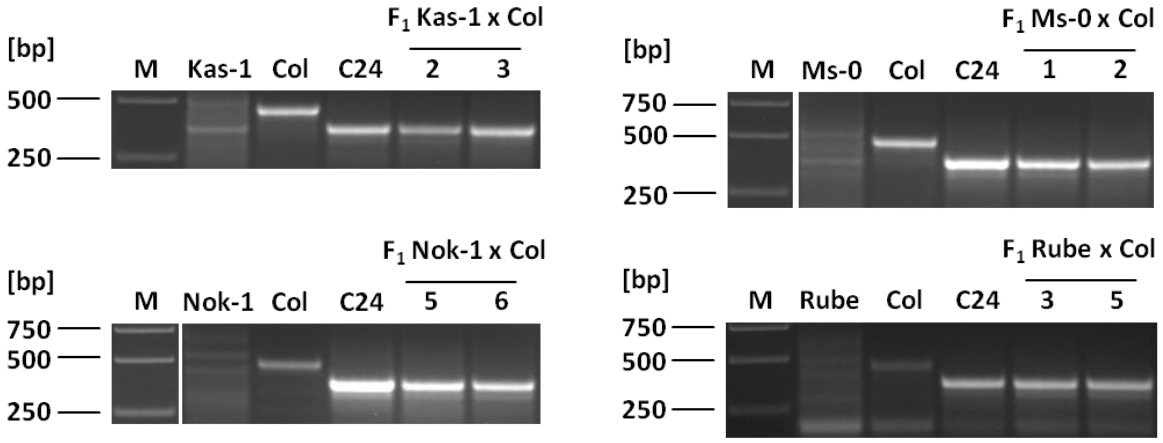


Abbildung 27: Das Kerngenom von Col kann die *ccmC*-mRNA-Prozessierung in Kas-1, Ms-0, Nok-1 und Rube vermitteln. CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Die betrachteten Ökotypen sowie F_1-Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden.

Um diese Annahme zu verifizieren, wurden im weiteren Verlauf Kreuzungen zwischen No-0, Ms-0 und Rube durchgeführt. Die beiden Ökotypen Kas-1 und Nok-1 wurden auf Grund eines gleichen CR-RT-PCR-Musters wie in Ms-0 bzw. No-0 (Abbildung 13B) nicht in den Analysen berücksichtigt. Zur Charakterisierung vorhandener *ccmC*-Transkripte wurden CR-RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei konnte in keiner der F_1-Pflanzen das C24-typische, ca. 380 bp große PCR-Produkt detektiert werden. Es zeigen sich vielmehr Mischungen der PCR-Muster beider Parental-Ökotypen (Abbildung 28).

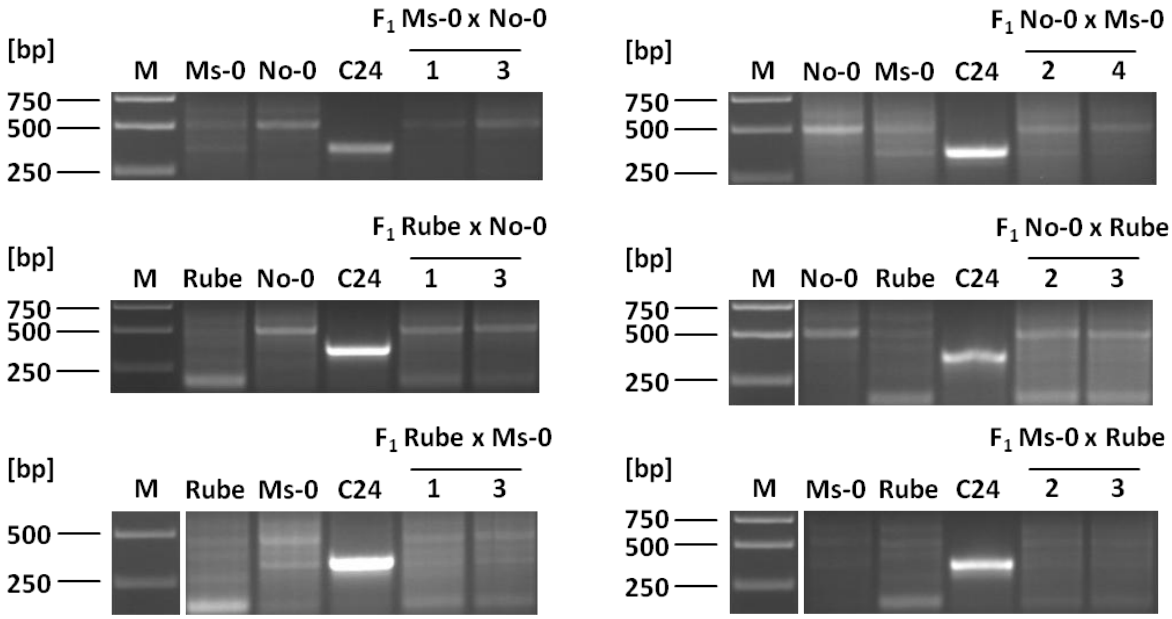


Abbildung 28: Ms-0 und Rube tragen wie No-0 ein defektes *RPF6*-Allel. CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte. Die betrachteten Ökotypen sowie F_1-Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass in Ms-0 und Rube defekte *RPF6*-Allele dafür ausschlaggebend sind, dass es zu keiner korrekten *ccmC*-mRNA-Prozessierung kommt. Es ist anzunehmen, dass gleiches auch für die entsprechenden *RPF6*-Allele von Kas-1 und Nok-1 zutrifft.

3.2.10. Mögliche Gründe des Ausfalls von RPF6 in Kas-1, Ms-0, Nok-1 und Rube

Bislang wurde gezeigt, dass in Kas-1, Ms-0, Nok-1 und Rube analog zu No-0 defekte *RPF6*-Allele vorliegen. Mit dem Ziel Hinweise auf die Struktur der *RPF6*-Allele in den einzelnen Ökotypen zu erhalten, wurden Teile der Allele sowie deren nähere Umgebung amplifiziert. Unter Verwendung von Primern gegen das Leseraster von *RPF6* konnte im Fall von Kas-1 und Ms-0 ein Unterschied zum Col-Allel festgestellt werden. In beiden Ökotypen zeigt sich ein ca. 500 bp größeres PCR-Produkt als in Col (Abbildung 29A, Kas-1 und Ms-0). Der Strukturunterschied konnte zumindest in Ms-0 durch eine Sequenzierung des PCR-Produkts mit At1g63130.B (P7 in Abbildung 26) verifiziert werden. Dabei ergab sich, dass das *RPF6*-Allel im 5'-Bereich eine Duplikation von ca. 400 bp aufweist (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, dass dies auch für Kas-1 zutrifft. In den anderen Ökotypen treten dagegen PCR-Produkte gleicher Größe wie in Col auf (Abbildung 29A). Desweiteren konnte in Kas-1, Ms-0 und Nok-1 die bereits in No-0 beobachtete Deletion stromabwärts des Leserasters beobachtet werden (Abbildung 26B, Ansatz IV; Abbildung 29B). In Rube erbrachte die entsprechende PCR kein PCR-Produkt (Abbildung 29B). Dies lässt auf einen strukturellen Unterschied im untersuchten Bereich schließen, wobei Ersterer bislang nicht näher erfasst wurde.

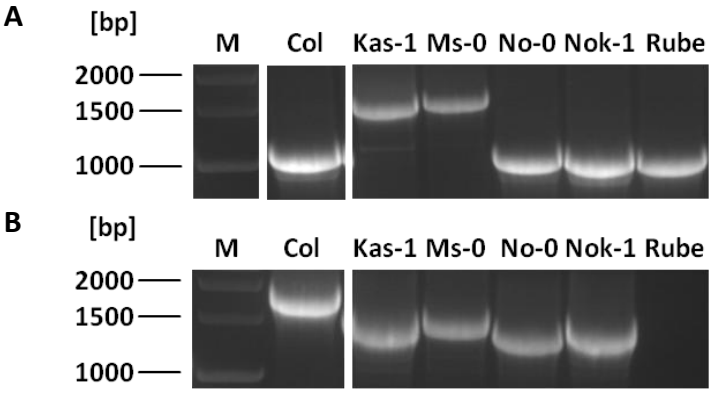


Abbildung 29: PCR-Analysen bezüglich der *RPF6*-Allele in Kas-1, Ms-0, No-0, Nok-1 und Rube. Die Analysen wurden mit den Primern At1g63130.H und RPF3_6Chimär.R2 (P4 und P9 in Abbildung 26) **(A)** bzw. At1g63130.C und At1g63130-kompl.R1 (P8 und P11 in Abbildung 26) **(B)** durchgeführt. Weitere Angaben können Abbildung 26 entnommen werden.

Zusätzlich wurde die Expression von *RPF6* untersucht, wobei als Referenzen Col und C24 verwendet wurden. Nach einem DNase-Verdau von gRNA und anschießender cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern wurde die RT-PCR bezüglich *RPF6* mit den Primern At1g63130.A und At1g63130.B (P6 und P7 in Abbildung 26) durchgeführt. Anhand einer PCR

mit gDNA konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Primer in allen Ökotypen binden können (Abbildung 30B). In der RT-PCR bezüglich *RPF6* werden in C24 und Ms-0 in etwa gleich starke Signale erhalten (Abbildung 30A). Ms-0 weist folglich eine mit C24 vergleichbare Expression von *RPF6* auf. Im Gegensatz dazu ist die Expression in den anderen Ökotypen vermindert, wobei dies bei No-0 und Rube am stärksten ausgeprägt ist (Abbildung 30A). Da die Expression des funktionalen *RPF6*-Allels aus Col in etwa gleich stark wie in Kas-1 und Nok-1 ist, kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Ökotypen die Expressionsstärke nicht ausschlaggebend für den Defekt von RPF6 ist.

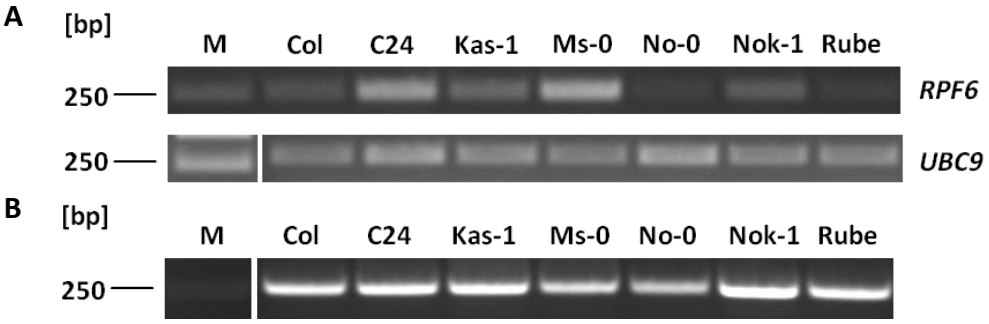


Abbildung 30: Expression von *RPF6*. Die verwendeten Ökotypen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. **A:** RT-PCR bezüglich *RPF6*. Es wurden die Primer At1g63130.A und At1g63130.B (P6 und P7 in Abbildung 26) verwendet, wobei ein PCR-Produkt von etwa 250 bp erwartet wird. Zur Einstellung der cDNA-Menge wurde eine RT-PCR bezüglich *UBC9* (unten) analog zu Abbildung 21 durchgeführt. **B:** PCR bezüglich *RPF6*. Die PCR erfolgt analog zu A, wobei als *Template* gDNA verwendet wurde. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass der Ausfall von RPF6 vermutlich auf unterschiedliche Ursachen in den einzelnen Ökotypen zurückzuführen ist. Es können sowohl strukturelle Unterschiede im Vergleich zum funktionalen *RPF6*-Allel als auch verminderte Expressionsstärken von *RPF6* festgestellt werden.

3.2.11. RPF3 und RPF6 in Ökotypen mit nicht-korrelierendem *ccmC*-Genotyp

Im Laufe der durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass das Kern-Genom von Col die *ccmC*-mRNA-Prozessierung ausgehend von mitochondrialer *ccmC*-mRNA des C24-*ccmC*-Genotyps korrekt zu prozessieren vermag (Abbildung 27). Insbesondere wurde deutlich, dass RPF6(Col), ein Protein, welchem bisher keine Funktion in Col zugeordnet ist, diese Prozessierung bewerkstelligt (Abbildung 25). Desweiteren wurde festgestellt, dass auch C24 dazu in der Lage ist, die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte des nicht-korrelierenden (nicht in C24 vorliegenden) *ccmC*-Genotyps einzuleiten. So hat etwa die stabile Integration von *RPF3*(C24) in *rpf3-1* die Reifung der Col-typischen *ccmC*-Transkripte zur Folge (Abbildung 20B).

Auf Grund dieser Feststellungen liegt die Vermutung nahe, dass jeder Ökotyp über die nötigen Proteine verfügt, um prinzipiell mit beiden mitochondrialen *ccmC*-Genotypen umzugehen. Um dies zu überprüfen, wurden einmal mehr Kreuzungen durchgeführt, wobei im vorliegenden Fall die zur korrekten *ccmC*-mRNA-Prozessierung unfähigen Ökotypen des Col-*ccmC*-Genotyps mit Ökotypen des C24-*ccmC*-Genotyps, ebenfalls mit fehlerhafter *ccmC*-mRNA-Prozessierung, reziprok gekreuzt wurden. Anhand einer CR-RT-PCR-Analyse wurden die vorliegenden *ccmC*-Transkripte der F_1-Pflanzen charakterisiert. In den F_1-Pflanzen, die einer Kreuzung von Lip-0 oder Ta mit Ökotypen des C24-*ccmC*-Genotyps entstammen, tritt analog zu Col ein ca. 470 bp großes PCR-Produkt auf (Abbildung 31A, F_1 Lip-0 x Ms-0, F_1 Ta x Kas-1 oder Rube). Das Kern-Genom von Kas-1, Ms-0 und Rube ist folglich dazu in der Lage, die korrekte Prozessierung der Col-typischen *ccmC*-Transkripte zu vermitteln. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den F_1-Pflanzen aus der Kreuzung zwischen Ms-0 und Ta bzw. Rube und Lip-0. Hier kann in der CR-RT-PCR-Analyse jeweils ein PCR-Produkt gleicher Größe wie in C24 detektiert werden (Abbildung 31B, F_1 Ms-0 x Ta, F_1 Rube x Lip-0).

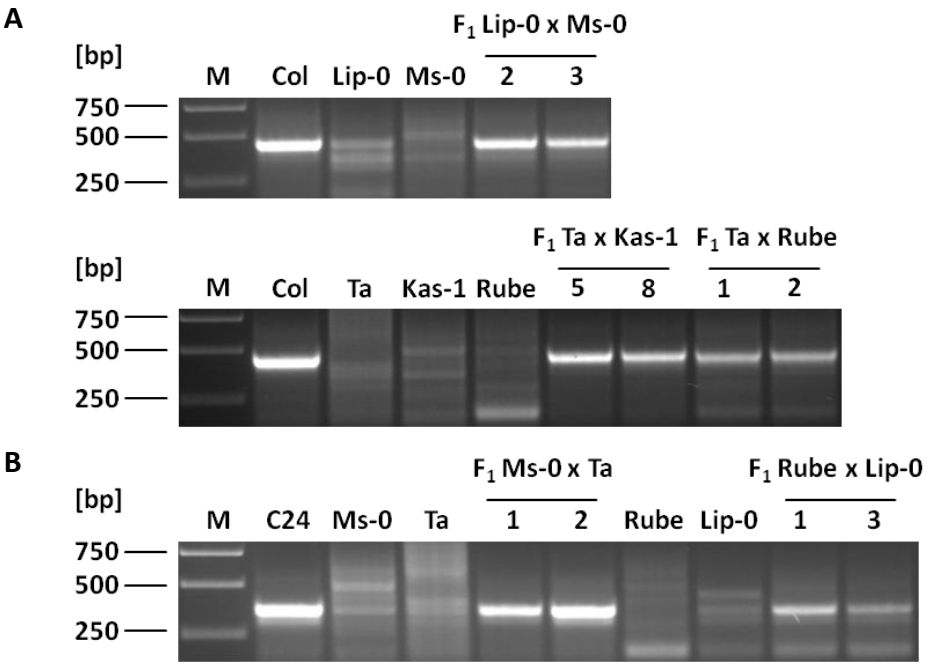


Abbildung 31: Die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte wird durch das Kerngenom des nicht-korrelierenden *ccmC*-Genotyps vermittelt. CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte in F_1-Pflanzen aus Kreuzungen von Ökotypen mit defekter *ccmC*-mRNA-Prozessierung, wobei als Eizell-Donor Ökotypen des Col- **(A)** bzw. C24-*ccmC*-Genotyps **(B)** und als Pollen-Donor Ökotypen des nicht-korrelierenden *ccmC*-Genotyps verwendet wurden. Die betrachteten Ökotypen sowie F_1-Pflanzen sind oberhalb der Bildausschnitte angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden.

Anhand der Ausführungen wird deutlich, dass jeder der hier untersuchten Ökotypen grundsätzlich dazu in der Lage ist ausgehend von beiden *ccmC*-Genotypen reife *ccmC*-Transkripte zu bilden.

3.2.12. RPF3 und RPF6 - zwei ähnliche Proteine

Die bisherigen Daten deuten an, dass der vorliegende *ccmC*-Genotyp darüber entscheidet, ob die Prozessierung durch RPF3 oder durch RPF6 erfolgt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung der Proteine an die zwischen Col und C24 diskriminierende Sequenz stromaufwärts der Prozessierungsstellen erfolgt (Abbildung 12). Mit der Annahme, dass die AS an Position 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) der Repeats den Ort der RNA-Bindung festlegen [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a], konnte für beide Proteine eine vermeintliche Bindungsstelle innerhalb der den *ccmC*-Genotyp definierenden Sequenz identifiziert werden (Abbildung 12; Abbildung 32). Dabei fällt auf, dass die vermeintlichen Bindungsstellen von RPF3(Col) und RPF6(Col) an mehreren Positionen identische Nukleotide aufweisen (Abbildung 32, unterstrichene Nukleotide). Dies ist wohl mit einer zu 86 % identischen AS-Sequenz zwischen RPF3 und RPF6 zu erklären (Anhang 9) und weist darauf hin, dass die Spezifität vermutlich nur von einzelnen Interaktionen zwischen RNA und RPF3 bzw. RPF6 abhängt.

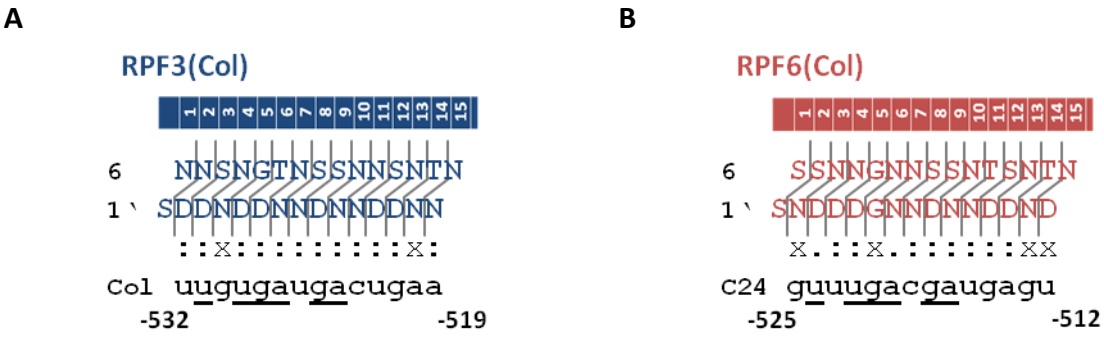


Abbildung 32: Vorhergesagte Bindung von RPF3(Col) und RPF6(Col) an die *ccmC*-mRNA. Die AS an Position 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) der 15 Repeats sind im Einbuchstabencode angegeben. Es sind die Interaktionen zwischen RPF3(Col) und Nukleotiden der Col-*ccmC*-mRNA im Bereich von -532 bis -519 (Position relativ zum Translations-Startkodon) **(A)** sowie zwischen RPF6(Col) und Nukleotiden der C24-*ccmC*-mRNA im Bereich von -525 bis -512 **(B)** dargestellt. Identische Nukleotide zwischen den vorhergesagten Bindungssequenzen von RPF3(Col) und RPF6(Col) sind unterstrichen. Weitere Angaben können Abbildung 8 entnommen werden.

Anhand der Betrachtung der AS-Sequenzen von RPF3 und RPF6 wird weiter deutlich, dass sich die Proteine am N-Terminus im Vergleich zum C-Terminus stärker unterscheiden (Anhang 9). Um zu überprüfen, ob für die spezifische RNA-Bindung sowohl der N- als auch der C-terminale Teil der Proteine benötigt wird, wurden chimäre Gene ausgehend von *RPF3* und *RPF6* generiert. In diesen sind der 5‘-flankierende Bereich sowie der 5‘-Bereich des *RPF3*- bzw. *RPF6*-Leserasters mit dem 3‘-Bereich des *RPF6*- bzw. *RPF3*-Leserasters inklusive der entsprechenden 3‘-flankierenden Sequenz kombiniert (Abbildung 33A).

Die chimären Gene wurde durch eine Überlapp-PCR ausgehend von *RPF3* und *RPF6* mit den in Tabelle 16 aufgelisteten Primern erzeugt. Nach dem Verdau mit *Asc*I und *Pac*I, wurden die Gene in pMDC100 sowie pMDC123 kloniert (Anhang 1A). Mit dem Ziel die Funktionalität der chimären Gene bezüglich der Erzeugung reifer *ccmC*-Transkripte wie in Col bzw. C24 zu überprüfen, wurden Erstere stabil über einen *Floral Dip* in *rpf3-1* (pMDC100-Konstrukte) bzw. die natürliche *RPF6*-Mutante No-0 (pMDC123-Konstrukte) transformiert.

Tabelle 16: Verwendete Primer zur Klonierung von *RPF3N/6C* und *RPF6N/3C*.

	PCR 5'-Bereich	**PCR 3'-Bereich**	**Überlapp-PCR**
RPF3N/6C	Bereich aus ***RPF3*(Col)**: At1g62930-kompl.H + RPF3_6Chimär.R2	Bereich aus ***RPF6*(Col)**: RPF3_6Chimär.H2 + At1g63130-kompl.R	At1g62930-kompl.H + At1g63130-kompl.R
RPF6N/3C	Bereich aus ***RPF6*(Col)**: At1g63130-kompl.H + RPF3_6Chimär.R2	Bereich aus ***RPF3*(Col)**: RPF3_6Chimär.H2 + At1g62930.R	At1g63130-kompl.H + At1g62930-kompl.R2

Abhängig vom Transformations-Konstrukt erfolgte die Selektionierung transformierter Pflanzen auf Erde durch das Besprühen mit Basta® (pMDC123-Konstrukte) oder auf MS-Platten durch den Zusatz von Kanamycin (pMDC100-Konstrukte). Die Aufnahme des jeweiligen Transformations-Konstrukte wurde durch eine PCR mit den Primern At1g62930.A und At1g63130.D (*RPF3N/6C*) bzw. At1g63130.H und At1g62930.I (*RPF6N/3C*) überprüft.

Anhand der Bindungsvorhersagen wird deutlich, dass der C-terminale Teil von RPF3N/6C ein ähnliches Bindungsvermögen an die *ccmC*-mRNA aus Col aufweist wie RPF3, wobei allerdings zwei zusätzliche AS-Paare gemäß dem postulierten Erkennungscode nicht mit der *ccmC*-mRNA interagieren (Abbildung 32A; Abbildung 33A, oben links). Im Gegensatz dazu scheint der N-Terminus von RPF6N/3C kaum mit der *ccmC*-mRNA aus Col zu interagieren, da hier lediglich eine Interaktionsstelle, die eine hohe Übereinstimmung mit dem beschriebenen Code aufweist, auftritt (Abbildung 33A, oben rechts). Beim N-Terminus von RPF3 ist dies dagegen an fünf Positionen der Fall (Abbildung 32A). Ein Vergleich der chimären Proteine mit RPF6 macht deutlich, dass RPF6N/3C vermutlich ähnlich wie RPF6 an die C24-*ccmC*-mRNA binden kann (Abbildung 32B; Abbildung 33A untern rechts). Die vorhergesagten Bindungen der N-Termini von RPF6 und RPF3N/6C an die *ccmC*-mRNA aus C24 unterscheiden sich dagegen, wobei auffällt, dass die Interaktion von RPF3N/6C im Vergleich zu RPF6 vermeintlich stärker ist (Abbildung 32B; Abbildung 33A, untern links).

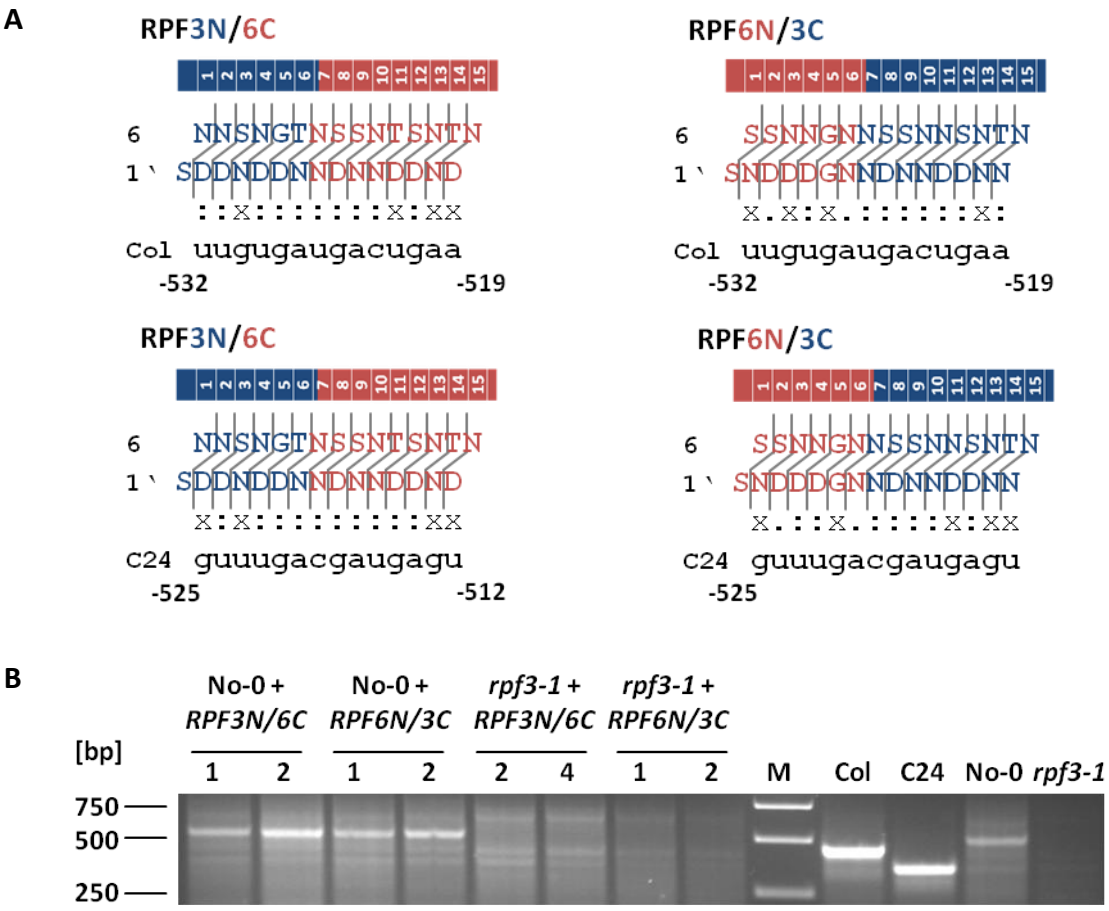


Abbildung 33: Der N- und der C-Terminus von RPF3 und RPF6 können sich nicht gegenseitig funktional ersetzen. A: Vorhergesagtes Bindungsvermögen der chimären Proteine RPF3N/6C (links) und RPF6N/3C (rechts) an die *ccmC*-mRNA des Col- (oben) bzw. C24-*ccmC*-Genotyps (unten). Die chimären Proteine setzen sich aus Teilen von RPF3(Col), in blau dargestellt, und aus Teilen von RPF6(Col), in rot dargestellt, zusammen, wobei der C-terminale Teil die AS bis Repeat 7 Position 1 und der N-terminale die restlichen AS beinhaltet. Weitere Angaben können Abbildung 32 entnommen werden. **B:** CR-RT-PCR-Analyse der *ccmC*-Transkripte in mit *RPF3N/6C* und *RPF6N/3C* transformierten No-0- und *rpf3-1*-Pflanzen. Die verwendeten Referenzproben sind oberhalb des Bildausschnitts angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden.

Diese Betrachtungen lassen vermuten, dass trotz der beschriebenen Unterschiede zwischen den chimären und Wildtyp-Proteinen, zumindest RPF3N/6C analog zu RPF3 und RPF6N/3C analog zu RPF6 die *ccmC*-mRNA-Reifung beeinflusst. Die C-terminalen Bereiche von RPF3 bzw. RPF6 scheinen daher im Gegensatz zu den N-terminalen Bereichen nicht wichtig für die Funktion der Proteine zu sein. Eine CR-RT-PCR-Analyse bezüglich *ccmC* widerlegt allerdings diese Annahme. Die T_1-Pflanzen zeigen jeweils das gleiche PCR-Muster wie die untransformierten Pflanzen (Abbildung 33B). Keines der chimären Proteine ist folglich dazu fähig die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte in No-0 oder *rpf3-1* einzuleiten. Somit scheinen sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich der Proteine wichtig für deren Funktionalität zu sein.

Auf Grundlage der bisherigen *in silico*-Daten wird eine Bindung von RPF3 und RPF6 innerhalb der zwischen Col und C24 diskriminierenden Region stromaufwärts der 5‘-Enden vermutet.

Weiter ist davon auszugehen, dass die spezifische Bindung an die *ccmC*-mRNA sowohl durch den C- als auch den N-terminalen Teil der Proteine vermittelt wird.

3.2.13. Überexpression und Aufreinigung rekombinanter RPF3- und RPF6-Proteine

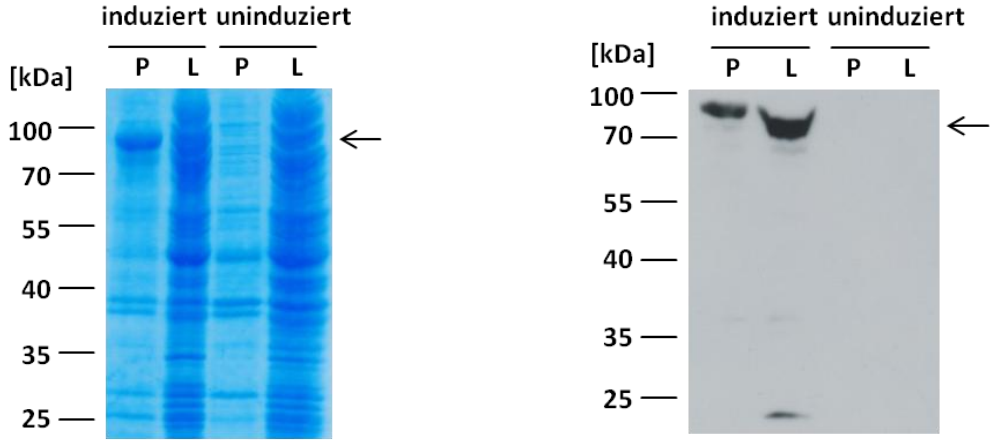
Die bisherigen Daten zur Bindung von RPF3 und RPF6 an die *ccmC*-mRNA beruhen lediglich auf *in silico*-Vorhersagen. Um diese durch *in vitro*-Analysen zu verifizieren, werden rekombinante Proteine benötigt, wobei um 23 (rRPF3) bzw. 24 AS (rRPF6) N-terminal verkürzte Proteine zum Einsatz kommen. Diese sollen die in den Mitochondrien vorliegenden nativen Proteine imitieren.

Zur Erzeugung des RPF6-Überexpressions-Konstrukts wurde das unter Verwendung der Primer At1g63130UEx.H und At1g63130UEx.R amplifizierte PCR-Produkt mit *BamH*I und *Sal*I verdaut und in pET32a kloniert. Desweiteren konnte auf ein bereits kloniertes RPF3-Überexpressions-Konstrukt zurückgegriffen werden [Christian Jonietz und Stefan Binder]. Beide Klonierungsstrategien wurden so gewählt, dass N-terminal verkürzte Proteine mit verschiedenen Tags (u.a. His-Tag) am N-Terminus generiert werden. Auf Grund des mit eingebrachten Stoppkodons verfügen die rekombinanten Proteine über keine weiteren Tags am C-Terminus (Anhang 1B, oben) und werden nachfolgend mit $rRPF6^{N(His)}$ bzw. $rRPF3^{N(His)}$ bezeichnet.

Um festzustellen, bei welcher Temperatur $rRPF6^{N(His)}$ löslich ist, wurden 50 ml Kulturen bei 22, 30 und 37 °C kultiviert. Die Überexpression von $rRPF3^{N(His)}$ erfolgte lediglich bei 28 °C. Die erste Analyse der exprimierten Proteine anhand einer Coomassie-Färbung lässt keine Aussage darüber zu, ob die rekombinanten Proteine löslich sind (Abbildung 34, links). Durch eine Western-Blot-Analyse mit anschließender His-Tag-Detektion können dagegen beide Proteine auf Grund von Signalen der erwarteten Größe (apparentes Molekulargewicht ca. 87,5 Kilodalton (kDa)) in den löslichen Fraktionen detektiert werden, wobei $rRPF6^{N(His)}$ bei 22 und 30 °C vergleichbar löslich ist (Abbildung 34, rechts, Pfeil).

