Charakterisierung von Proteinen der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von

Birgit 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. Die Transkription mitochondrialer Gene in *Arabidopsis thaliana* 8

1.2. PPR-Proteine 10

1.3. Endonukleolytische Generierung von 5‘-Enden mitochondrialer mRNAs 12

1.4. Fragestellung der Arbeit 13

2. Material und Methoden 14

2.1. Material 14

2.1.1. Puffer und Lösungen 14

2.1.1.1. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit DNA 14

2.1.1.2. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA 14

2.1.1.3. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen 16

2.1.1.4. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit *A.thaliana* und *Nicotiana tabacum* (*N.tabacum*) 18

2.1.2. Flüssig- und Festmedien 18

2.1.2.1. Medien zur Kultivierung von *A.thaliana* 18

2.1.2.2. Medien zur Isolation von Tabakprotoplasten 19

2.1.2.3. Medien zur Kultivierung von Bakterien 20

2.1.3. Gele, Lauf- und Ladepuffer, Größenstandards 20

2.1.3.1. Agarose-Gelelektrophorese 20

2.1.3.2. Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese 21

2.1.3.3. SDS-Gelelektrophorese 22

2.1.4. Nukleinsäuren 23

2.1.5. Enzyme und Inhibitoren 27

2.1.6. Präparation, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen 27

2.1.7. Organismen 28

2.1.7.1. *A.thaliana* 28

2.1.7.2. *N.tabacum* 29

2.1.7.3. Bakterienstämme 29

2.1.8. *Software* 29

2.2. Methoden 30

2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden 30

2.2.2. Arbeiten mit DNA 30

2.2.2.1. Gesamt-DNA-Extraktion aus grünem Blattgewebe 30

2.2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion 30
2.2.2.2.1. *Circularized-RNA-Reverse-Transcription*-PCR 30
2.2.2.2.2. *Real-Time quantitative* RT-PCR (*Real-Time* qRT-PCR) 31
2.2.2.3. Sequenzierung von DNA-Fragmenten 31
2.2.3. Arbeiten mit RNA 32
2.2.3.1. gRNA-Extraktion aus grünem Blattgewebe 32
2.2.3.2. DNase-Verdau 32
2.2.3.3. Ligation von RNA 32
2.2.3.4. cDNA-Synthese 33
2.2.3.5. Northern-Blot-Analyse 34
2.2.3.6. *in vitro*-Transkription 37
2.2.3.7. EMSA 37
2.3.4. Arbeiten mit Proteinen 38
2.3.4.1. Proteinüberexpression in *E.coli* BL21-AI™ und Zellaufschluss 38
2.3.4.2. Coomassie-Färbung 39
2.3.4.3. Western-Blot-Analyse 39
2.3.4.4. His-Tag-Aufreinigung 40
2.3.4.5. Isolierung von Proteinlysat aus grünem Blattgewebe 41
2.3.5. Arbeiten mit *A.thaliana* 41
2.3.5.1. Kultivierung von *A.thaliana* 41
2.3.5.2. Kreuzen von *A.thaliana* 42
2.3.5.3. Transformation von *A.thaliana* (*Floral Dip*) 42
2.3.5.4. Selektion transformierter *A.thaliana* Pflanzen nach *Floral Dip* 43
2.3.6. Arbeiten mit *N.tabacum* 44
2.3.6.1. Kultivierung von *N.tabacum* 44
2.3.6.2. Isolation von Protoplasten aus *N.tabacum* 44
2.3.6.3. Transformation von *N.tabacum* Protoplasten 44
2.3.7. Arbeiten mit Bakterien 45
2.3.7.1. Kultivierung von *E.coli* und *A.tumefaciens* 45
2.3.7.2. Transformation von *E.coli* 45
2.3.7.3. Transformation von *A.tumefaciens* 45
3. Ergebnisse 46
3.1. Identifizierung und Charakterisierung von RNA PROCESSING FACTOR 7 in *Arabidopsis thaliana* 46

3.1.1. Mitochondrialer *nad*2-mRNA-Polymorphismus zwischen den *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Col, Can-0 und Chat-1 46

3.1.2. Kartierung des Genlokus von *RNA PROCESSING FACTOR 7* 47

3.1.3. Identifizierung von *RPF7* 50

3.1.4. Analyse 5‘- und 3‘-verlängerter *nad*2-Transkripte 55

3.1.5. Untersuchung der *RPF7*-Allele in den *A.thaliana* Ökotypen Can-0 und Chat-1 59

3.1.6. Analyse der Interaktion von RPF7 mit *nad*2-Transkripten *in vitro* 62

3.1.6.1. Überexpression und His-Tag-Aufreinigung des rekombinanten Proteins rRPF7$^{\Delta N117}$ 62

3.1.6.2. Erzeugung von *nad*2-Transkripten für die *in vitro*-Bindungsanalysen 65

3.1.6.3. *in vitro*-Bindungsanalysen zwischen rRPF7$^{\Delta N117}$ und *nad*2-Transkripten 66

3.2. Identifizierung von MITOCHONDRIAL NUCLEASE 1 und 2 in *A.thaliana* 70

3.2.1. Subzelluläre Lokalisation von AT5G64710.1 71

3.2.2. Genotypisierung von *A.thaliana* T-DNA-Insertionslinien bezüglich At5g09840.1 (SAIL663D05) und At5g64710.1 (SALK071821, SALK094849) 72

3.2.3. Komplementierung von SAIL663D05, SALK071821 und SALK094849 mit den Col-Allelen von At5g09840.1 und At5g64710.1 75

3.2.4. Etablierung und Phänotypisierung der Doppel*knockout*-Mutanten *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2* 79

3.2.4.1. Prozessierung von *atp*8-Transkripten in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2* 80

3.2.4.2. Prozessierung von *ccmF*$_{N2}$-Transkripten in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2* 82

3.2.4.3. Prozessierung von *nad*3-*rps*12-Transkripten in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2* . 85

3.2.4.4. Prozessierung von *nad*9-Transkripten in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2* 89

3.2.4.5. Prozessierung weiterer mitochondrialer Transkripte in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2* 90

3.2.5. Etablierung und Charakterisierung der Doppel*knockout*-Mutanten *rpf2-1*/*mnu1-1*, *rpf2-1*/*mnu1-2* und *rpf2-1*/*mnu2-1* 91

3.2.6. cDNA-Sequenz von *MNU1* und *MNU2* 95

3.2.7. Erzeugung der rekombinanten Proteine rMNU1$^{\Delta N52}$ und rMNU2$^{\Delta N75}$ 97

3.2.7.1. Überexpression und His-Tag-Aufreinigung von rMNU1$^{\Delta N52}$ 97

3.2.7.2. Überexpression und His-Tag-Aufreinigung von rMNU2$^{\Delta N75}$ 100

4. Diskussion 104

4.1. Ein weiteres PPR-Protein der P-Unterfamilie ist an der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* beteiligt 104

4.2. Die C-terminalen Aminosäuren sind essentiell für die Funktion von RPF7. 105

4.3. Zur eindeutigen Definition der endonukleolytischen Schnittstelle der *nad*2-mRNA wird neben RPF7 ein weiteres Protein benötigt. 107

4.4. Die 5‘-Prozessierung ist wichtig für die Stabilität von *nad*2-Transkripten in *A.thaliana*. 109

4.5. Zwei mitochondriale Nukleasen sind in die Prozessierung einzelner mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* involviert. 112

4.5.1. MNU1 und MNU2 sind an der endonukleolytischen 5‘-Prozessierung von *ccmF*$_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-Transkripten beteiligt 114

4.5.2. MNU1 und MNU2 beeinflussen gemeinsam mit RPF2 die 5‘-Prozessierung von *nad*9-Transkripten. 117

4.5.3. MNU1 und MNU2 stabilisieren das *atp8*-Haupttranskript 122

4.6. Was ist die genaue molekulare Funktion von MNU1 und MNU2? 123

4.7. MNU1 und MNU2 beeinflussen die Reifung einzelner mitochondrialer Transkripte. 125

5. Zusammenfassung 127

6. Literaturverzeichnis 128

7. Anhang 132

Anhang 1: Schematische Genkarten klonierter Konstrukte 132

Anhang 2: CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte in Col, Can-0, Can-0 + *RPF7*(Col), *rpf7-1* und *rpf7-1* + *RPF7*(Col) 133

Anhang 3: Nukleotidsequenz der *RPF*7-Allele aus Can-0 und Chat-1 136

Anhang 4: Vergleich der AS-Sequenz von RPF7(Col), RPF7(Sf-2), RPF7(Sg-1) und RPF7(Wei-0) 137

Anhang 5: CR-RT-PCR-Analyse einzelner mitochondrialer Transkripte in Col, SALK071821, SALK094849 und SAIL663D05 138

Anhang 6: Weitere Analysen mit *mnu2-1* + *MNU2*(Col), *mnu1-1* + *MNU1*(Col) und *mnu1-2* + *MNU1*(Col) 139

Anhang 7: Identifizierung neuer 5‘-Enden der *ccmF*$_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1* 140

Anhang 8: CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte in Col, *mnu2-1*, *mnu1-1* und *mnu2-1* x *mnu1-1* 143

Anhang 9: Analyse der cDNA-Sequenz von *MNU2* 146

Danksagung 147

Eidesstattliche Versicherung 148

Publikationsliste 149

Lebenslauf 150

Abkürzungsverzeichnis

amiRNA	*artificial microRNA*
AS	Aminosäure(n)
A.thaliana	*Arabidopsis thaliana*
A.tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
bp	Basenpaar(e)
CR-RT-PCR	*Circularized-RNA-Reverse-Transcription*-PCR
E.coli	*Escherichia coli*
EMSA	*Electro-Mobility-Shift-Assay*
gDNA	Gesamt-DNA
gRNA	Gesamt-RNA
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	*Left-Border*
Mbp	Megabasenpaar(e)
MNU	MITOCHONDRIAL NUCLEASE
nt	Nukleotid(e)
N.tabacum	*Nicotiana tabacum*
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNPase	Polynukleotid-Phosphorylase
PPR	*Pentatricopeptide-Repeat*
RACE	*Rapid Amplification of cDNA Ends*
RB	*Right-Border*
Real-Time qRT-PCR	*Real-Time quantitative RT*-PCR
rhx	*Random Hexamer*
rMNU1$^{\Delta N52}$	rekombinantes MNU1, um 52 AS am N-Terminus verkürzt
rMNU2$^{\Delta N75}$	rekombinantes MNU2, um 75 AS am N-Terminus verkürzt
RPF	RNA PROCESSING FACTOR
RPOT	RNA-Polymerase vom T3/T7-Phagen-Typ
rRPF7$^{\Delta N117}$	rekombinantes RPF7, um 117 AS am N-Terminus verkürzt
RT-PCR	*Reverse-Transcription*-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
UBC9	UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 9

1. Einleitung

1.1. Die Transkription mitochondrialer Gene in *Arabidopsis thaliana*

Das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) weist bei einer Größe von ≈367 Kilobasenpaaren die Information für etwa 60 Gene auf. Diese Gene kodieren für Untereinheiten der einzelnen Atmungsketten-Komplexe, für Proteine der Cytochrom *c*- und der Häm-Biosynthese sowie für verschiedene Komponenten der Genexpression (ribosomale Proteine, 3 rRNA- und 22 tRNA-Gene) [Unseld et al. 1997].