Sowohl $rRPF6^{N(His)}$ als auch $rRPF3^{N(His)}$ sind zu einem gewissen Teil löslich. Auf Grundlage der bisherigen Experimente, werden die nachfolgenden Überexpressionen von $rRPF6^{N(His)}$ bei 30 °C durchgeführt.

A rRPF3$^{N(His)}$



B rRPF6$^{N(His)}$

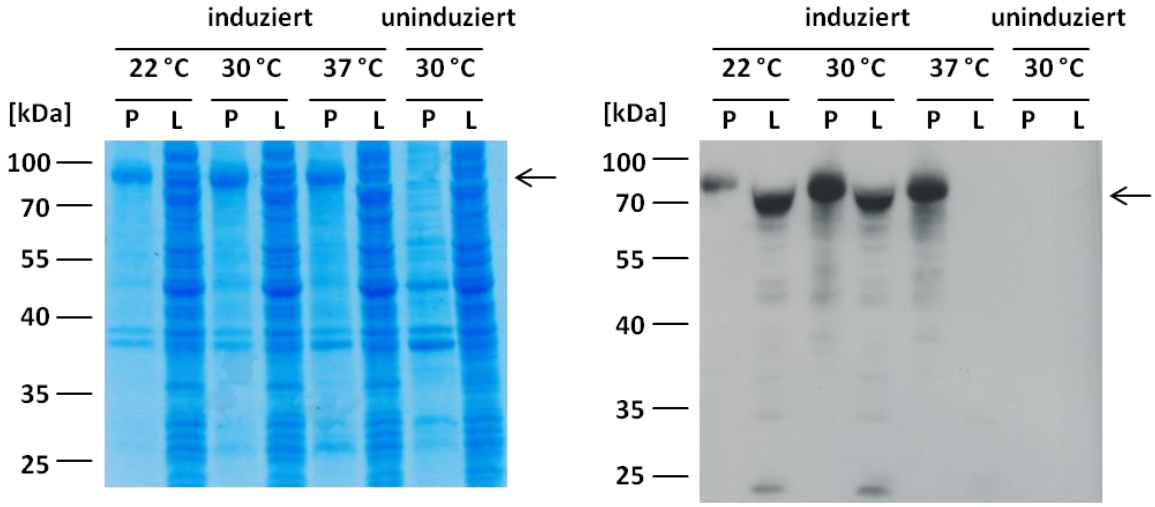


Abbildung 34: Die rekombinanten Proteine sind löslich. Die Überexpression von rRPF3$^{N(His)}$ **(A)** sowie die Inkubation der uninduzierten Kultur erfolgten bei 28 °C. Die Überexpression von rRPF6$^{N(His)}$ **(B)** erfolgte bei 22, 30 und 37 °C. Die uninduzierte Kultur wurde bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, wobei 30 µg (Coomassie-Gele, links) sowie von rRPF6$^{N(His)}$ 100 µg und von rRPF3$^{N(His)}$ 85 µg Lysat-Protein (Gele für Western-Blot-Analyse, rechts) verwendet wurden. Vom aufgekochten Zellpellet wurden jeweils 10 µl eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen den N-terminalen His-Tag. Der Pfeil am rechten Rand kennzeichnet die überexprimierten Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 87,5 kDa. Am linken Rand sind die Größen der Protein-Fragmente des PageRuler™ Prestained Protein Ladder in Kilodalton (kDa) angegeben. P: Pellet. L: Lysat.

Ausgehend von einer weiteren Überexpression mit einer 200 ml Hauptkultur wurde rRPF6$^{N(His)}$ unter Verwendung von Protino® Ni-NTA Agarose aufgereinigt (siehe 2.2.4.5.). Die anschließende Analyse über eine Coomassie-Färbung zeigt, dass in den Eluaten neben dem vermeintlich aufgereinigten rRPF6$^{N(His)}$ noch eine Vielzahl an weiteren Proteinen enthalten ist (Abbildung 35, links). Zusätzlich wurde eine His-Tag-Detektion durchgeführt. In allen drei Eluaten wird ein Signal bei etwa 90 kDa, welches das aufgereinigte rRPF6$^{N(His)}$ anzeigt, erhalten (Abbildung 35, rechts, Pfeil). Zusätzlich tritt jeweils ein Signal bei ca. 25 kDa auf (Abbildung 35, rechts).

rRPF6$^{N(His)}$

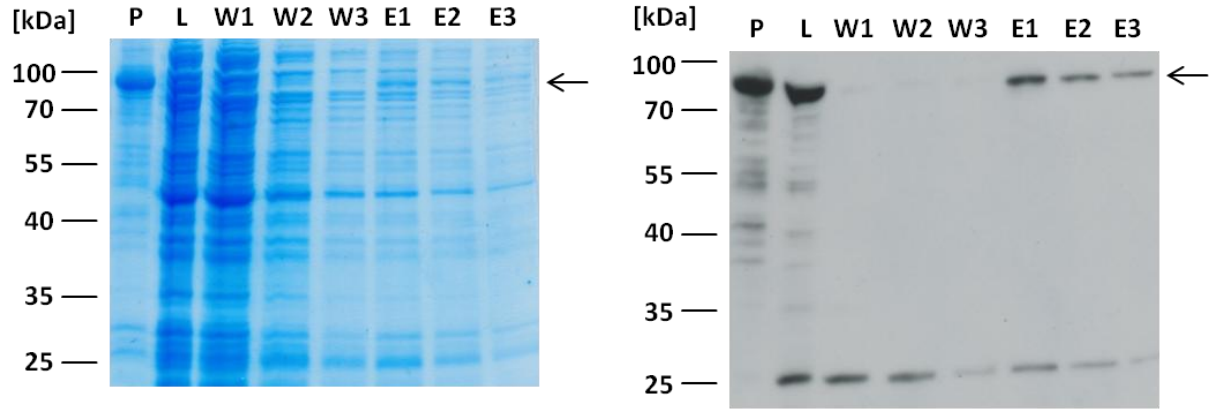


Abbildung 35: His-Tag-Aufreinigung des löslichen rRPF6$^{N(His)}$. Ausgehend von einer 200 ml Hauptkultur wurde rRPF6$^{N(His)}$ mit Protino® Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Als Proben wurden 30 µg (Coomassie-Gel, links) bzw. 45 µg Lysat-Protein (Gel für Western-Blot-Analyse, rechts), 5 µl aufgekochtes Zellpellet und je 22,5 µl der einzelnen Proben aus der His-Tag-Aufreinigung verwendet. W: Probe Waschschritt. E: Eluat. Weitere Angaben können Abbildung 34 entnommen werden.

Die Analysen zeigen, dass nach der His-Tag-Aufreinigung neben rRPF6$^{N(His)}$ auch viele andere Proteine in den finalen Proben enthalten sind. Dieser Sachverhalt macht einen weiteren Aufreinigungsschritt zwingend notwendig.

rRPF6$^{N(His)}$

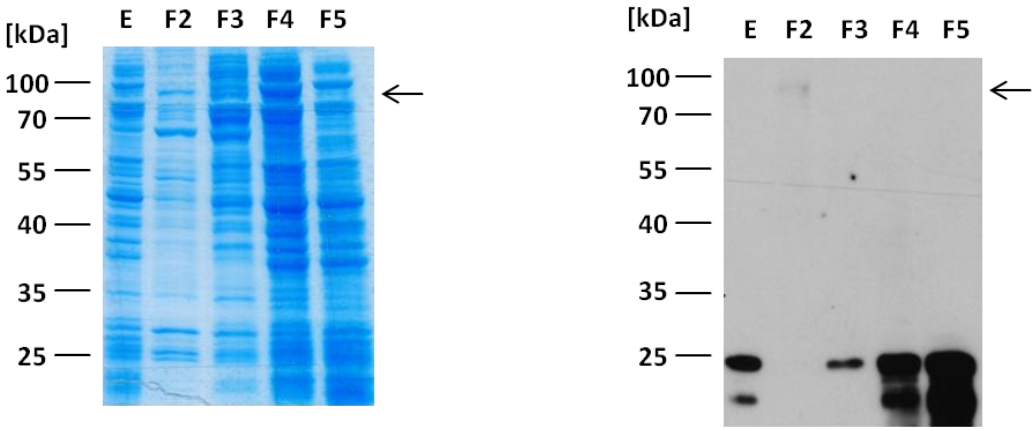


Abbildung 36: Gelchromatografische Aufreinigung der nach der His-Tag-Aufreinigung erhaltenen Eluate. Ausgehend von einer 4 l Überexpressionskultur wurde rRPF6$^{N(His)}$ zunächst mit Protino® Ni-NTA Agarose und dann gelchromatografisch aufgereinigt. Zum Vergleich wurde neben den Fraktionen 2 bis 5 (F2 bis F5) auch das zur gelchromatogratischen Aufreinigung verwendete aufkonzentrierte Eluat (E) geladen. Unter der Annahme, dass die gelchromatografische Aufreinigung eine gleichmäßige Verteilung der Proteine in den einzelnen Fraktionen zur Folge hat, wurde in allen Spuren in etwa die gleiche Proteinmenge geladen. Die Proben wurden über eine Coomassie-Färbung (links) sowie eine His-Tag-Detektion (rechts) charakterisiert. Weitere Angaben können Abbildung 34 entnommen werden.

Um auch nach zwei Aufreinigungsschritten eine entsprechende Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhalten, wurde das Volumen der Überexpressionskultur auf 4 l erhöht. Im Anschluss an die His-Tag-Aufreinigung wurden in einem zweiten Aufreinigungsschritt 70 µl der aufkonzentrierten Eluate über Superdex™ 200 5/150 GL gelchromatografisch aufgetrennt, wobei 10 Fraktionen à 400 µl erhalten wurden (siehe 2.2.4.5. und 2.2.4.6.). Auf Grund eines

internen Standards der Gelchromatografie wird rRPF6$^{N(His)}$ in Fraktion 2 oder 3 erwartet. Diese sowie die Fraktionen 4 und 5 wurden über eine Coomassie-Färbung und eine Western-Blot-Analyse mit anschließender His-Tag-Detektion charakterisiert. Anhand der Coomassie-Färbung wird ersichtlich, dass trotz der gelchromatogratischen Aufreinigung Proteine aller Größen in den betrachteten Fraktionen vorliegen (Abbildung 36, links). Es kann allerdings ein leichter Trend von links nach rechts hin zu kleineren Proteinen beobachtet werden. Dies zeigt sich auch mit der His-Tag-Detektion. So werden lediglich in den Fraktionen 3 bis 5 Signale von 25 bzw. < 25 kDa erhalten (Abbildung 36, rechts). Im Gegensatz dazu weist ein schwaches Signal bei ca. 90 kDa auf rRPF6$^{N(His)}$ in Fraktion 2 hin (Abbildung 36, rechts, Pfeil).

Trotz eines Überexpressionsvolumens von 4 l können nach zwei Aufreinigungsschritten nur minimale Mengen an rRPF6$^{N(His)}$ detektiert werden. Dabei muss allerdings davon ausgegangen werden, dass die entsprechende Probe (Abbildung 36, Fraktion 2) noch eine Vielzahl weiterer Proteine enthält und rRPF6$^{N(His)}$ somit nur einen geringen Prozentsatz in dieser ausmacht.

Mit dem Ziel schon nach einem Aufreinigungsschritten mehr und vor allem reineres Protein zu erhalten, wurden weitere Überexpressions-Konstrukte mit einem zusätzlichen Strep-Tag am C-Terminus erzeugt (Anhang 1B, unten). Diese rekombinanten Proteine werden in den nachfolgenden Abschnitten mit rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ bzw. rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ bezeichnet. Zur Herstellung der neuen Konstrukte wurden die 5‘-verkürzten Gene unter Verwendung der Primer At1g62930UEx.H2 und At1g62930UEx.R2 (rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$) bzw. At1g63130UEx.H und At1g63130UEx.R1 (rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$) amplifiziert, mit *BamH*I und *Xho*I (rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$) bzw. *BamH*I und *Sal*I (rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$) verdaut und in pET32a kloniert (Anhang 1B, unten). Desweiteren wurde der Strep-Tag über eine PCR mit T7prom und pET32aStrep.rück und anschließendem *Xba*I- und *Sal*I-Verdau in pET32a kloniert. Dieses Konstrukt soll in nachfolgenden Bindungsstudien als Negativkontrolle dienen und wird mit pET32a^{Strep} bezeichnet.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Strep-Tag die Löslichkeit der rekombinanten Proteine beeinflusst, wurde die Überexpression zunächst mit 50 ml Kulturen bei 22, 30 und 37 °C durchgeführt. Erneut kann mit einer Coomassie-Färbung die Löslichkeit der exprimierten Proteine nicht beurteilt werden (Abbildung 37, links). Dagegen werden durch eine Western-Blot-Analyse mit nachfolgender His-Tag-Detektion beide Proteine anhand von Signalen der erwarteten Größe (apparentes Molekulargewicht ca. 88,7 kDa) in der löslichen Fraktion

detektiert (Abbildung 37, rechts, Pfeil). Die Löslichkeit von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ scheint bei 30 °C am besten zu sein.

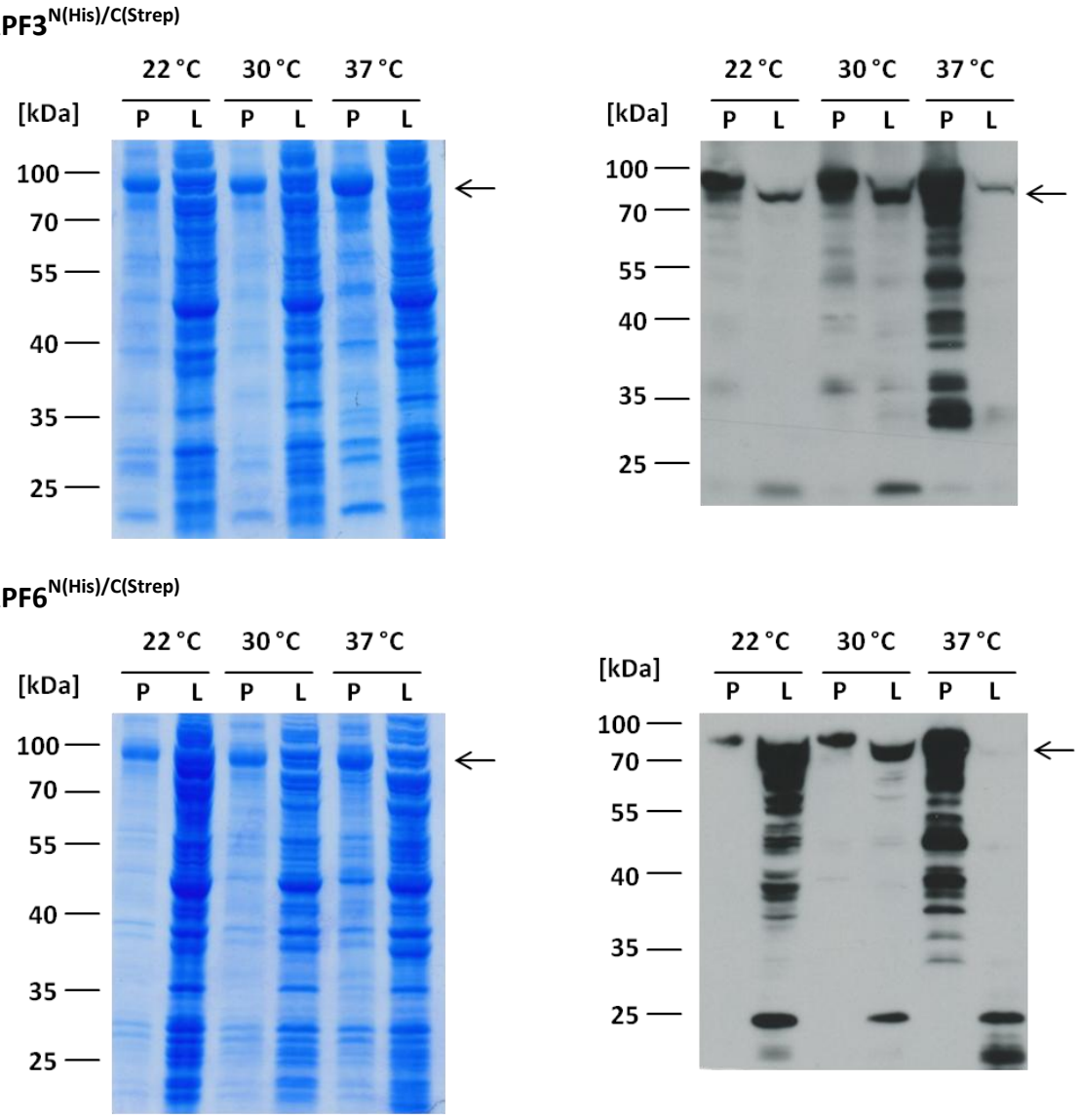


Abbildung 37: Der Step-Tag beeinträchtigt die Löslichkeit der rekombinanten Proteine nicht. Die Überexpression von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ **(A)** sowie rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ **(B)** erfolgte bei 22, 30 und 37 °C. Als Proben wurden 5 µl aufgekochtes Zellpellet, 30 µg (Coomassie-Gele, links) sowie von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ 100 µg und von rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ 58,5 µg Lysat-Protein (Gele für Western-Blot-Analyse, rechts) verwendet. Der Pfeil am rechten Rand kennzeichnet die überexprimierten Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 88,7 kDa. Weitere Angaben können Abbildung 34 entnommen werden.

Die Löslichkeit der rekombinanten Proteine ist durch den C-terminalen Strep-Tag nicht beeinträchtigt. Auf Grund der beobachteten Löslichkeit von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$, erfolgen die weiteren Überexpressionen bei 30 °C.

Im weiteren Verlauf wurden die rekombinanten Proteine ausgehend von einer 2 l Kultur mit Hilfe der Gravity flow *Strep*-Tactin® Sepharose® column aufgereinigt (siehe 2.2.4.7.). Anhand der Coomassie-Färbung werden jeweils im Eluat 2 und 3 Signale der erwarteten Größe von

ca. 88,7 kDa erhalten (Abbildung 38, links, Pfeil). Neben diesen Signalen treten durch die Färbung noch geringe Mengen weiterer Proteine unterschiedlicher Größe auf (Abbildung 38, links). Analog zur Coomassie-Färbung werden auch durch eine His-Tag-Detektion rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ in den Eluaten 2 und 3 detektiert, wobei jeweils im Eluat 2 ein stärkeres Signal erhalten wird (Abbildung 38, rechts, Pfeil). Signale < 25 kDa treten lediglich im Lysat sowie im Waschschritt 1 auf (Abbildung 38, rechts).

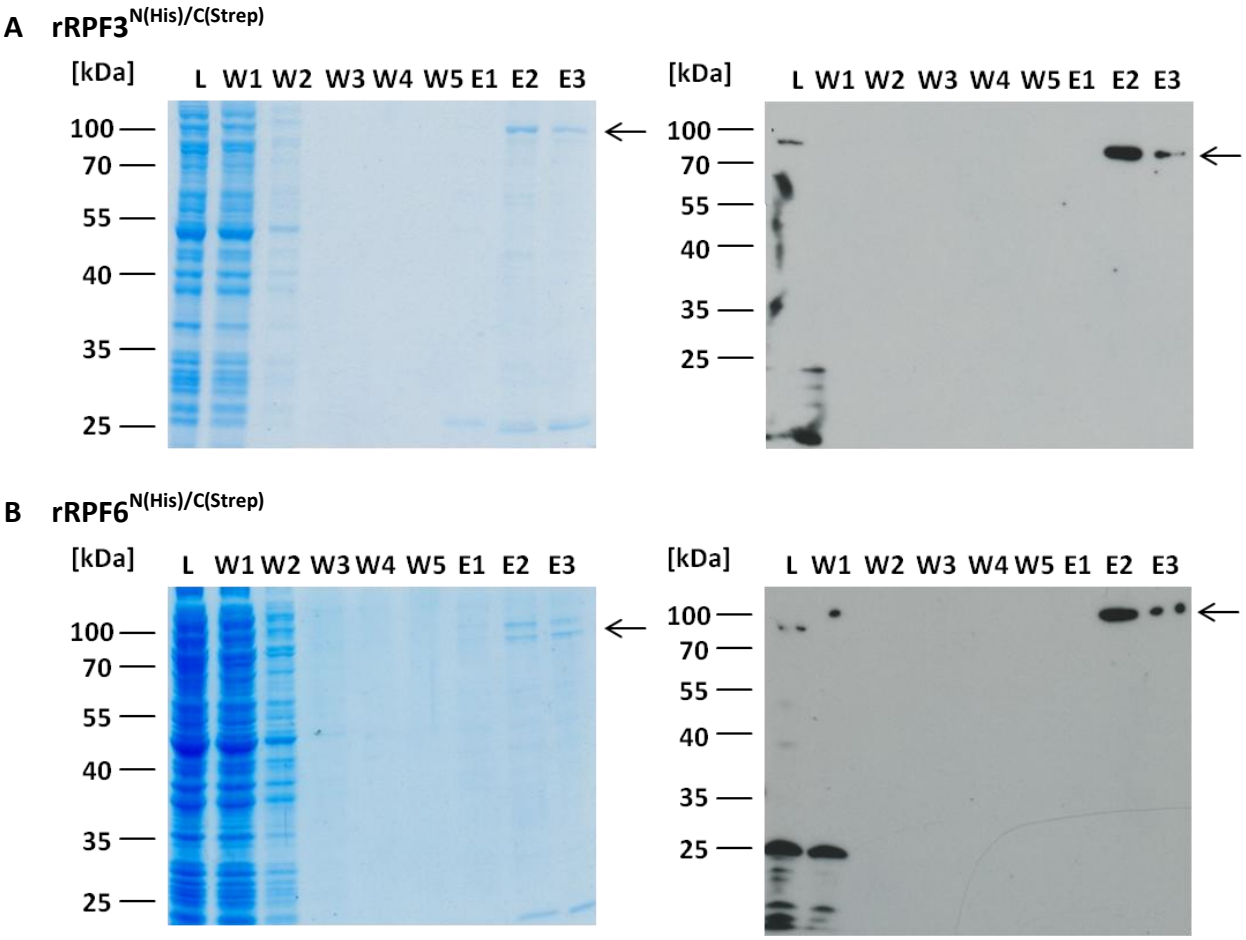


Abbildung 38: Strep-Tag-Aufreinigung von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$. Ausgehend von einer 2 l Hauptkultur wurden rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ **(A)** und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ **(B)** mit einer Gravity flow *Strep*-Tactin® Sepharose® column aufgereinigt. Als Proben wurden 10 µg Lysat-Protein sowie 2 µl der Waschschritte (W1-W5) und 20 µl der Eluate (E1-E3) aus der Strep-Tag-Aufreinigung verwendet. Die Proben wurden über eine Coomassie-Färbung (links) sowie eine His-Tag-Detektion (rechts) charakterisiert. Weitere Angaben können Abbildung 37 entnommen werden.

Die finalen Proben der Strep-Tag-Aufreinigung enthalten neben rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ nur geringe Mengen weiterer Proteine. Die aufgereinigten rekombinanten Proteine werden daher für die nachfolgenden Bindungsstudien verwendet.

3.2.14. Bindung von RPF3 und RPF6 an die *ccmC*-mRNA

Auf Grund der *in silico*-Vorhersagen wird vermutet, dass RPF3(Col) im Bereich von -532 bis -519 (Position relativ zum Translations-Startkodon) und RPF6(Col) im Bereich von -525 bis -

512 an die *ccmC*-mRNA binden (Abbildung 32). Für die *in vitro*-Analysen werden Transkripte herangezogen, die die vermeintlichen Bindungsstellen enthalten und eine Länge von 30 nt aufweisen (Abbildung 39). Als Proteine werden die rekombinanten Proteine rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ (siehe 3.2.13.) verwendet. Zur Kontrolle werden die Bindungsstudien mit dem analog aufgereinigten pET32a^{Strep} (Daten nicht gezeigt) durchgeführt.

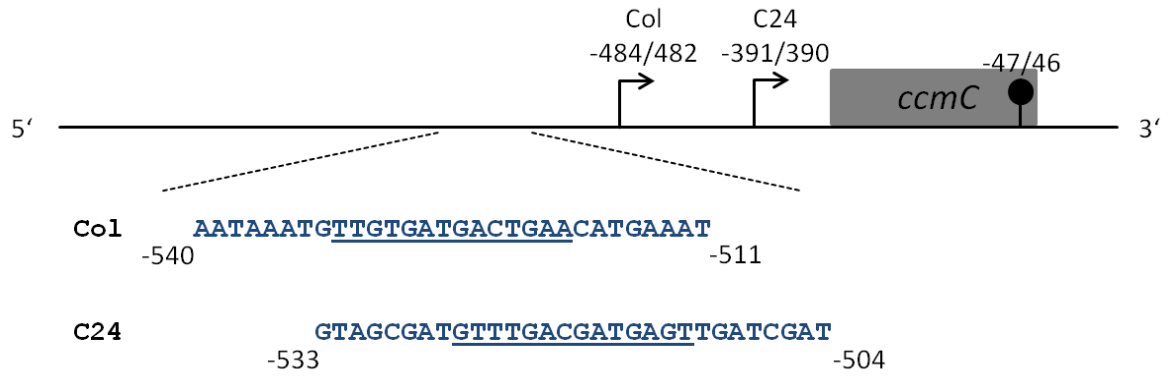


Abbildung 39: Verwendete *ccmC*-Transkripte für RNA-Protein-Bindungsstudien. Die Transkripte umfassen den Bereich von -540 bis -511 (Col, oben; Angaben relativ zum Translations-Startkodon) bzw. von -533 bis -504 (C24, unten) und sind jeweils 30 nt lang. Die vermeintlichen Bindungsstellen von RPF3 (Col, oben) bzw. RPF6 (C24, unten) sind unterstrichen. Weitere Angaben können Abbildung 12 entnommen werden

Anhand der Bindungsstudien wird ersichtlich, dass rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ an das Col-*ccmC*-Transkript binden kann. Dies wird durch das Auftreten eines Protein-RNA-Komplexes deutlich (Abbildung 40A, PR1). Demgegenüber kann auch bei Einsatz von rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ und dem Col-*ccmC*-Transkript ein Protein-RNA-Komplex detektiert werden, wobei die Intensität im Vergleich zum rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$/Col-*ccmC*-Transkript-Komplex (Abbildung 40A, PR1) schwächer ist (Abbildung 40B, PR2). Es deutet sich weiter an, dass die rekombinanten Proteine jeweils auch eine Bindung mit dem C24-*ccmC*-Transkript eingehen. Unter Verwendung beider Proteine treten Protein-RNA-Komplexe auf, wobei die Intensität des detektierten Signals bei Verwendung von rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ stärker ist (Abbildung 41A, PR3; Abbildung 41B, PR4). Allen Bindungsexperimenten ist gemein, dass die Protein-RNA-Komplexe lediglich bei einer Proteinmenge von 5 µg auftreten. In den Kontrollen mit pET32a^{Strep} kann jeweils kein Protein-RNA-Komplex detektiert werden (Abbildung 40C; Abbildung 41C).

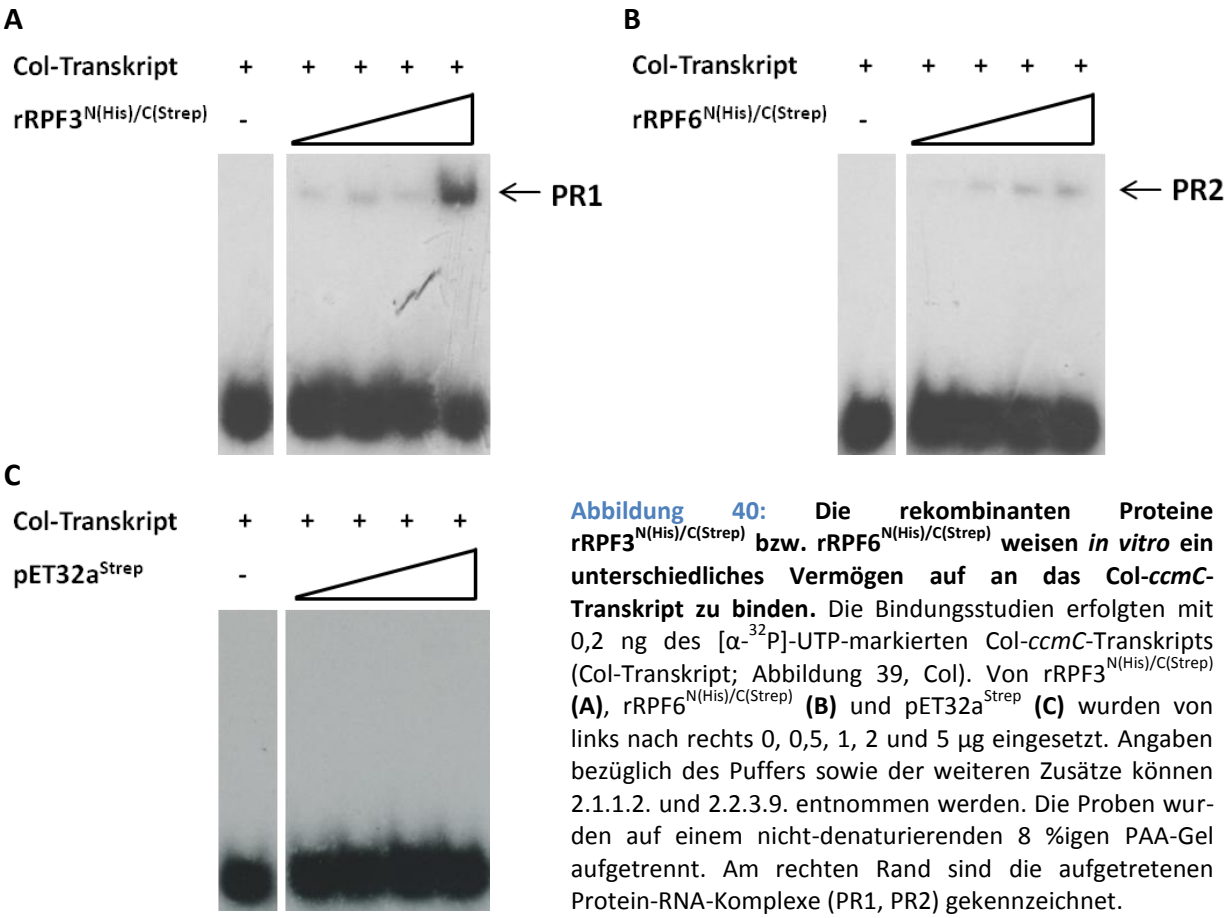


Abbildung 40: Die rekombinanten Proteine rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ bzw. rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ weisen *in vitro* ein unterschiedliches Vermögen auf an das Col-*ccmC*-Transkript zu binden. Die Bindungsstudien erfolgten mit 0,2 ng des [α-^{32}P]-UTP-markierten Col-*ccmC*-Transkripts (Col-Transkript; Abbildung 39, Col). Von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ **(A)**, rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ **(B)** und pET32a^{Strep} **(C)** wurden von links nach rechts 0, 0,5, 1, 2 und 5 µg eingesetzt. Angaben bezüglich des Puffers sowie der weiteren Zusätze können 2.1.1.2. und 2.2.3.9. entnommen werden. Die Proben wurden auf einem nicht-denaturierenden 8 %igen PAA-Gel aufgetrennt. Am rechten Rand sind die aufgetretenen Protein-RNA-Komplexe (PR1, PR2) gekennzeichnet.

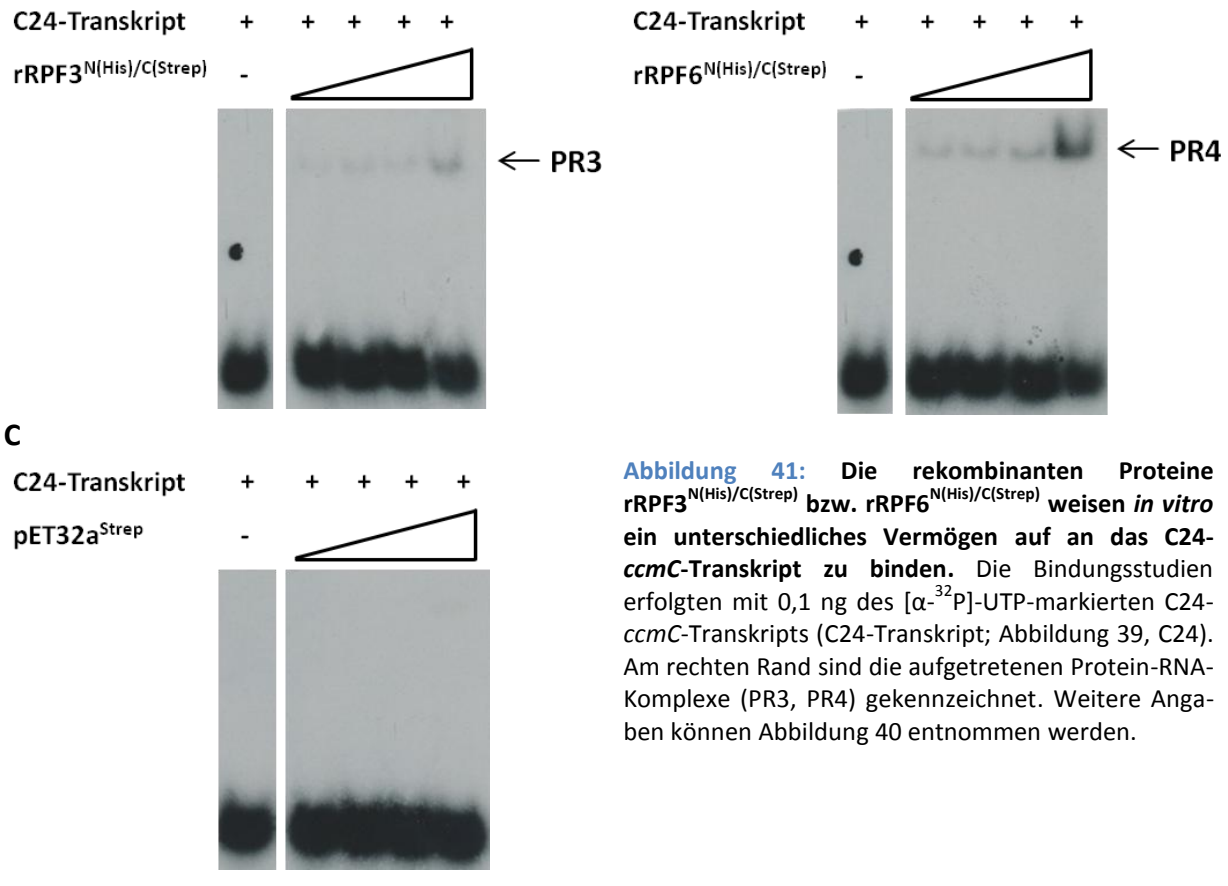


Abbildung 41: Die rekombinanten Proteine rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ bzw. rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ weisen *in vitro* ein unterschiedliches Vermögen auf an das C24-*ccmC*-Transkript zu binden. Die Bindungsstudien erfolgten mit 0,1 ng des [α-^{32}P]-UTP-markierten C24-*ccmC*-Transkripts (C24-Transkript; Abbildung 39, C24). Am rechten Rand sind die aufgetretenen Protein-RNA-Komplexe (PR3, PR4) gekennzeichnet. Weitere Angaben können Abbildung 40 entnommen werden.

Die *in vitro*-Analysen weisen zunächst darauf hin, dass sowohl rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ als auch rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ mit der *ccmC*-mRNA im Bereich der vorhergesagten Bindungsstellen interagieren. Es deutet sich allerdings an, dass die rekombinanten Proteine nicht spezifisch nur an eines der beiden *ccmC*-Transkripte binden. Die durchgeführten *Electro-Mobility-Shift-Assays* lassen jedoch den Schluss zu, dass die vermeintliche Bindung der rekombinanten Proteine an die jeweils korrelierende RNA, d.h. im Fall von rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ an das Col-*ccmC*-Transkript und im Fall von rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ an das C24-*ccmC*-Transkript, im Vergleich zur nicht-korrelierenden RNA stärker ist. Um diese Annahme zu unterstützen sind Kompetitionsassays notwendig.

4. Diskussion

4.1. Weitere RF-ähnliche RNA PROCESSING FACTORs sind an der 5‘-Reifung mitochondrialer Transkripte in *Arabidopsis thaliana* beteiligt.

Alle bislang beschriebenen RNA PROCESSING FACTORs (RPFs) gehören der P-Subfamilie der *Pentatricopeptide Repea*t(PPR)-Proteine an [Binder et al. 2013]. Dies trifft auch auf RPF4 und RPF6 zu, denen eine Funktion in der 5‘-Reifung von *ccmB*- bzw. *ccmC*-Transkripten zugeordnet werden konnte.

Verschiedene Analysen zeigen, dass mit At1g62910 bzw. At1g63130 die für RPF4 bzw. RPF6 kodierenden Gene identifiziert wurden. Zum einen konnte ein Zusammenhang zwischen einer defekten 5‘-Prozessierung der *ccmB*- bzw. *ccmC*-Transkripte und einer Region auf dem unteren Arm von Chromosom 1, in der eine Vielzahl an PPR-Genen kodiert ist (u.a. At1g62910, At1g63130, *RPF3*), festgestellt werden. Zum anderen wurde anhand von Komplementationsstudien gezeigt, dass lediglich durch das Einbringen von At1g62910(L*er*) in Col L*er*-typische *ccmB*-Transkripte gebildet werden (Abbildung 7). Analog konnte durch das At1g63130-Allel aus Col die 5‘-Reifung der *ccmC*-Transkripte in No-0 wieder hergestellt werden (Abbildung 25).

Beide Proteine gehören wie auch RPF3 zu den RESTORER OF FERTILITY(RF)-ähnlichen PPR-Proteinen. Analog zu den bisher identifizierten RF-ähnlichen RPFs sind RPF4 und RPF6 an der 5‘-Reifung mitochondrialer Transkripte in einer Vielzahl von *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana)* Ökotypen beteiligt. Die RF-ähnlichen PPR-Proteine zeichnen sich weiter dadurch aus, dass sie wie auch die RFs untereinander sehr ähnlich sind [Desloire et al. 2003]. Als Beispiel kann hier die zu 86 % identische Aminosäure(AS)-Sequenz zwischen RPF3(Col) und RPF6(Col) aufgeführt werden (Anhang 9). Trotz dieser hohen Sequenz-Übereinstimmung beeinflussen RPF3 und RPF6 die 5‘-Reifung unterschiedlicher *ccmC*-Transkripte. Dies deutet an, dass schon einzelne AS über die Spezifität der Proteine entscheiden. Es ist daher davon auszugegehen, dass bereits kleinste Veränderungen in der Nukleotidsequenz der RF-ähnlichen Gene funktionslose Allele zur Folge haben können [Desloire et al. 2003]. Dies zeigt sich etwa darin, dass trotz einer zu 94 % identischen AS-Sequenz zwischen RPF6(Col) und RPF6(No-0) lediglich das Protein aus Col funktional bezüglich der *ccmC*-mRNA-Prozessierung ist (Anhang 8; Abbildung 25). Desweiteren besitzen Lip-0 und Ta RPF3-Proteine, die im Vergleich zum Protein aus Col zu 95 % (Lip-0) bzw. 96 % (Ta) identische AS aufweisen (Anhang 7), jedoch keine (vollständige) RPF3-

typische *ccmC*-mRNA-Reifung vermitteln. Ein ähnliches Szenario tritt auch beim Vergleich der *RPF4*-Allele bzw. RPF4-Proteine aus L*er* und Col auf. Die Allele besitzen zu 92 % identische Nukleotide (Anhang 3). Dies resultiert in Proteinen, deren AS-Sequenz zu 85 % übereinstimmt (Anhang 4), doch nur das Protein aus L*er* ist dazu in der Lage die 5‘-Prozessierung der *ccmB*-Transkripte einzuleiten. Die Betrachtungen legen somit nahe, dass die Funktionalität der RPF4- sowie RPF3- bzw. RPF6-Proteine nur von einzelnen AS abhängt, wobei anzunehmen ist, dass dies bezüglich der *ccmC*-mRNA-Prozessierung stärker ausgeprägt ist. An dieser Stelle muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass der Funktionsverlust der betrachteten RPF3- und RPF6-Proteine auch von der AS-Sequenz unabhängige Ursachen haben kann (Abbildung 21; Abbildung 26; Abbildung 30). Ähnliches kann für RPF4 angenommen werden.

Im Gegensatz zu häufigen, scheinen seltene mitochondriale mRNA-Polymorphismen bzw. Reifungsereignisse, für die keine oder nur wenige natürliche Mutanten bekannt sind, auf PPR-Proteine der P-Subfamilie zurückzuführen zu sein, die keine Ähnlichkeit mit RF-Proteinen zeigen [Binder et al. 2013]. Dies trifft auf RPF5 sowie RPF7 zu [Hauler et al. 2013, Stoll et al. 2014]. Da bislang mit RPF1 bis RPF7 aber erst wenige PPR-Proteine, die in die 5‘-Reifung mitochondrialer Transkripte involviert sind, charakterisiert wurden, kann lediglich ein Trend hin zu RF-ähnlichen RPFs verzeichnet werden. Es ist allerdings zu bemerken, dass dies mitunter auf die bisherige Vorgehensweise (natürliche genetische Variationen zur Identifizierung weiterer RPFs) zurückzuführen ist [Binder et al. 2013].

4.2. RPF4 vermittelt die 5‘-Reifung mehrerer *ccmB*-Transkripte.

RPF4 trägt in L*er* und weiteren Ökotypen zur Entstehung von *ccmB*-Transkripten bei, die zusätzlich zu den in Col vorhanden Transkripten mit 5‘-Enden bei -140 und -347/346, vorliegen (Abbildung 5). Die angewandten Methoden lassen keine einheitliche Aussage über die Anzahl der durch RPF4 beeinflussten *ccmB*-Transkripte zu. In der Northern-Blot-Analyse tritt ein zusätzliches Transkript auf, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Signal bei ca. 950 Nukleotiden (nt) mehrere Transkriptspezies beinhaltet (Abbildung 7B, Transkript 2). Dem gegenüber stehen zwei PCR-Produkte in der CR-RT-PCR- sowie vier Verlängerungsprodukte in der *Primer-Extension*-Analyse, die auf zwei bzw. vier zusätzliche *ccmB*-Transkripte hinweisen (Abbildung 7A, Produkte 2a und 2b; Abbildung 6, L*er* Spur b, Signale 2 i bis 2 iiii). Unabhängig von der Anzahl der beeinflussten 5‘-Enden liegt die Einzigartigkeit von RPF4 da-

rin, dass das Protein anders als die bisher beschriebenen RPFs die Bildung mehrerer Transkripte ausgehend von einem einzigen mitochondrialen Gen beeinflusst [Binder et al. 2013].

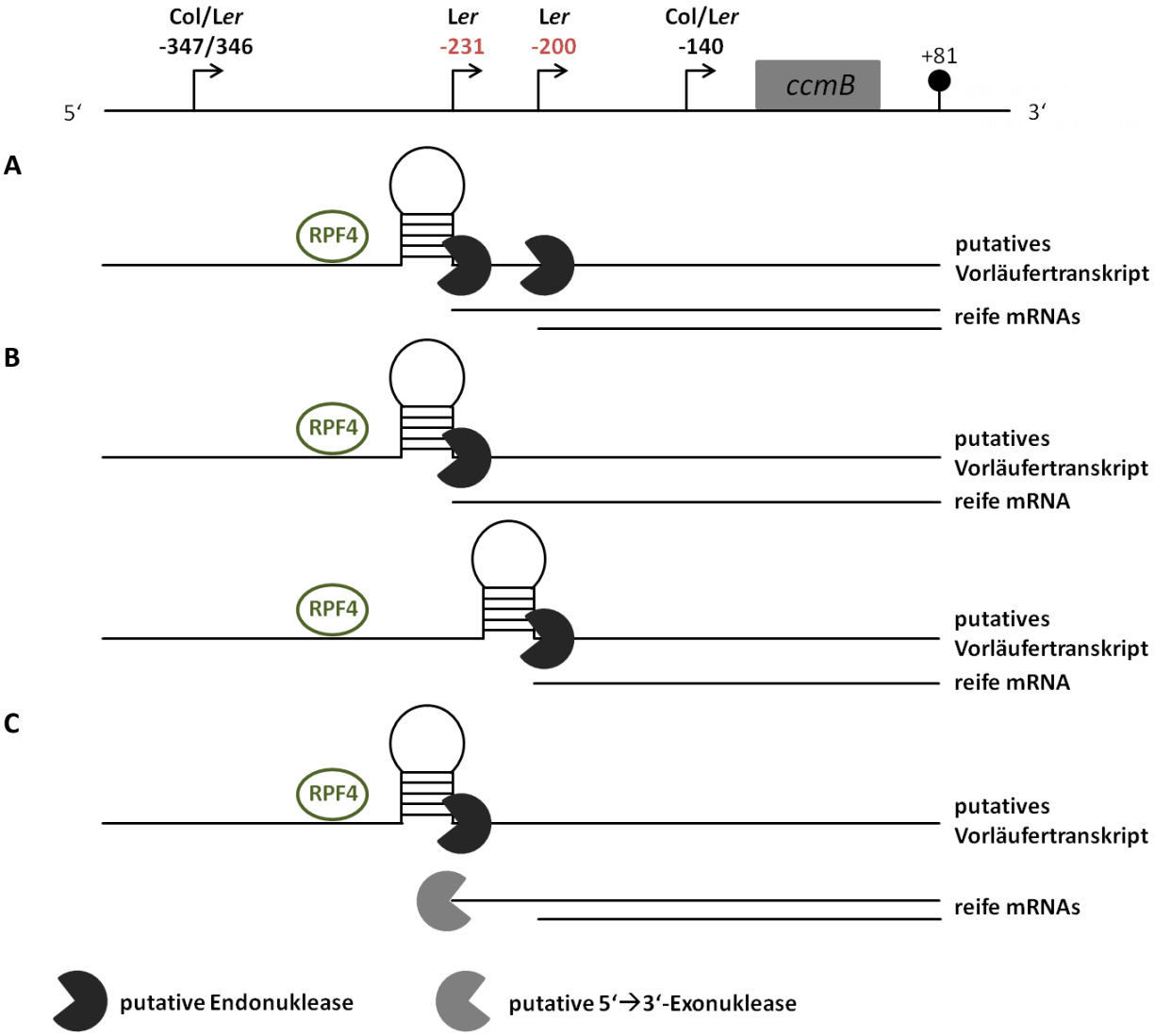


Abbildung 42: Schematische Darstellung verschiedener Szenarien zur RPF4-vermittelten Bildung mehrerer 5‘-reifer *ccmB*-Transkripte. Die Szenarien berücksichtigen nicht die Bildung des reifen 3‘-Endes. Zur Vereinfachung wird nur auf die Entstehung von zwei 5‘-reifen *ccmB*-Transkripten eingegangen. oben: Schematische Genkarte von *ccmB*. Weitere Angaben können Abbildung 5 entnommen werden. In der restlichen Abbildung sind gebildete Transkripte durch waagrechte Linien dargestellt. **A:** Die Bindung von RPF4(*Ler*) hat die Entstehung einer Sekundärstruktur zur Folge. Dadurch werden zwei Angriffsstellen einer putativen Endonuklease freigelegt. **B:** Durch die Bindung von RPF4(*Ler*) bilden sich zwei verschiedene Sekundärstrukturen aus, wobei die Bevorzugung einer Sekundärstruktur möglich ist. Jede Sekundärstruktur erlaubt den Angriff einer putativen Endonuklease. **C:** Die Entstehung des längeren Transkripts resultiert aus der Bildung einer Sekundärstruktur und damit verbunden einem endonukleolytischen Schnitt. Das kürzere Transkript entsteht aus dem längeren 5‘-reifen Transkript durch die Aktivität einer putativen 5‘→3‘-Exonuklease, wobei unklar bleibt wie das 5‘-Ende des kürzeren Transkripts definiert wird.

Die zusätzlichen Transkripte treten in L*er* mit Ausnahme des vermeintlich kleinsten Transkripts (Abbildung 6, L*er* Spur b, Signal 2 i) in etwa gleichen Anteilen auf. Es ist allerdings zu bemerken, dass diese Tendenz lediglich der *Primer-Extension*- nicht aber der CR-RT-PCR-

oder Northern-Blot-Analyse entnommen werden kann (Abbildung 6, L*er* Spur b, Signale 2 i bis 2 iiii; Abbildung 7A, Produkte 2a und 2b; Abbildung 7B, Transkript 2).

Um die Entstehung der verschiedenen 5‘-reifen *ccmB*-Transkripte durch den Einfluss von RPF4(L*er*) zu erklären, sind verschiedene Szenarien denkbar (Abbildung 42). Zur Vereinfachung wird in den vorgeschlagenen Szenarien lediglich auf die Bildung von zwei zusätzlichen *ccmB*-Transkripten eingegangen, wobei jeweils auch das Auftreten von reifen Transkripten, die nur in geringen Mengen vorliegen, erklärt werden kann.

Das erste Szenario sieht vor, dass durch die Bindung von RPF4(L*er*) eine Sekundärstruktur gebildet wird, die den Angriff einer putativen Endonuklease an zwei Stellen ermöglicht. Der endonukleolytische Schnitt und damit verbunden die Entstehung der 5‘-reifen Transkripte soll an beiden Positionen als gleich wahrscheinlich gelten. Demgegenüber kann mit diesem Modell das Vorliegen von *ccmB*-Transkripten geringerer Menge dadurch erklärt werden, dass entgegen der obigen Annahme der endonukleolytische Schnitt bevorzugt an einer der beiden Angriffsstellen erfolgt (Abbildung 42A). In einem zweiten Szenario wird angenommen, dass RPF4(L*er*) die Bildung verschiedener Sekundärstrukturen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, induziert. Dadurch wird jeweils die Angriffsstelle einer putativen Endonuklease freigelegt und die 5‘-reifen *ccmB*-Transkripte entstehen zu gleichen Anteilen. Weniger häufige 5‘-reife mRNAs können hier durch ungünstige Sekundärstrukturen und damit verbunden einem erschwerten Binden der putativen Endonuklease erklärt werden (Abbildung 42B). Das letzte Szenario geht davon aus, dass einzig das längere *ccmB*-Transkript analog zu den bisherigen Ausführungen endonukleolytisch gebildet wird. Ausgehend von diesem Transkript ist eine exonukleolytische Entstehung des kleineren *ccmB*-Transkripts denkbar. Das in der *Primer-Extension*-Analyse beobachtete Ungleichgewicht der in L*er* zusätzlich vorliegenden Transkripte kann hier durch eine verminderte Aktivität der putativen 5‘→3‘-Exonuklease auf Grund einer eventuell ungünstigen Sekundärstruktur erklärt werden (Abbildung 42C).

Es kann nur spekuliert werden, welches der beschriebenen Szenarien die Entstehung der verschiedenen durch RPF4(L*er*) beeinflussten *ccmB*-Transkripte am besten widerspiegelt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass mit der Annahme einer exonukleolytischen Entstehung der (kleineren) Transkripte nicht geklärt ist, wie die 5‘-Enden dieser Transkripte definiert werden. Desweiteren bleibt auch unklar, wodurch der vollständige exonukleolytische Abbau

des längeren *ccmB*-Transkripts verhindert wird. Vor diesem Hintergrund scheinen die ersten beiden Modelle und damit verbunden eine endonukleolytische Bildung aller durch RPF4(L*er*) beeinflussten *ccmB*-Transkripte am wahrscheinlichsten zu sein. Bislang war es allerdings noch nicht möglich die aus einem endonukleolytischen Schnitt resultierenden 5‘-*Leader*-Moleküle nachzuweisen.

Die Entstehung größerer *ccmB*-Transkripte erfolgt unabhängig von RPF4(L*er*). Dies zeigt sich etwa darin, dass in Col sowie Col + *RPF4*(L*er*) ein gleiches Transkriptmuster bezüglich der *ccmB*-mRNA-Vorläufer, das sich aber von dem in L*er* unterscheidet, auftritt (Abbildung 11C). Unklar bleibt an dieser Stelle aber der Sachverhalt, warum sich RPF4-c1 im Hinblick auf die L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte zwar gleich verhält wie RPF4(L*er*) (siehe 4.8.), doch Col-Pflanzen, die *RPF4*-c1 exprimieren, von Col unterschiedliche Vorläufer aufweisen (Abbildung 10C, Col + *RPF4*-c1). Unabhängig von dieser Diskrepanz, hat das funktionale RPF4(L*er*) folglich keinen Einfluss auf die in Col vorliegenden *ccmB*-Vorläufertranskripte. Die Funktion von RPF4(L*er*) scheint damit auf die Reifung von *ccmB*-Transkripten mit 5‘-Enden im Bereich von -231/200 beschränkt zu sein. Prinzipiell ist es aber möglich, dass RPF4(L*er*) auch in die Reifung anderer mitochondrialer Transkripte bzw. rRNAs involviert ist. Ähnliches ist beispielsweise von RPF2 und RPF5 bekannt [Binder et al. 2013]. Bislang konnte RPF4(L*er*) aber keine weitere Funktion zugeordnet werden.

4.3. RPF3 und RPF6 sind an der 5‘-Reifung unterschiedlicher *ccmC*-Transkripte beteiligt.

RPF3 und RPF6 sind zwei PPR-Proteine der P-Subfamilie, die einen Einfluss auf die Reifung der 5‘-Enden mitochondrialer *ccmC*-Transkripte haben. Ein solches Phänomen ist bisher noch nicht beschrieben. So konnte allen bezüglich der 5‘-Reifung beeinflussten mitochondrialen Transkripten bislang nur ein RPF zugeordnet werden [Binder et al. 2013]. Die Einzigartigkeit in der *ccmC*-mRNA-Prozessierung steht in direktem Zusammenhang mit dem Vorhandensein unterschiedlicher mitochondrialer *ccmC*-Genotypen, welche durch eine 66 Basenpaare (bp) lange Sequenz ca. 500 bp stromaufwärts des *ccmC*-Gens definiert sind (Abbildung 12). Der Col-*ccmC*-Genotyp erlaubt die Bindung von RPF3 (siehe 4.7.) und in der Folge die Bildung von *ccmC*-Transkripten mit einem 5‘-Ende bei -484/482 [Jonietz et al. 2011]. RPF3 kann bei Vorliegen des C24-*ccmC*-Genotyps nicht agieren. Zur Generierung von 5‘-reifen *ccmC*-Transkripten ist hier RPF6 notwendig.

Abweichungen zu den bisherigen Ausführungen stellen die vorhandenen *ccmC*-Transkripte in den Ökotypen Lip-0 und Sorbo dar. Beide Ökotypen besitzen gemäß mehreren voneinander unabhängigen Analysen den Col-*ccmC*-Genotyp. Das Vorliegen des C24-*ccmC*-Genotyps konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13; Abbildung 17). Trotzdem treten in Lip-0 und Sorbo *ccmC*-Transkripte ähnlicher bzw. gleicher Größe wie in C24 auf (Anhang 6A + C), wobei in Lip-0 zusätzlich die Col-typischen (Anhang 6B) und in Sorbo keine weiteren *ccmC*-Transkripte vorhanden sind (Abbildung 13A, oben). Es ist anzunehmen, dass in beiden Ökotypen RPF6 (schwach) mit der mRNA des Col-*ccmC*-Genotyps interagieren kann und dadurch *ccmC*-Transkripte wie in C24 gebildet werden (siehe 4.4. und 4.7.). Im Fall von Sorbo ist das Ausbleiben der Col-spezifischen *ccmC*-mRNA-Prozessierung wohl auf ein stark verkürztes RPF3-Protein zurückzuführen (Anhang 7). Demgegenüber liegt in Lip-0 ein RPF3-Protein vor, das zu 95 % identische AS wie RPF3(Col) aufweist (Anhang 7). Ausgehend von dem in Barkan et al. 2012 und Yagi et al. 2013a beschriebenen Codes der Interaktion zwischen den relevanten AS der PPR-Motive und einem Nukleotid der RNA, scheint RPF3(Lip-0) in ähnlicher Weise wie RPF3(Col) mit der Col-*ccmC*-mRNA zu interagieren (Abbildung 43A + C). Es fällt auf, dass bezüglich der vermeintlichen Interaktion beider Proteine mit der Col-*ccmC*-mRNA an den gleichen Positionen eine hohe bzw. keine Übereinstimmung mit dem Code vorliegt. Warum das Protein aus Lip-0 aber keine vollständige Col-typische *ccmC*-mRNA-Reifung vermittelt, kann anhand dieser Betrachtungen nicht beurteilt werden.

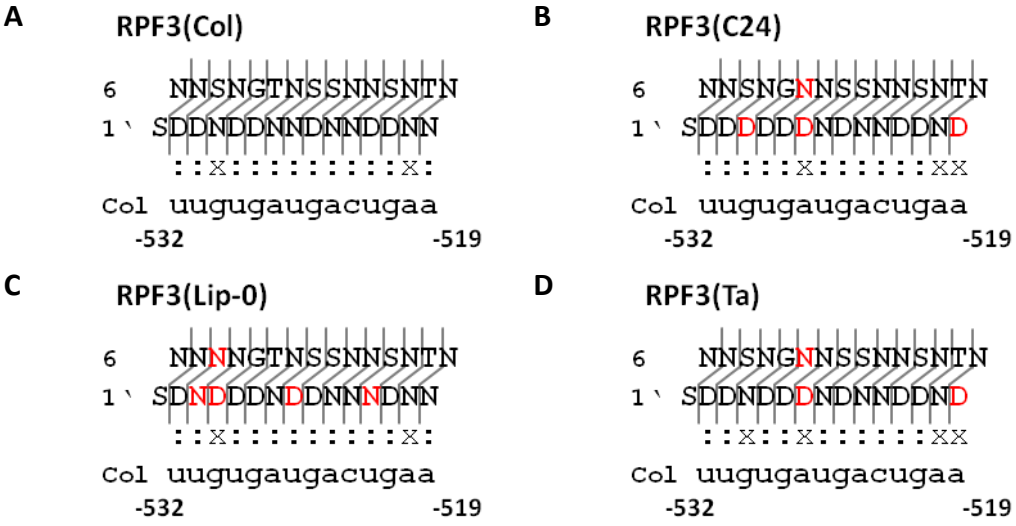


Abbildung 43: Vorhergesagte Bindung verschiedener RPF3-Proteine an die *ccmC*-mRNA des Col-*ccmC*-Genotyps. AS, die sich von RPF3(Col) unterscheiden, sind in rot geschrieben. Weitere Angaben können Abbildung 32 entnommen werden. **A:** RPF3(Col). **B:** RPF3(C24). **C:** RPF3(Lip-0). **D:** RPF3(Ta).

Auch die ausbleibende Aktivität von RPF3(Ta) lässt sich mit dem postulierten Erkennungscode nur schwer erklären. RPF3(Ta) scheint in ähnlicher Weise wie das aus C24 funktionale

RPF3-Protein (Abbildung 20) mit der Col-*ccmC*-mRNA zu interagieren, wobei aber eine zusätzliche Position (AS-Paar Repeat 3 Position 6/Repeat 4 Position 1‘) mit ausbleibender Übereinstimmung bezüglich des Codes vorliegt (Abbildung 43B + D). Da der Code allerdings gleichfalls RPF3(Col) an besagter Position keine Interaktion mit der *ccmC*-mRNA vorhersagt (Abbildung 43A + D), scheint hier nicht die Ursache des Funktionsverlusts von RPF3(Ta) zu liegen.

Die nicht oder nur in geringen Mengen vorhandenen 5‘-reifen *ccmC*-Transkripte in Kas-1, Ms-0, No-0, Nok-1 und Rube (Ökotypen mit C24-*ccmC*-Genotyp; Abbildung 13B, oben) lassen vermuten, dass in diesen Ökotypen die Interaktion von RPF6 mit der C24-*ccmC*-mRNA nicht ausreicht, um die *ccmC*-mRNA-Prozessierung einzuleiten. Wodurch der vermeintliche Funktionsverlust von RPF6 in den einzelnen Ökotypen bedingt ist, bleibt bisweilen unklar. Analog zum Ausfall von RPF3 in Lip-0, Sorbo und Ta scheinen für den Defekt der RPF6-Proteine in oben genannten Ökotypen strukturelle Veränderungen oder eine verminderte Expression ursächlich zu sein (Abbildung 29; Abbildung 30). Obwohl zumindest in Kas-1, Ms-0 und Rube funktionale *RPF3*-Allele vorliegen (Abbildung 31), kommt es in den Ökotypen allerdings nicht wie in Lip-0, Sorbo und wohl zu einem gewissen Teil auch in Ta zur Bildung von *ccmC*-Transkripten des nicht-korrelierenden *ccmC*-Genotyps. RPF6 verhindert hier wahrscheinlich in einer bestimmten Art und Weise eine Anlagerung von RPF3 an die *ccmC*-mRNA. Da die RPF6-Proteine aber keine C24-typische *ccmC*-mRNA-Reifung vermitteln, scheint die vermeintliche Bindung der RPF6-Proteine an die *ccmC*-mRNA nicht die Bildung der zur Prozessierung erforderlichen Sekundärstruktur zu vermitteln (siehe 4.4.). Es liegt demzufolge die Vermutung nahe, dass die Proteine nur zum Teil vergleichbar wie RPF6(Col) an die *ccmC*-mRNA binden. Dies scheint zumindest auf das RPF6-Protein aus No-0 zuzutreffen. Unter Berücksichtigung des beschriebenen Codes der Interaktion zwischen PPR-Proteinen und RNA [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a] wird ersichtlich, dass der C-Terminus von RPF6(No-0) vermutlich schwächer an die C24-*ccmC*-mRNA bindet als dies bei RPF6(Col) der Fall ist (Abbildung 44A + B). Es scheint daher, dass der Unterschied in den C-terminalen Repeats ursächlich für die vermeintlich unzureichende Bindung von RPF6(No-0) an die *ccmC*-mRNA und damit verbunden die ausbleibende C24-typische *ccmC*-mRNA-Prozessierung sein kann.

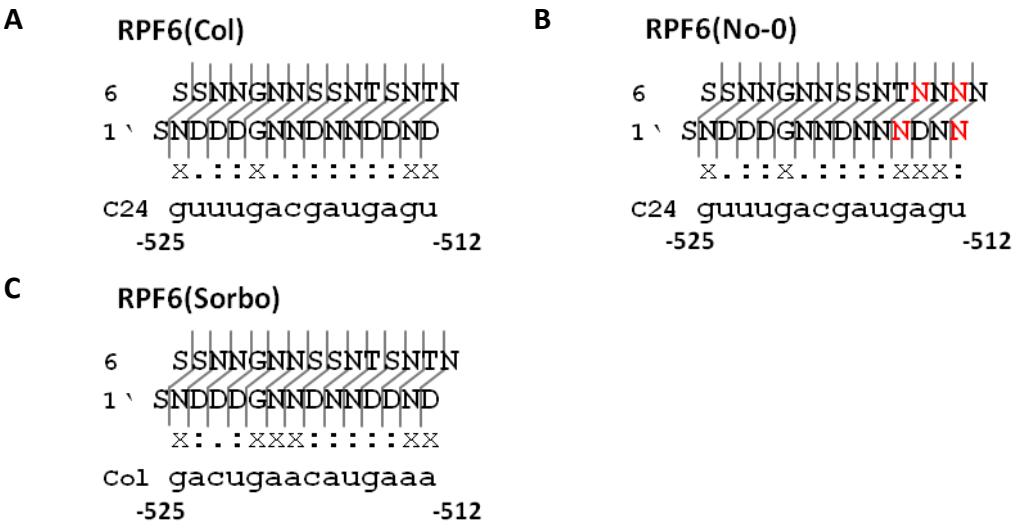


Abbildung 44: Vorhergesagte Bindung verschiedener RPF6-Proteine an die *ccmC*-mRNA des C24-*ccmC*- (oben) **bzw. des Col-*ccmC*-Genotyps** (unten)**.** AS, die sich von RPF6(Col) unterscheiden, sind in rot geschrieben. Weitere Angaben können Abbildung 32 entnommen werden. **A:** RPF6(Col). **B:** RPF6(No-0). **C:** RPF6(Sorbo).

Jeder Ökotyp weist prinzipiell die notwendige genomische Ausstattung zum Umgang mit Vorläufertranskripten beider *ccmC*-Genotypen auf. Welchen Nutzen die Pflanzen daraus ziehen ist jedoch unklar, auch vor dem Hintergrund homoplasmatischer *ccmC*-Genotypen (Abbildung 17). In einzelnen Ökotypen zeichnet es sich allerdings ab, dass bei einem Ausfall oder Funktionsverlust des für den vorliegenden *ccmC*-Genotyp notwendigen RPFs das weiterhin funktionale Protein des nicht-korrelierenden *ccmC*-Genotyps zumindest in gewisser Weise die *ccmC*-mRNA-Prozessierung bewerkstelligt. Das Vorhandensein beider Proteine kann aber auch darauf hindeuten, dass diese weitere bislang nicht erfasste und von der *ccmC*-mRNA-Prozessierung unabhängige Funktionen ausüben.

4.4. Die Co-Adaptation zwischen Mitochondrien und Kern beeinflusst die 5'-Prozessierung der *ccmC*-mRNAs in *A.thaliana*.

Es wird allgemein angenommen, dass Mitochondrien aber auch Chloroplasten von freilebenden Bakterien abstammen [Dyall et al. 2004]. Dies begründet auch das eigenständige Genom der Organellen, wobei allerdings große Teile der Organellen-DNA in das Kerngenom integriert wurden. Daher ist beispielsweise eine Vielzahl an Kern-kodierten Proteinen (z.B. RPFs) notwendig, um den RNA-Metabolismus in den Mitochondrien zu gewährleisten.

Auf Grundlage von Studien in tierischen Systemen wird davon ausgegangen, dass schädliche Mutationen in der mitochondrialen DNA die Selektion entsprechend angepasster Kern-Genome zur Folge haben [Dowling et al. 2008, Moison et al. 2010]. Dies erklärt wiederum das Vorliegen von mehreren co-adaptieren Systemen zwischen Kern und Mitochondrien oder Chlo-

roplasten innerhalb einer Spezies. In der Literatur sind verschiedene Beispiele dafür beschrieben, dass der Ausfall oder Verlust solcher Systeme in Pflanzen schwerwiegende Folgen haben kann. Die Kombination des Kern-Genoms von *Atropa belladona* mit der plastidären DNA von *Nicotiana tabacum* führt beispielsweise zur Ausprägung eines Albino-Phänotyps der cytoplasmatischen Hybride. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen eines Editingfaktors im Kern-Genom von *Atropa belladona* ursächlich für die ausbleibende Reifung des *atpA*-Transkripts und damit des Albino-Phänotyps ist [Schmitz-Linneweber et al. 2005]. Auch das Auftreten von cytoplasmatischer männlicher Sterilität ist auf die Inkompatibilität des vorliegenden mitochondrialen mit dem Kern-Genom zurückzuführen. Nur bei Vorhandensein eines im Kern-kodierten RF kann die Sterilität umgangen werden [Fujii and Toriyama 2008].