Zwei im Kern kodierte RNA-Polymerasen vom T3/T7-Phagen-Typ (RPOT) bewerkstelligen in *A.thaliana* die Transkription der im mitochondrialen Genom kodierten Gene. Eine dieser RNA-Polymerasen agiert ausschließlich in Mitochondrien (RPOTm), die andere wird auch in Plastiden importiert (RPOTmp). Ein weiterer Vertreter dieser RNA-Polymerasen in *A.thaliana* ist die Plastiden-spezifische RPOTp [Hedtke et al. 2000]. Das durch die Aktivität der RPOTm bzw. RPOTmp generierte Primärtranskript durchläuft eine Vielzahl an Prozessierungsschritten, wobei im Folgenden auf das RNA-Editing, das *cis*-/*trans*-Spleißen sowie die 3‘- und die 5‘-Reifung näher eingegangen wird.

Das RNA-Editing ist eine post-transkriptionale Modifizierung an definierten Positionen der RNA-Sequenz, wobei Cytidine deaminiert werden und so Uridine entstehen [Binder and Brennicke 2003]. Im mitochondrialen Genom von *A.thaliana* wurde dieser Vorgang an über 450 Positionen beschrieben [Chateigner-Boutin and Small 2010; Giegé and Brennicke 1999]. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass *Pentatricopeptide-Repeat*(PPR)-Proteine der PLS-Unterfamilie eine entscheidende Rolle bei der Spezifizierung der Editing-Stelle spielen [Barkan and Small 2014]. So beeinflussen beispielsweise MEF18, MEF19, MEF20, MEF21 und MEF22 Editing-Stellen innerhalb der mitochondrialen Gene *nad*4, *ccmB*, *rps*4, *cox*3 und *nad*3 [Takenaka et al. 2010]. Darüber hinaus wurden mit den *Multiple Organellar RNA Editing Factors* weitere am RNA-Editing in *A.thaliana* beteiligte Proteine beschrieben [Takenaka et al. 2012].

Das *cis*-/*trans*-Spleißen der 23 Typ II Introns Protein-kodierender mitochondrialer Gene wird durch eine Vielzahl an Kern-kodierten Faktoren bewältigt [Bonen 2008]. Den PPR-Proteinen wird bei diesem Prozess eine große Bedeutung zugesprochen, wobei auffällt, dass jedes dieser Proteine spezifisch nur an der Beseitigung von ein oder zwei Introns mitwirkt [Barkan and Small 2014]. So ist beispielsweise PpPPR_43 lediglich am *cis*-Spleißen von Intron 3 der mitochondrialen *cox*1-mRNA beteiligt [Ichinose et al. 2012]. Desweiteren ist ABO5 nur in das *cis*-

Spleißen von Intron 3 des mitochondrialen *nad*2-Transkripts involviert [Liu et al. 2010]. Darüber hinaus wird vermutet, dass die vier im Kerngenom kodierten Proteine nMAT1-4 am Spleißen von Typ II Introns in Mitochondrien mitwirken. Das Protein nMAT1 wird beispielsweise wie das PPR-Protein OTP43 für das *trans*-Spleißen von Intron 1 der mitochondrialen *nad*1-mRNA in *A.thaliana* benötigt [Falcon de Longevialle et al. 2007; Keren et al. 2012].

Die genauen Abläufe bei der Reifung der 3‘- und 5‘-Enden mitochondrialer Transkripte sind noch weitestgehend unverstanden. Für die entsprechenden Vorgänge in Chloroplasten wird vermutet, dass PPR-Proteine der P-Unterfamilie zusammen mit Exoribonukleasen die post-transkriptionale Bildung der 3‘- und 5‘-Enden plastidärer Transkripte bewerkstelligen. Ein Beleg für diese Annahme ist die Untersuchung von PPR10. Dieses PPR-Protein ist dazu in der Lage an spezifische Bereiche verschiedener RNA-Moleküle zu binden und dadurch eine 5‘→3‘- oder 3‘→5‘-Exoribonuklease zu blockieren. Durch die Wechselwirkung von PPR10 mit der RNA wird das Transkriptende definiert. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen generellen Mechanismus [Prikryl et al. 2011].

Vermutlich sind die Vorgänge bei der 3‘-Reifung mitochondrialer Transkripte ähnlich zu denen in Chloroplasten. So konnten zwei Proteine mit einer 3‘→5‘-Exonukleaseaktivität identifiziert werden [Perrin et al. 2004a; Perrin et al. 2004b]. Die mitochondriale Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) baut große Stücke der RNA stromabwärts des reifen 3‘-Endes ab. Die endgültige Definition des 3‘-Endes erfolgt durch die RNase R Homolog 1, die nur wenige Nukleotide entfernt. Analog zu PPR10 in Plastiden bindet MTSF1 an den 3‘-Bereich der mitochondrialen *nad*4-mRNA. Vermutlich schützt diese Bindung die RNA vor einem weiteren 3‘→5‘-exonukleolytischen Abbau [Haïli et al. 2013].

Im Gegensatz zur exonukleolytischen Reifung der 3‘-Enden mitochondrialer Transkripte wird vermutet, dass an der 5‘-Reifung eine oder mehrere Endonuklease(n) beteiligt ist/sind [Binder et al. 2013]. Zusätzlich konnten einige PPR-Proteine der P-Unterfamilie identifiziert werden, die RNA PROCESSING FACTORs (RPFs), die in die 5‘-Prozessierung involviert sind [Binder et al. 2013]. Auf ein vorgeschlagenes Modell zum Zusammenspiel von einer putativen Endonuklease und einem RPF wird im Abschnitt 1.3. näher eingegangen. Die exakte molekulare Funktion der einzelnen RPFs ist noch unklar. Darüber hinaus ist bisher auch noch nichts über weitere an der 5‘-Reifung beteiligte Proteine bekannt.

In diesem Zusammenhang soll auch auf die Polyadenylierung von mitochondrialen mRNAs eingegangen werden. Im Gegensatz zu Kern-kodierten mRNAs sind mitochondrial-kodierte Transkripte nicht generell polyadenyliert. Vielmehr ist in Mitochondrien das Vorhandensein eines Poly-A-Anhangs ein Abbausignal der entsprechenden RNA [Hammani and Giegé 2014]. Oftmals befindet sich dieser Poly-A-Anhang am oder nahe des 3'-Ende(s) der reifen Transkripte. In Folge dessen ist es naheliegend, dass der Abbau dieser markierten RNAs durch eine 3'→5'-Exonuklease erfolgt [Hammani and Giegé 2014]. Es wurde gezeigt, dass die PNPase hier eine entscheidende Rolle spielt [Holec et al. 2006; Perrin et al. 2004a; Perrin et al. 2004b]. Darüber hinaus beeinflusst die Poly-A-spezifische Ribonuklease AHG2 zusammen mit der Poly-A-Polymerase AGS1 den Poly-A-Status von mitochondrialen mRNAs [Hirayama et al. 2013].

1.2. PPR-Proteine

Die PPR-Proteine stellen eine der größten Proteinfamilien in Landpflanzen dar, dabei sind je nach Organismus 400-1000 Vertreter beschrieben [O'Toole et al. 2008]. Das Genom von *A.thaliana* kodiert für etwa 450 PPR-Proteine. Die entsprechenden Gene sind über das ganze Genom verteilt, wobei eine starke Anhäufung auf dem unteren Arm von Chromosom 1 (bei 23 Megabasenpaaren) auftritt [Lurin et al. 2004]. Auch die meisten nicht-pflanzlichen Eukaryoten exprimieren PPR-Proteine, jedoch mit 5-30 weit weniger als Pflanzen. Das humane Genom etwa verfügt lediglich über sechs Gene, die für PPR-Proteine kodieren [Lurin et al. 2004].

Die Bezeichnung PPR-Proteine bezieht sich auf ein 35 Aminosäuren (AS) umfassendes degeneriertes Motiv, das bis zu 30-mal innerhalb eines Proteins auftritt [Small and Peeters 2000]. Die Einteilung der PPR-Proteine in Unterfamilien erfolgt anhand vorhandener PPR-Motive (Abbildung 1). So weist die P-Unterfamilie meist nur das „klassische" 35 AS lange PPR-Motiv (P) auf. Acht Vertreter dieser Unterfamilie in *A.thaliana* verfügen jedoch über eine zusätzliche „*small MutS-related*"-Domäne, deren Funktion noch unklar ist [Liu et al. 2013]. Andere Proteine mit dieser Domäne besitzen eine RNA- oder DNA-Endonuklease-Aktivität [Fukui et al. 2011]. Zwei dem P-Motiv verwandte Motive wurden durch bioinformatische Analysen identifiziert, wobei das kürzere S-Motiv 31 AS und das längere L-Motiv 35-36 AS aufweist [Lurin et al. 2004]. Tripletts aus P-, L- und S-Motiven definieren die PLS-Unterfamilie. Eine weitere Unterteilung in die E-, E^+- bzw. DYW-Unterklasse resultiert aus dem Vorhandensein zusätzlicher C-terminaler Domänen [Lurin et al. 2004]. Die DYW-Domäne ist verwandt zu Nukleotid-

Deaminase-Domänen anderer Proteine und weist Ähnlichkeiten zu bekannten Cytosin-Deaminase-Domänen auf [Iyer et al. 2011].