Gleichfalls beruht die *ccmC*-mRNA-Prozessierung in *A.thaliana* auf einer Co-Adaptation. Die Reifung der Transkripte wird hier durch zwei co-adaptierte Systeme zwischen Kern- und mitochondrialem Genom bewerkstelligt. RPF3 vermittelt die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte ausgehend vom Col-*ccmC*-Genotyp. Demgegenüber ist RPF6 für die 5‘-Reifung von *ccmC*-mRNAs in C24 verantwortlich (Abbildung 45). Im Gegensatz zu obigen Beispielen führt ein Ungleichgewicht zwischen Kern- und mitochondrialen Genom, wobei das Kern- sich vermutlich (noch) nicht an die Veränderungen des mitochondrialen Genoms angepasst hat, nicht zu einem äußerlich sichtbaren Phänotyp. Vielmehr kommt es in Ökotypen mit nicht-angepasstem Kern-kodierten Faktor (RPF3 oder RPF6) zu einer Beeinträchtigung in der *ccmC*-mRNA-Prozessierung. Wird das entsprechende mitochondriale Genom mit dem Kern-Genom eines anderen Ökotyps, der ein funktionales, d.h. mit der mitochondrialen DNA kompatibles, *RPF3*- oder *RPF6*-Allel aufweist, kombiniert, ist die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte wieder möglich (Abbildung 18; Abbildung 20; Abbildung 25; Abbildung 27; Abbildung 31).

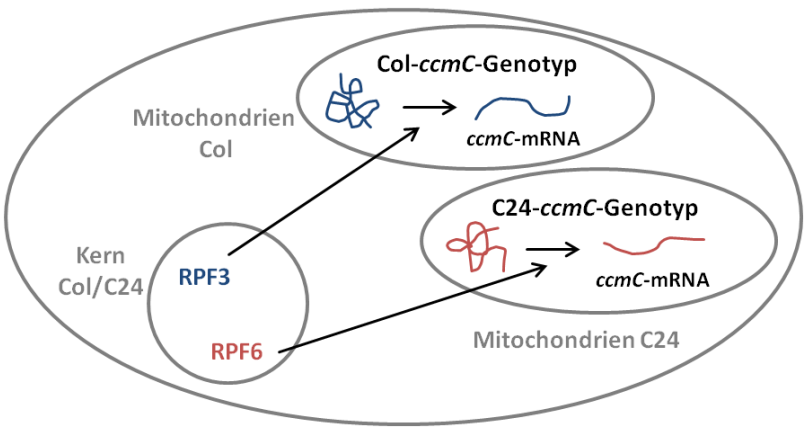


Abbildung 45: Zwei co-adaptive Systeme zwischen dem mitochondrialen und dem Kern-Genom sind für das Auftreten reifer *ccmC*-Transkripte in *A.thaliana* verantwortlich. RPF3 ist für die Reifung der *ccmC*-Transkripte ausgehend vom Col-*ccmC*-Genotyp notwendig. Liegt der C24-*ccmC*-Genotyp vor, erfolgt die Prozessierung in Anwesenheit von RPF6.

Anhand der Untersuchung mehrerer Ökotypen bezüglich der vorliegenden *ccmC*-Genotypen und *ccmC*-Transkripte zeigt sich keine geografische Präferenz für eines der beiden co-adaptierten Systeme (Tabelle 8; Tabelle 14). Da alle Ökotypen prinzipiell die genomische Ausstattung zum Umgang mit beiden *ccmC*-Genotypen besitzen (Abbildung 31), scheint daher zunächst die mitochondriale DNA ausschlaggebend für die vorliegenden *ccmC*-Transkripte zu sein.

Die Annahme, dass ein Col-*ccmC*-Genotyp die Reifung der Col- nicht aber der C24-typischen *ccmC*-Transkripte zur Folge hat, steht im Widerspruch mit dem Auftreten der *ccmC*-Transkripte mit 5‘-Enden bei -389 bzw. -391 in Lip-0 und Sorbo (Ökotypen mit Col-*ccmC*-Genotyp; Anhang 6A + C). Wie bereits vermutet scheinen die RPF6-Proteine aus Lip-0 und Sorbo dazu in der Lage zu sein an die Col-*ccmC*-mRNA zu binden und damit die Bildung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte zu ermöglichen. In beiden Ökotypen entscheidet damit vermutlich nicht in erster Linie der gegenwärtige *ccmC*-Genotyp darüber welche 5‘-Enden die *ccmC*-mRNAs aufweisen, sondern vielmehr das Vermögen der vorhandenen RPFs an die *ccmC*-mRNA zu binden. An dieser Stelle soll die Annahme getroffen werden, dass durch die Bindung von RPF3 bzw. RPF6 an die *ccmC*-mRNA unterschiedliche Angriffsstellen für einen nachfolgenden endonukleolytischen Schnitt freilegt werden. Dadurch können zunächst die verschiedenen *ccmC*-Transkripte in Col und C24 erklärt werden (Abbildung 46, Col und C24).

In Sorbo liegt RPF3 nicht bzw. nur stark verkürzt vor (Anhang 7). Demgegenüber verfügt der Ökotyp über ein RPF6-Protein, dass zu 99 % identische AS wie das Protein aus Col aufweist, wobei keine Unterschiede an den für die Interaktion mit der RNA vermeintlich entscheidenden Positionen 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) innerhalb der PPR-Motive auftreten (Anhang 10B) [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a]. Unter der Annahme, dass die vermeintliche Bindung von RPF6(Sorbo) analog zum RPF6-Protein aus Col an die *ccmC*-mRNA im Bereich von -525 bis -512 erfolgt, zeigt sich, dass im C-Terminus die relevanten AS-Paare von RPF6(Sorbo) ein vergleichbares Interaktionsvermögen mit der Col-*ccmC*-mRNA aufweisen wie RPF6(Col) mit der C24-*ccmC*-mRNA (Abbildung 44A + C). Dies trifft allerdings nicht auf die mutmaßliche Interaktion des N-Terminus von RPF6(Sorbo) mit der Col-*ccmC*-mRNA zu. Hier treten im Gegensatz zur Bindung von RPF6(Col) an die C24-*ccmC*-mRNA mehrere zusätzliche Positionen mit ausbleibender Interaktion auf (Abbildung 44A + C). Die vermeintliche Interaktion des C-Terminus von RPF6(Sorbo) scheint daher auszureichen, um die Bildung der

erforderlichen Sekundärstruktur zu induzieren und somit die Entstehung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte zu ermöglichen (Abbildung 46, Sorbo).

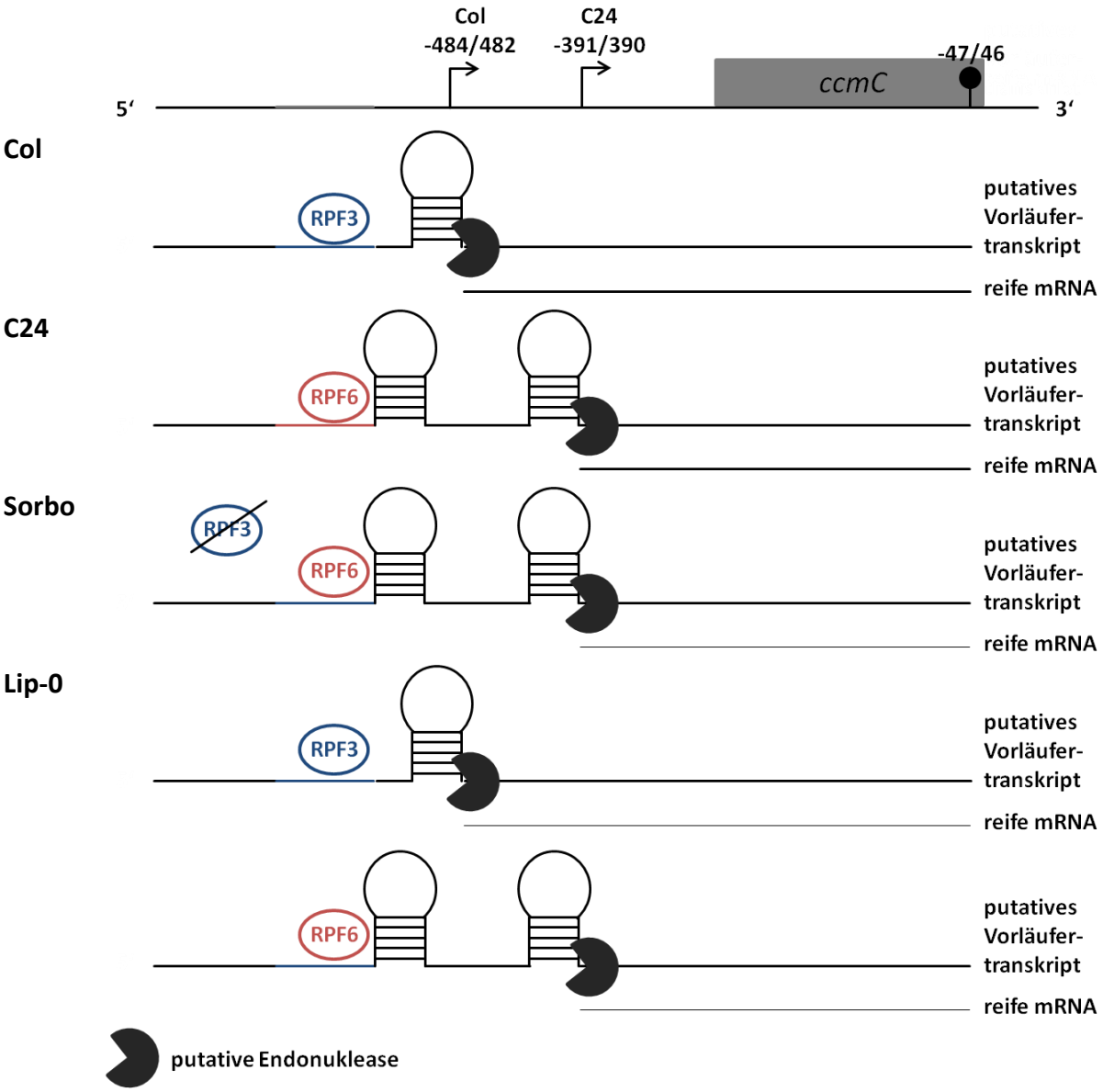


Abbildung 46: Schematische Darstellung diverser Modelle zur Erklärung C24-typischer *ccmC*-Transkripte in Lip-0 und Sorbo. Die Modelle berücksichtigen nicht die Bildung des reifen 3‘-Endes. oben: Schematische Genkarte von *ccmC*. Der den *ccmC*-Genotyp definierende Bereich ist in hellgrau unterlegt. Weitere Angaben können Abbildung 12 entnommen werden. In der restlichen Abbildung ist der dem Col-*ccmC*-Genotyp entsprechende Bereich in blau und der dem C24-*ccmC*-Genotyp entsprechende Bereich in rot unterlegt. Die durch RPF3 bedingte Sekundärstruktur ist durch eine, die durch RPF6 vermittelte Sekundärstruktur durch zwei Haarnadelstruktur(en) symbolisiert. Gebildete Transkripte sind durch waagrechte Linien dargestellt, wobei die Stärke der Linien die Häufigkeit der Transkripte widerspiegelt. **Col:** Die Bindung von RPF3 induziert die Entstehung einer Sekundärstruktur. Dadurch wird der Angriff einer putativen Endonuklease ermöglicht und die Col-typischen *ccmC*-Transkripte werden gebildet. **C24:** Die Bindung von RPF6 resultiert in der Entstehung einer Sekundärstruktur. Eine putative Endonuklease kann angreifen und es kommt zur Bildung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte. **Sorbo:** RPF3 ist defekt. Die schwache Bindung von RPF6 reicht aus, um die Entstehung der durch RPF6 vermittelten Sekundärstruktur zu induzieren. In der Folge werden (wenige) C24-typische *ccmC*-Transkripte gebildet. **Lip-0:** RPF3 und RPF6 binden vergleichbar stark an die *ccmC*-mRNA und induzieren damit die Entstehung der verschiedenen Sekundärstrukturen. Dies resultiert in der Bildung der Col- sowie der C24-typischen *ccmC*-Transkripte, wobei im Vergleich zu Col oder C24 weniger reife *ccmC*-mRNAs vorliegen.

Analog zu RPF6(Sorbo) scheint RPF6(Lip-0) ebenfalls in der Lage zu sein eine gewisse Interaktion mit der Col-*ccmC*-mRNA einzugehen, wobei in Lip-0 wohl auch eine Interaktion zwischen RPF3 und der Col-*ccmC*-mRNA auftritt. Auf Grund einer von RPF3(Lip-0) und RPF6(Lip-0) vermutlich vergleichbar starken Interaktion mit der Col-*ccmC*-mRNA, kommt es in Lip-0 zur Bildung beider relevanter Sekundärstrukturen und in der Folge zur Col- bzw. C24-typischen *ccmC*-mRNA-Prozessierung (Abbildung 13A; Abbildung 14A; Abbildung 46, Lip-0). Die vermeintlich schwache Interaktion von RPF3(Lip-0) kann auch ursächlich für das Unvermögen des Proteins, die *ccmC*-mRNA-Prozessierung in Sorbo oder Ta wieder herzustellen (Abbildung 19, F_1 Ta x Lip-0 und F_1 Sorbo x Lip-0), sein.

Auch in Ta treten *ccmC*-Transkripte auf, die von der Größe her den reifen *ccmC*-Transkripten in C24 ähneln (Abbildung 14A, Transkript 2). Eventuell kann RPF6(Ta) vergleichbar zu den RPF6-Proteinen aus Lip-0 und Sorbo in einer gewissen Weise die Reifung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte vermitteln.

Die getroffenen Annahmen bezüglich der Bindung von RPF6 an die Col-*ccmC*-mRNA werfen die Frage auf, warum es nicht auch in Col zu einer C24-typischen *ccmC*-mRNA-Prozessierung kommt. Dies kann wohl damit erklärt werden, dass hier eine Anlagerung von RPF6 durch die stärkere Bindung von RPF3 an die Col-*ccmC*-mRNA verhindert wird (siehe 4.7.). In *rpf3-1* können demgegenüber nur wenige 5‘-reife *ccmC*-Transkripte detektiert werden, wobei wohl auch geringe Mengen an C24-typischen *ccmC*-Transkripten vorliegen [Jonietz et al. 2011]. Dies korreliert wiederum mit obigen Ausführungen, dass RPF6 vermutlich unter bestimmten Umständen (z.B. Ausfall oder Defekt von RPF3) an die Col-*ccmC*-mRNA binden kann.

4.5. Vermutlich verursacht eine *gain-of-function*-Mutation die Akkumulation von *ccmC*-Vorläufertranskripten in Ta.

Das *ccmC*-Transkriptmuster in Ta unterscheidet sich grundlegend von dem der anderen untersuchten Ökotypen. Zwar treten in Ta auch *ccmC*-Transkripte der vermeintlich gleichen Größe wie in Col oder C24 auf (Abbildung 14A, Transkripte 2 und 3), zusätzlich kommt es in diesem Ökotyp aber zu einer Akkumulation größerer Transkripte (Abbildung 14A, Transkripte 5, 6 und 7; Abbildung 22, Produkte 4 bis 7). Das Auftreten der *ccmC*-Vorläufertranskripte scheint in direktem Zusammenhang mit einem Kern-kodierten Faktor zu stehen (Abbildung 22). Weiter deuten die dominant vererbten Vorläufer in reziproken F_1-Hybriden zwischen Ta und *rpf3-1* an, dass eine *gain-of-function*-Mutation ursächlich für das Vorliegen der größeren

ccmC-Transkripte ist (Abbildung 22, F_1 *rpf3-1* x Ta und F_1 Ta x *rpf3-1*). Auch das gehäufte Auftreten der Ta-typischen *ccmC*-Transkripte in den F_2-Pflanzen weist darauf hin, dass eine *gain-of-function*-Mutation vorliegt (Abbildung 23). Anhand der bisherigen Daten kann allerdings nicht eindeutig beurteilt werden, ob es sich bei dem involvierten Protein um RPF3(Ta) selbst oder ein anderes Kern-kodiertes Protein handelt. Für ein anderes Protein spricht zunächst, dass in *rpf3-1*-Pflanzen, in welche das *RPF3*(Ta)-Allel eingebracht wurde, keine Ta-typischen *ccmC*-Vorläufer auftreten (Abbildung 24, *rpf3-1* + *RPF3*(Ta)). Um an dieser Stelle fundiertere Aussagen bezüglich der Bildung der Ta-typischen *ccmC*-Vorläufer treffen zu können, sind weitere Analysen bezüglich der *RPF3*-Allele in den F_2-Pflanzen notwendig. Stimmt die Annahme, dass RPF3(Ta) die Akkumulation nicht verursacht, sollten in den F_2-Pflanzen *RPF3*(Ta)-Allele und der Ta-typische *ccmC*-mRNA-Phänotyp unabhängig voneinander vorliegen. Korreliert dagegen das Auftreten der Vorläufer mit dem Vorhandensein zumindest eines *RPF3*(Ta)-Allels wäre dies wiederum ein Hinweis für einen Einfluss von RPF3(Ta).

4.6. Die Bindung der RPFs stromaufwärts der Prozessierungsstelle vermittelt die 5‘-Reifung der Transkripte.

Wie eingangs erwähnt wird auf Grund von *in silico*-Vorhersagen vermutet, dass ein generelles Merkmal der RPFs eine Bindung stromaufwärts der Prozessierungsstelle ist. In dieses Muster passen auch die vorhergesagten Bindungsstellen von RPF3 [Binder et al. 2013], RPF4 und RPF6 (Abbildung 5; Abbildung 12). Es fällt allerdings auf, dass der Abstand zwischen dem 3‘-terminalen Nukleotid der vermeintlichen Bindungsstelle und der Prozessierungsstelle variiert. In den meisten Fällen beträgt der Abstand etwa 30 bis 60 nt, dies trifft auch auf die mutmaßlichen Bindungsstellen von RPF4 und RPF3 zu (Abbildung 5; Abbildung 8A; Abbildung 12; Abbildung 32A). Im Gegensatz dazu erfolgt die vorhergesagte Bindung von RPF6 an die *ccmC*-mRNA mehr als 120 nt stromaufwärts der Prozessierungsstelle (Abbildung 12; Abbildung 32B).

Bezüglich des RNA-Editings ist dagegen beschrieben, dass die involvierten PPR-Proteine durch eine Bindung etwa 5 bis 20 nt stromaufwärts des zu editierenden Cytidins die Deaminierung vermittelten, wobei das terminale S-Motiv des PPR-Proteins mit dem Nukleotid an Position -4 bezüglich der Editingstelle in Kontakt steht [Barkan and Small 2014]. Solche generellen Aussagen über die Bindung der RPFs sind derzeit nicht möglich. Was aber mit dem Editingereignis übereinstimmt, ist die Tatsache, dass die involvierten PPR-Proteine weitere Pro-

teine zur Reifung der Transkripte benötigen. Im Fall der RPFs ist dies auf eine nicht vorhandene enzymatische Aktivität der PPR-Proteine der P-Subfamilie zurückzuführen. Daher scheint die Bindung der RPFs vermutlich die Rekrutierung zumindest eines weiteren Proteins zu vermitteln. Es gibt Hinweise dafür, dass dieses Protein eine endonukleolytische Aktivität aufweist [Binder et al. 2013]. Auch wenn vieles für eine Endonuklease spricht, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in die Entstehung 5‘-reifer Transkripte auch Proteine mit einer exonukleolytischen Aktivität involviert sind (Abbildung 42C). Für diese Annahme spricht, dass bislang nicht von allen 5‘-reifen Transkripten, die in Abhängigkeit eines RPF entstehen, die korrespondierenden 5‘-*Leader*-Moleküle nachgewiesen werden konnten. Es muss allerdings beachtet werden, dass diese Moleküle mitunter sehr instabil sind und sich deren Nachweis als schwierig darstellt [Binder et al. 2013]. Daher ist die Abwesenheit von 5‘-*Leader*-Molekülen, aber auch von Vorläufertranskripten, nicht zwangsläufig mit einer exonukleolytischen Prozessierung gleichzusetzen. Auf der anderen Seite kann auch durch den Nachweis von Vorläufern nicht automatisch auf eine endonukleolytische Entstehung der Transkripte geschlossen werden.

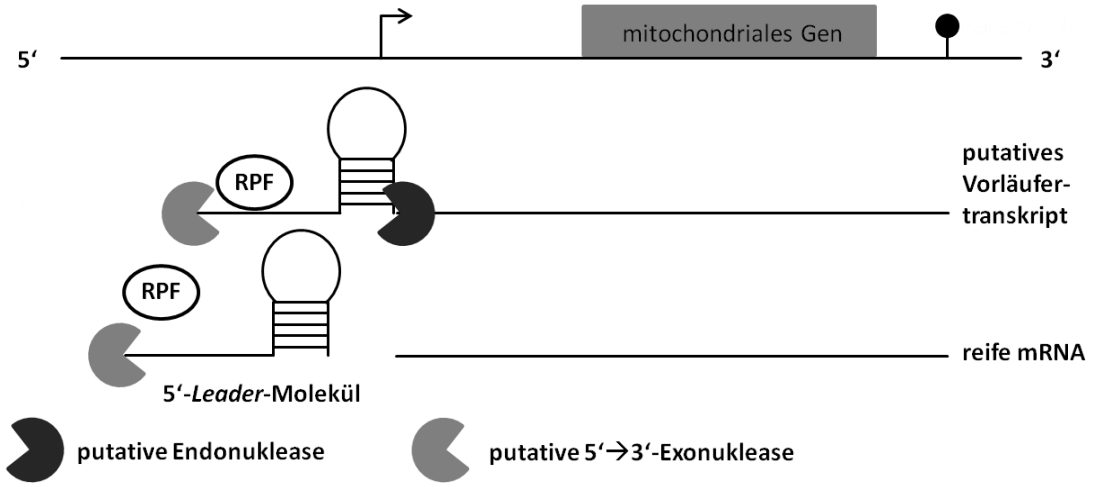


Abbildung 47: Schematische Darstellung eines Modells zur Entstehung 5‘-reifer Transkripte unter dem Einfluss einer putativen 5‘→3‘-Exo- und einer putativen Endonuklease. Das Modell berücksichtigt nicht die Bildung des reifen 3‘-Endes. oben: Schematische Genkarte eines mitochondrialen Gens. Das reife 5‘-Ende ist durch einen abgewinkelten Pfeil, das reife 3‘-Ende durch einen ausgefüllten Kreis dargestellt. unten: Das putative Vorläufertranskript wird exonukleolytisch (5‘→3‘) abgebaut, wobei die Bindung des RPF den weiteren Abbau verhindert. Die Anlagerung des RPF induziert außerdem die Bildung einer Sekundärstruktur, die den Angriff einer putativen Endonuklease ermöglicht. Es entstehen die reife mRNA sowie ein Molekül, das den Bereich stromaufwärts der Prozessierungsstelle bis zur Bindungsstelle des RPF beinhaltet (5‘-*Leader*-Molekül). Nach dem Ablösen des RPF kann die Exonuklease wieder angreifen und das 5‘-*Leader*-Molekül abbauen.

Die Annahme einer exonukleolytischen Prozessierung scheint zunächst nicht vereinbar mit den vermeintlichen Bindungsstellen der RPFs stromaufwärts der Prozessierungsstellen. Wird allerdings zunächst eine exo- und dann eine endonukleolytische Reifung der Transkripte in

Betracht gezogen, kann die Lage der Bindungsstelle durchaus mit der Beteiligung einer Exonuklease in Einklang gebracht werden. Die Bindung des RPF schützt dabei vermutlich die RNA vor einem exonukleolytischen Abbau, vergleichbar wie dies von MITOCHONDRIAL STABILITY FACTOR 1 bezüglich der *nad4*-mRNA angenommen wird, wobei Letzterer aber im Gegensatz zu den RPFs in die 3‘-Prozessierung involviert ist [Haïli et al. 2013]. Das Modell sieht weiter vor, dass durch die Bindung des RPF die Ausbildung der zur 5‘-Prozessierung benötigten Sekundärstruktur induziert wird (Abbildung 47). Der RPF löst sich wahrscheinlich wieder von der RNA und die putative 5‘→3‘-Exonuklease baut das entstandene 5‘-*Leader*-Molekül effizient ab. Ein solches Modell korreliert damit, dass ein Nachweis der Bindungsstellen der RPFs durch das Vorhandensein kleiner RNAs, welche die durch die Bindung des PPR-Proteins geschützte RNA, den sogenannten *Footprint*, widerspiegeln, wie sie z.B. in Chloroplasten vorkommen, bislang nicht möglich war [Ruwe and Schmitz-Linneweber 2012].

4.7. RPF3 und RPF6 binden *in vitro* an die *ccmC*-mRNA.

Der Einfluss der RPFs auf die mRNA-Prozessierung scheint durch eine RNA-Bindung der Proteine stromaufwärts der Prozessierungsstelle vermittelt zu werden. Bislang konnten für diese Annahme aber lediglich *in silico*-Vorhersagen erbracht werden (Abbildung 8; Abbildung 32) [Binder et al. 2013]. Im Rahmen dieser Arbeit war es nun zum ersten Mal möglich auch *in vitro* eine RNA-Bindung der RPFs nachzuweisen.

Die durchgeführten Bindungsstudien mit rRPF3$^{N(His)/C(Strep)}$ und rRPF6$^{N(His)/C(Strep)}$ zeigen, dass die beiden Proteine an die *ccmC*-mRNA in dem Bereich stromaufwärts der Prozessierungsstellen binden, der sich zwischen Col und C24 unterscheidet und den jeweiligen *ccmC*-Genotyp definiert. Weiter konnte der Bereich der RNA-Bindung in beiden Fällen auf 30 nt eingegrenzt werden, wobei jeweils die vermeintliche Bindungsstelle von RPF3 bzw. RPF6 enthalten ist (Abbildung 39). Die *in vitro*-Analysen deuten an, dass die rekombinanten Proteine neben einer Interaktion mit der korrelierenden *ccmC*-mRNA auch eine vermeintlich schwächere Bindung mit der nicht-korrelierenden *ccmC*-mRNA eingehen (Abbildung 40A + B; Abbildung 41A + B). Anhand der bisherigen Bindungstests bleibt es aber schwierig zu beurteilen, inwieweit sich die Affinität der Proteine zu den beiden Transkripten unterscheidet, weshalb Kompetitionstests zwingend notwendig sind.

Unter der Annahme, dass die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des RNA-Bindungsvermögens der rekombinanten Proteine auch *in vivo* gelten, bekräftigen sich zuvor

aufgestellte Vermutungen. Es bestätigen sich zunächst die vorherigen Überlegungen zur Erklärung C24-typischer *ccmC*-Transkripte in Ökotypen mit dem Col-*ccmC*-Genotyp, wobei von einer Bindung der entsprechenden RPF6-Proteine an die Col-*ccmC*-mRNA ausgegangen wird (Abbildung 46, Lip und Sorbo). Zumindest im Fall von RPF6(Sorbo) kann dem Protein auf Grund einer nahezu identischen AS-Sequenz wohl eine analoge Bindungsaffinität wie RPF6(Col) zugesprochen werden (Anhang 10). Die 5‘-Reifung der *ccmC*-mRNAs in Sorbo scheint daher in direktem Zusammenhang mit einer Bindung von RPF6(Sorbo) an die Col-*ccmC*-mRNA zu stehen. An dieser Stelle liegt die Vermutung nahe, dass dies auch auf RPF6(Lip-0) zutrifft. Entsprechende *in vitro*-Analysen können hier weitere Erkenntnisse liefern. Desweiteren kann auch erklärt werden, warum es in Col trotz des Vorliegens eines funktionalen RPF6-Proteins nicht zur Bildung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte kommt. Im Gegensatz zu Sorbo und Lip-0 weist Col ein funktionsfähiges RPF3-Protein auf, welches mit einer vermeintlich höheren Affinität als RPF6(Col) an die Col-*ccmC*-mRNA bindet und damit vermutlich die Anlagerung von RPF6 verhindert.

Entgegen der *in vitro* beobachteten (vermutlich schwachen) Bindung von RPF3 an die C24-*ccmC*-mRNA scheint eine derartige Interaktion *in vivo* nicht oder nur in dem Maße zu erfolgen, dass keine 5‘-Reifung der *ccmC*-mRNAs eingeleitet wird. So werden in den natürlichen *RPF6*-Mutanten trotz eines funktionalen RPF3-Proteins keine Col-typischen *ccmC*-Transkripte gebildet (siehe 4.3.). Ob sich in diesen Ökotypen das RPF3-Protein aber trotzdem an die C24-*ccmC*-mRNA anlagert, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

Die *in vitro*-Analysen bilden eine wichtige Grundlage zum Verständnis der RNA-Bindung im Zuge der 5‘-mRNA-Prozessierung. Sie beantworten in der bisherigen Form allerdings nur die Frage in welcher Region die Proteine an die mRNA binden. Welche AS oder Bereiche der Proteine, RPF4 mit inbegriffen, zur RNA-Bindung beitragen, können dagegen bislang lediglich indirekt über das Einbringen chimärer Gene in (natürliche) *RPF*-Mutanten beurteilt werden (siehe 4.8. und 4.9.).

4.8. Der N-Terminus von RPF4(L*er*) trägt einen entscheidenden Beitrag zur Funktionalität des Proteins bei.

Die Bindungsvorhersage zwischen RPF4 und der *ccmB*-mRNA weist darauf hin, dass das Protein mit 11 nt der mRNA interagiert, wobei die N-terminalen Repeats nicht an der Bindung beteiligt sind (Abbildung 8A). Dies deutet zunächst darauf hin, dass der N-Terminus keinen

Einfluss auf die sequenzspezifische Bindung des Proteins und in der Folge auf die Prozessierung der *ccmB*-Transkripte hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass allein ein Austausch der AS von RPF4(L*er*) vor Repeat 2 Position 6 in diejenigen von RPF4(Col) ausreicht, um die Funktionalität des Proteins dahingehend zu verändern, dass keine L*er*-typische *ccmB*-mRNA-Prozessierung mehr möglich ist (Abbildung 9A, RPF4-c7; Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c7). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass auch die AS vor Repeat 2 Position 6 zur Bindung an die *ccmB*-mRNA beitragen. Da wie bereits erwähnt bislang keine kleinen RNAs in Mitochondrien beschrieben sind, die den *Footprint* der PPR-Proteine anzeigen, gestaltet es sich aber als schwierig die Länge oder auch genaue Lage der Bindungsstelle zu definieren [Ruwe and Schmitz-Linneweber 2012]. Unabhängig einer ausbleibenden Interaktion mit der *ccmB*-mRNA kann aber auch die unterschiedliche Primärstruktur zwischen RPF4(L*er*) und RPF4(Col) vor den PPR-Motiven (Anhang 4) ursächlich für den Funktionsverlust von RPF4-c7 und damit von RPF4(Col) sein.

Desweiteren wird anhand einer L*er*-typischen *ccmB*-mRNA-Prozessierung in Col-Pflanzen, die RPF4-c1 aufweisen, deutlich, dass die C-terminalen Repeats von RPF4(Col) die entsprechenden AS aus RPF4(L*er*) funktional ersetzen können (Abbildung 9A, RPF4-c1; Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c1). Auf Grund der fast identischen AS-Sequenz der beiden Proteine ab Repeat 11 (Anhang 4), liegt die Vermutung nahe, dass durch den Austausch der AS die zur Funktionalität benötigten Interaktionen erhalten bleiben. An dieser Stelle kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne vorhergesagte Interaktionen am C-Terminus irrelevant für die Funktion von RPF4(L*er*) bei der Prozessierung der *ccmB*-Transkripte sind.

Ein Blick in die Literatur zeigt, dass die RNA-Bindung vieler PPR-Proteine der P-Subfamilie oftmals durch die äußeren Repeats vermittelt wird und die mittleren Bereiche vermeintlich schlecht mit der mRNA interagieren. Dies konnte z.B. bei der Bindung von PPR10 an die *atpH*- oder *psaJ*-mRNA in Chloroplasten beobachtet werden [Barkan et al. 2012, Yin et al. 2013]. Im Fall von RPF4 scheinen jedoch auch die mittleren Repeats einen entscheidenden Teil zur Funktionalität des Proteins beizutragen, wobei an dieser Stelle nicht sicher ist, ob die entsprechenden AS eine Interaktion mit der *ccmB*-mRNA eingehen oder in anderer Weise die L*er*-typische *ccmB*-mRNA-Prozessierung begünstigen. Die Wichtigkeit der mittleren Repeats zeigt sich etwa darin, dass das chimäre Protein RPF4-c8, welches lediglich den Bereich zwischen Repeat 4 Position 6 und Repeat 8 Position 1 aus RPF4(Col) aufweist, nicht mehr dazu

in der Lage ist, die *ccmB*-mRNA-Prozessierung in Col analog zu RPF4(L*er*) zu vermitteln (Abbildung 7; Abbildung 9A, RPF4-c8; Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c8). Ein anderes Beispiel ist das chimäre Protein RPF4-c4, das ebenfalls nicht funktional bezüglich der *ccmB*-mRNA-Prozessierung ist (Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c4). Das Protein unterscheidet sich vom funktionalen RPF4-c1 durch zusätzliche AS von RPF4(Col) im Bereich zwischen Repeat 9 Position 1 und Repeat 11 Position 1 (Abbildung 9A, RPF4-c1 und RPF4-c4). Dies deutet darauf hin, dass auch die hier veränderten AS wichtig für die Funktionalität von RPF4(L*er*) bei der *ccmB*-mRNA-Prozessierung sind.

Der Sequenzvergleich der RPF4-Proteine aus verschiedenen Ökotypen, welche die L*er*- bzw. die Col-typischen *ccmB*-Transkripte aufweisen, spiegelt die getroffenen Beobachtungen wider. Die Proteine ähneln sich analog zu RPF4(L*er*) und RPF4(Col) im C-Terminus, wobei hier kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen L*er*-Typ- und Col-Typ-Proteinen auftreten (Anhang 4). Desweiteren können zwischen den RPF4-Proteine zwar nur zwei konsistente Unterschiede an den für die Interaktion mit der *ccmB*-mRNA vermeintlich wichtigen Positionen ausgemacht werden [Barkan et al. 2012, Yagi et al. 2013a], jedoch liegen diese in Bereichen, denen anhand der Analyse der chimären Proteine (Abbildung 9) ein entscheidender Beitrag zur Funktionalität von RPF4(L*er*) zugeschrieben werden kann. Zum einen korreliert der konsistente Unterschied in Repeat 2 Position 1 mit dem Ausbleiben der L*er*-typischen *ccmB*-mRNA-Prozessierung in Col + *RPF4*-c7 (Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c7; Anhang 4). Desweiteren tritt im Bereich von Repeat 8 und 9, u.a. an Position 1 von Repeat 9, eine Vielzahl konsistenter Unterschiede zwischen den RPF4-Proteinen auf (Anhang 4). Diese Beobachtung stimmt mit dem Unvermögen von RPF4-c4, L*er*-typische *ccmB*-Transkripte zu prozessieren, überein (Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c4) und weist einmal mehr darauf hin, dass auch die zentralen Repeats von RPF4(L*er*) einen wichtigen Beitrag zur Funktionalität des Proteins leisten.

4.9. RPF3 und RPF6 unterscheiden sich im Wesentlichen in den terminalen Repeats.

Beim Vergleich von RPF3(Col) und RPF6(Col) fällt auf, dass sich die beiden Proteine sowohl in den N- als auch C-terminalen Bereichen unterscheiden. Der mittlere Teil der Proteine (Repeat 7 bis 10) ist dagegen nahezu identisch (Anhang 9). Dies deutet an, dass die Spezifität der Bindungen an die *ccmC*-mRNA in erster Linie durch die äußeren Repeats der beteiligten Proteine vermittelt wird.

Ein erster Hinweis für diese Annahme stellt das Unvermögen der chimären Proteine RPF3N/6C und RPF6N/3C, die sich lediglich durch die ersten sechs PPR-Motive sowie die Aminosäuren vor Repeat 1 von RPF6 bzw. RPF3 unterscheiden, zur korrekten *ccmC*-mRNA-Prozessierung in No-0 bzw. *rpf3-1* beizutragen, dar (Abbildung 33B, No-0 + *RPF3N/6C* und *rpf3-1* + *RPF6N/3C*). RPF3N/6C ist folglich nicht dazu in der Lage das defekte *RPF6*-Allel in No-0 funktional zu ersetzen. Analog kann RPF6N/3C die Abwesenheit von RPF3 in *rpf3-1* nicht ausgleichen. An dieser Stelle sollen einmal mehr die vermeintlichen Bindungsstellen von RPF3(Col) und RPF6(Col) betrachtet werden. Dabei fällt auf, dass diese im 5‘-Bereich an mehreren Positionen identische Nukleotide aufweisen (Abbildung 32, unterstrichene Nukleotide). Lediglich einzelne Interaktionen der N-terminalen Repeats scheinen über die spezifische Bindung von RPF3 bzw. RPF6 und damit die Bildung reifer *ccmC*-Transkripte zu entscheiden. Vermutlich ist es RPF3N/6C folglich nicht möglich eine ausreichend starke Bindung mit der *ccmC*-mRNA einzugehen, um die 5‘-Reifung der Transkripte in No-0 einzuleiten, wobei allerdings der angewandte Code der Interaktion zwischen den AS an Position 6 bzw. 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) der PPR-Motive und der RNA dem chimären Protein eine stärkere Interaktion mit der C24-*ccmC*-mRNA als RPF6(Col) zuspricht (Abbildung 32B; Abbildung 33A, unten links). Weiter scheint auch das vermeintlich schwache Bindungsvermögen von RPF6N/3C an die Col-*ccmC*-mRNA es nicht zu erlauben die *ccmC*-mRNA-Prozessierung in *rpf3-1* wieder herzustellen. Analog zu den Betrachtungen der chimären RPF4-Proteine kann an dieser Stelle aber nicht ausgeschlossen werden, dass mitunter auch die unterschiedliche Primärstruktur vor den Repeats (Anhang 9) die Funktion von RPF3(Col) bzw. RPF6(Col) beeinflusst und damit ursächlich für die ausbleibende *ccmC*-mRNA-Prozessierung in No-0 + *RPF3N/6C* und *rpf3-1* + *RPF6N/3C* ist.

Zum zweiten kann der vermutete Einfluss der terminalen Repeats auf die Bindung damit begründet werden, dass auch die Veränderung der C-terminalen Repeats im Unvermögen der chimären Proteine, zur *ccmC*-mRNA-Reifung beizutragen, resultiert. So ist in *rpf3-1* auch in Anwesenheit von RPF3N/6C weiterhin die Bildung 5‘-reifer *ccmC*-Transkripte nicht möglich (Abbildung 33, *rpf3-1* + *RPF3N/6C*). Gleichermaßen ist RPF6N/3C nicht dazu in der Lage in No-0 die Entstehung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte einzuleiten (Abbildung 33B, No-0 + *RPF6N/3C*). Obwohl sich RPF3(Col) und RPF6(Col) im betrachteten Bereich stark ähneln, legen die erhaltenen Ergebnisse nahe, dass sich analog zu den N-Termini die C-Termini der Proteine nicht funktional ersetzen können. Auch die vermeintliche Bindung des C-Terminus

scheint daher durch einzelne RPF3- bzw. RPF6-spezifische Interaktionen mit der mRNA vermittelt zu werden und damit über eine korrekte oder ausbleibende *ccmC*-mRNA-Prozessierung zu entscheiden.

Die Ausführungen legen nahe, dass die mRNA-Bindung von RPF4(L*er*) auf der einen Seite sowie von RPF3(Col) bzw. RPF6(Col) auf der anderen Seite Ähnlichkeiten aber auch Unterschiede aufweist. Allen Protein-RNA-Interaktionen ist gemein, dass der N-terminale Teil der Proteine einen wesentlichen Beitrag zur Bindung und damit Funktionalität bezüglich der 5‘-Prozessierung leistet (Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c7; Abbildung 33B, No-0 + *RPF3N/6C* und *rpf3-1* + *RPF6N/3C*). Zumindest im Fall von RPF3 und RPF6 konnte Vergleichbares auch für den C-Terminus festgestellt werden, wobei dies ebenso die Analysen von RPF6(Sorbo) und RPF6(No-0) mit einbezieht. Die Bindung von RPF6(Sorbo) an die Col-*ccmC*-mRNA scheint im Wesentlichen durch die C-terminalen Repeats zu erfolgen (Abbildung 44C). Desweiteren liegt auch die Vermutung nahe, dass der Ausfall von RPF6(No-0) womöglich mit Unterschieden im C-Terminus im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu begründen ist (Abbildung 44A + B). Ähnliches wurde, wie bereits erwähnt, auch schon an anderer Stelle beobachtet, wobei oftmals die zentralen Repeats der PPR-Proteine nicht zur Bindung beitragen [Barkan et al 2012, Yin et al. 2013]. Ob dies ebenso auf RPF3 und RPF6 zutrifft, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Anders sieht es bei RPF4(L*er*) aus. Hier sind auch die zentralen Repeats wesentlich an der Interaktion von RPF4 mit der *ccmB*-mRNA beteiligt (Abbildung 9A, RPF4-c4 und RPF4-c8; Abbildung 9B, Col + *RPF4*-c4 und Col + *RPF4*-c8). Unabhängig von den betrachteten Interaktionen zwischen den vermeintlich wichtigen AS innerhalb der Repeats und der mRNA spielen aber wohl noch weitere, bislang nicht näher bestimmte, Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Festlegung der Bindungsstelle.

4.10. Der Ausfall eines RPF scheint keine negativen Auswirkungen auf die Pflanzen zu haben.

In Col sowie einer Vielzahl anderer Ökotypen liegen *ccmB*-Transkripte mit 5‘-Enden bei -140 bzw. -347/346 vor. Im Gegensatz dazu werden in L*er* und einigen weiteren Ökotypen zusätzliche *ccmB*-Transkripte generiert (Abbildung 5, Tabelle 12). Anhand des Wachstums oder der Fitness kann kein phänotypischer Nachteil der Pflanzen ohne diese zusätzlichen Transkripte im Vergleich zu den Pflanzen mit den L*er*-typischen *ccmB*-Transkripten beobachtet werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die 5‘-reifen *ccmB*-Transkripte in Col ausreichen, um

die erforderliche Menge an *CcmB*-Protein zu erzeugen. Diese Annahme wirft allerdings die Frage auf, wozu die L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte benötigt werden, zumal in L*er* auch die in Col vorliegenden *ccmB*-Transkripte gebildet werden. Die L*er*-typischen *ccmB*-Transkripte scheinen daher nicht (mehr) notwendig für den Energiegewinn im Zuge der Atmungskette zu sein. In diesem Zusammenhang kann die Vermutung aufgestellt werden, dass RPF4(Col) sich durch eine Vielzahl an nicht-synonymen AS-Austauschen dahingehend verändert hat, dass eine Bindung an die *ccmB*-mRNA nicht mehr möglich ist. Diese Annahme korreliert auch damit, dass dem Protein aus Col in einer kürzlich veröffentlichten Publikation, hier als RF-like 9 (RFL9) bezeichnet, eine Funktion in der ribonukleolytischen Prozessierung zweier mitochondrialer Transkripte zugewiesen wurde. RFL9 (RPF4(Col)) stellt somit ein Protein dar, dass das Potential dazu hat mitochondriale Transkripte ähnlich wie RFs auszuschalten [Arnal et al. 2014].

Die durchgeführten Untersuchungen bezüglich 5‘-reifer *ccmC*-Transkripte weisen darauf hin, dass Letztere für *A.thaliana* nicht essentiell sind. So wurde etwa festgestellt, dass *rpf3-1*-Pflanzen trotz der nahezu vollständigen Abwesenheit reifer *ccmC*-Transkripte und einer damit stark verminderten Menge an *CcmC*-Protein, keinen makroskopischen Phänotyp oder ein Wachstumsdefizit unter normalen Wachstumsbedingungen zeigen. Desweiteren beeinflusst die geringe Menge an *CcmC*-Protein die Aktivität der Atmungsketten-Komplexe nicht messbar [Jonietz et al. 2011]. Analog zu diesen Untersuchungen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass ebenso in den natürlichen *RPF3*- oder auch *RPF6*-Mutanten weniger *CcmC*-Protein vorliegt als dies etwa in Col oder C24 der Fall ist. Eine ausbleibende Beeinträchtigung dieser Mutanten korreliert zunächst mit der Tatsache, dass mitochondriale Transkripte sehr stabil sind und somit vermutlich auch geringe Mengen an korrekt prozessierten Transkripten ausreichen, um die benötigten Proteine zu synthetisieren [Nelson et al. 2013]. Desweiteren kann auch spekuliert werden, dass anders als in Bakterien das *CcmC*-Protein wohl keine essentielle Funktion in der Cytochrom C-Biogenese in Pflanzen hat. Im Gegensatz dazu ist das *CcmC*-Protein in Bakterien am Häm-Transport durch die Cytoplasma-Membran beteiligt [Giegé et al. 2008, Kranz et al. 2009].

Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass in *A.thaliana* ein großer Aufwand zur Bildung 5‘-reifer *ccmB*- bzw. *ccmC*-Transkripte betrieben wird. Wie beschrieben haben sich beispielsweise zwei co-adaptierte Systeme zwischen dem mitochondrialen und dem Kern-

Genom etabliert, die zur Reifung der *ccmC*-Transkripte beitragen (Abbildung 45). Welche Bedeutung die 5‘-Prozessierung in *A.thaliana* im Allgemeinen bzw. bezogen auf die Reifung der *ccmB*- und *ccmC*-mRNAs hat, ist derzeit noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

In *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) sind die RNA PROCESSING FACTORs (RPFs), *Pentatricopeptide Repeat*(PPR)-Proteine der P-Subfamilie, an der 5'-Prozessierung mitochondrialer Transkripte beteiligt. Die RPFs sind teilweise RESTORER OF FERTILITY(RF)-ähnlich, so auch die in dieser Arbeit charakterisierten Proteine RPF3, RPF4 und RPF6. RF-Proteine tragen dazu bei eine cytoplasmatische männliche Sterilität (CMS) zu umgehen, indem die Expression von CMS-auslösenden, mitochondrialen Genen unterdrückt wird.

RPF4(L*er*) ist in die Entstehung mehrerer 5'-reifer *ccmB*-mRNAs involviert, die neben den auch in Col vorliegenden *ccmB*-Haupttranskripten gebildet werden. Anhand von *in silico*-Vorhersagen wird eine Bindung von RPF4(L*er*) stromaufwärts der Prozessierungsstellen angenommen. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich dem N-Terminus von RPF4(L*er*) einen wesentlichen Einfluss auf die 5'-Reifung der *ccmB*-Transkripte zuzusprechen. Desweiteren scheinen auch die zentralen PPR-Motive zur Funktionalität von RPF4(L*er*) beizutragen. Der C-Terminus ist im Gegensatz dazu vermutlich nicht spezifisch für die Funktion des Proteins. Die Bedeutung des N-Terminus und der zentralen Repeats spiegelt sich im Sequenzvergleich der RPF4-Proteine aus Ökotypen mit dem L*er*- bzw. dem Col-typischen *ccmB*-Transkriptmuster wider. So treten innerhalb der vermeintlich wichtigen Bereiche konsistente Unterschiede zwischen den verschiedenen RPF4-Proteinen auf.

Die 5'-Reifung der *ccmC*-Transkripte in *A.thaliana* steht in direktem Zusammenhang mit einem 66 bp langen Sequenzabschnitt der mitochondrialen DNA stromaufwärts des *ccmC*-Leserasters, der den Col- bzw. C24-*ccmC*-Genotyp definiert. Bei Vorliegen des Col-*ccmC*-Genotyps bilden sich unter dem Einfluss von RPF3 *ccmC*-Transkripte mit 5'-Enden bei -484/482. Für die Reifung der C24-typischen *ccmC*-Transkripte mit 5'-Enden bei -391/390 ist dagegen RPF6 verantwortlich. Anhand von *in silico*-Vorhersagen wird eine Bindung der Proteine innerhalb des zwischen Col und C24 diskriminierenden Bereichs angenommen. Dies konnte durch *in vitro*-Analysen bestätigt werden. Auf Grund der Ähnlichkeit von RPF3 und RPF6 scheint die Bindung an die *ccmC*-mRNA und damit Funktionalität der Proteine von einzelnen Aminosäuren abzuhängen. Der Ausfall oder (teilweise) Funktionsverlust der Proteine resultiert in einem veränderten *ccmC*-Transkriptmuster, wobei sich teilweise andeutet, dass in den entsprechenden *A.thaliana* Ökotypen der nicht mit dem vorliegenden *ccmC*-Genotyp korrelierende RPF zur Transkriptreifung beiträgt.

6. Literaturverzeichnis

Arnal N., Quadrado M., Simon M., Mireau H. (2014): A restorer-of-fertility like pentatricopeptide repeat gene directs ribonucleolytic processing within the coding sequence of rpf3-rpl16 and orf240a mitochondrial transcripts in Arabidopsis thaliana, *The Plant Journal* **78** (1): 134-145.

Arrieta-Montiel M.P., Shedge V., Davila J., Christensen A.C., Mackenzie S.A. (2009): Diversity of the Arabidopsis Mitochondrial Genome Occurs via Nuclear-Controlled Recombination Activity, *Genetics* **183** (4): 1261-1268.

Backert S., Börner T. (2000): Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of higher plant *Chenopodium album* (L.), *Current Genetics* **37** (5): 304-314.

Backert S., Nielsen B. and Börner T. (1997): The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants, *Trends in Plant Science* **2** (12), 477–483.

Barkan A., Rojas M., Fujii S., Yap A., Chong Y.S., Bond C.S., Small I. (2012): A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genetics* **8** (8): e1002910.

Barkan A., Small I. (2014): Pentatricopeptide Repeat Proteins in Plants, *Annual Review of Plant Biology* **65**: 415-442

Bentolila S., Alfonso A.A., Hanson M.R. (2002): A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **99** (16): 10887-10892.

Binder S., Stoll K., Stoll B. (2013): P-class pentatricopeptide repeat proteins are required for efficient 5‘ end formation of plant mitochondrial transcripts, *RNA Biology* **10** (9): 1511-1519.

Bonen L. (2008): *Cis*- and *trans*-splicing of group II introns in plant mitochondria, *Mitochondrion* **8** (1): 26-34.

Brown G.G., Formanová N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W.Y., Landry B.S. (2003): The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats, *The Plant Journal* **35** (2): 262-272.

Chase C.D. (2007): Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions, *Trends in Genetics* **23** (2): 81-90.

Chateigner-Boutin A.-L., Colas des Francs-Small C., Fujii S., Okuda K., Tanz S., Small I. (2013): The E domains of pentatricopeptide repeat proteins from different organelles are not functionally equivalent for RNA editing, *The Plant Journal* **74** (6): 935-945.

Chateigner-Boutin A.-L., Small I. (2010): Plant RNA editing, *RNA Biology* **7** (2): 213-219.

Clough S.J., Bent A.F. (1998): *Floral dip*: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal* **16** (6): 735-743.

Curtis M.D., Grossniklaus U. (2003): A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta, *Plant Physiology* **133** (2): 462-469.

Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., Scheible W.R. (2005): Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* **139** (1): 5-17.

Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants, *Nucleic Acids Research* **13** (13): 4777-4788.

Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentin C., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I., Caboche M., Delourme R., Bendahmane A. (2003): Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family, *EMBO Reports* **4** (6): 588-594.

Dowling D.K., Friberg U., Lindell J. (2008): Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation, *Trends in Ecology and Evolution* **23** (10): 546-554.

Dyall S.D., Brown M.T., Johnson P.J. (2004): Ancient invasions: from endosymbionts to organelles, *Science* **304** (5668): 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 Research* **19** (6): 1349.

Falcon de Longevialle A.F., Meyer E.H., Andrés C., Taylor N.L., Lurin C., Millar A.H., Small I. (2007): The pentatricopeptide repeat gene *OTP43* is required for *trans*-splicing of the mitochondrial *nad1* intron 1 in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* **19** (10): 3256-3265.

Falcon de Longevialle A.F., Small I., Lurin C. (2010): Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles, *Molecular Plant* **3** (4): 691-705.

Forner J., Hölzle A., Jonietz C., Thuss S., Schwarzländer M., Weber B., Meyer R.C., Binder S. (2008): Mitochondrial mRNA Polymorphisms in Different Arabidopsis Accessions, *Plant Physiology* **148** (2): 1106-1116.

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 Research* **35** (11): 3676-3692.

Fujii S., Bond C.S., Small I.D. (2011): Selection pattern on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **108** (4): 1723-1728.

Fujii S., Small I. (2011): The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes, *New Phytologist Trust* **191** (1): 37-47.

Fujii S., Toriyama K. (2008): Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility, *Plant and Cell Physiology* **49** (10): 1484-1494.

Gan X., Stegle O., Behr J., Steffen J.G., Drewe P., Hildebrand K.L., Lyngsoe R., Schultheiss S.J., Osborne E.J., Sreedharan V.T., Kahles A., Bohnert R., Jean G., Derwent P., Kersey P., Belfield E.J., Harberd N.P., Kemen E., Toomajian C., Kover P., Clark R.M., Rätsch G., Mott R. (2011): Multiple reference genomes and transcriptomes of Arabidopsis thaliana, *Nature* **477** (7365): 419-423.

Giegé P., Brennicke A. (1999): RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (26): 15324-15329.

Giegé P., Grienenberger J.M., Bonnard G. (2008): Cytochrom c biogenesis in mitochondria, *Mitochondrion* **8** (1): 61-73.

Gobron N., Waszczak C., Simon M., Hiard S., Boivin S., Charif D., Ducamp A., Wenes E., Budar F. (2013): A Cryptic Cytoplasmic Male Sterility Unveils a Possible Gynodioecious Past for *Arabidopsis thaliana*, *PLoS ONE* **8** (4): e62450.

Haïli N., Arnal N., Quadrado M., Amiar S., Tcherkez G., Dahan J., Briozzo P., Colas des Francs-Small C. Vrielynck N., Mireau H. (2013): The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the *nad*4 mRNA in Arabidopsis mitochondria, *Nucleic Acids Research* **41** (13): 6650-6663.

Hammani K., Giegé P. (2014): RNA metabolism in plant mitochondria, *Trends in Plant Science* **19** (6): 380-389.

Hauler A., Jonietz C., Stoll B., Stoll K., Braun H.-P., Binder S. (2013): RNA PROCESSING FACTOR 5 is required for efficient 5‘ cleavage at a processing site conserved in RNAs of three different mitochondrial genes in Arabidopsis thaliana, *The Plant Journal* **74** (4): 593-604.

Hedtke B., Börner T., Weihe A. (1997): Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis, *Science* **277** (5327): 809-811.

Hedtke B., Börner T., Weihe A. (2000): One RNA polymerase serving two genomes, *EMBO Reports* **1** (5): 435-440.

Hedtke B., Meixner M., Gillandt S., Richter E., Börner T., Weihe A. (1999): Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*, *The Plant Journal* **17** (5):557-561.

Hirayama T., Matsuura T., Ushiyama S., Narusaka M., Kurihara Y., Yasuda M., Ohtani M., Seki M., Demura T., Nakashita H., Narusaka Y., Hayashi S. (2013): A poly(A)-specific ribonuclease directly regulates the poly(A) status of mitochondrial mRNA in Arabidopsis, *Nature Communications* **4** (2247): DOI:10.1038/ncomms3247.

Hölzle A., Jonietz C., Törjek O., Altmann T., Binder S., Forner J. (2011): A RESTORER OF FERTILITY-like PPR gene is required for 5‘ end processing of the *nad*4 mRNA in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal* **65** (5): 737-744.

Holec S., Lange H., Kühn K., Alioua M., Börner T., Gagliardi D. (2006): Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and PNPase, *Molecular and Cellular Biology* **26** (7): 2869-2876.

Hu J., Wang K., Huang W., Liu G., Gao Y., Wang J., Huang Q., Ji Y., Qin X., Wan L., Zhu R., Li S., Yang D., Zhu Y. (2012): The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162, *The Plant Cell* **24** (1): 109-122.

Jonietz C., Forner J., Hildebrandt T., Binder S. (2011): RNA PROCESSING FACTOR 3 is Crucial for the Accumulation of mature *ccm*C Transcripts in Mitochondria of Arabidopsis Accession Columbia, *Plant Physiology* **157** (3): 1430-1439.

Jonietz C., Forner J., Hölzle A., Thuss S., Binder S. (2010): RNA PROCESSING FACTOR 2 is Required for 5‘ End Processing of *nad*9 and *cox*3 mRNAs in Mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell* **22** (2): 443-453.

Kazama T., Toriyama K. (2003): A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice, *FEBS Letters* **544** (1-3): 99-102.

Keren I., Tal L., Colas des Francs-Small C., Araújo W.L., Shevtsov S., Shaya F., Fernie A.R., Small I., Ostersetzer-Biran O. (2012): nMAT1, a nuclear-encoded maturase involved in the *trans*-splicing of *nad*1 intron 1, is essential for mitochondrial complex I assembly and function, *The Plant Journal* **15** (12): 2299-2311.

Koizuka N., Imai R., Fujimoto H., Hayakawa T., Kimura Y., Kohno-Murase J., Sakai T., Kawasaki S., Imamura J. (2003): Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish, *The Plant Journal* **34** (4): 407-415.

Koprivova A., Colas des Francs-Small C., Calder G., Mugford S.T., Tanz S., Lee B.R., Zechmann B., Small I., Kopriva S. (2010): Identification of a Pentatricopeptide Repeat Protein Implicated in Splicing of Intron 1 of Mitochondrial *nad*7 Transcripts, *Journal of Biological Chemistry* **285** (42): 32192-32199.

Kranz R.G., Richard-Fogal C., Taylor J.S., Frawley E.R. (2009): Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73** (3): 407-415.

Kühn K., Weihe A., Börner T. (2005): Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in Arabidopsis, *Nucleic Acids Research* **33** (1): 337-346.

Lister C., Dean C. (1993): Recombinant inbred lines for mapping of RFLP and phenotypic markers in Arabidopsis thaliana, *The Plant Journal* **4** (4): 745-750.

Liu S., Melonek J., Boykin L.M., Small I., Howell K.A. (2013): PPR-SMRs: ancient proteins with enigmatic functions, *RNA Biology* **10** (9):1501-1510.

Logan D.C. (2006): The mitochondrial compartment, *Journal of Experimental Botany* **57** (6): 1225-1243.

Lonsdale D.M., **Brears T., Hodge T.P., Melville S.E., Rottmann W.H.** (1988): The plant mitochondrial genome: homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity, *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* **319** (1189): 149-163.

Lurin C., Andrés C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., Bruyère C., Caboche M., Debast C., Gualberto J., Hoffmann B., Lecharny A., Le Ret M., Martin-Magniette M.-L., Mireau H., Peeters N., Renou J.-P., Szurek B., Taconnat L., Small I. (2004): Genome-wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis, *The Plant Cell* **16** (8): 2089-2103.

Mackenzie S.A. (2007): The unique biology of mitochondrial genome instability in plants, PLANT MITOCHONDRIA - Annual Plant Reviews, edited by D. Logan, *Blackwell Publishing*, **31**: 36-46.

Moison M., Roux F., Quadrado M., Duval R., Ekovich M., Lê D.H., Verzaux M., Budar F. (2010): Cytoplasmic phylogeny and evidence of cyto-nuclear co-adaptation in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal* **63** (5):728-738.

Nelson C.J., Li. L., Jacoby R., Millar A.H. (2013): Degradation rate of mitochondrial proteins in Arabidopsis thaliana cells, *Journal of Proteome Research* **12** (7): 3449-3459.

Perrin R., Lange H., Grienenberger J.M., Gagliardi D. (2004b): AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in Arabidopsis thaliana mitochondria, *Nucleic Acids Research* **32** (17): 5174-5182.

Perrin R., Meyer E.H., Zaepfel M., Kim Y.J., Mache R., Grienenberger J.M., Gualberto J.M., Gagliardi D. (2004a): Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of atp9 mRNAs in Arabidopsis mitochondria, *The Journal of Biological Chemistry* **279** (24): 25440-25446.

Pfalz J., Bayraktar O.A., 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** (14): 2042-2052.

Preuten T., Cincu E., Fuchs J., Zoschke R., Liere K., Börner T. (2010): Fewer genes than organelles: extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells, *The Plant Journal* **64** (6): 948-959.

Ruwe H., Schmitz-Linneweber C. (2012): Short non-coding RNA fragments accumulating in chloroplasts: footprints of RNA binding proteins?, *Nucleic Acids Research* **40** (7): 3106-3116.

Sambrook J., Russel D.W. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Third Edition.

Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Tabata S. (1999): Complete Structure of the Chloroplast Genome of Arabidopsis thaliana, *DNA Research* **6** (5): 283-290.

Schmitz-Linneweber C., Kushnir S., Babiychuk E., Poltnigg P., Herrmann R.G., Maier R.M. (2005): Pigment Deficiency in Nightshade/Tobacco Cybrids Is Caused by the Failure to Edit the Plastid ATPase α-Subunit mRNA, *The Plant Cell* **17** (6): 1815-1828.

Small I., Peeters N. (2000): The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends in Biochemical Science* **25** (2): 46-47.

Steinhilber J. (2010): Phänotypisierung mitochondrialer RNAs in T-DNA-Insertionsmutanten und verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*, Institut für Molekulare Botanik, Universität Ulm.

Stoll B., **Stoll K.**, **Steinhilber J.**, **Jonietz C.**, **Binder S.** (2013): Mitochondrial transcript length polymorphisms are a widespread phenomenon in Arabidopsis thaliana, *Plant Molecular Biology* **81** (3): 221-233.

Stoll B., Zendler D., Binder S. (2014): RNA Processing Factor 7 and Polynucleotide Phosphorylase Are Necessary for Processing and Stability of nad2 mRNA in Arabidopsis Mitochondria, *RNA Biology* **11** (7): 968-976.

Stoll K., Jonietz C., Binder S. (2015): In *Arabidopsis thaliana* two co-adapted cyto-nuclear systems correlate with distinct *ccmC* transcript sizes, *The Plant Journal* **81** (2): 247-257.

Stutzer C. (2011): Kartierung eines *ccmC* mRNA-Prozessierungsfaktors in *Arabidopsis thaliana*, Institut für Molekulare Botanik, Universität Ulm

Takenaka M., Zehrmann A., Verbitskiy D., Kugelmann M., Härtel B., Brennicke A. (2012): Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **109** (13): 5104-5109.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* **408** (6826): 796-815.

Unseld M., Marienfeld J.R., Brandt P., Brennicke A. (1997): The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides, *Nature Genetics* **15** (1): 57-61.

Wang Z., Zhou Y., Li X., Zhang Q., Chen L., Wu H., Su D., Chen Y., Guo J., Luo D., Long Y., Zhong Y., Liu Y.G. (2006): Cytoplasmic male sterility of rice boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing, *The Plant Cell* **18** (3): 676-687.

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** (9): 1930-1941.

Yagi Y., Hayashi S., Kobayashi K., Hirayama T., Nakamura T. (2013a): Elucidation of the RNA Recognition Code for Pentatricopeptide Repeat Proteins Involved in Organelle RNA Editing in Plants, *PLoS One* **8** (3): e57286.

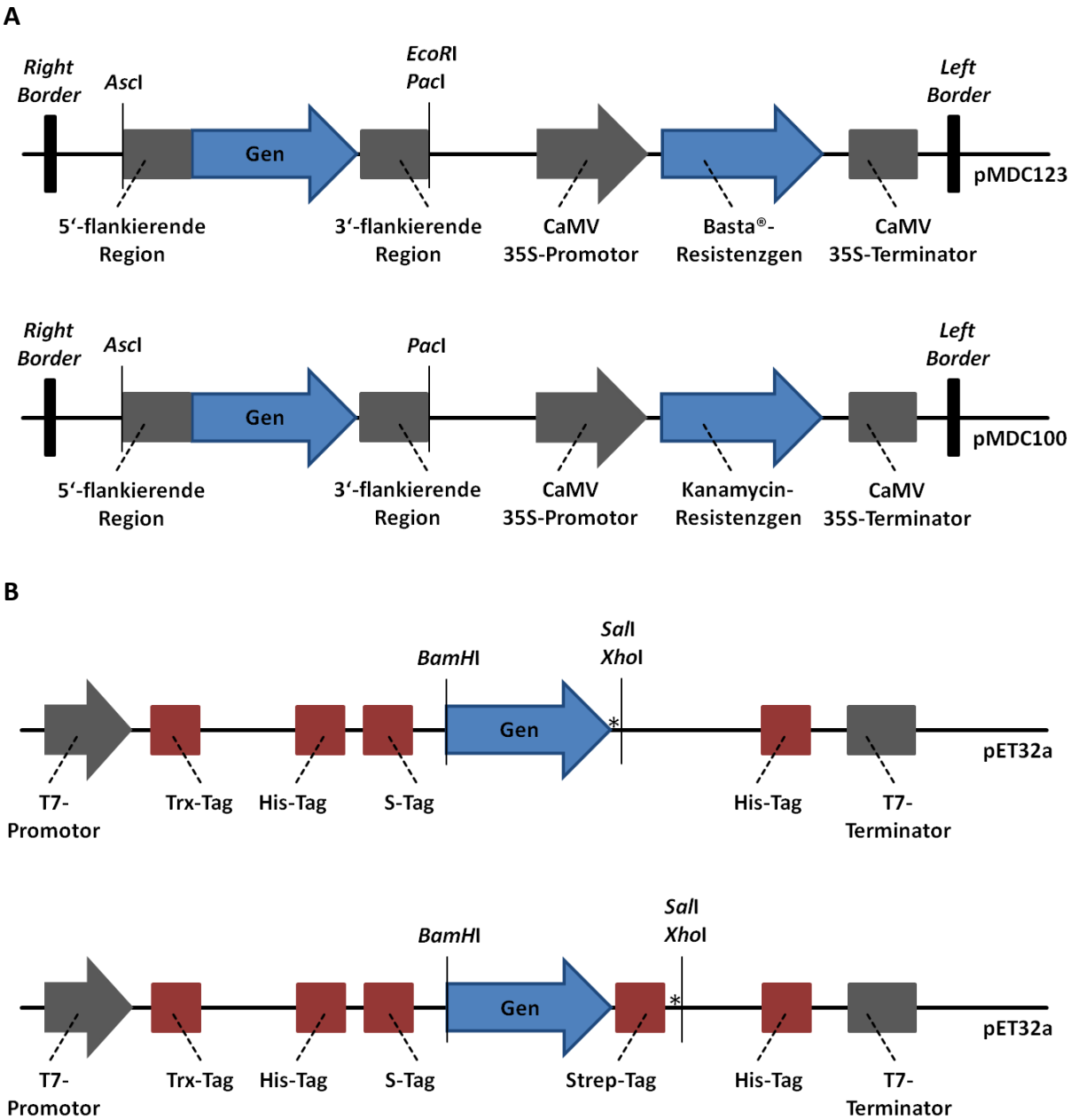
Yagi P., Tachikawa M., Noguchi H., Satoh S., Obokata J., Nakamura T. (2013b): Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA editing, *RNA Biology* **10** (9): 1419-1425.