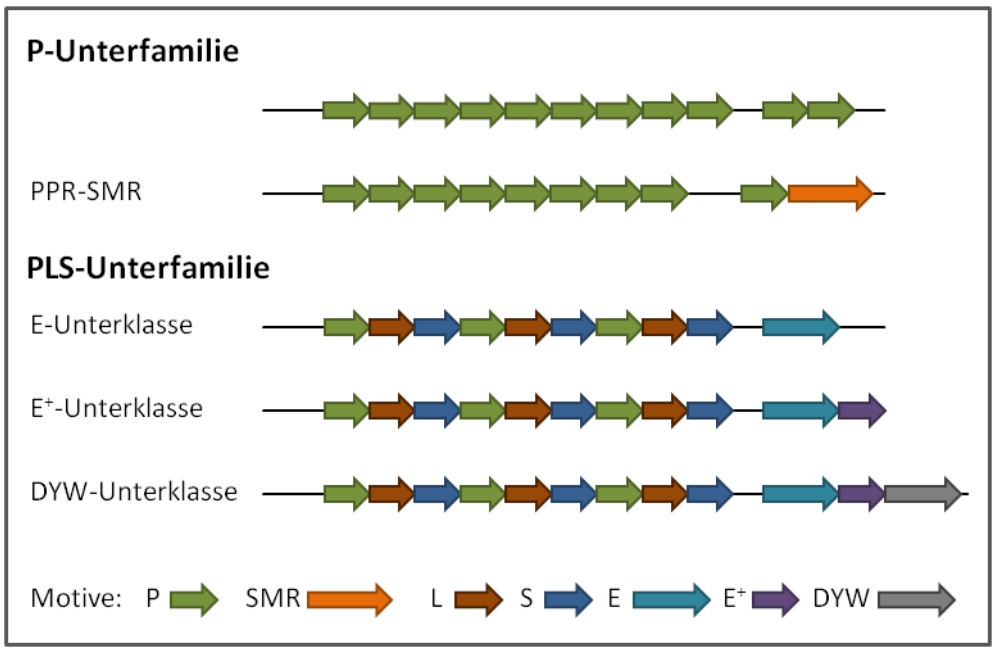


Abbildung 1: Einteilung der PPR-Proteine anhand vorhandener Motive. Die P-Unterfamilie weist meist ausschließlich das klassische P-Motiv auf, wobei acht P-PPR-Proteine in *A.thaliana* eine zusätzliche *small MutS-related*(SMR)-Domäne besitzen. Die PLS-Unterfamilie ist durch die repetitive Abfolge von P-, L- und S-Motiven charakterisiert. Anhand zusätzlicher C-terminaler Domänen können Unterklassen definiert werden.

In vereinfachter Weise kann der molekularbiologische Wirkmechanismus eines PPR-Proteins wie folgt beschrieben werden. Das PPR-Protein wird entweder in die Mitochondrien und/ oder Chloroplasten importiert und bindet dort (spezifisch) ein oder mehrere mitochondriale bzw. plastidäre Transkripte, wobei die Gen-Expression auf vielfältige Weise verändert wird. So sind PPR-Proteine beschrieben, die die Transkription, die RNA-Stabilität, das RNA-Splicing, das RNA-Editing oder die Translation beeinflussen [Barkan and Small 2014]. Bisher existieren nur wenige direkte biochemische Beweise für die postulierten Funktionen der PPR-Proteine im RNA-Metabolismus. Somit muss in Betracht gezogen werden, dass vermutlich oftmals weitere bisher noch unbekannte Faktoren benötigt werden [Schmitz-Linneweber and Small 2008].

PPR-Proteine binden Sequenz-spezifisch (meist) einzelsträngige RNA-Moleküle [Delannoy et al. 2007]. Darüber hinaus wurde ein kombinatorischer Code, der auf die spezifische Bindung von RNA-Molekülen durch PPR-Proteine eingeht, beschrieben [Barkan et al. 2012]. Dieses Modell beruht darauf, dass es eine Korrelation zwischen bestimmten AS innerhalb eines PPR-Motivs und Nukleotiden der Ziel-RNA gibt. So interagieren die AS an Position 6 eines PPR-Motivs und die AS an Position 1 des nächsten PPR-Motivs mit einem Nukleotid. Auf Grund der Tat-

sache, dass verschiedene AS-Paare das gleiche Nukleotid definieren, muss von einem gewissermaßen degenerierten Code gesprochen werden. Ein anderer Ansatz bezüglich der PPR-Protein/RNA-Interaktion beschreibt die zusätzliche Beteiligung der AS an Position 3 eines PPR-Motivs [Yagi et al. 2013].

1.3. Endonukleolytische Generierung von 5‘-Enden mitochondrialer mRNAs

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt, sind an der Bildung der reifen 5‘-Enden mitochondrialer mRNAs PPR-Proteine der P-Unterfamilie, die RPFs, beteiligt. Es gibt Hinweise, dass zumindest einige der 5‘-Enden durch einen endonukleolytischen Schnitt entstehen. Beispielsweise konnten so genannte *nad*4-5‘-*Leader*-Moleküle, die aus einem endonukleolytischen Schnitt hervorgehen, nachgewiesen werden (Abbildung 2) [Binder et al. 2013; Hölzle et al. 2011]. Da die RPFs selbst keine bekannte enzymatische Aktivität aufweisen, ist vermutlich ein anderes Protein für den endonukleolytischen Schnitt verantwortlich. Ein vor kurzem beschriebenes Modell bezieht eine putative Endonuklease in die Generierung der 5‘-Enden mitochondrialer mRNAs mit ein (Abbildung 2) [Binder et al. 2013]. Bisher ist jedoch noch nichts über das hier involvierte Enzym bzw. die hier beteiligten Enzyme bekannt.

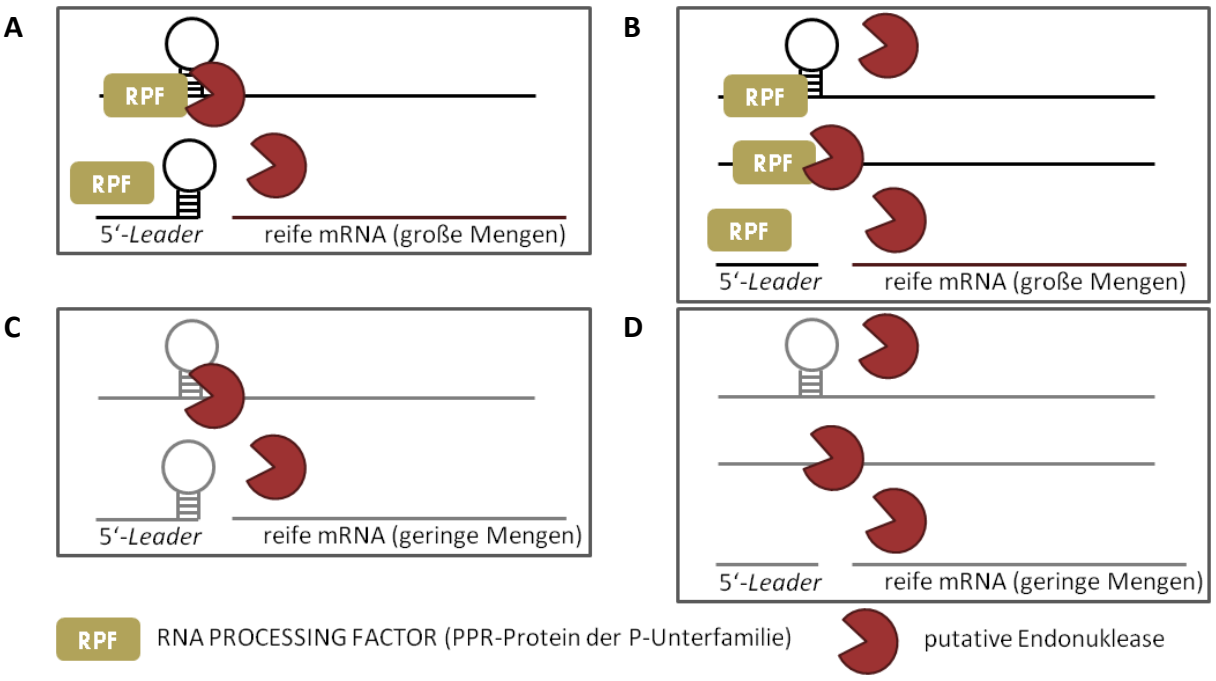


Abbildung 2: Modell für die endonukleolytische Generierung von 5‘-Enden mitochondrialer Transkripte. (A + B) Vorgänge bei Anwesenheit von RPF. An der Generierung reifer 5‘-Enden mitochondrialer Transkripte sind vermutlich (mindestens) zwei Proteine beteiligt, ein PPR-Protein (RPF) und eine putative Endonuklease. Entweder stimuliert der RPF die Bildung einer spezifischen Sekundärstruktur der Ziel-RNA (A) oder der RPF verhindert die Bildung bzw. fördert die Auflösung der Sekundärstruktur (B). Daraufhin ist die Bindungsstelle für die putative Endonuklease frei zugänglich und es kommt zum endonukleolytischen Schnitt, wobei zwei Moleküle entstehen (5‘-*Leader* und reife mRNA). **(C + D)** Vorgänge bei Abwesenheit von RPF. Die spezifische Sekundärstruktur der Ziel-RNA kann sich spontan bilden (C) oder auflösen (D). Die weiteren Vorgänge entsprechen denen bei (A) bzw. (B), jedoch ist die Effizienz sehr viel geringer als bei Anwesenheit des RPF.

Das beschriebene Modell geht auch auf die Tatsache ein, dass oftmals selbst bei Abwesenheit eines RPF geringe Mengen an reifen Transkripten gebildet werden [Hauler et al. 2013; Jonietz et al. 2010]. Vermutlich kann die putative Endonuklease auch alleine den endonukleolytischen Schnitt vermitteln, was zu einer ineffizienten Bildung geringer Mengen an reifen Transkripten führt. Dies wird durch äußere Faktoren wie z.B. eine ungünstige Sekundärstruktur der Ziel-RNA erklärt [Binder et al. 2013].

1.4. Fragestellung der Arbeit

Die Generierung mitochondrialer Transkripte in höheren Pflanzen ist ein hoch-komplexer Prozess, der eine Vielzahl an Kern-kodierten Proteinen benötigt. Ein bisher nur in Ansätzen verstandener Vorgang ist die 5‘-Reifung der mitochondrialen mRNAs. So wurden zwar einige Vertreter der *Pentatricopeptide-Repeat*(PPR)-Proteine, die RNA PROCESSING FACTORs, als wichtige Komponenten bei diesem Prozess beschrieben, jedoch ist die Bedeutung dieses Vorgangs noch weitgehend unklar. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass zumindest einige der 5‘-Enden endonukleolytisch gebildet werden. Die hierbei involvierten Proteine sind allerdings momentan noch unbekannt [Binder et al. 2013].

In einer vorangegangen Arbeit wurde gezeigt, dass der *nad*2-mRNA-Polymorphismums zwischen den *A.thaliana* Ökotypen Col und Can-0 durch eine Variation im Kerngenom verursacht wird [Stoll et al. 2013]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den entsprechenden RNA PROCESSING FACTOR zu identifizieren und zu charakterisieren, um dadurch weitere Erkenntnisse bezüglich der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte und deren Bedeutung in *A.thaliana* zu erhalten.