Yin P., Li Q., Yan C., Liu Y., Liu J., Yu F., Wang Z., Long J., He J., Wang H.-W., Wang J., Zhu J.-K., Shi Y., Yan N. (2013): Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins, *Nature* **504** (7478): 168-171.

Zehrmann A., Verbitskiy D., van der Merwe J.A., Brennicke A., Takenaka M. (2009): A DYW domain-containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria in *Arabidopsis thaliana, The Plant Cell* **21** (2): 558-567.

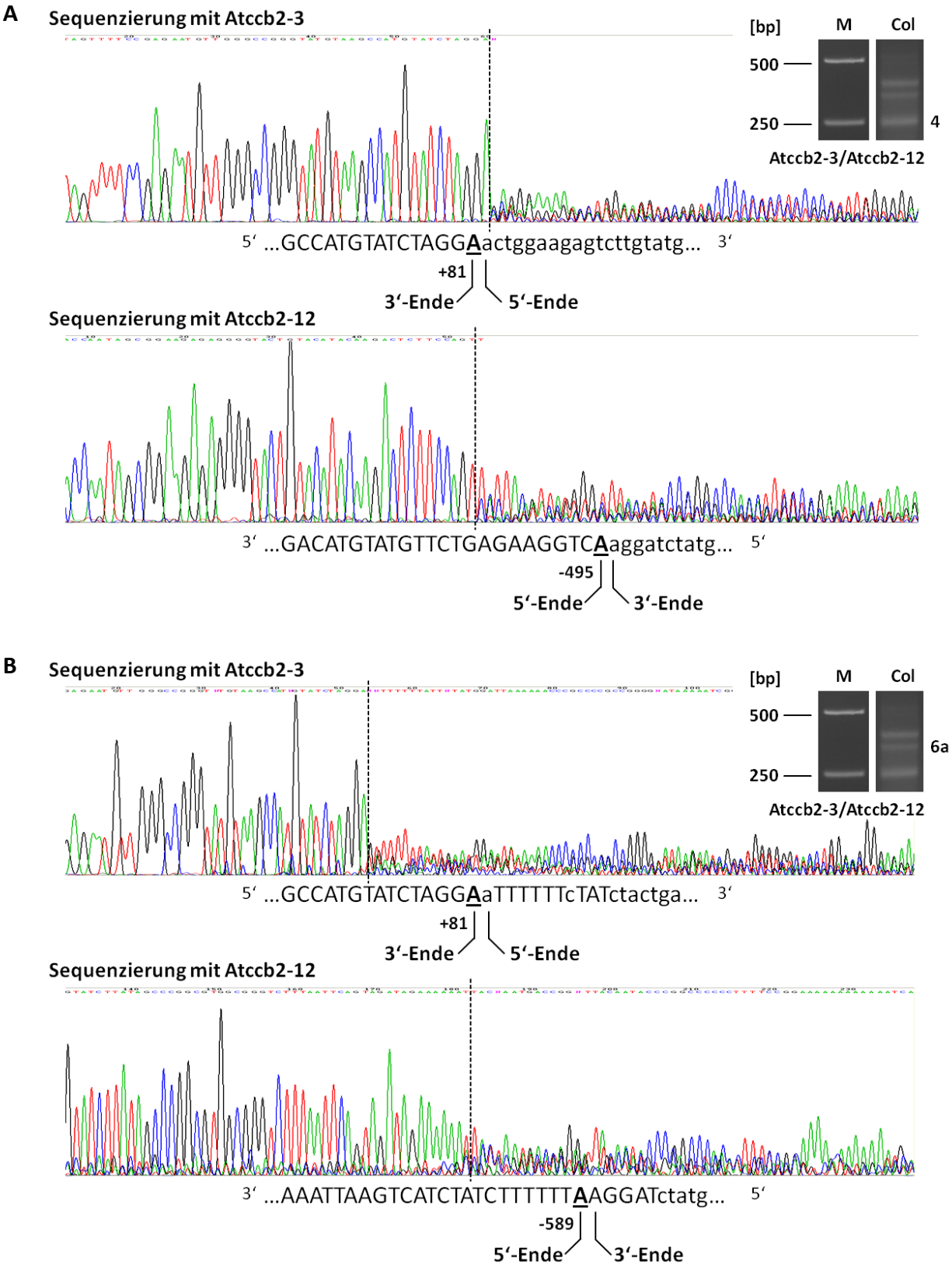
7. Anhang

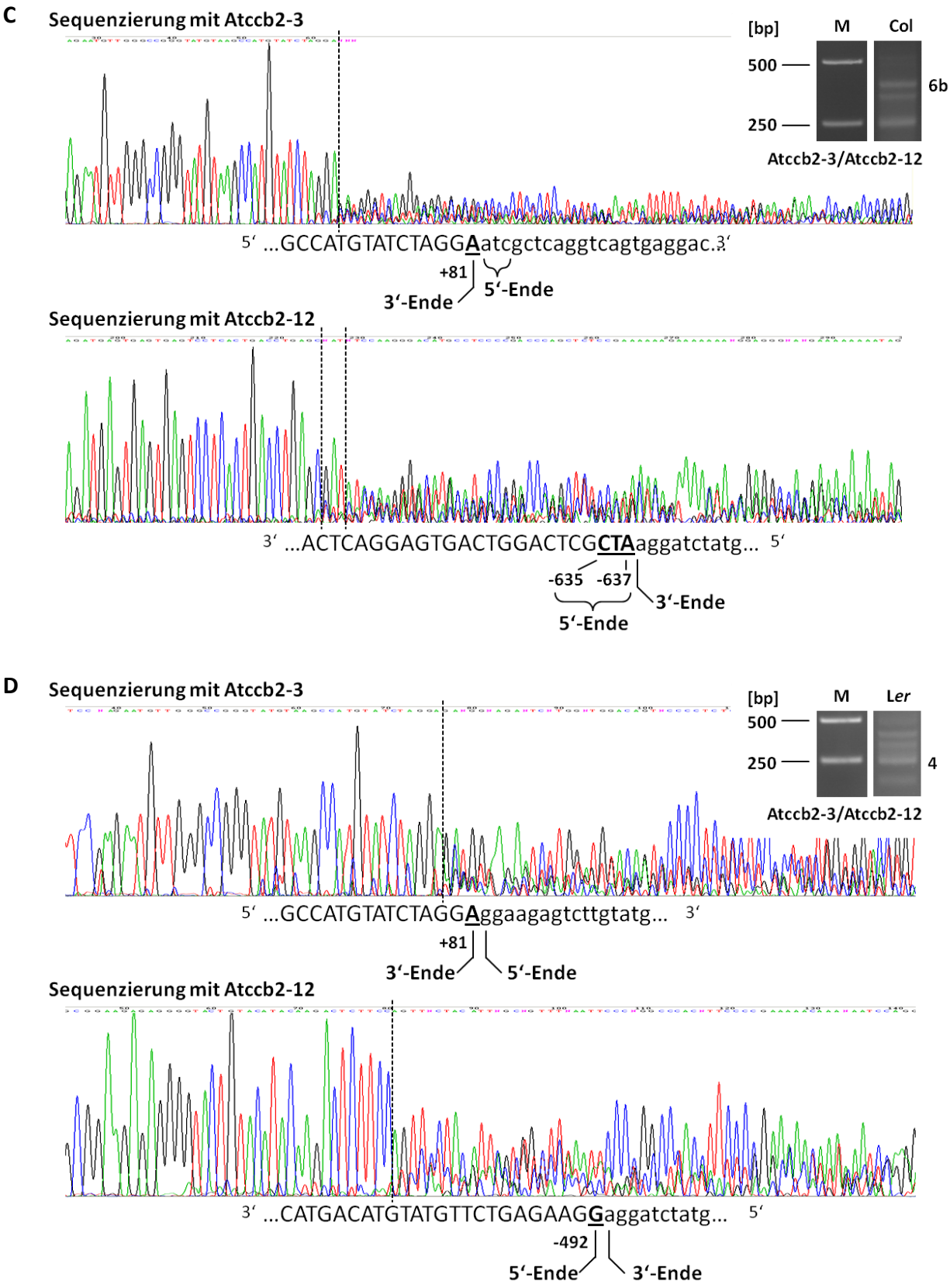
Anhang 1: Schematische Konstruktkarten

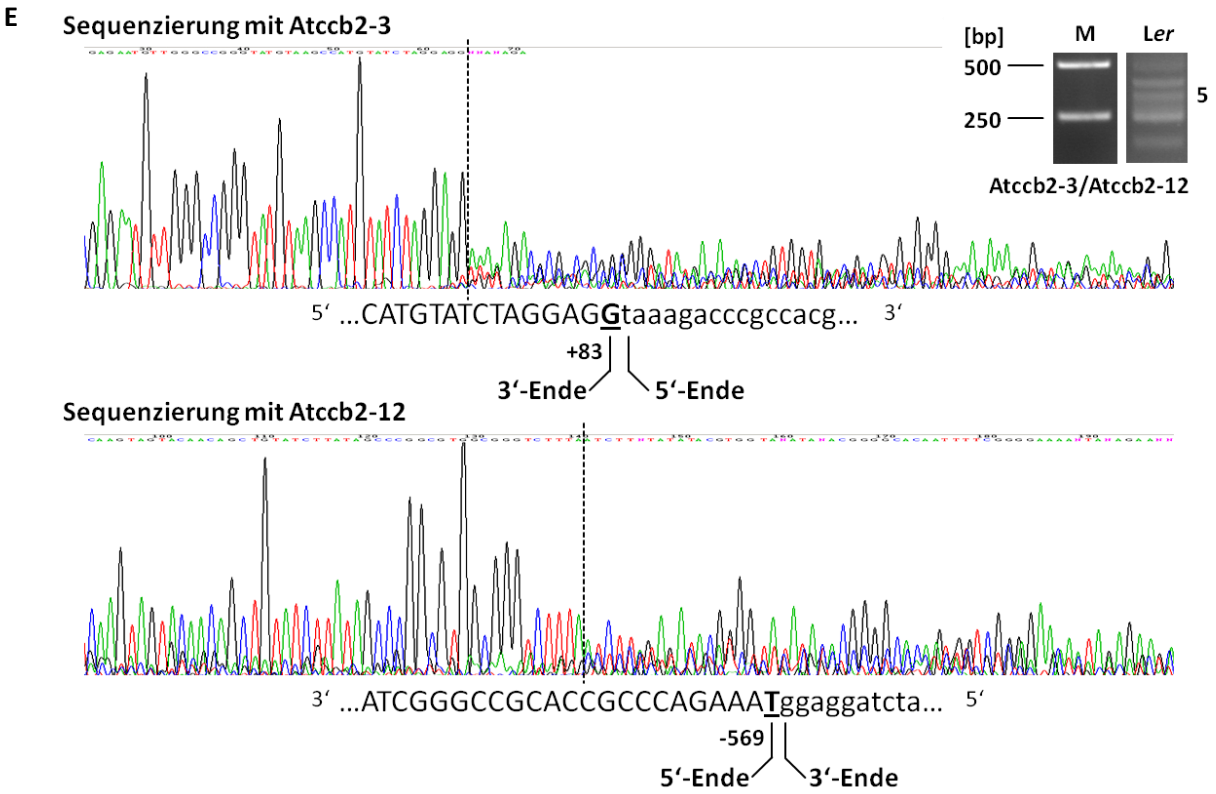


Anhang 1: Schematische Konstruktkarten. A: Pflanzentransformationskonstrukte. Die (chimären) Gene sowie die 5'- und 3'-flankierenden Regionen wurden mit *Asc*I und *Pac*I bzw. im Fall von At1g62720 mit *Asc*I und *EcoR*I verdaut und in pMDC123 bzw. pMDC100 kloniert. Je nach Vektor wird unter der Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors ein Basta®- (pMDC123) oder ein Kanamycin-Resistenzgen (pMDC100) exprimiert. In pMDC123 wurden At1g62910(L*er*), At1g62914(L*er*), At1g62930(L*er*), *RPF4*-c1, *RPF4*-c2, *RPF4*-c4, *RPF4*-c6, *RPF4*-c7, *RPF4*-c8, At1g62590(Col), At1g62680(Col), At1g62720(Col), At1g62910(Col), At1g62914(Col), At1g63070(Col), At1g63080(Col), At1g63130(Col), *RPF3N/6C* sowie *RPF6N/3C* und in pMDC100 At1g62930(C24), At1g62930(Ta), *RPF3N/6C* sowie *RPF6N/3C* kloniert. **B:** Überexpressionskonstrukte. Die 5'-verkürzten Gene inklusive Stoppkodon (*) wurden mit *Bam*HI und *Sal*I (*RPF6*) oder *Xho*I (*RPF3*) verdaut und in pET32a kloniert. Die rekombinanten Proteine weisen N-terminal einen Trx-, einen His- sowie einen S-Tag auf. Die 5'-verkürzten Gene ohne Stoppkodon, jedoch mit der Sequenz des Strep-Tags am 3'-Ende, wurden mit *Bam*HI und *Sal*I (*RPF6*) bzw. *Bam*HI und *Xho*I (*RPF3*) verdaut und in pET32a kloniert. Die rekombinanten Proteine weisen N-terminal einen Trx-, einen His- sowie einen S-Tag und C-terminal einen Strep-Tag auf.

Anhang 2: Bestimmung neuer *ccmB*-mRNA-5‘-Enden in Col und L*er*




C
Sequenzierung mit Atccb2-3
[bp]
M
Col
500
250
6b
Atccb2-3/Atccb2-12
5‘ ...GCCATGTATCTAGGAatcgctcaggtcagtgaggac.3‘
+81
3‘-Ende
5‘-Ende
Sequenzierung mit Atccb2-12
3‘ ...ACTCAGGAGTGACTGGACTCGCTAaggatctatg... 5‘
-635
-637
3‘-Ende
5‘-Ende
D
Sequenzierung mit Atccb2-3
[bp]
M
Ler
500
250
4
Atccb2-3/Atccb2-12
5‘ ...GCCATGTATCTAGGAggaagagtcttgtatg... 3‘
+81
3‘-Ende
5‘-Ende
Sequenzierung mit Atccb2-12
3‘ ...CATGACATGTATGTTCTGAGAAGGaggatctatg... 5‘
-492
5‘-Ende
3‘-Ende



Anhang 2: Bestimmung neuer *ccmB*-mRNA-5‘-Enden in Col und L*er*. Die CR-RT-PCR erfolgte mit den Primern Atccb2-3 und Atccb2-12 (P7 und P1 in Abbildung 5). Die erhaltenen PCR-Muster sind jeweils oben rechts gezeigt. Desweiteren ist immer das sequenzierte PCR-Produkt gekennzeichnet, wobei die angegebenen Zahlen denen in Abbildung 10 und Abbildung 11 entsprechen. Weitere Angaben können Abbildung 7 entnommen werden. In Col wurden neben dem ca. 250 bp großen PCR-Produkt **(A)** noch zwei weitere PCR-Produkte einer Größe von etwa 350 **(B)** und 400 bp **(C)** sequenziert. In L*er* wurden ein ca. 250 **(D)** sowie ein ca. 320 bp großes PCR-Produkt **(E)** sequenziert. Die Sequenzierung wurde jeweils mit den in der PCR verwendeten Primern durchgeführt. Die senkrechte Linie im Chromatogramm bzw. unterstrichene Nukleotide in der darunter stehenden Sequenz markieren das jeweils ermittelte 3‘- bzw. 5‘-Ende. Großbuchstaben geben durch die Sequenzierung erfasste Nukleotide an. Kleingeschriebenen Nukleotide sind aus dem Chromatogramm nicht lesbar und geben die Sequenz des 5‘- (oben) bzw. 3‘-Endes (unten) nach NC_001284 wider. Als Kriterien zur Bestimmung der 5‘- und 3‘-Enden werden eine deutliche Abnahme der Peakhöhe, eine Zunahme der Unterpeaks und damit verbunden eine zunehmend unsaubere Sequenz herangezogen. **A:** Das erfasste *ccmB*-Transkript von Col besitzt ein 5‘-Ende bei -495 sowie ein 3‘-Ende bei +81. **B:** Das erfasste *ccmB*-Transkript von Col besitzt ein 5‘-Ende bei -589 sowie ein 3‘-Ende bei +81. **C:** Das erfasste *ccmB*-Transkript von Col besitzt ein 5‘-Ende im Bereich von -635 bis -637 (durch eine Klammer unter den entsprechenden Nukleotiden gekennzeichnet) sowie ein 3‘-Ende bei +81. **D:** Das erfasste *ccmB*-Transkript von L*er* besitzt ein 5‘-Ende bei -492 sowie ein 3‘-Ende bei +81. **E:** Das erfasste *ccmB*-Transkript von L*er* besitzt ein 5‘-Ende bei -569 sowie ein 3‘-Ende bei +83.

Anhang 3: *RPF4*-Allele in verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen

A *RPF4*-Allel aus L*er*

```
ATGATGTTATCGTTTGCGATTGCATATACAGCGAAGAGATTTGTTCATCGGAGTCTTGTGGTGAGAGGTAATGC  74
TGCAACTGTTTCTCCCTCTTTTTCCTTTTTCTGGAGACGAGCTTTCTCTGGTAAGACTAGTTATTATTACAGAG  148
AGAAACTGAGTAGAAATGGGCTGAGTGAATTAAAGTTAGATGACGCTGTTGCTCTGTTCGGTGAAATGGTCAAG  222
TCTCGTCCCTTCCCTTCCATCATTGAGTTCAGCAAACTGTTGAGTGCAATTGCTAAGATGAACAAGTTCGATGT  296
CGTCATCTCTCTGGGCGAGCAGATGCAAAACTTGGGAATGCCTCATAATCACTATACTTACAGTATTTTGATTA  370
ACTGTTTTTGTCGACGCTCTCAACTCCCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGCTATGAG  444
CCCGATATTGTCACGCTTAACTCGCTGCTCAATGGTTTCTGTCACGGGAATAGGATTTCTGATGCCGTAGCTTT  518
GGTTGATCAAATGGTCGAAATGGGATATAAACCCGATACCGTCACATTTAACACTCTAATCCATGGGCTTTTTC  592
TTCACAACAAAGCTTCCGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTGCCAGAGGGTGTCAACCAGATCTATTT  666
ACTTATGGTACCGTAGTAAACGGATTATGTAAGAGAGGTGATATTGATTTGGCTTTGAGTTTGTTAAAGAAGAT  740
GGAGAAAGGGAAAATAGAGGCTGATGTTGTGATCTACAACACAATCATTGATGGTCTTTGCAAATACAAACATA  814
TGGATGATGCACTCAACTTGTTCACTGAAATGGAAAACAAAGGAGTTAGACCAAATGTTATCACCTACAGCTCC  888
CTCATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCCTCTCGATTACTGAGTGATATGCTTGAGAAGAA  962
TATCAACCCTGATTTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAGAGGCTG  1036
AGAAATTGTACGAGGAGATGATCAAAAGGTCCATAGATCCTAATATTTTCACTTATAGTTCACTGATCAATGGG  1110
TTTTGTATGCTCGATCGCCTTGGTGAGGCTAAGCAGATGCTTGAGTTGATGATTAGGAAGGATTGTCTACCAAA  1184
CGTAGTCACTTATAATACGCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGACAAAGGTATGGAACTCTTCC  1258
GCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCT  1332
AGAGATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTATCTGATGGCGTGCCTCCCAATATTATGACATA  1406
CAACACTTTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGAGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATCTGCAAA  1480
GGAGTAAAATGGAACCTACTATTTACACATATAATACTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCAGGGAAGGTGGAA  1554
GATGGGTGGGATCTATTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAAGCCTGATGTTGTAGCGTACAATACAATGAT  1628
ATCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAAATGAAAGAAGATGGGCCTC  1702
TTCCAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACCAAGCAGCATCAGCTGAA  1776
CTCATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTACA  1850
TGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                                  1893
```

B *RPF4*-Allel aus En-1

```
ATGATGTTATCGTTTGCGATTGCATATACAGCGAAGAGATTTGTTCATCGGAGTCTTGTGGTGAGAGGTAATGC  74
TGCAACTGTTTCTCCCTCTTTTTCCTTTTTCTGGAGACGAGCTTTCTCTGGTAAGACTAGTTATTATTACAGAG  148
AGAAACTGAGTAGAAATGGGCTGAGTGAATTAAAGTTAGATGACGCTGTTGCTCTGTTCGGTGAAATGGTCAAG  222
TCTCGTCCCTTCCCTTCCATCATTGAGTTCAGCAAACTGTTGAGTGCAATTGCTAAGATGAACAAGTTCGATGT  296
CGTCATCTCTCTGGGCGAGCAGATGCAAAACTTGGGAATGCCTCATAATCACTATACTTACAGTATTTTGATTA  370
ACTGTTTTTGTCGACGCTCTCAACTCCCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGCTATGAG  444
CCCGATATTGTCACGCTTAACTCGCTGCTCAATGGTTTCTGTCACGGGAATAGGATTTCTGATGCCGTAGCTTT  518
GGTTGATCAAATGGTCGAAATGGGATATAAACCCGATACCGTCACATTTAACACTCTAATCCATGGGCTTTTTC  592
TTCACAACAAAGCTTCCGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTGCCAGAGGGTGTCAACCAGATCTATTT  666
ACTTATGGTACCGTAGTAAACGGATTATGTAAGAGAGGTGATATTGATTTGGCTTTGAGTTTGTTAAAGAAGAT  740
GGAGAAAGGGAAAATAGAGGCTGATGTTGTGATCTACAACACAATCATTGATGGTCTTTGCAAATACAAACATA  814
TGGATGATGCACTCAACTTGTTCACTGAAATGGAAAACAAAGGAGTTAGACCAAATGTTATCACCTACAGCTCC  888
CTCATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCCTCTCGATTACTGAGTGATATGCTTGAGAAGAA  962
TATCAACCCTGATTTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAGAGGCTG  1036
AGAAATTGTACGAGGAGATGATCAAAAGGTCCATAGATCCTAATATTTTCACTTATAGTTCACTGATCAATGGG  1110
TTTTGTATGCTCGATCGCCTTGGTGAGGCTAAGCAGATGCTTGAGTTGATGATTAGGAAGGATTGTCTACCAAA  1184
CGTAGTCACTTATAATACGCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGACAAAGGTATGGAACTCTTCC  1258
GCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCT  1332
AGAGATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTATCTGATGGCGTGCCTCCCAATATTATGACATA  1406
CAACACTTTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGAGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATCTGCAAA  1480
GGAGTAAAATGGAACCTACTATTTACACATATAATACTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCAGGGAAGGTGGAA  1554
GATGGGTGGGATCTATTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAAGCCTGATGTTGTAGCGTACAATACAATGAT  1628
ATCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAAATGAAAGAAGATGGGCCTC  1702
TTCCAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACCAAGCAGCATCAGCTGAA  1776
CTCATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTACA  1850
TGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                                  1893
```

C *RPF4*-Allel aus Pi-2

```
ATGATGTTATCGTTTGCGATTGCATATACAGCGAAGAGATTTGTTCATCGGAGTCTTGTGGTGAGAGGTAATGC  74
TGCAACTGTTTCTCCCTCTTTTTCCTTTTTCTGGAGACGAGCTTTCTCTGGTAAGACTAGTTATTATTACAGAG  148
AGAAACTGAGTAGAAATGGGCTGAGTGAATTAAAGTTAGATGACGCTGTTGCTCTGTTCGGTGAAATGGTCAAG  222
TCTCGTCCCTTCCCTTCCATCATTGAGTTCAGCAAACTGTTGAGTGCAATTGCTAAGATGAACAAGTTCGATGT  296
CGTCATCTCTCTGGGCGAGCAGATGCAAAACTTGGGAATGCCTCATAATCACTATACTTACAGTATTTTGATTA  370
ACTGTTTTTGTCGACGCTCTCAACTCCCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGCTATGAG  444
CCCGATATTGTCACGCTTAACTCGCTGCTCAATGGTTTCTGTCACGGGAATAGGATTTCTGATGCCGTAGCTTT  518
GGTTGATCAAATGGTCGAAATGGGATATAAACCCGATACCGTCACATTTAACACTCTAATCCATGGGCTTTTTC  592
TTCACAACAAAGCTTCCGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTGCCAGAGGGTGTCAACCAGATCTATTT  666
ACTTATGGTACCGTAGTAAACGGATTATGTAAGAGAGGTGATATTGATTTGGCTTTGAGTTTGTTAAAGAAGAT  740
GGAGAAAGGGAAAATAGAGGCTGATGTTGTGATCTACAACACAATCATTGATGGTCTTTGCAAATACAAACATA  814
TGGATGATGCACTCAACTTGTTCACTGAAATGGAAAACAAAGGAGTTAGACCAAATGTTATCACCTACAGCTCC  888
CTCATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCCTCTCGATTACTGAGTGATATGCTTGAGAAGAA  962
TATCAACCCTGATTTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAGAGGCTG  1036
AGAAATTGTACGAGGAGATGATCAAAAGGTCCATAGATCCTAATATTTTCACTTATAGTTCACTGATCAATGGG  1110
TTTTGTATGCTCGATCGCCTTGGTGAGGCTAAGCAGATGCTTGAGTTGATGATTAGGAAGGATTGTCTACCAAA  1184
CGTAGTCACTTATAATACGCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGACAAAGGTATGGAACTCTTCC  1258
GCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCT  1332
AGAGATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTATCTGATGGCGTGCCTCCCAATATTATGACATA  1406
CAACACTTTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGAGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATCTGCAAA  1480
GGAGTAAAATGGAACCTACTATTTACACATATAATACTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCAGGGAAGGTGGAA  1554
GATGGGTGGGATCTATTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAAGCCTGATGTTGTAGCGTACAATACAATGAT  1628
ATCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAAATGAAAGAAGATGGGCCTC  1702
TTCCAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACCAAGCAGCATCAGCTGAA  1776
CTCATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTACA  1850
TGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                                  1893
```

D *RPF4*-Allel aus Col

```
ATGCAGAGATCGATTTCATTGACGGCCAAAAGATTGTTTGTTCATTGGAATCTCCAGGGGATAGGTAATCCTCC  74
AACTGTTCCTTCTTTCTTCAATCTTTGCGGTTCCGGTTGCTGGGAACGATCTTTTGCTAGTGCTAGTGGTGATT  148
ACAGAGAGATATTGAGAAATAGGCTAAGTGATATTATTAAGGTAGATGATGCGGTTGATCTGTTCGGTGACATG  222
GTCAAGTCTCGTCCATTTCCTTCCATTGTTGAATTCAATAAACTGTTGAGTGCCGTTGCTAAGATGAACAAGTT  296
TGAACTTGTCATCTCTCTCGGCGAGCAGATGCAAACTTTGGGAATTTCACATGATCTTTACACATACAGTATTT  370
TCATCAACTGCTTTTGCCGACGCTCTCAGCTCTCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGCCAAGATGATGAAACTCGGC  444
TATGAGCCCGATATTGTCACGCTTTCTTCGCTGCTCAATGGCTACTGTCACAGTAAGAGGATTTCTGATGCCGT  518
AGCTTTGGTTGATCAAATGGTCGAAATGGGATATAAACCTGATACCTTTACATTCACAACTCTAATTCATGGAC  592
TTTTTCTTCACAACAAAGCTTCAGAAGCAGTGGCTTTAGTTGATCAAATGGTTCAAAGAGGATGTCAACCAGAT  666
CTGGTTACTTATGGTACCGTAGTAAACGGATTATGTAAGAGAGGTGATATTGATTTGGCTTTGAGTTTGTTAAA  740
GAAGATGGAGAAAGGGAAAATAGAGGCTGATGTTGTGATCTACAACACAATCATTGATGGTCTTTGCAAATACA  814
AACATATGGATGATGCACTCAATCTGTTCACTGAAATGGATAACAAAGGTATTAGACCAGATGTTTTTACCTAC  888
AGCTCCCTCATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCTTCTCGACTACTCAGTGATATGATTGA  962
GAGGAAAATCAATCCAAATGTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAG  1036
AGGCTGAGAAATTGTACGACGAGATGATCAAAAGGTCTATAGATCCTGATATTTTCACTTATAGTTCACTGATC  1110
AATGGGTTTTGTATGCACGATCGTTTAGACGAGGCCAAGCACATGTTTGAGTTGATGATTAGCAAAGACTGTTT  1184
CCCAAACGTAGTGACTTACAGTACTCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGAAGAAGGTATGGAAC  1258
TCTTCCGCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTT  1332
CAAGCTAGAGATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTTTCTGTTGGTGTGCATCCCAATATTTT  1406
GACATACAACATTCTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGCGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATC  1480
TGCAAAGGAGTACAATGGAACCTGATATTTACACATATAATATTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCAGGGAAG  1554
GTGGAAGATGGGTGGGAATTGTTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAGCCCTAATGTTATAGCCTACAATAC  1628
AATGATATCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAAATGAAAGAAGATG  1702
GGCCTCTTCCAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACAGAGAAGCATCA  1776
GCTGAACTCATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATAT  1850
GTTACATGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                            1899
```

E *RPF4*-Allel aus Sha

```
ATGATGTTATCGTTTGCGATTGCATATACAGCGAAGAGTTTTGTTCATCGGAGTCTTGTGGTGAGAGGTAATGC  74
TGCAACTGTTTCTCCCTCTTTTTCCTTTTGCCGGAGAAGAGCTTTCTCTGGTAAGACTAGTTATGATTACAGAG  148
AGGTACTCAGAACTGGGCTAAGTGATATTAAATTAGATGATGCGATTGGTTTGTTCGGTGACATGGTCAAGTCT  222
CGTCCATTTCCTTCCATTGTTGAATTCAATAAACTGCTGAGTGCCGTTGCTAAGATGAAGAAGTTTGATCTTGT  296
CATCTCTCTCGGCGAGCGGATGCATAATCTAGGGATTTCATATGACCTCTATTCGTACAATATTTTGATTAACT  370
GTTTTTGTCGACGCTCTCAACTCCCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGCTATGAGCCC  444
AGCATTGTCACGCTTAACTCGCTGCTCAATGGTTTCTGTCACGGGAATAGGATTTCTGATGCCGTAGCTTTGGT  518
TGATCAAATGGTCGAAATGGGATATAAACCCGATACGGTGACATTCACAACTCTAATTCATGGACTTTTTCTTC  592
ACAACAAAGCTTCAGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTCAAAGAGGCTGTCAACCAGATCTGGTTACT  666
TATGGTGCGGTAGTTAATGGATTATGTAAGAGAGGTGATACTGATTTGGCTTTAAATCTGCTCAACAAGATGGA  740
AGCTGCGAAAATAGAGGCCAATGTTGTGATCTACAGCACAGTCATAGATAGTCTCTGCAAATATAGACATGAGG  814
ATGATGCACTCAACTTGTTCACTGAAATGGAAAACAAAGGAGTTAGACCAAATGTTATCACCTACAGCTCCCTC  888
ATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCTTCTCGACTACTCAGTAATATGATTGAGAGGAAAAT  962
CAATCCAAATGTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAGAGGCTGAGA  1036
AATTGTACGACGAGATGATCAAAAGGTCTATAGATCCTGATATTTTCACTTATAGTTCACTGATTAATGGGTTT  1110
TGTATGCACGATCGTTTAGACGAGGCCAAGCACATGTTTGAGTTGATGATTAGCAAAGACTGTTTCCCAAACGT  1184
AGTGACTTACAATACTCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGAAGAAGGTATGGAACTCTTCCGCG  1258
AGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCTAGA  1332
GATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTTTCTGTTGGTGTGCATCCCAATATTTTGACATACAA  1406
CATTCTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGCGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATCTGCAAAGGA  1480
GTACAATGGAACCTGATATTTACACATGTAATATTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCTGGGAAGGTGGAAGAT  1554
GGGTGGGAATTGTTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAGCCCTAATGTTATAGCCTACAATACAATGATATC  1628
AGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAATGAAAGAAGATGGGCCTCTTC  1702
CAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACAGAGAAGCATCAGCTGAACTC  1776
ATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTACATGA  1850
TGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                                     1890
```

F *RPF4*-Allel aus Sorbo

```
ATGATGTTATCGTTTGCGATTGCATATACAGCGAAGAGTTTTGTTCATCGGAGTCTTGTGGTGAGAGGTAATGC  74
TGCAACTGTTTCTCCCTCTTTTTCCTTTTGCCGGAGAAGAGCTTTCTCTGGTAAGACTAGTTATGATTACAGAG  148
AGGTACTCAGAACTGGGCTAAGTGATATTAAATTAGATGATGCGATTGGTTTGTTCGGTGACATGGTCAAGTCT  222
CGTCCATTTCCTTCCATTGTTGAATTCAATAAACTGCTGAGTGCCGTTGCTAAGATGAAGAAGTTTGATCTTGT  296
CATCTCTCTCGGCGAGCGGATGCATAATCTAGGGATTTCATATGACCTCTATTCGTACAATATTTTGATTAACT  370
GTTTTTGTCGACGCTCTCAACTCCCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGCTATGAGCCC  444
AGCATTGTCACGCTTAACTCGCTGCTCAATGGTTTCTGTCACGGGAATAGGATTTCTGATGCCGTAGCTTTGGT  518
TGATCAAATGGTCGAAATGGGATATAAACCCGATACGGTGACATTCACAACTCTAATTCATGGACTTTTTCTTC  592
ACAACAAAGCTTCAGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTCAAAGAGGCTGTCAACCAGATCTGGTTACT  666
TATGGTGCGGTAGTTAATGGATTATGTAAGAGAGGTGATACTGATTTGGCTTTAAATCTGCTCAACAAGATGGA  740
AGCTGCGAAAATAGAGGCCAATGTTGTGATCTACAGCACAGTCATAGATAGTCTCTGCAAATATAGACATGAGG  814
ATGATGCACTCAACTTGTTCACTGAAATGGAAAACAAAGGAGTTAGACCAAATGTTATCACCTACAGCTCCCTC  888
ATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCTTCTCGACTACTCAGTAATATGATTGAGAGGAAAAT  962
CAATCCAAATGTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAGAGGCTGAGA  1036
AATTGTACGACGAGATGATCAAAAGGTCTATAGATCCTGATATTTTCACTTATAGTTCACTGATTAATGGGTTT  1110
TGTATGCACGATCGTTTAGACGAGGCCAAGCACATGTTTGAGTTGATGATTAGCAAAGACTGTTTCCCAAACGT  1184
AGTGACTTACAATACTCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGAAGAAGGTATGGAACTCTTCCGCG  1258
AGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCTAGA  1332
GATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTTTCTGTTGGTGTGCATCCCAATATTTTGACATACAA  1406
CATTCTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGCGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATCTGCAAAGGA  1480
GTACAATGGAACCTGATATTTACACATGTAATATTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCTGGGAAGGTGGAAGAT  1554
GGGTGGGAATTGTTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAGCCCTAATGTTATAGCCTACAATACAATGATATC  1628
AGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAATGAAAGAAGATGGGCCTCTTC  1702
CAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACAGAGAAGCATCAGCTGAACTC  1776
ATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTACATGA  1850
TGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                                     1890
```

G *RPF4*-Allel aus Tsu-1

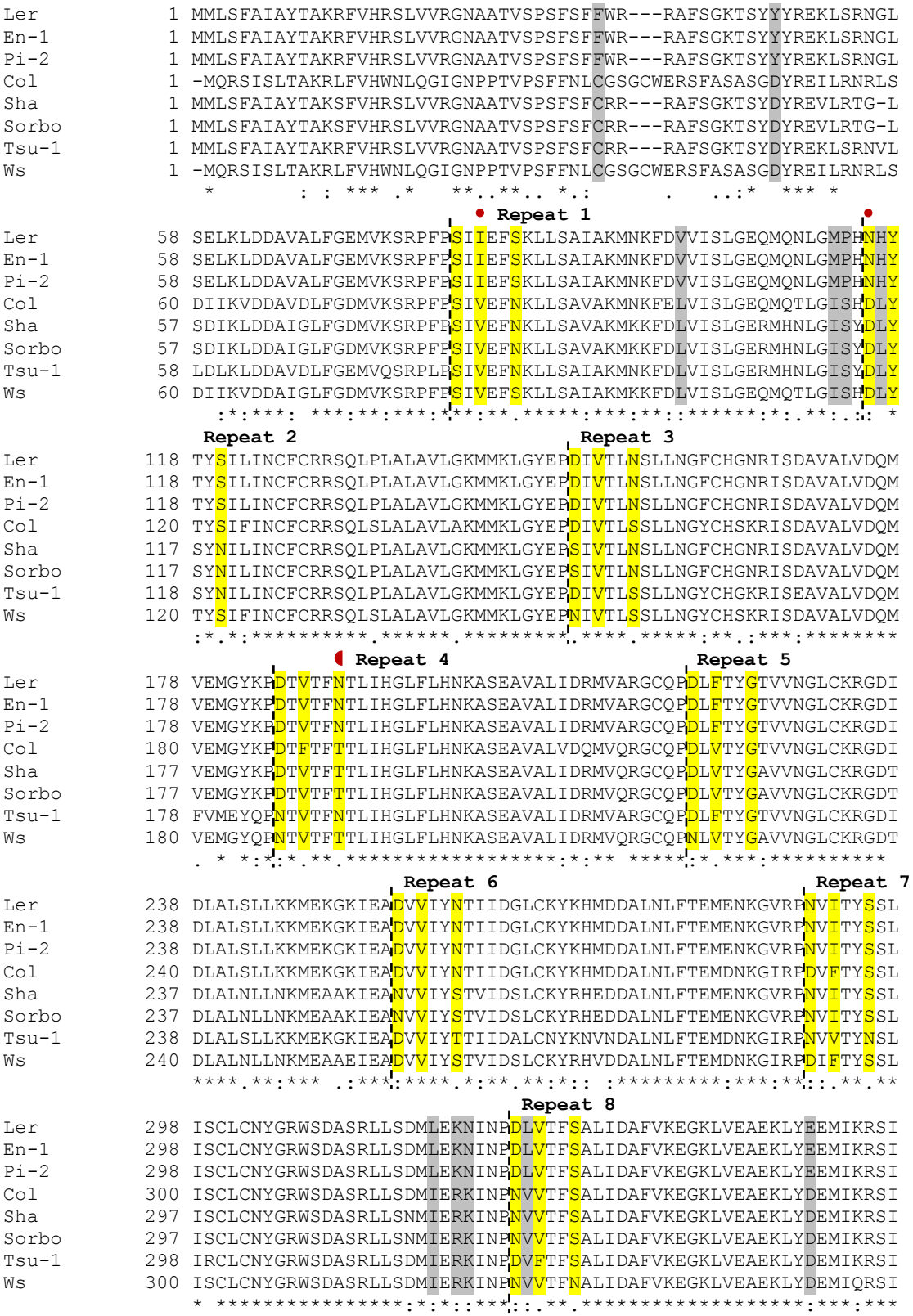
```
ATGATGTTATCGTTTGCGATTGCATATACAGCGAAGAGATTTGTTCATCGGAGTCTTGTGGTGAGAGGTAATGC   74
TGCAACTGTTTCTCCCTCTTTTTCCTTTTGCCGGAGAAGAGCTTTCTCTGGTAAGACTAGTTATGATTACAGAG  148
AGAAACTGAGTAGAAATGTGTTGCTCGATTTGAAGCTAGATGATGCGGTTGATCTGTTCGGTGAGATGGTACAG  222
TCTCGTCCTTTACCTTCCATTGTTGAGTTCAATAAATTGTTGAGTGCCATTGCTAAGATGAACAAGTTTGATCT  296
TGTCATCTCTCTCGGCGAGCGGATGCATAATCTAGGGATTTCATATGACCTCTATTCGTACAATATTTTGATTA  370
ACTGTTTTTGTCGACGCTCTCAACTCCCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGCTATGAG  444
CCCGATATTGTCACGCTTTCTTCGCTCCTCAATGGGTACTGCCACGGTAAGAGGATATCCGAGGCTGTAGCTTT  518
GGTTGATCAAATGTTCGTAATGGAGTATCAACCCAATACCGTCACATTTAACACTCTAATCCATGGGCTTTTTC  592
TTCACAACAAAGCTTCCGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTGCCAGAGGGTGTCAACCAGATCTATTT  666
ACTTATGGTACCGTAGTAAACGGATTATGTAAGAGAGGTGATATTGATTTGGCTTTGAGTTTGTTAAAGAAGAT  740
GGAGAAAGGGAAAATAGAGGCTGATGTTGTGATCTACACCACTATCATTGATGCTCTTTGCAACTACAAAAACG  814
TGAATGATGCACTCAATCTGTTCACTGAAATGGATAACAAAGGAATTAGACCAAATGTTGTTACCTACAACTCC  888
CTCATAAGATGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCTTCTCGACTACTCAGTGATATGATTGAGAGGAA  962
AATCAACCCTGATGTATTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAAGGGAAGCTTGTAGAGGCTG 1036
AGAAATTGTACGACGAGATGATCAAAAGGTCTATAGATCCTGATATTTTCACTTATAGTTCACTGATCAATGGG 1110
TTTTGTATGCACGATCGTTTAGACGAGGCCAAGCACATGTTTGAGTTGATGATTAGCAAAGACTGTTTCCCAAA 1184
CGTAGTGACTTACAATACTCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGAAGAAGGTATGGAACTCTTCC 1258
GCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCT 1332
AGAGATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTTTCTGTTGGTGTGCATCCCAATATTTTGACATA 1406
CAACATTCTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGCGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATCTGCAAA 1480
GGAGTACAATGGAACCTGATATTTACACATATAATATTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCTGGGAAGGTGGAA 1554
GATGGGTGGGAATTGTTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAGCCCTAATGTTATAGCCTACAATACAATGAT 1628
ATCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAAATGAAAGAAGATGGGCCTC 1702
TTCCAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACAGAGAAGCATCAGCTGAA 1776
CTCATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTACA 1850
TGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                                  1893
```

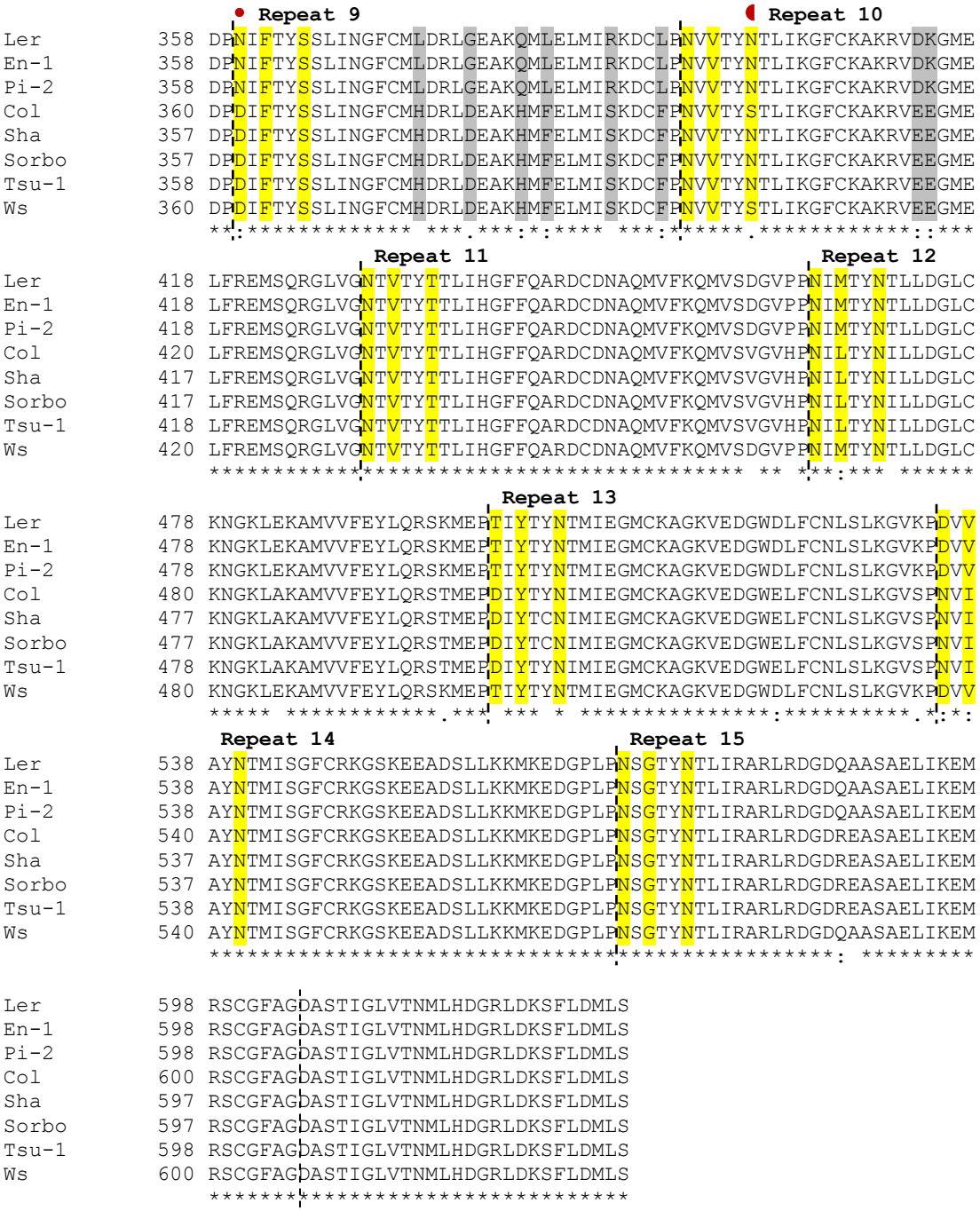
H *RPF4*-Allel aus Ws

```
ATGCAGAGATCGATTTCATTGACGGCCAAAAGATTGTTTGTTCATTGGAATCTCCAGGGGATAGGTAATCCTCC   74
AACTGTTCCTTCTTTCTTCAATCTTTGCGGTTCCGGTTGCTGGGAACGATCTTTTGCTAGTGCTAGTGGTGATT  148
ACAGAGAGATATTGAGAAATAGGCTAAGTGATATTATTAAGGTAGATGATGCGATTGGTTTGTTCGGTGACATG  222
GTCAAGTCTCGTCCATTTCCTTCGATTGTTGAGTTCAGTAAATTGTTGAGTGCCATTGCTAAGATGAAGAAGTT  296
CGATCTTGTCATCTCTCTCGGCGAGCAGATGCAAACTTTGGGAATTTCACATGATCTTTACACATACAGTATTT  370
TCATCAACTGCTTTTGCCGACGCTCTCAGCTCTCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGGCAAGATGATGAAACTCGGC  444
TATGAGCCCAATATTGTCACGCTTTCTTCGCTGCTCAATGGCTACTGTCACAGTAAGAGGATTTCTGATGCCGT  518
AGCTTTGGTTGATCAAATGGTCGAAATGGGATATCAACCCAATACCGTCACATTTACAACTCTGATTCATGGAC  592
TTTTTCTTCACAACAAAGCTTCAGAAGCAGTGGCTTTAATTGATCGAATGGTTCAAAGAGGCTGTCAACCAAAT  666
CTGGTTACTTATGGTGCGGTAGTAAATGGATTATGTAAGAGAGGTGATACTGATTTGGCTTTAAATCTGCTCAA  740
CAAGATGGAAGCTGCGGAAATAGAGGCTGATGTTGTGATCTACAGCACAGTCATAGATAGTCTCTGCAAATATA  814
GACATGTGGATGATGCACTCAATCTGTTCACTGAAATGGATAACAAAGGTATTAGACCAGATATTTTTACCTAC  888
AGCTCCCTCATAAGTTGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCTTCTCGACTACTCAGTGATATGATTGA  962
GAGGAAAATCAATCCAAATGTAGTCACTTTCAACGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAGGGGAAGCTTGTAG 1036
AGGCTGAGAAATTGTACGACGAGATGATCCAAAGGTCTATAGATCCTGATATTTTCACTTATAGTTCACTGATC 1110
AATGGGTTTTGTATGCACGATCGTTTAGACGAGGCCAAGCACATGTTTGAGTTGATGATTAGCAAAGACTGTTT 1184
CCCAAACGTAGTGACTTACAGTACTCTTATAAAGGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGAAGAAGGTATGGAAC 1258
TCTTCCGCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTT 1332
CAAGCTAGAGATTGTGATAATGCCCAAATGGTTTTCAAACAGATGGTATCTGATGGCGTGCCTCCCAATATTAT 1406
GACATACAACACTTTGTTAGATGGACTTTGTAAAAATGGGAAGCTAGAGAAAGCAATGGTTGTATTCGAGTATC 1480
TGCAAAGGAGTAAAATGGAACCTACTATTTACACATATAATACTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCAGGGAAG 1554
GTGGAAGATGGGTGGGATCTATTTTGTAATCTCAGCCTTAAAGGAGTGAAGCCTGATGTTGTAGCGTACAATAC 1628
AATGATATCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTCAAAGGAGGAAGCAGATTCCCTGTTAAAAAAAATGAAAGAAGATG 1702
GGCCTCTTCCAAATAGTGGTACCTATAATACGCTGATTAGGGCACGCCTTAGAGATGGTGACCAAGCAGCATCA 1776
GCTGAACTCATCAAAGAAATGAGGAGTTGCGGGTTTGCTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATAT 1850
GTTACATGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTCCTCGATATGCTTTCTTAA                            1899
```

Anhang 3: *RPF4*-Allele in verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen. Die Allele wurden wie im Text beschrieben amplifiziert und sequenziert (siehe 3.1.5.). En-1 und Pi-2 weisen einen *ccmB*-mRNA-Phänotyp wie L*er* auf. Sha, Sorbo, Tsu-1 sowie Ws besitzen *ccmB*-Transkripte wie Col. Die Zahlen am rechten Rand geben die Position relativ zum Start-ATG an (A = 1). Die Analysen wurden teilweise von Christian Jonietz und Stefan Binder durchgeführt. Die Allele aus L*er* und Col weisen zu 92 % identische Nukleotide auf. **A:** *RPF4*-Allel aus L*er.* **B:** *RPF4*-Allel aus En-1. **C:** *RPF4*-Allel aus Pi-2. **D:** *RPF4*-Allel aus Col. **E:** *RPF4*-Allel aus Sha. **F:** *RPF4*-Allel aus Sorbo. **G:** *RPF4*-Allel aus Tsu-1. **H:** *RPF4*-Allel aus Ws.

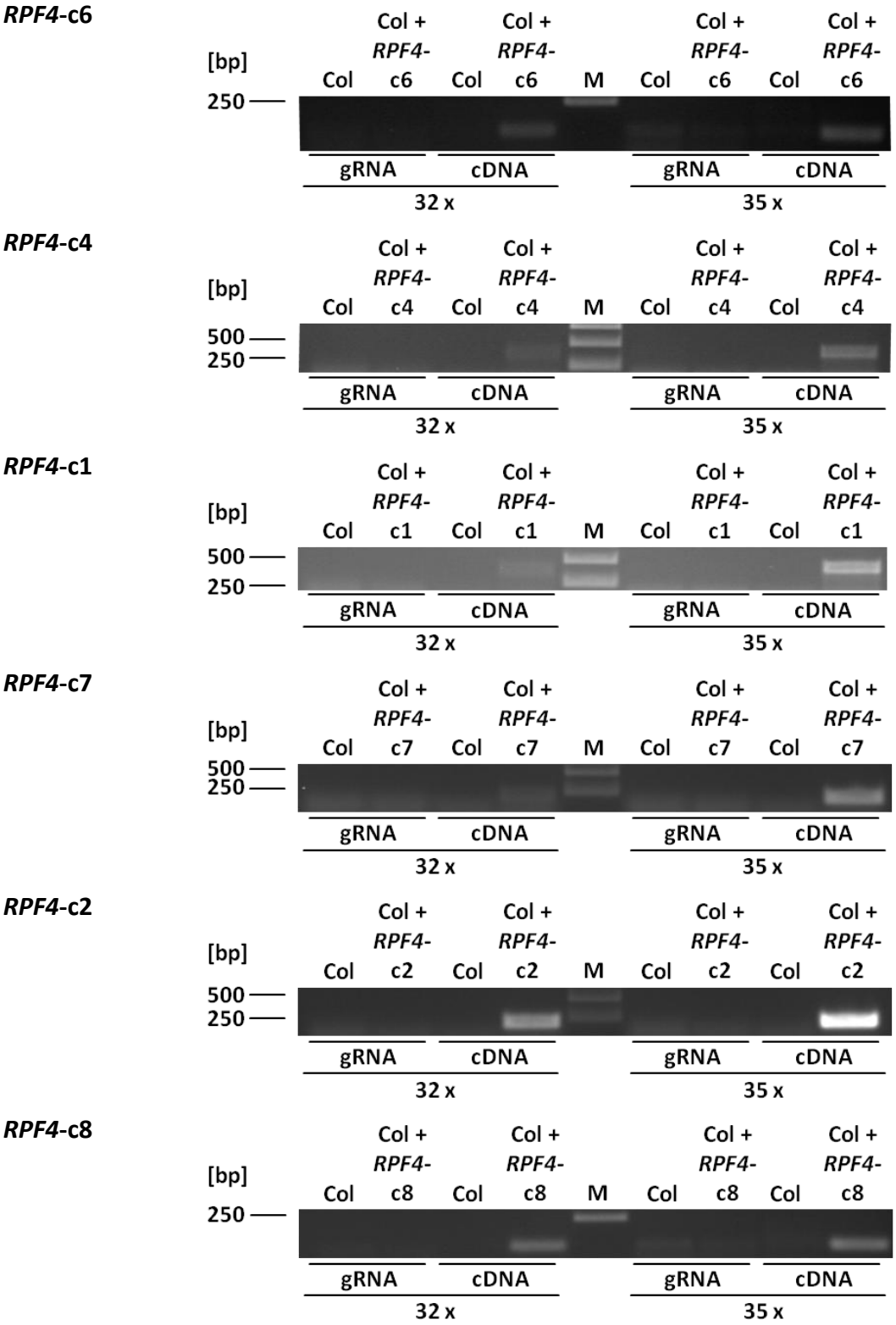
Anhang 4: Alignment von RPF4 verschiedener *A.thaliana* Ökotypen





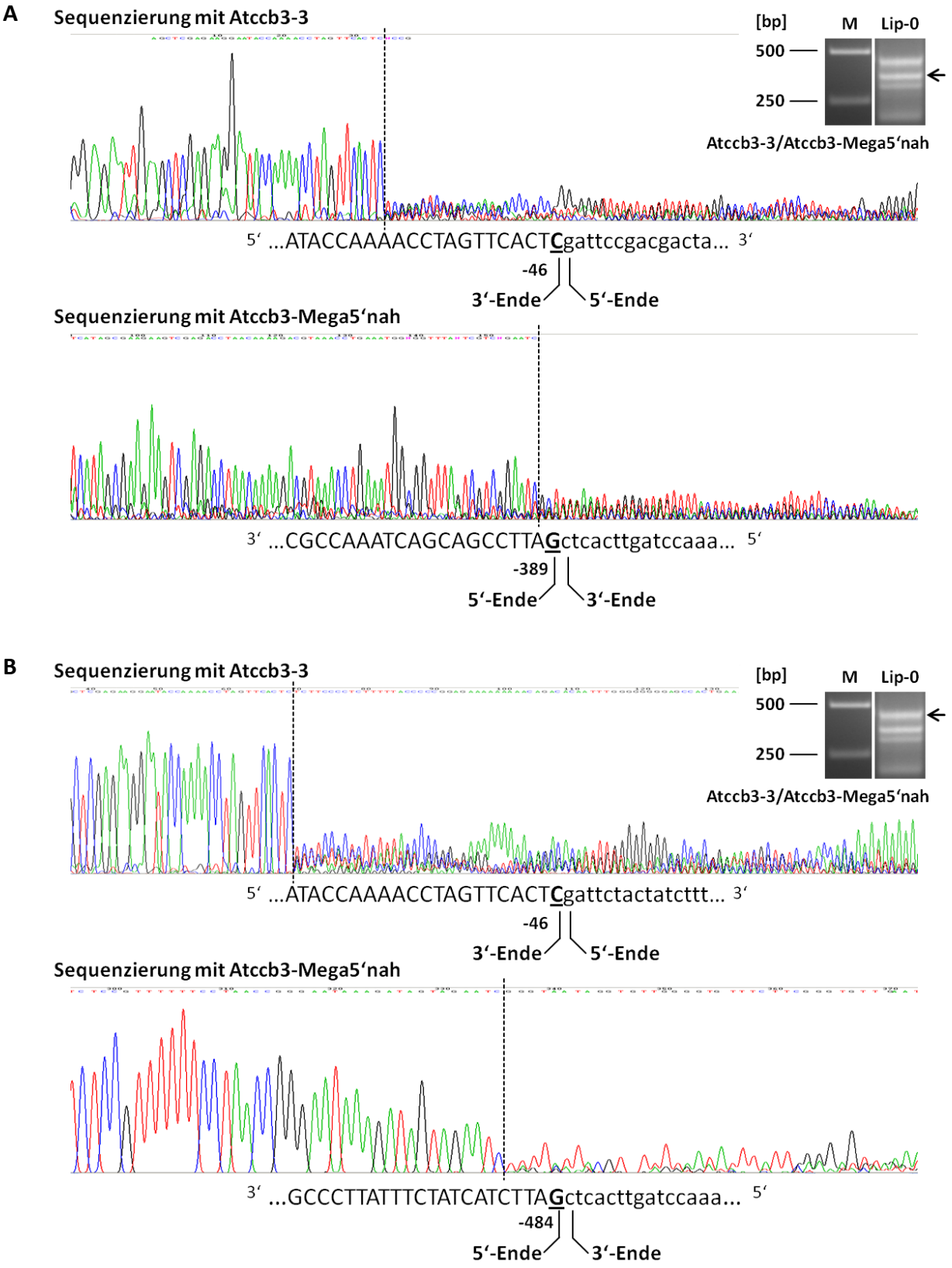
Anhang 4: Alignment von RPF4 verschiedener *A.thaliana* Ökotypen. Angaben bezüglich der verwendeten Ökotypen siehe Anhang 3. Die AS sind im Einbuchstabencode angegeben. Die senkrechten, gestrichelten Linien markieren den Beginn bzw. das Ende der PPRs (Repeats) 1-15. AS an Position 3, 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) sind in gelb unterlegt und falls konsistent unterschiedlich zwischen den L*er*- und Col-Typ Proteinen zusätzlich mit einem roten Punkt gekennzeichnet. Weitere konsistent unterschiedliche AS sind in grau unterlegt. Ein rot ausgefüllter Halbkreis markiert AS, die für das Ausbleiben einer Interaktion von RPF4(Col) mit der *ccmB*-mRNA verantwortlich sein könnten. Identische (*), funktionell oder strukturell ähnliche (:), nur zu einem gewissen Teil ähnliche (.) und unterschiedliche ( ) AS sind gekennzeichnet.

Anhang 5: Expression der chimären *RPF4*-Gene

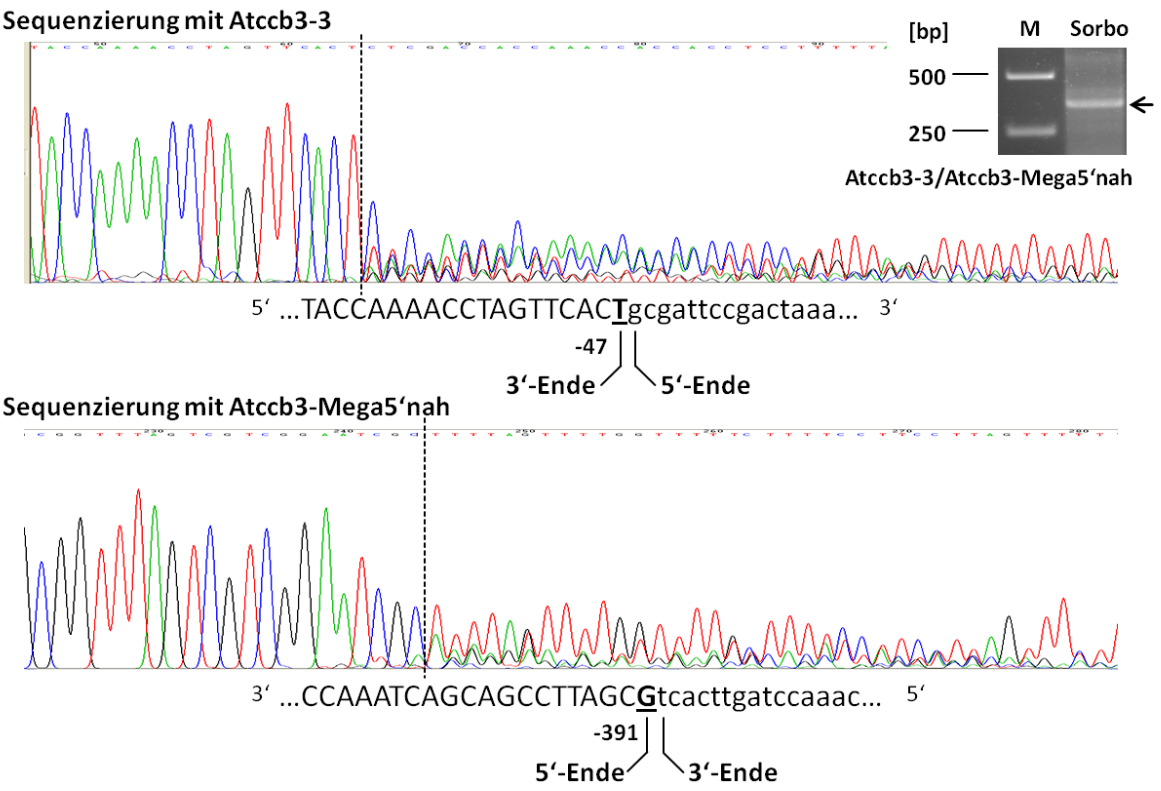


Anhang 5: Expression der chimären *RPF4*-Gene. In die einzelnen RT-PCRs wurde als *Template* neben der mit Oligo(dT) erzeugten cDNA auch die DNase-verdaute gRNA eingesetzt. Als Primer wurden At1g62910Ler.7 und At1g62910Ler.11 (*RPF4*-c6, *RPF4*-c8), At1g62910Ler.7 und At1g62910Ler.8 (*RPF4*-c4, *RPF4*-c1) bzw. At1g62910Ler.9 und At1g62910Ler.10 (*RPF4*-c7, *RPF4*-c2) verwendet. Das generierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 120 (*RPF4*-c6, *RPF4*-c8), ca. 420 (*RPF4*-c4, *RPF4*-c1) bzw. ca. 200 bp (*RPF4*-c7, *RPF4*-c2). Die Anzahl der Zyklen (32 x und 35 x) ist unter den Gelbildern angegeben. Weitere Angaben können Abbildung 7A entnommen werden.