Darüber hinaus soll zunächst anhand von *in silico*-Analysen versucht werden, die vermutlich an der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte beteiligten Enzyme mit endonukleolytischer Aktivität zu identifizieren. Ist dies erfolgreich, sollen die entsprechenden Proteine hinsichtlich ihrer tatsächlichen Beteiligung an der Prozessierung der mitochondrialen Transkripte untersucht werden. Letzten Endes soll gezeigt werden, ob die identifizierten Proteine eine generelle, alle mitochondrialen Transkripte betreffende, endonukleolytische Aktivität besitzen oder lediglich spezifisch in die Reifung einzelner mitochondrialer mRNAs involviert sind.

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

Extraktionspuffer:	20 ml	2 M TRIS/HCl pH 7,5
(autoklavieren)	10 ml	5 M NaCl
	10 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	155 ml	H_2O_{dd}
	Zugabe nach dem Autoklavieren:	
	5 ml	20 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)

2.1.1.2. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA

Northern-Blot-Analyse

Denaturierungslösung:	500 µl	Dimethylsulfoxid
(frisch ansetzen)	255 µl	H_2O_{dd}
	195 µl	40 % Glyoxal
	50 µl	20x PB pH 6,5
50x Denhardt's:	10 g	Ficoll Typ 400
	10 g	BSA
	10 g	Polyvinylpropyrrolidon 360
	ad 1 l	H_2O_{dd}
Methylenblaulösung:	0,4 g	Methylenblau
	167 ml	3 M Na-Acetat pH 5,2
	ad 1 l	H_2O_{dd}
Prähybridisierungslösung A:	20 ml	Formamid (deionisiert)
(frisch ansetzen)	10 ml	20x SSPE
	6 ml	H_2O_{dd}
	4 ml	50x Denhardt's
	200 µl	20 % SDS
	vor der Zugabe 5 min auf 95 °C, dann 5 min auf Eis:	
	40 µl	50 mg/ml Sperma-DNA
Prähybridisierungslösung B:	27,5 ml	H_2O_{dd}
(frisch ansetzen)	15 ml	20x SSPE
	5 ml	50x Denhardt's
	2,5 ml	20 % SDS
	vor der Zugabe 5 min auf 95 °C, dann 5 min auf Eis:	
	50 µl	50 mg/ml Sperma-DNA

20x SSC:	175,2 g	NaCl
pH 7,0	88,2 g	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
(autoklavieren)	ad 1 l	H_2O_{dd}
20x SSPE:	210,4 g	NaCl
pH 7,4	27,6 g	NaH_2PO_4 x H_2O
(autoklavieren)	6,72 g	Ethylendiamintetraacetat
	ad 1 l	H_2O_{dd}
Strippinglösung:	75 ml	Formamid
(frisch ansetzen)	60 ml	H_2O_{dd}
	15 ml	20x SSPE
10x TE:	100 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
pH 8,0	20 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
(autoklavieren)	ad 1 l	H_2O_{dd}

***in vitro*-Transkription**

RNA-Elutionspuffer:	3,85 g	NH_4-Acetat
(autoklavieren)	0,04 g	Ethylendiamintetraacetat
pH 5,0	ad 100 ml	H_2O_{dd}
	Zugabe nach dem Autoklavieren:	
	500 µl	20 % SDS

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

10x EMSA-Puffer:	116 µl	86 % Glycerin
	40 µl	TRIS/HCl pH 7,5
	20 µl	5 M NaCl
	5 µl	10 mg/ml BSA
	5 µl	100 mg/ml Heparin (*)
	ad 1 ml	H_2O_{dd}
	(*) entspricht 0,5 µg/µl; variiert bis 16 µg/µl	
10 mM PMSF:	10 µl	100 mM PMSF (in Isopropanol gelöst)
(frisch ansetzen)	90 µl	H_2O_{dd}

2.1.1.3. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen

Coomassie-Färbung

Lösung A:	100 g	Ammoniumsulfat
(autoklavieren)	20 ml	85 % ortho-Phosphorsäure
	ad 1 l	H_2O_{dd}
Lösung B:	1 g	Coomassie G 250
(in steriler Flasche ansetzen)	ad 20 ml	H_2O_{dd}
Färbelösung:	98 ml	Lösung A
(frisch ansetzen)	2 ml	Lösung B
	25 ml	Methanol
Fixierlösung:	75 ml	H_2O_{dd}
(frisch ansetzen)	60 ml	Methanol
	15 ml	100 % Essigsäure

Western-Blot-Analyse

Blockierungs-Lösung:	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:	2,42 g	TRIS
	11,26 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	ad 1 l	H_2O_{dd}
10x TTBS:	590 ml	H_2O_{dd}
pH 8,0	300 ml	5 M NaCl
(autoklavieren)	100 ml	1 M TRIS/HCl pH 8,0
	Zugabe nach dem Autoklavieren:	
	10 ml	Tween 20

His-Tag-Aufreinigung

1x Elutionspuffer:	1,7 g	Imidazol
(steril filtrieren)	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}
	vor Gebrauch frisch zugeben:	
	1 ml	1 M Dithiothreitol
1x Lysispuffer:	0,14 g	Imidazol
(steril filtrieren)	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}
	vor Gebrauch frisch zugeben:	
	1 ml	1 M Dithiothreitol
1x Waschpuffer:	0,48 g	Imidazol
(steril filtrieren)	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}

Proteinlysat auf grünem Blattgewebe

Acetonlösung:	80 ml	Aceton
	20 ml	H_2O_{dd}
Extraktionspuffer:	23,96 g	Saccharose
pH 8,0	25 ml	2 M TRIS/HCl pH 8,0
(steril filtrieren)	10 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	10 ml	1 M KCl
	ad 97 ml	H_2O_{dd}
	vor Gebrauch frisch zugeben:	
	2 ml	β-Mercaptoethanol
	1 ml	0,2 M PMSF
Fällungslösung:	0,77 g	Ammoniumacetat
	ad 100 ml	Methanol

2.1.1.4. Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit *A.thaliana* und *Nicotiana tabacum* (*N.tabacum*)

***Bleaching*-Lösung:**	94 ml	H_2O_{dd}
(frisch ansetzen)	5 ml	12 % Natriumhypochlorid
	1 ml	Triton X-100
40 % PEG:	1,28 g	Mannitol
pH 9,75	0,41 g	$Ca(NO_3)_2 \times H_2O$
(sterilfiltrieren)	ad 17,5 ml	H_2O_{dd}
	pH einstellen, dann Zugabe von:	
	10 g	PEG 1500

2.1.2. Flüssig- und Festmedien

2.1.2.1. Medien zur Kultivierung von *A.thaliana*

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

Nach dem Autoklavieren werden evt. erforderliche Zusätze zugegeben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika und Herbizide für die Kultivierung von *A.thaliana*.

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

0,1 % Topagar:	200 mg	Microagar
(autoklavieren)	ad 200 ml	H_2O_{dd}

2.1.2.2. Medien zur Isolation von Tabakprotoplasten

F-PCN:	0,5 g	MES
pH 5,8	500 µg	6-Benzylaminopurin
(sterilfiltrieren)	50 µg	Naphtalenessigsäure
	50 ml	10x Macro-MS (modifiziert)
	5 ml	100x Micro-MS
	5 ml	PC-Vitamine
	ad 500 ml	H_2O_{dd}

Osmolarität auf 550 mOsm mit ca. 30 g Glucose einstellen, dann pH einstellen

F-PIN:	0,5 g	MES
pH 5,8	500 µg	6-Benzylaminopurin
(sterilfiltrieren)	50 µg	Naphtalenessigsäure
	50 ml	10x Macro-MS (modifiziert)
	5 ml	100x Micro-MS
	5 ml	PC-Vitamine
	ad 500 ml	H_2O_{dd}

Osmolarität auf 550 mOsm mit ca. 64 g Saccharose einstellen, dann pH einstellen

2 M Ammoniumsuccinat:	23,6 g	Succinat
pH 5,8	10,6 g	Ammoniumchlorid
(sterilfiltrieren)	ad 100 ml	H_2O_{dd}

10x Macro-MS (modifiziert):	5,06 g	KNO_3
(sterilfiltrieren)	2,2 g	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$
	1,85 g	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
	0,85 g	KH_2PO_4
	50 ml	2 M Ammoniumsuccinat
	ad 500 ml	H_2O_{dd}

100x Micro-MS:	2 g	Ethylendiamintetraacetat
(sterilfiltrieren)	1,115 g	$MnSO_4 \times H_2O$
	0,43 g	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$
	0,31 g	Borsäure
	41,5 mg	Kaliumiodid
	12,5 mg	$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$
	1,25 mg	$CoCl_2 \times 6\ H_2O$
	1,25 mg	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$
	ad 500 ml	H_2O_{dd}

PC-Vitamine:	4 g	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$
(sterilfiltrieren)	4 g	Inosit
	40 mg	Pyridoxin-HCl
	20 mg	Thiamin-HCl
	40 µl	d-Biotin (Vitamin H)
	ad 200 ml	H_2O_{dd}

Transformationsmedium:	1,22 g	$MgCl_2$ x 6 H_2O
pH 5,8	0,4 g	MES
(sterilfiltrieren)	ad 400 ml	H_2O_{dd}
	Osmolarität mit ca. 33 g Mannitol auf 550 mOsm einstellen, dann pH einstellen	

2.1.2.3. Medien 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
(autoklavieren)	5 g	Hefeextrakt
	ad 1 l	H_2O_{dd}

Zur Herstellung von LB-Platten werden vor dem Autoklavieren pro Liter Medium 20 g Microagar zugegeben. Die Zugabe von Antibiotika erfolgt nach dem Autoklavieren, sobald das Medium handwarm ist. Tabelle 2 können die verwendeten Antibiotika entnommen werden, wobei die Angaben sowohl für Flüssig- als auch für Festmedien gelten.

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika für die Kultivierung von *E.coli* und *A.tumefaciens*.

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

2.1.3. Gele, Lauf- und Ladepuffer, Größenstandards

2.1.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

1 % Agarose-Gel:	1,5 g	Agarose
	150 ml	1x TAE
	7,5 µl	Ethidiumbromid
50x TAE:	242 g	TRIS
pH 8,3	100 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
(autoklavieren)	44 ml	100 % Essigsäure
	ad 1 l	H_2O_{dd}
10x DNA-Ladepuffer:	5 ml	50 % Glycerin
	5 ml	1x TAE
	Spatelspitze	Bromphenolblau

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

Bei der Northern-Blot-Analyse wird das Agarosegel mit 1x PB hergestellt. Weiter ist zu beachten, dass nur ein Teil des Gels nach der Gelelektrophorese mit 5x PB + 15 µl Ethidiumbromid gefärbt wird.

20x PB:	35,6 g	Na_2HPO_4 x 2 H_2O
pH 6,5	31,2 g	NaH_2PO_4 x 2 H_2O
(autoklavieren)	ad 1 l	H_2O_{dd}
10x RNA-Ladepuffer:	5 ml	>99,5 % Glycerin
	4,56 ml	H_2O_{dd}
	440 µl	20x PB
	Spatelspitze	Bromphenolblau

2.1.3.2. Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese

***in vitro*-Transkription**

6 % PAA-Gel:	12,62 g	Harnstoff
(denaturierend)	4,5 ml	Rotiphorese® Gel 40 (1:19)
	3 ml	10x TBE
	ad 30 ml	H_2O_{dd}
	unmittelbar vor dem Gießen zugeben:	
	112,5 µl	10 % Ammoniumperoxodisulfat
	22,5 µl	TEMED
10x TBE:	180 g	TRIS
(autoklavieren)	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	ad 1 l	H_2O_{dd}
3x PAA-Ladepuffer:	9,8 ml	Formamid (deionisiert)
	200 µl	0,5 M Ethylendiamintetraacetat pH 8,0
	Spatelspitze	Bromphenolblau
	Spatelspitze	Xylencyanol

EMSA

6 % PAA-Gel:	8 ml	Rotiphorese® Gel 40 (1:19)
(nicht-denaturierend)	8 ml	5x TG
(Angabe für 2 Gele)	24 ml	H_2O_{dd}
	unmittelbar vor dem Gießen zugeben:	
	400 µl	10 % Ammoniumperoxodisulfat
	40 µl	TEMED

5x TG:	21,77 g	Glycin
(autoklavieren)	25 ml	2 M TRIS/HCl pH 8,0
	ad 1 l	H_2O_{dd}
EMSA-Ladepuffer:	581 µl	86 % Glycerin
	419 µl	H_2O_{dd}
	Spatelspitze	Bromphenolblau

2.1.3.3. SDS-Gelelektrophorese

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

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

2.1.4. Nukleinsäuren

Nachfolgenden Tabellen können die verwendeten Nukleotide (Tabelle 3) und Oligonukleotide (Tabelle 4) entnommen werden, wobei letztere von Sigma-Aldrich bezogen werden.

Tabelle 3: Nukleotide

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

Tabelle 4: Oligonukleotide mit Sequenz. Nukleotide, die komplementär zur Zielsequenz sind, sind in Großbuchstaben geschrieben.

Oligonukleotid	**Sequenz** (5'→3')
At18S-Adapter.H3	CTT ATT GGC GCA TAC CAC GGT GG
At18S-Adapter.R4	CCT AGC TCC CCG AGA ACA ACG TTC GA
At1g62670.3	CAG ATG TTT GAG TTC ATG GTT AGC CAA GC
At1g62670.10	GGT TGG CAA CAC TGT CAC
At1g62670.R	GAT ATG GTT TGC TCG ACT ATT CTC TCG ACT CAA GG
At26S-Adapter.R3	AAA CCT GGC GAA AAA GAA GTG
At2g27800.D	TAC ATG GAT TAT GTG CTC
At2g27800_kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cGA AAA CTC TCA ATC GTC GG
At2g27800_kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa TTC TCC AAT TCT GAG ACG
At2g28050.A	TCA ATA ACG CTA GAG ACG
At2g28050.B	TCT CCA TTA ACT TAA GAA CC
At2g28050.C	CTC AAA CTC ATT CAC TCG
At2g28050.D	GGT GTT GAT GAA TGG AC
At2g28050_kompl.H2	agt cga gcg gcg cgc cTC TTA AGC TAT AAT AAG CC
At2g28050_kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa TCA AAA GAC TAA AAT GGT GAC
At2g28050UEx.H1	tcg agc gga tcc TAC CCT TTT AAT GTA ATC GTC
At2g28050UEx.R	gag ttt gtc gac TCA TTT CAG ACC ATA TTG AGA ACA CG
At4g27960_1	TCA CAA TTT CCA AGG TGC TG
At4g27960_2	TCA TCT GGG TTT GGA TCC GT
At5g09840.A	AAG ACT GTG GTA TGG TTC ACC TG
At5g09840.B	CTG AAA CGA ATC AGG CTA TAC CC
At5g09840.C	TTG ACA AGC TCC TGA TTC CCA C
At5g09840.E	TTT AGC GGT TGA CAA GCT CG
At5g09840.EGFP.1	gag ttt gtc gac CGT TAG GAA CAT GAG TGA GAC
At5g09840.G	GAG CTG AGT AAG AGC AAC TTG GC
At5g09840.H	TCG AAG TTT CTT TTA TCC ATG CC
At5g09840.I	GCT CAT GCT GGA GTT TCT GTT GG
At5g09840_kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cTT TGG TTT AGC GAG AGT ACG G
At5g09840_kompl.R	ctt cga gtt t TT AAT TAA ACA GTA AAC AAC CCT CTG ACT C
At5g09840.UEx.H	tcg agc gga tcc TGG TGG GAC TTC CTG AGC TGT
At5g09840.UEx.R	gag ttt gtc gac CTA GAC TTC TGA ATC TTT CAC
At5g64710.1.UEx.H	tcg agc cca tgg AAT ACG AGG AAG ATT CAC GGA GT
At5g64710.1.UEx.R	gag ttt gaa ttc TCA ATC TTG AAT CCT AGA GTC ACC
At5g64710.A	ACA GGT TGT TCC TCT GGG AG

At5g64710.B	GGA CTC TTA GAT TTC CCG TTG CC
At5g64710.C	CTG ATG GTT TCT TCC TCA AGC TC
At5g64710.D	GTC TTT GAT AGA AAT GAT GCC C
At5g64710.E	AAC AGA GGA AAA CGC TGG AGG
At5g64710.EGFP.2	tcg agc gag ctc CAT GCA ATT CGG ATC TTC C
At5g64710.EGFP.3	gag ttt gtc gac AGT TCT CAA AAT CCC ACC A
At5g64710_kompl.H	agt cga gcg gcg cgc cGT TCG CAA TTT TTG AAC GTT GCG
At5g64710_kompl.R	ctt cga gtt ttt aat taa CGT TTT GGT CAA TTA CCA CGG
At5S-2	CAC ATA TCG AGG TCG GAA TG
At5S-3	ATT CCG ACC TCG ATA TGT GG
Atatp1-8	TTC GCG TAA AAG TTC CTA ATT CGA CTT TCG
Atatp1-9	GCA GCT GTC AAT GGA TTC TGT GAT CG
Atatp6-2	GGT CTG GAA TTA GGT GTA GC
Atatp6-2.Mega5'B	CCA GCG CAT ATT AAC TAA GAA GTG ATT CAA CCG
Atatp6-3	ACC GGA CGC TTG ACC ACT AG
Atatp6.Mega3'	TCT TGC ATT AAC CGG TCT GGA ATT AGG TG
Atatp8-1	GTA CTC CAT CTC CAT CAT TGC
Atatp8-4	AGT GGC TCA CGA GGA ATG G
Atatp8-NS.H	CTG GAT AAA TTC ACT TAT TTT TCA C
Atatp8-NS.R	TTC GAT ATA TTA TAT AAT ATG TTT CTT TCC
Atatp9-Mega3'	GCC CTA ATG ATG GCC TTT TTG ATC TTA TTC
Atatp9-Mega5'	AGA GCA AAG CCC AAA ATG GCA TAA CC
Atccb2-3	CAA TTT CGG TCT CGA TTA
Atccb2-6	GTC GTC TCA TTT CCT TAC TTC
Atccb3-3	TGT TCT GGA AAC ACG TCT TC
Atccb3-Mega5'nah	CTT GTG CGT GGC ACT CCT TGC T
Atccb6-1	CAT TTC AAT AGT ACG GGT GC
Atccb6-3	GAG AAA GTT CCG TGG AGT TC
Atccb6n1-Mega3'2	TGC TTT GTG AAC CCA ATT GCT TTG ACA
Atccb6n1-Mega5'	TGT AAG TGA ATG CAA CGA AAA GAC CCG GA
Atccb6n2-5	TCC TGA TCA GAG ACC ACT GTG TTC GC
Atccb6n2-6	AGC AGG CAT CGG TCC GTA GAA CCT
Atccb6n2-7	GAT TCG CCG AAG GAT GAG
Atccb6n2-9	CCC TTC TTC ATT CTT GGA C
Atccb6n2-10	GAT GCA CAA GAG TAC TTC GC
Atccb6n2-13	CAA GTA ATG ATC GTG TCA GC
Atccb6n2-14	ATG AGA GTC CTT CCG CGT TGG
Atcob-3	ATT CTG GGA CGA GTT GGA AG
Atcox1-2	TAC GAA TCA GTA CTG AGA AGC
Atcox1-4	GAA TGG ATG GTA GGT TAC AAA GTC C
Atcox2-5	AAG GTT CCT TCA TTT TCT GC
Atcox2-6	TTG TAT GGC AGG AAT TAC CAC
Atcox3-Mega5'	CAC ATA AAT GAA GGA ATC GAA GAG ATT ATG GCA G
Atcox3-Mega3'	AAC GGA GAC ACC AAT TAA GGA ACG CAC
Atmt26S2-F	TGT TAT GCC AAT AGC AGC GC
Atnad1a-1	AAG TAT TTC AGC TGG AAC AGC
Atnad1a-Mega.5'B	TTC CAA GTA TTT CAG CTG GAA CAG CTA TGT ACG
Atnad1de-3	GTC ACC TTT CAA TGG CTT CC
Atnad1de-Mega.3'B	TGG TCT TTT AGT CAC CTT TCA ATG GCT TCC
Atnad2ab-2	AAA GAT CTC TGG GGA AAC CG
Atnad2ab-9	TTC ATC TAG ATA GGT ATC CCG