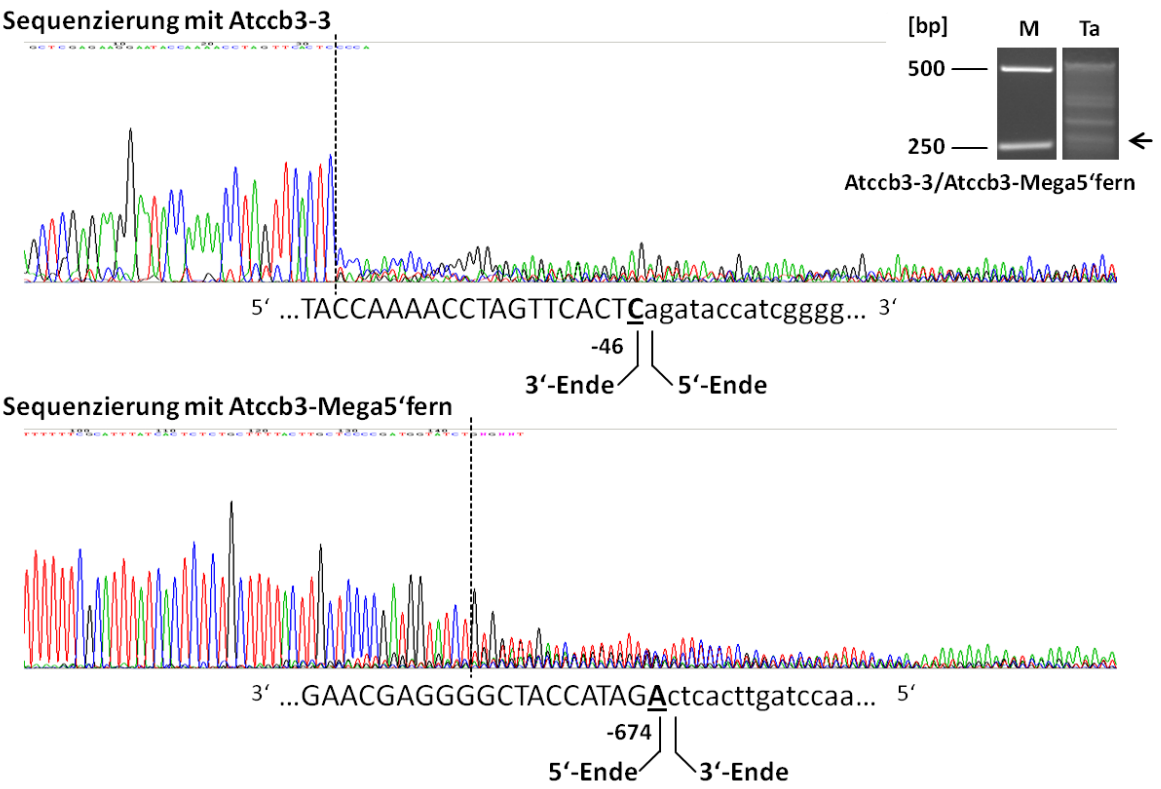
Anhang 6: Bestimmung von *ccmC*-mRNA-5‘-Enden in Lip-0, Sorbo und Ta

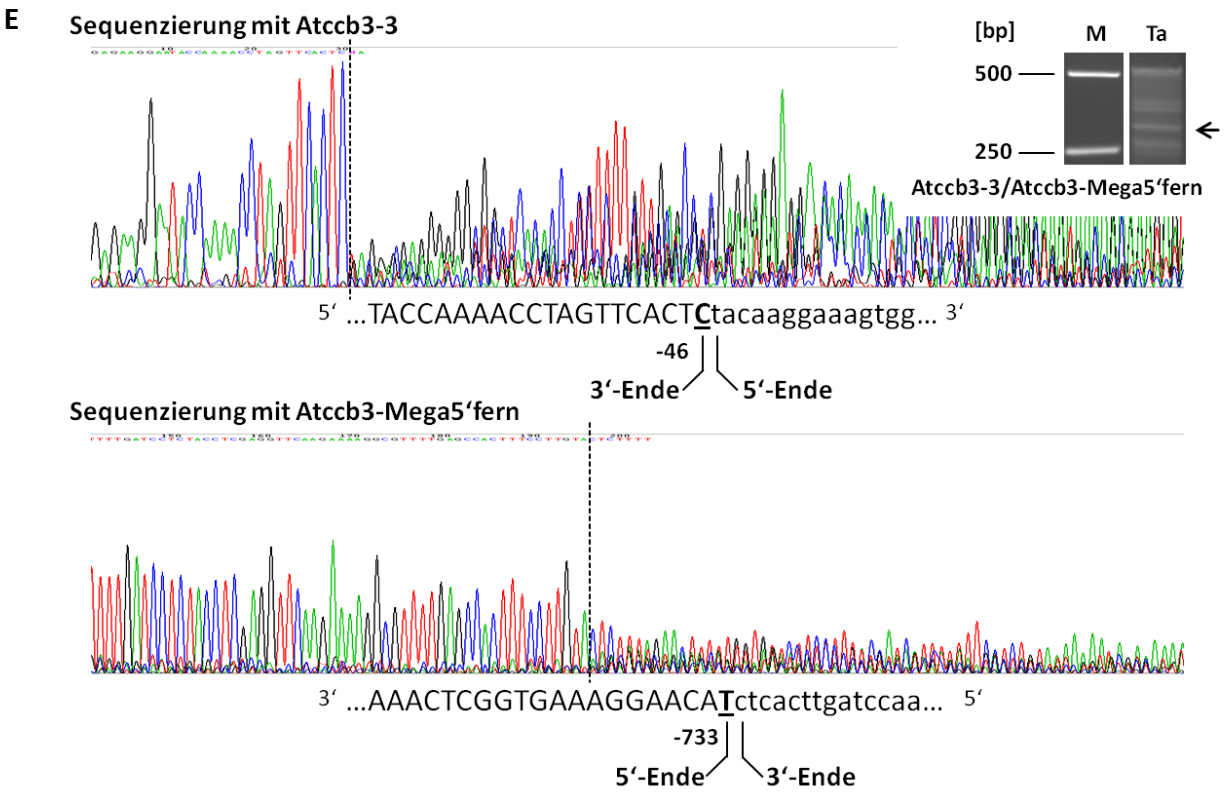


C


Sequenzierung mit Atccb3-3
[bp]
M
Sorbo
500
250
Atccb3-3/Atccb3-Mega5‘nah
5‘ ...TACCAAAACCTAGTTCACTgcgattccgactaaa... 3‘
-47
3‘-Ende
5‘-Ende
Sequenzierung mit Atccb3-Mega5‘nah
3‘ ...CCAAATCAGCAGCCTTAGCGtcacttgatccaaac... 5‘
-391
5‘-Ende
3‘-Ende

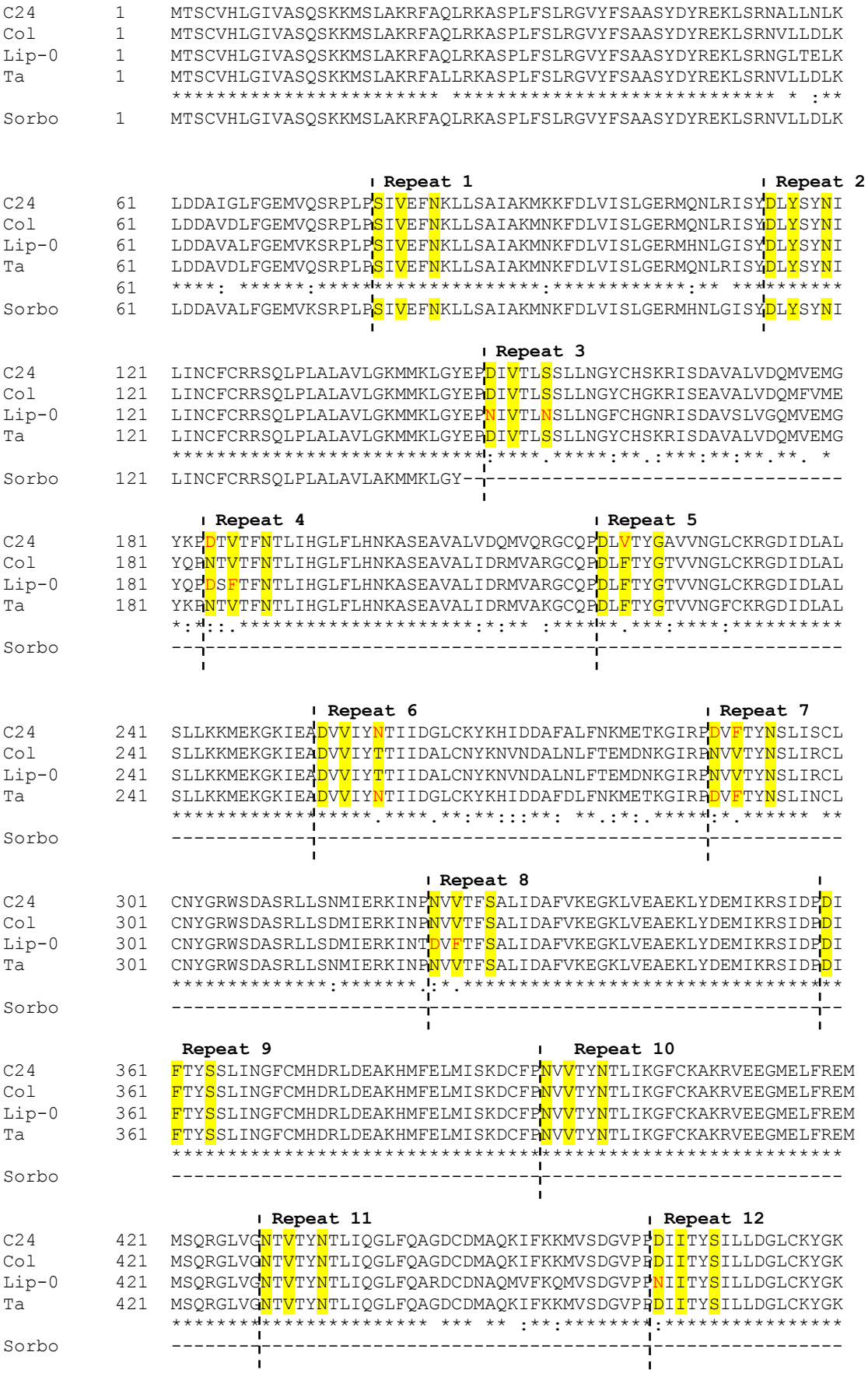
D

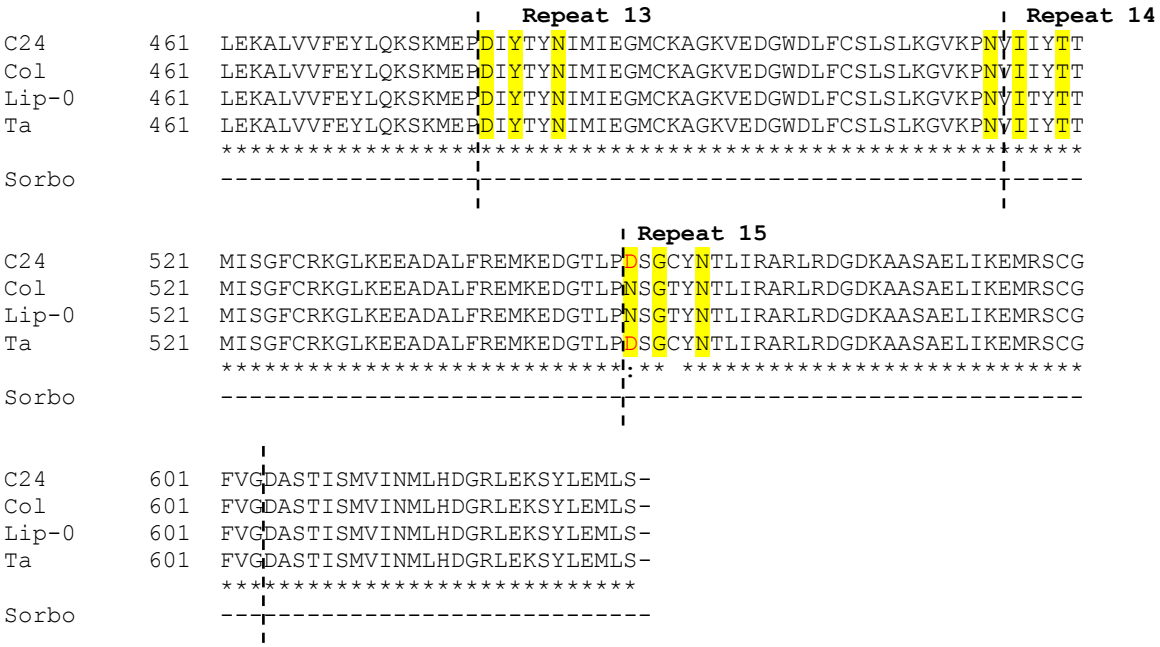

Sequenzierung mit Atccb3-3
[bp]
M
Ta
500
250
Atccb3-3/Atccb3-Mega5‘fern
5‘ ...TACCAAAACCTAGTTCACTCagataccatcgggg... 3‘
-46
3‘-Ende
5‘-Ende
Sequenzierung mit Atccb3-Mega5‘fern
3‘ ...GAACGAGGGGCTACCATAGActcacttgatccaa... 5‘
-674
5‘-Ende
3‘-Ende



Anhang 6: Bestimmung von *ccmC*-mRNA-5‘-Enden in Lip-0, Sorbo und Ta. Die CR-RT-PCR erfolgte mit den Primern Atccb3-3 und Atccb3-Mega5’nah bzw. Atccb3-Mega5‘fern (P12 und P8 bzw. P5 in Abbildung 12). Die erhaltenen PCR-Muster sind jeweils oben rechts gezeigt. Desweiteren ist immer das sequenzierte PCR-Produkt durch einen Pfeil gekennzeichnet. Weitere Angaben können Abbildung 13 entnommen werden. In Lip-0 wurden die etwa 380 **(A)** und 470 bp **(B)** großen PCR-Produkte sequenziert. In Sorbo wurde das ca. 380 bp große PCR-Produkt **(C)** sequenziert. In Ta wurden die etwa 260 **(D)** und 320 bp **(E)** großen PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung wurde jeweils mit den in der PCR verwendeten Primern durchgeführt. Weitere Angaben können Anhang 2 entnommen werden. **A:** Das erfasste *ccmC*-Transkript von Lip-0 besitzt ein 5‘-Ende bei -389 sowie ein 3‘-Ende bei -46. **B:** Das erfasste *ccmC*-Transkript von Lip-0 besitzt ein 5‘-Ende bei -484 sowie ein 3‘-Ende bei -46. **C:** Das erfasste *ccmC*-Transkript von Sorbo besitzt ein 5‘-Ende bei -391 sowie ein 3‘-Ende bei -47. **D:** Das erfasste *ccmC*-Transkript von Ta besitzt ein 5‘-Ende bei -674 sowie ein 3‘-Ende bei -46. **E:** Das erfasste *ccmC*-Transkript von Ta besitzt ein 5‘-Ende bei -733 sowie ein 3‘-Ende bei -46.

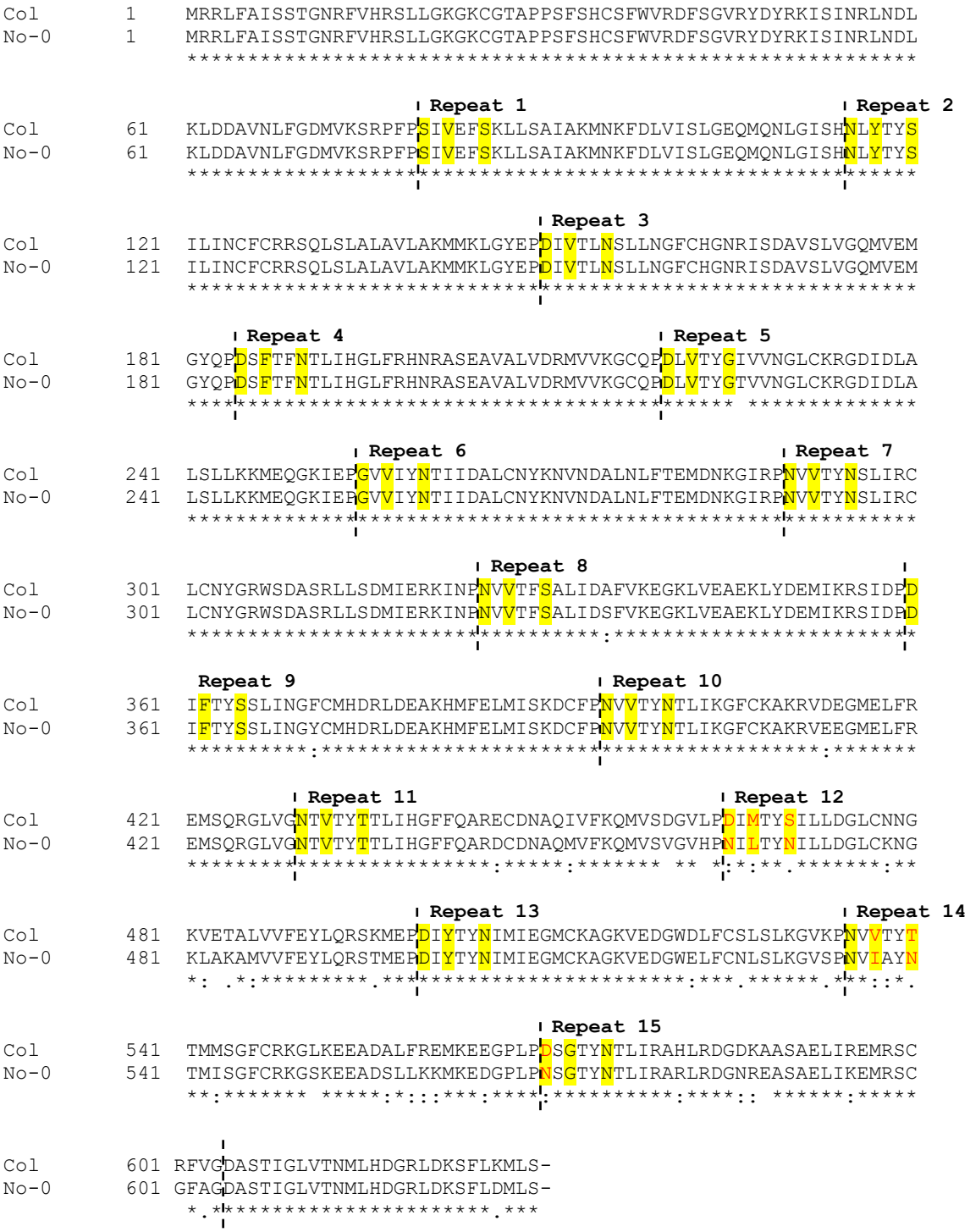
Anhang 7: Alignment von RPF3 verschiedener *A.thaliana* Ökotypen





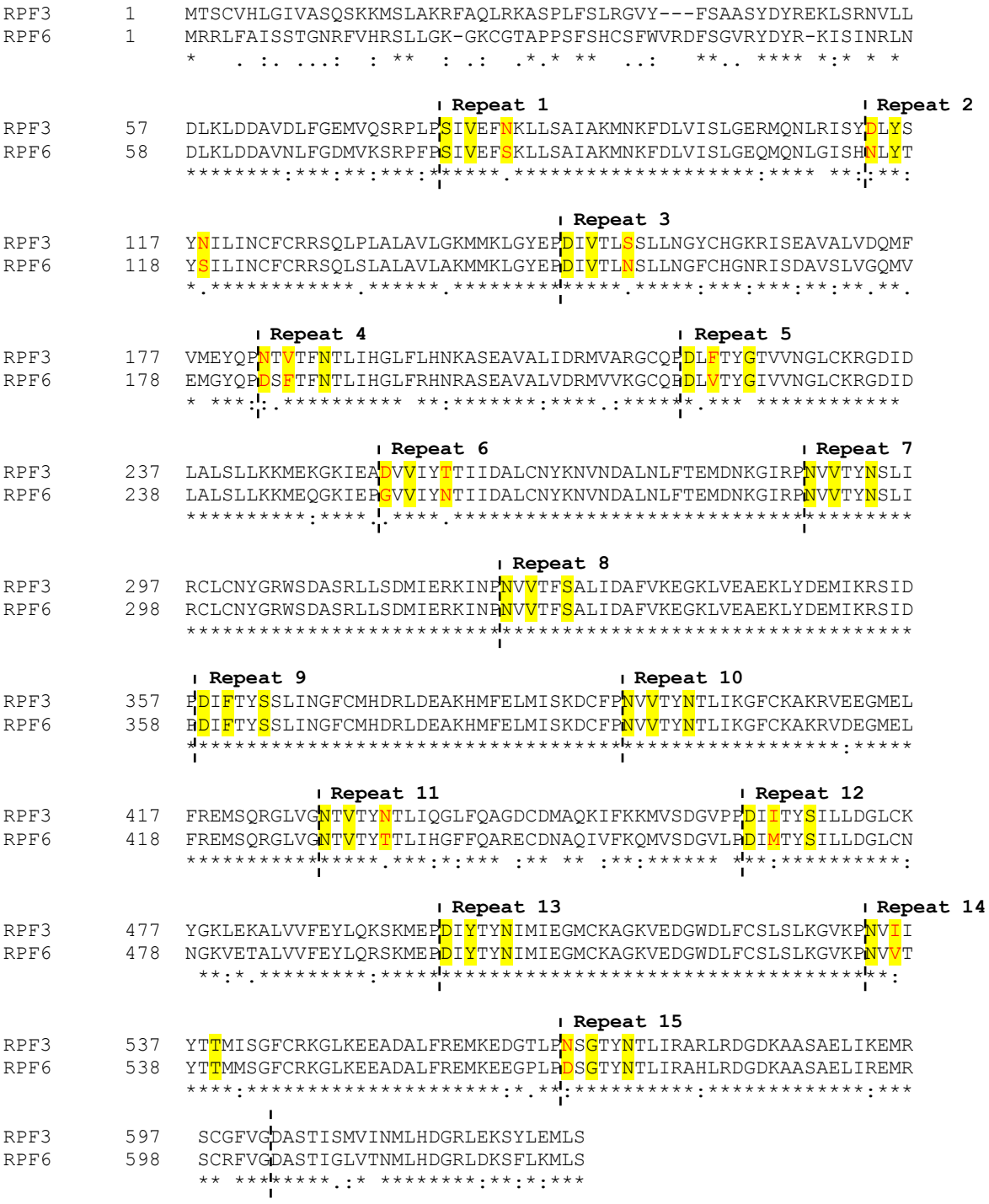
Anhang 7: Alignment von RPF3 verschiedener *A.thaliana* Ökotypen. Die AS sind im Einbuchstabencode angegeben. Die senkrechten, gestrichelten Linien markieren den Beginn bzw. das Ende der PPRs (Repeats) 1-15. AS an Position 3, 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) sind in gelb unterlegt und falls unterschiedlich zur Col-Sequenz in rot geschrieben. Identische (*), funktionell oder strukturell ähnliche (:), nur zu einem gewissen Teil ähnliche (.) und unterschiedliche ( ) AS zwischen den Proteinen aus C24, Col, Lip-0 und Ta sind gekennzeichnet. Die Sequenzen von *RPF3*(C24), *RPF3*(Lip-0) und *RPF3*(Ta) sind unter den *Accession Numbers* LN555006, LN555007 und LN555008 im *European Nucleotide Archive* öffentlich zugänglich.

Anhang 8: Alignment von RPF6 aus Col und No-0



Anhang 8: Alignment von RPF6 aus Col und No-0. Die AS sind im Einbuchstabencode angegeben. Die senkrechten, gestrichelten Linien markieren den Beginn bzw. das Ende der PPRs (Repeats) 1-15. AS an Position 3, 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) sind in gelb unterlegt und falls unterschiedlich zwischen Col und No-0 in rot geschrieben. Identische (*), funktionell oder strukturell ähnliche (:), nur zu einem gewissen Teil ähnliche (.) und unterschiedliche ( ) AS zwischen den Proteinen aus Col und No-0 sind gekennzeichnet. Die Sequenz von *RPF6*(No-0) ist unter der *Accession Number* LN555009 im *European Nucleotide Archive* öffentlich zugänglich.

Anhang 9: Alignment von RPF3 und RPF6 aus Col



Anhang 9: Alignment von RPF3 und RPF6 aus Col. Die AS sind im Einbuchstabencode angegeben. Die senkrechten, gestrichelten Linien markieren den Beginn bzw. das Ende der PPRs (Repeats) 1-15. AS an Position 3, 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) sind in gelb unterlegt und falls unterschiedlich zwischen RPF3 und RPF6 in rot geschrieben. Identische (*), funktionell oder strukturell ähnliche (:), nur zu einem gewissen Teil ähnliche (.) und unterschiedliche ( ) AS zwischen RPF3 und RPF6 aus Col sind gekennzeichnet.

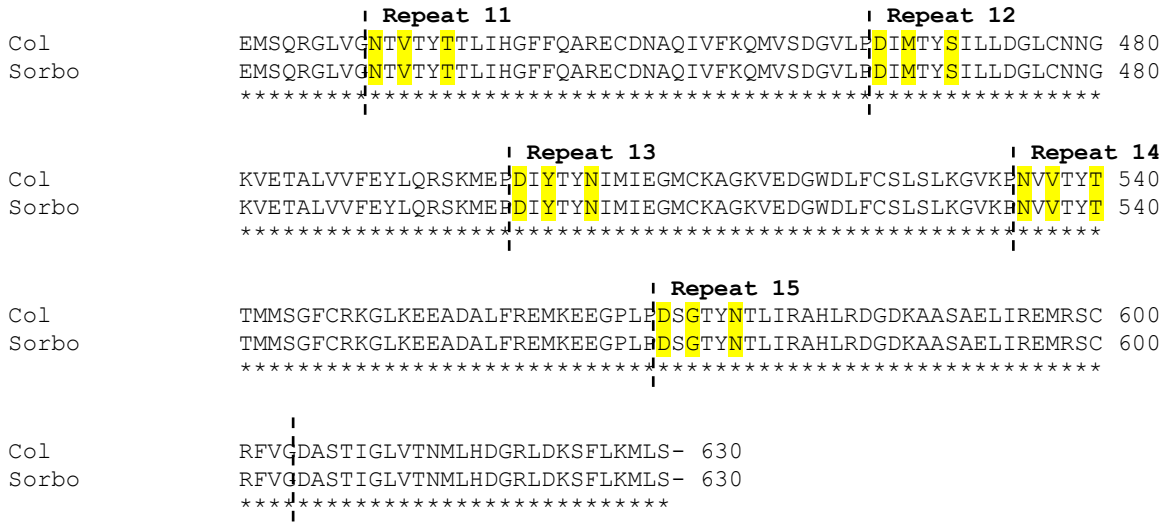
Anhang 10: RPF6 in Sorbo

A *RPF6*-Allel aus Sorbo

```
ATGAGGAGATTGTTTGCGATTTCATCGACGGGAAACAGATTTGTTCATCGGAGTCTTCTCGGAAAAGGTAAATG   74
TGGAACTGCTCCTCCTTCCTTTAGCCATTGCAGTTTCTGGGTACGAGATTTCTCTGGTGTTAGTTATGATTACA  148
GAAAGATATCGAGAAATAGGCTGAATGATTTGAAGCTAGATGATGCGGTTAATCTGTTCGGTGACATGGTCAAG  222
TCTCGTCCTTTCCCTTCGATTGTTGAGTTCAGTAAACTGTTGAGTGCCATTGCTAAGATGAAGAAGTTCGATCT  296
TGTCATCTCTCTCGGCGAGCAGATGCAAAATTTGGGAATTTCACATAATCTTTACACATACAGTATTCTCATCA  370
ACTGTTTCTGCCGACGCTCTCAGCTCTCTCTTGCTTTAGCTGTTCTTGCCAAGATGATGAAACTCGGGTATGAG  444
CCCGATATTGTCACGCTTAACTCTCTGCTCAATGGTTTCTGTCACGGGAATAGGATTTCTGATGCCGTATCTCT  518
TGTTGGTCAGATGGTGGAAATGGGATATCAGCCCGATTCATTCACATTCAACACTCTAATTCATGGACTTTTTC  592
GCCACAACAAAGCTTCCGAAGCAGTGGCTTTAGTTGACCGGATGGTTGTGAAAGGTTGTCAACCAGATCTGGTT  666
ACTTATGGTACCGTAGTAAATGGATTATGTAAGAGAGGTGATATTGATTTGGCTTTGAGTTTGTTAAAGAAGAT  740
GGAACAAGGGAAAATAGAGCCTGGTGTTGTGATCTACAACACTATCATTGATGCTCTTTGCAACTACAAAAACG  814
TGAATGATGCACTCAATCTGTTCACTGAAATGGATAACAAAGGAATTAGACCAAATGTTGTTACCTACAACTCC  888
CTCATAAGATGCCTTTGTAATTACGGAAGATGGAGTGATGCTTCTCGACTACTCAGTGATATGATTGAGAGGAA  962
AATCAATCCAAATGTAGTCACTTTCAGCGCATTGATTGATGCATTTGTGAAGGAGGGGAAGCTTGTAGAGGCTG 1036
AGAAATTGTACGACGAGATGATCAAAAGGTCTATAGATCCTGATATTTTCACTTATAGTTCACTGATCAATGGG 1110
TTTTGTATGCACGATCGTTTAGACGAGGCCAAGCACATGTTTGAGTTGATGATTAGCAAGGACTGTTTCCCAAA 1184
CGTAGTAACTTACAATACTCTTATTAATGGATTTTGTAAGGCTAAGAGAGTAGACGAAGGTATGGAACTCTTCC 1258
GCGAGATGTCTCAAAGAGGATTGGTTGGCAACACAGTCACTTACACCACTCTTATCCATGGATTTTTTCAAGCT 1332
AGAGAGTGTGATAATGCCCAAATAGTTTTCAAACAGATGGTTTCTGATGGTGTGCTTCCCGATATTATGACATA 1406
CAGCATTTTATTAGATGGGCTTTGTAATAATGGGAAGGTAGAGACAGCATTGGTGGTGTTTGAGTATCTGCAAA 1480
GGAGTAAAATGGAACCTGATATTTACACATATAATATTATGATTGAAGGGATGTGCAAGGCAGGGAAGGTGGAA 1554
GATGGGTGGGATCTATTTTGTAGCCTCAGCCTTAAAGGAGTGAAGCCTAATGTTGTAACCTACACAACAATGAT 1628
GTCAGGATTTTGTAGGAAAGGTTTAAAGGAAGAAGCAGATGCCTTGTTTAGAGAAATGAAAGAAGAAGGGCCTC 1702
TTCCAGATAGTGGTACATATAATACGCTTATCAGGGCACATCTGAGAGATGGTGACAAAGCAGCATCAGCTGAA 1776
CTCATCAGAGAAATGAGGAGTTGCAGGTTTGTTGGAGATGCTTCAACCATTGGCTTGGTCACTAATATGTTGCA 1850
TGATGGGAGATTGGACAAAAGCTTTCTCAAGATGCTTTCTTAA                                  1893
```

B Alignment von RPF6 aus Col und Sorbo

```
Col             MRRLFAISSTGNRFVHRSLLGKGKCGTAPPSFSHCSFWVRDFSGVRYDYRKISINRLNDL 60
Sorbo           MRRLFAISSTGNRFVHRSLLGKGKCGTAPPSFSHCSFWVRDFSGVSYDYRKISRNRLNDL 60
                ********************************************* ******* ******

                                    Repeat 1                          Repeat 2
Col             KLDDAVNLFGDMVKSRPFPSIVEFSKLLSAIAKMNKFDLVISLGEQMQNLGISHNLYTYS 120
Sorbo           KLDDAVNLFGDMVKSRPFPSIVEFSKLLSAIAKMKKFDLVISLGEQMQNLGISHNLYTYS 120
                ********************************:***************************

                                              Repeat 3
Col             ILINCFCRRSQLSLALAVLAKMMKLGYEPDIVTLNSLLNGFCHGNRISDAVSLVGQMVEM 180
Sorbo           ILINCFCRRSQLSLALAVLAKMMKLGYEPDIVTLNSLLNGFCHGNRISDAVSLVGQMVEM 180
                ******************************************************************

                    Repeat 4                          Repeat 5
Col             GYQPDSFTFNTLIHGLFRHNRASEAVALVDRMVVKGCQPDLVTYGIVVNGLCKRGDIDLA 240
Sorbo           GYQPDSFTFNTLIHGLFRHNKASEAVALVDRMVVKGCQPDLVTYGTVVNGLCKRGDIDLA 240
                ****************:*****************************  **************

                          Repeat 6                                Repeat 7
Col             LSLLKKMEQGKIEPGVVIYNTIIDALCNYKNVNDALNLFTEMDNKGIRPNVVTYNSLIRC 300
Sorbo           LSLLKKMEQGKIEPGVVIYNTIIDALCNYKNVNDALNLFTEMDNKGIRPNVVTYNSLIRC 300
                ***************************************************************

                                        Repeat 8                                 
Col             LCNYGRWSDASRLLSDMIERKINPNVVTFSALIDAFVKEGKLVEAEKLYDEMIKRSIDPD 360
Sorbo           LCNYGRWSDASRLLSDMIERKINPNVVTFSALIDAFVKEGKLVEAEKLYDEMIKRSIDPD 360
                ************************************************************

                Repeat 9                          Repeat 10
Col             IFTYSSLINGFCMHDRLDEAKHMFELMISKDCFPNVVTYNTLIKGFCKAKRVDEGMELFR 420
Sorbo           IFTYSSLINGFCMHDRLDEAKHMFELMISKDCFPNVVTYNTLINGFCKAKRVDEGMELFR 420
                ************************************:**********:***************
```



Anhang 10: **RPF6 in Sorbo. A:** *RPF6*-Allel aus Sorbo. Das *RPF6*-Allel wurde unter Verwendung der Primer At1g63130.H und At1g63130.R amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte mit At1g63130.B, At1g63130.D und At1g63130.E. **B:** Alignment von RPF6 aus Col und Sorbo. Die AS sind im Einbuchstabencode angegeben. Die senkrechten, gestrichelten Linien markieren den Beginn bzw. das Ende der PPRs (Repeats) 1-15. AS an Position 3, 6 und 1‘ (Position 1 des nachfolgenden Repeats) sind in gelb unterlegt. Identische (*), funktionell oder strukturell ähnliche (:) und unterschiedliche ( ) AS zwischen den Proteinen aus Col und Sorbo sind gekennzeichnet.

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Eidesstattliche Versicherung

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Charakterisierung der mitochondrialen
RNA-Prozessierungs-Faktoren 4 und 6
in *Arabidopsis thaliana*“

eigenständig verfasst habe. Alle eingesetzten Hilfsmittel sind angegeben. Weiter habe ich sämtliche in diese Arbeit eingeflossene Stellen aus veröffentlichten Werken in jedem einzelnen Fall kenntlich gemacht.

Ich versichere außerdem, dass meine Arbeit nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Satzung der Universität Ulm zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ erstellt wurde.

Ulm, den 14.07.2015

_____

(Unterschrift)

Publikationsliste

Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

Binder S., Stoll K., Stoll B. (2013): P-class pentatricopeptide repeat proteins are required for efficient 5‘ end formation of plant mitochondrial transcripts, *RNA Biology* **10** (9): 1511-1519.

Hauler A., Jonietz C., Stoll B., Stoll K., Braun H.-P., Binder S. (2013): RNA PROCESSING FACTOR 5 is required for efficient 5‘ cleavage at a processing site conserved in RNAs of three different mitochondrial genes in Arabidopsis thaliana, *The Plant Journal* **74** (4): 593-604.

Stoll B., **Stoll K.**, **Steinhilber J.**, **Jonietz C.** and **Binder S.** (2013): Mitochondrial transcript length polymorphisms are a widespread phenomenon in Arabidopsis thaliana, *Plant Molecular Biology* **81** (3): 221-233.

Stoll K., Jonietz C., Binder S. (2015): In *Arabidopsis thaliana* two co-adapted cyto-nuclear systems correlate with distinct *ccmC* transcript sizes, *The Plant Journal* **81** (2): 247-257.

Poster

Binder S., Stoll K. (2014): In *Arabidopsis thaliana* accessions different cyto-nuclear systems correlate with the generation of distinct mitochondrial *ccmC* transcripts, Tri National Arabidopsis Meeting, Heidelberg.

Stoll K., Binder S. (2015): RPF3 and RPF6 are involved in *ccmC* mRNA maturation in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, International Conference for Plant Mitochondrial Biology, Breslau.

Stoll K., Jonietz C., Binder S. (2013): The *ccmC* upstream region influences the 5’ processing of *ccmC* mRNAs in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, Botanikertagung, Tübingen.

Stoll K., Jonietz C., Hölzle A., Binder S. (2015): In *Arabidopsis thaliana* mitochondria RNA Processing Factor 4 is required for the generation of *ccmB* transcripts, Regio Plant Science Meeting, Ulm.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht:

Stoll K., Jonietz C., Binder S. (2015): In *Arabidopsis thaliana* two co-adapted cyto-nuclear systems correlate with distinct *ccmC* transcript sizes, *The Plant Journal* **81** (2): 247-257.