Atnad2ab-10	TTT CGG AAA GGA GGG GT
Atnad2ab-12	GAC GGC TAG GAA GGA TCG CT
Atnad2ab-13	ATG TAG AAA AGA AAG GGC GGA A
Atnad2ab-14	TCT CTA GCG GAC TTT CCG A
Atnad2ab-15	ACG GCC TTG ATT ATG CCG
Atnad2ab-16	TTT ACT TAG TCT TAT TAA TTG GGT GGG G
Atnad2cde-3	GTC GTT ACT ACT AGC AAT GAC
Atnad2cde-5	TCG TGA AAC CAA CCA ACA GGT
Atnad2cde-6	AGA AAG GGA AAG GTT TCC GCC
Atnad2cde-7	TGA CCT CGC TTG ACG GA
Atnad2QPCR.1	CCC ACA TAT AGA AAA GGA ACT GCA
Atnad2QPCR.2	CAC TGG TGC TCG ATC TAG TGG
Atnad2-T7-1	taa tac gac tca cta tag gga gaA CAA TTA TGC TAT TCC GCC CT
Atnad2-T7-2	taa tac gac tca cta tag gga gaA TAT TAT ATA TTC ATT GTT GGT TTG GC
Atnad3-2	GGT AGG TAG AAC TAT TGG AAG C
Atnad3-4	GGA TTT TGG TCC ATG ATG GC
Atnad3-8	CCC ACT AGT GGT CCT CGG ATT ATC GAG
Atnad3-11	GGA GTT CTC GAG GAA TCC GAC
Atnad3-13	TGG ATT AGC TGG AAG CGC AG
Atnad4-2	CCA ATT AAT CGT ATC GGT CG
Atnad4-3	GAC TGC ATG CAT ACA TCC G
Atnad4-15	AAC CCT TCC CGT GTA TAC G
Atnad4L-Mega5'neu	TTC GCT GCT GCG GCA AGG
Atnad5ab-1	TTC CGA TGA GAT CCA TGG AG
Atnad5de-3	GGG ACT CTC TAT CTT CTT GGG
Atnad6-1	AGT AAA CCT GAA GTG TCG CG
Atnad6-9	GGT TTA TGC CGG AAA GG
Atnad7-4	AAG AGC ACC CGG CTC TGC CC
Atnad7-6	TCC ATG AGC AGC AGG ATG TTG AGG TC
Atnad9-3	CGA TTT TGC TAG TCC TTG GG
Atnad9-7	TTG GTC CAA CCA AGA AAG GC
Atnad9-9	CCA ATA CAG GCG AGC ACG CTT TGG AG
Atnad9-NS.H	ATG GAT AAC CAA TTC ATT TTC
Atnad9-NS.R	TTA TCC GTC GCT ACG CTG
Atorf25Mega3'	AGT AGA ATT CAT TCG AGA GAG CTT GGT GGT C
AtorfX-3	CAC AGC TGC TCT TTC CAC AC
atp8-B	AAT TCC TAC AAG TGA TCC ACC
Atrpl2-1	AAC CGT AAT ACG CCC TGA GG
Atrpl5-2	TCT TTA GAC GGA CTT CCC TC
Atrpl16-3	CCA AGT TTG TTC AGT GGT CG
Atrps3-2	AAG GTG AGT CTC GTA GGT GG
Atrps4-2	CTC TGT TCC GAA CAT TTC CTG
Atrps4-4	TAG GTC ATA TCC CTC ACG AC
Atrps7-1	GTT TTT GCT CAC CAT CCA AG
Atrps7-4	TGG ACT GGC TTC CAC CAA TC
Atrps12-1	TGT CGA TTG CTC AAC CGT AC
Atrps12-6	AGG AGT AAA GGA TTT GAT GGG AAT TCC GG
Atrps12-7	AGT CGG TGG AAC AAT CAC AAC G
Atrps12-8	AGC CTT TCA ATT AGT CGG TC

CER449181.H	TAG GAG TTT GTC CCA GCT TTA G
CER449181.R	ACC GAT GCA AGT ACA ATT GAC
CER451235.H	GGT TGT CTT TTT TGA AAG AGT C
CER451235.R	AGT TAA GTG TAA ACT GGT TGG
CER451469.H	TTG ATT CGG ACC ACC
CER451469.R	AAT CTT AAT GTA ATC ACT TCC C
CER451941.H	ACT AAT TTG TAA TCG GTG GCC TTC ACG
CER451941.R	AGA GGA ACC GGG ATT CGT CCA
CER452606.H	TAA TCT ATT CTC TTG GGG
CER452606.R	CTT CTC TTC AAG TCT ACT CG
CER454014.H	AAC CAC TAC ATC TCG GG
CER454014.R	TCG TAG GCT GAG ACA CC
CER454505.H	AGA TCC GAC CCA CCG TA
CER454505.R	GAT GAG ATG ATT TTG GGG G
CER455790.H	CCT CCT TTA ATT TTC TCT CTG TG
CER455790.R	TAA GTG AAA GTG AGT TTG GTC G
CER456162.H	TTA GTA ATG TGT AGG GTT CCC
CER456162.R	TGC TTC TCT ATC TCC TAT ACT CTC
CER458039.H	AAC ATA GAA AGT GGC GCC
CER458039.R	CAT TAA ATG GGC ATT CCC
CER458621.H	CAG CCT CAT TGC CTG ATG TCA AGA ATG C
CER458621.R	CGG GTG AAT GGG CAG CAT GG
CER458914.H	AAA GAT TGA ATG TGG CTG C
CER458914.R	ATA AGA GCA CAC ATA AAA ACC C
CER460534.H	CAT GGT CAA TGC AAC GTT ACA AAG TGC
CER460534.R	CGA AAC GCC CAA AGC GTA ATC TCC
CFPseq	TTG AAC ACC GGC AAA TGC
Chr.2 11602119.H	AAA TGG ATT TGG AGT TTG CAG
Chr.2 11602119.R	AGA CAA GCA CCA CAC CCT C
Chr.2 12383133.H	TGT AAC AAA AAC CTC CAT G
Chr.2 12383133.R	TCA ACA TCT TAT ATT GGT AGA GC
dTXSC	GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT
LB-XL	CGA TTT CGG AAC CAC CAT CAA ACA GG
nad2dNS.H	GTC ACT ACT CCC ACT GG GC
nad2dNS.R	GGG CAC CAG ATA TCT ATG AGG G
Oligo(dT)	TTT TTT TTT TTT TTT TT
P18SrRNA	AAG CAT ATG ACT ACT GGC AGG
pETanti	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GCA GC
pETsense	CCG CTG CTG CTA AAT TCG AAC GCC
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)
RS	CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
SynLB4	TAG CCT TGC TTC CTA TTA TAT CTT CC
T7prom	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T7term	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
UBC9.H2	CTA CTT CAT GTA GCG CAG GAC
US	GTA ACG CCA GGG TTT TCC C
XSC	GAC TCG AGT CGA CAT CGA

2.1.5. Enzyme und Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten **Restriktionsenzyme** wurden mit Ausnahme von *Pac*I (New England Biolabs) von Thermo Scientific bezogen. Bei einem Doppelverdau mit *Pac*I und *Sgs*I wurde der 10x Tango Buffer von Thermo Scientific (Endkonzentration 1x) eingesetzt.

Alle weiteren verwendeten Enzyme und Inhibitoren sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Enzyme und Inhibitoren. (*) Anstelle des *Pfu* 10x Reaktionspuffer wird der 5x Green GoTaq® G2 Reaktionspuffer verwendet.

	spezifischer Puffer	**Hersteller**
Cellulase Onozuka R-10	-	Duchefa
GoTaq® G2 DNA-Polymerase	5x Green GoTaq® G2 Reaktionspuffer	Promega
Macerozym (Pektinase)	-	Duchefa
M-MLV Reverse Transkriptase	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 Puffer	Promega
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

2.1.6. Präparation, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen

Die folgende Zusammenstellung beinhaltet verwendete Hilfsmittel für die Präparation, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen.

Präparation von Nukleinsäuren

NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel
Spectrum™ Plant Total RNA Kit	Sigma-Aldrich

Aufreinigung von Nukleinsäuren und Proteinen

Amicon Ultra - 0,5 ml 30K	Millipore
Amicon Ultra - 4 Ultracel 50k	Millipore
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich
illustra™ NAP™-5 Column	GE Healthcare
Protino® Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel
Spin-X® Centrifuge Tube filters	costar

Nukleinsäure- und Proteinanalytik

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

2.1.7. Organismen

2.1.7.1. *A.thaliana*

Die verwendeten Ökotypen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Darüber hinaus wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten *A.thaliana* T-DNA-Insertions- und amiRNA-Linien verwendet.

Tabelle 6: *A.thaliana* Ökotypen.

Ökotyp	Herkunft
Can-0	Kanarische Inseln (Spanien)
Chat-1	Chateaudun (Frankreich)
Col	Columbia (USA)
Sg-1	St.Georgen (Deutschland)
Sf-2	San Feliu (Spanien)
Wei-0	Weiningen (Schweiz)

Tabelle 7: *A.thaliana* T-DNA-Insertions- und amiRNA-Linien. Die Linien wurden alle im Col-Hintergrund etabliert.

Linie	Genotyp	Abkürzung
amiR-PNP-3	*artificial microRNA* (amiRNA) gegen die mitochondriale Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), Zielsequenz: +1828-1848 bezüglich Translations-Startkodon (ATG, A = +1) der PNPase-mRNA [Zendler 2013]	-
SALK058434	T-DNA-Insertion im Gen At2g28050.1 an Position +499 bezüglich Translations-Startkodon (ATG, A = +1); *Left-Border* Richtung 5‘-Ende (Abbildung 10)	*rpf7-1*
SALK071821	T-DNA-Insertion im Gen At5g64710.1 an Position +2324 bezüglich Translations-Startkodon (ATG, A = +1); *Left-Border* Richtung 3‘-Ende (Abbildung 32B)	*mnu1-2*
SALK094849	T-DNA-Insertion im Gen At5g64710.1 an Position +1324 bezüglich Translations-Startkodon (ATG, A = +1); *Left-Border* Richtung 5‘-Ende (Abbildung 32B)	*mnu1-1*
SALK146198	T-DNA-Insertion im Gen At1g62670.1 an Position +1325 bezüglich Translations-Startkodon (ATG, A = +1); *Left-Border* Richtung 5‘-Ende [Jonietz et al. 2010]	*rpf2-1*
SAIL663D05	2 T-DNA-Insertionen im Gen At5g09840.1 an Position +2203 (*Left-Border* Richtung 5‘-Ende) und +2217 (*Left-Border* Richtung 3‘-Ende) bezüglich Translations-Startkodon (ATG, A = +1) (Abbildung 32A)	*mnu2-1*

2.1.7.2. *N.tabacum*

In dieser Arbeit wurde eine transgene *N.tabacum* Linie verwendet, die ein Fusionsprotein, bestehend aus der N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssequenz der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase und dem Rot-fluoreszierenden-Protein aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor*, exprimiert [Forner and Binder 2007].

2.1.7.3. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sowie deren Herkunft sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Bakterienstämme

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

2.1.8. *Software*

Die verwendeten *Software*-Programme und Internet-*Tools* sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: *Software*-Programme und Internet-*Tools* mit Anwendung.

Software*/Internet-*Tool	**Anwendung u.a. für…**
1001 Genomes Project (http://1001genomes.org)	DNA-Sequenzen von verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen
Basic Local Alignments Search Tool (NCBI) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	Vergleich von DNA-Sequenzen
CHROMAS	Darstellung von Sequenzchromatogrammen
CLC DNA Workbench 6	Erstellung von Genkarten
CLUSTALW (Multiple Sequence Alignment) (http://www.genome.jp/tools/clustalw/)	Vergleich von Aminosäure-Sequenzen
ExPASy (http://www.expasy.org)	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen
Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite	Bearbeitung und Auswertung von Fluoreszenzbildern
Light-Cycler 480 *Software*	*Real-Time quantitative* RT-PCR (*Real-Time* qRT-PCR)
SIGNAL SALK (http://signal.salk.edu/)	Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten
SUBA	subzelluläre Lokalisation von *A.thaliana* Proteinen
TargetP 1.1 Server (www.cbs.dtu.dk/Services/TargetP)	Bestimmung der subzellulären Lokalisationssequenzen von Proteinen
The Arabidopsis Information Resource (http://arabidopsis.org/index.jsp)	DNA-Sequenzen von *A.thaliana* Genen

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden

An dieser Stelle wird nicht auf molekularbiologische Standardmethoden näher eingegangen. Zu diesen Methoden zählen unter anderem die Gelelektrophorese, die Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren. Die genauen Vorgehensweisen sind beispielsweise bei Sambrook and Russel [2001] beschrieben.

2.2.2. Arbeiten mit DNA

2.2.2.1. Gesamt-DNA-Extraktion aus grünem Blattgewebe

Die Gesamt-DNA(gDNA)-Extraktion von *A.thaliana* erfolgt je nach Verfügbarkeit aus 14 Tage alten Keimlingen oder 2-3 Wochen alten Blättern, wobei in Anlehnung an die von Edwards et al. [1991] beschriebene Methode vorgegangen wird.

Unter Verwendung eines Metall-/ oder Kunststoffstößels wird das Probenmaterial in 600 µl Extraktionspuffer mechanisch zerkleinert. Nach Zugabe von weiteren 600 µl Extraktionspuffer wird der Ansatz 5 s gevortext. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 5 min (Angaben gelten für alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte). 900 µl des Überstandes werden mit 900 µl Isopropanol versetzt. Durch mehrmaliges Invertieren wird der Ansatz gemischt, dann 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das DNA-Pellet in 200 µl H_2O_{dd} aufgenommen und der Ansatz zentrifugiert. 200 µl des Überstands werden mit 200 µl Isopropanol versetzt, der Ansatz wird gemischt (invertiert), 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wird komplett abgenommen, das weiße/transparente DNA-Pellet für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H_2O_{dd} gelöst.

2.2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion

Auf die Grundlagen und das allgemeine Vorgehen bei einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird an dieser Stelle nicht eingegangen. Es werden lediglich zwei Sonderformen der *Reverse-Transcription*-PCR (RT-PCR) erläutert.

2.2.2.2.1. *Circularized-RNA-Reverse-Transcription*-PCR

Bei der *Circularized-RNA-Reverse-Transcription*-PCR (CR-RT-PCR) wird wie bei allen RT-PCRs als *Template* ein cDNA-Molekül eingesetzt (Abbildung 3). Das Besondere an den hier verwendeten cDNA-Molekülen ist, dass diese ausgehend von „Kopf-an-Schwanz“ ligierten RNA-

Molekülen (durch die T4 RNA-Ligase) synthetisiert werden [Kuhn et al. 2002]. Da für die T4 RNA-Ligase nur RNA-Moleküle mit einem Monophosphat am 5‘-Ende (z.B. sekundäre Transkripte, die aus der Prozessierung hervorgehen) als Substrat dienen, ist diese Analyse eine erste Annäherung zur Bestimmung von prozessierten 5‘- und 3‘-Enden mitochondrialer Transkripte [Forner et al. 2007].

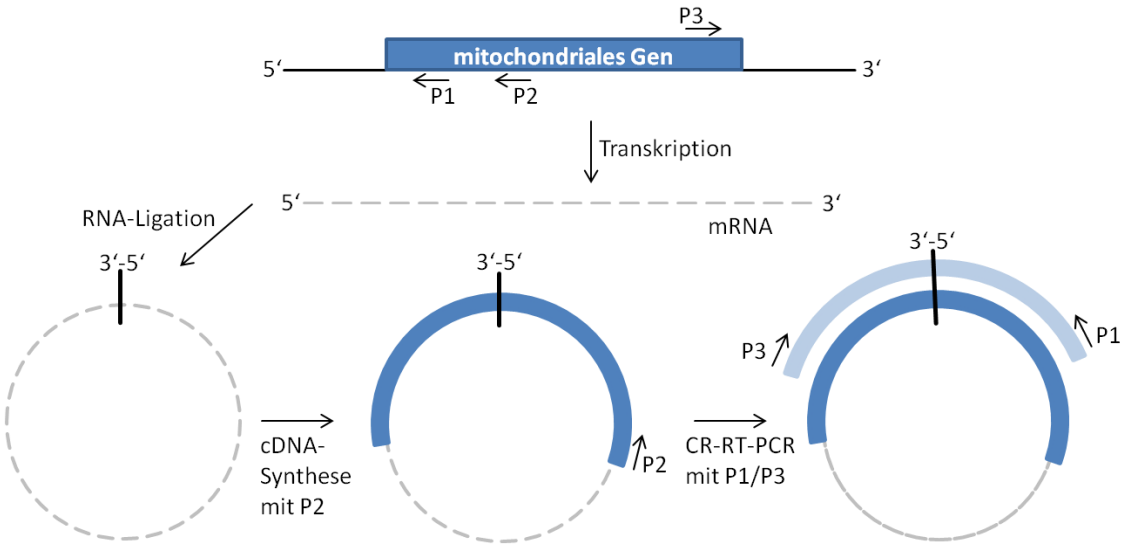


Abbildung 3: CR-RT-PCR-Analyse einer mitochondrialen mRNA. Nach Forner et al. [2007].

2.2.2.2.2. *Real-Time quantitative* RT-PCR (*Real-Time* qRT-PCR)

Die hier verwendeten cDNAs werden aus DNase-verdauten Gesamt-RNA(gRNA)-Proben hergestellt, wobei als Primer *Random Hexamer* (rhx) zum Einsatz kommen. Die Durchführung erfolgt mit dem DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit (F-416) in einer Light-Cycler® 480 *Real-Time* PCR Maschine (Roche). Für die Auswertung wird die Light-Cycler 480 *Software* verwendet. Die relativen Transkriptmengen werden ermittelt, indem gegen die Transkripte zweier Referenzgene gemessen wird [Czechowski et al. 2005]. Eines dieser Gene kodiert für die Untereinheit 3 der PROTEIN PHOSPHATASE 2A (At1g13320), das andere für UBIQUITIN CONJUGATING ENYZME 9 (UBC9, At4g27960). Das Experiment erfolgt pro Lauf in vier technischen Replikaten, wobei von jeder Probe mindestens zwei biologische Replikate analysiert werden.

2.2.2.3. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgt bei 4base lab GmbH (Reutlingen), LGC Genomics GmbH (Berlin) oder SeqLab GmbH (Göttingen). Zur Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wird die *Software* Chromas Lite verwendet.

2.2.3. Arbeiten mit RNA

2.2.3.1. gRNA-Extraktion aus grünem Blattgewebe

Die Isolierung von gRNA von *A.thaliana* erfolgt aus grünen Blättern 3-5 Wochen alter Pflanzen, alternativ auch aus 14 Tage alten Keimlingen. Unter Verwendung von flüssigem Stickstoff wird das Blattmaterial gemörsert. Die sich anschließende RNA-Extraktion wird mit dem Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma Aldrich) nach Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei zweimal mit 50 µl H_2O_{dd} eluiert wird. Die Qualität der gRNA wird photometrisch und gelelektrophoretisch überprüft.

2.2.3.2. DNase-Verdau

Um DNA-Kontaminationen in RNA-Proben zu beseitigen, wird ein DNase-Verdau durchgeführt. Die dabei eingesetzte DNase I gehört zur Familie der Endonukleasen und verdaut doppel- und einzelsträngige DNA unter Bildung von 3‘-OH-Oligonukleotiden.

Ansatz für 3 µg gRNA:		
	3 µg	gRNA
	3 µl	10x RQ1 RNase-Free DNase Puffer
	3 µl	RQ1 RNase-Free DNase [1 U/µl]
	0,6 µl	RiboLock™ RNase-Inhibitor [40 U/µl]
	ad 30 µl	H_2O_{dd}

Der Ansatz wird 1-2 h bei 37 °C inkubiert und durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende EtOH-Fällung aufgereinigt. Das RNA-Pellet wird in H_2O_{dd} gelöst, wobei das Volumen von der nachfolgenden cDNA-Synthese abhängt (siehe Abschnitt 2.2.3.4.).

2.2.3.3. Ligation von RNA

Die verwendete T4 RNA-Ligase katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5‘-Phosphat- und 3‘-OH-Gruppen von Oligonukleotiden oder einzelsträngiger RNA. Somit kommt es beim Einsatz von gRNA u.a. dazu, dass aus linearen mRNA-Molekülen zirkuläre Moleküle gebildet werden, deren 3‘- und 5‘-Ende in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen (Abbildung 3).

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

Die Ligationsreaktion erfolgt bei 15 °C im Wasserbad über Nacht, die sich anschließende Aufreinigung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung. Das getrocknete RNA-Pellet wird in 10,5-16 µl H_2O_{dd} (Volumen abhängig von verwendeter Reversen Transkriptase und Primern bei der cDNA-Synthese, siehe Abschnitt 2.2.3.4.) gelöst.

2.2.3.4. cDNA-Synthese

Je nach Verfügbarkeit wird die cDNA-Synthese mit dem M-MLV System (Promega) oder dem RevertAid System (Thermo Scientific) durchgeführt, wobei 4-6 µg ligierte gRNA oder 3-4 µg nicht-ligierte gRNA verwendet werden.

A: M-MLV System (Promega)

Zu 16 µl gRNA wird 1 µl rhx [100 µM] bzw. zu 15 µl werden 2 µl Oligo(dT) [100 µM] oder dTXSC [100 µM] gegeben. Die Proben werden 5 min bei 72 °C, dann 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe der weiteren Komponenten für die cDNA-Synthese.

Ansatz cDNA-Synthese:		
	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 [200 U/µl]

Anschließend wird der Ansatz bei 37 °C (rhx) bzw. 42 °C (Oligo(dT) + dTXSC) 60 min inkubiert.

B: RevertAid System (Thermo Scientific)

Zu 11,5 µl gRNA wird 1 µl rhx [100 µM] bzw. zu 10,5 µl werden 2 µl Oligo(dT) [100 µM] oder dTXSC [100 µM] pipettiert. Anschließend werden die Proben 5 min bei 72 °C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Dann werden die restlichen Komponenten für die cDNA-Synthese zugesetzt.

Ansatz cDNA-Synthese:		
	4 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]

Bei Verwendung von rhx wird der Ansatz zunächst 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Einsatz anderer Primer entfällt dieser Schritt. Dann folgt eine Inkubation bei 42 °C für 1 h.

Unabhängig vom verwendeten System wird die Reaktion durch die Zugabe von 5 µl 1 M NaOH abgestoppt. Der Ansatz wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 5 µl 1 M HCl neutralisiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgt mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit nach Herstellerprotokoll, wobei zweimal mit 50 µl H_2O_{dd} eluiert wird. Die cDNA wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5. Northern-Blot-Analyse

A: Gellauf und Färbegel

Je Probe werden 10-15 µg gRNA auf etwa 1 µl eingeengt, mit 5 µg gRNA (für das Färbegel) wird analog verfahren. Nach Zugabe von 20 µl Denaturierungslösung werden die Proben 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 1 min gut gelöst und für 1 h bei 55 °C inkubiert. Daraufhin werden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt, mit 2,5 µl 10x RNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgt zunächst für 10 min bei 100 V (Probeneinlauf), dann bei 120 V (inkl. Pumpe) für 2-3 h.

Der Teil des Agarosegels, der als Färbegel dient, wird nach dem Gellauf abgetrennt. Zunächst wird das Gelstück 30 min in 50 mM NaOH (Deglyoxylierung), dann für 20 min in 5x PB (Neutralisierung) inkubiert. Die eigentliche Gelfärbung erfolgt durch eine 20-30 minütige Inkubation mit 5x PB + 15 µl Ethidiumbromid. Daraufhin wird das Gelstück 15 min in 5x PB entfärbt und unter UV-Licht betrachtet.

B: Kapillarblot

Mit dem verbleibenden Gelstück wird unmittelbar nach Beendigung der Gelelektrophorese ein Kapillarblot durchgeführt (Abbildung 4). Wichtig dabei ist, dass sowohl das Gel als auch die Membran (Biodyne® A 0,45 µm) vollständig luftblasenfrei aufgebracht werden. Der Blot wird bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wird UV-Licht eingesetzt (*Crosslinken*). Daraufhin wird die Membran zur Deglyoxylierung in ein Becherglas mit kochendem 20 mM TRIS/HCl pH 8,0 gegeben, auf Raumtemperatur abgekühlt und kurz in frischem 20 mM TRIS/HCl pH 8,0 geschwenkt.

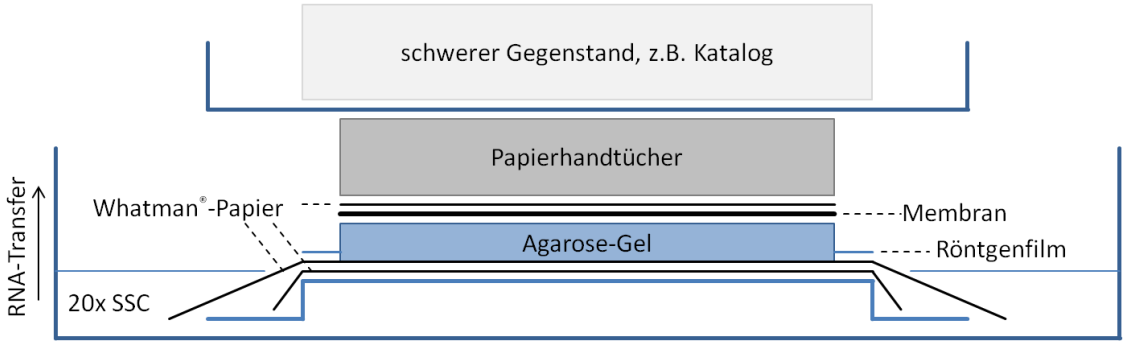


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Kapillar-Blots.

Wird nicht unmittelbar mit der Prähybridisierung fortgefahren, kann die Membran nach diesem Schritt bei -20 °C gelagert werden.

C: Prähybridisierung

Soll als Sonde ein radioaktiv-markiertes PCR-Produkt zum Einsatz kommen, wird die Membran in einer Tüte mit Prähybridisierungslösung A bei 42 °C unter leichtem Schütteln für 24 h inkubiert. Wird dagegen ein radioaktiv-markiertes Oligonukleotid verwendet, erfolgt eine Inkubation mit Prähybridisierungslösung B ebenfalls unter leichtem Schütteln für 24 h, wobei die Inkubationstemperatur T_i mit folgender Formel ermittelt wird.

$$T_i = T_m \cdot °C - 15\,°C$$

$$T_m = 16{,}6 \log M + 0{,}41 \cdot P_{gc} + 81{,}5 - P_m - L - 0{,}65 \cdot P_t$$

T_m: Schmelztemperatur [°C]
M: Molare Konzentration von Na^+
P_{gc}: G/C-Gehalt [%]
P_m: Anteil *Mismatches* [%]
P_t: Formamidgehalt [%]
L: Anzahl Nukleotide Oligonukleotid

D: Sondenmarkierung und Hybridisierung

Je nach Art der verwendeten Sonde erfolgt sowohl die Markierung als auch die Hybridisierung verschieden.

Bei Einsatz eines PCR-Produkts werden zunächst 25 ng DNA zu 1x TE pH 8,0 (ad 50 µl) gegeben. Die DNA wird durch eine Inkubation bei 95 °C für 5 min denaturiert, dann 5 min auf Eis abgekühlt. Unter Verwendung des Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System und 50 µCi [α-^{32}P]-dCTP erfolgt die radioaktive Markierung des DNA-Fragments nach Herstellerprotokoll. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl 0,2 M Ethylendiamintetraacetat abgestoppt und der Ansatz mit einer illustra™ NAP™-5 Column aufgereinigt, wobei mit 750 µl H_2O_{dd} eluiert wird. Bevor die Sonden-DNA zur Prähybridisierungslösung gegeben wird, wird Erstere

5 min bei 95 °C, dann 5 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Inkubation unter leichtem Schütteln für 24 h bei 42 °C.

Bei Verwendung eines Oligonukleotids erfolgt die Markierung durch die T4 Polynukleotidkinase, wobei dieses Enzym den Transfer eines γ-Phosphats von ATP auf die 5'-OH-Gruppe von einzel- oder doppelsträngiger DNA sowie RNA katalysiert.

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

Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h erfolgt die Aufreinigung mit einer illustra™ NAP™-5 Column, wobei mit 500 µl H_2O_{dd} eluiert wird. Das radioaktiv-markierte Oligonukleotid wird 5 min bei 95 °C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert und zur Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung der Membran erfolgt bei T_i unter leichtem Schütteln für 24 h.

E: Waschen

Um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen, wird die Membran mit verschieden konzentrierten Waschlösungen inkubiert.

Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Sonden-DNA, wird die Membran zunächst 10-20 min in 2x SSC + 0,1 % SDS bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Waschschritte resultieren aus der Geschwindigkeit des Anstiegs des Signal/Hintergrund-Verhältnisses. Zum Einsatz kommen dabei folgende Waschlösungen: 1x SSC + 0,1 % SDS (Raumtemperatur + 65 °C), 0,3x SSC + 0,1 % SDS (65 °C) und 0,1x SSC + 0,1 % SDS (65 °C). Bei Einsatz eines radioaktiv-markierten Oligonukleotids wird 6x SSPE + 0,1 % SDS als Waschlösung verwendet, die Inkubation erfolgt dabei zunächst bei Raumtemperatur, dann bei T_i. Die Membran wird nach dem letzten Waschschritt gut abgetropft, in Frischhaltefolie eingewickelt und mit einem autoradiografischen Film inkubiert.

F: Ladekontrolle

Die Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Bei Durchführung einer Methylenblaufärbung wird die Membran zunächst für 15 min mit 5 % (v/v) Essigsäure, dann für 3-5 min mit der Methylenblaulösung inkubiert und durch mehrma-

liges Waschen mit H_2O_{dd} entfärbt. Soll im Gegensatz dazu die Ladekontrolle mit einem radioaktiv-markierten Oligonukleotid (z.B. P18SrRNA, der komplementär zur cytosolischen 18S rRNA ist) erfolgen, wird die Membran 1-2 h bei 65 °C in der Strippinglösung geschwenkt. Danach wird die Membran kurz mit 1x SSC + 0,1 % SDS gewaschen, gut abgetropft, in Frischhaltefolie gewickelt und mit einem autoradiografischen Film inkubiert. Sind nach 24 h keine Signale detektierbar, folgen Prähybridisierung, Sondenmarkierung, Hybridisierung und Waschen wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, wobei nach den Vorschriften zur Durchführung mit einem radioaktiv-markierten Oligonukleotid vorgegangen wird. Die Membran kann nach erneutem Strippen mit weiteren Sonden hybridisiert werden.

2.2.3.6. *in vitro*-Transkription

Bei der Durchführung einer *in vitro*-Transkription sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen. Zum einen muss der zu transkribierende DNA-Abschnitt am 5‘-Ende einen T7-Promotor aufweisen. Andererseits sind glatte Enden des DNA-Fragments notwendig. Auf Grunddessen erfolgt nach der Amplifikation mit der GoTaq® G2 DNA-Polymerase (→ keine glatten Enden) eine Inkubation für 30 min bei 37 °C mit der *Pfu* DNA-Polymerase (→ glatte Enden).

Transkriptionsansatz:		
	300 ng	DNA
	4 µl	5x Transkriptionspuffer
	2 µl	NTPs [5 mM ATP, CTP, GTP; 1 mM UTP]
	2 µl	100 mM Dithiothreitol
	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 1 h bei 37 °C inkubiert, mit H_2O_{dd} auf 100 µl aufgefüllt, mit 100 % EtOH gefällt und anschließend auf ein denaturierendes PAA-Gel geladen. Zur Ermittlung der Laufweite des Transkripts wird ein autoradiografischer Film aufgelegt und das Transkript aus dem Gel ausgeschnitten. Letzteres wird über Nacht in 360 µl RNA-Elutionspuffer inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt unter Verwendung von SPIN-X® Centrifuge Tube filters, wobei das Transkript in 25 µl H_2O_{dd} aufgenommen wird.

2.2.3.7. EMSA

Die Durchführung des Protein-RNA-Bindungsassays erfolgt in Anlehnung an Prikryl et al. [2011], wobei die verwendete Heparinkonzentration variiert.

Ansatz EMSA:		
	2 µl	10x EMSA-Puffer (*)
	1-4 µl	2,5 µg/µl $tRNA^{Weizen}$
	+	[α-^{32}P]-UTP markiertes Transkript
	2 µl	100 mM Dithiothreitol
	2 µl	10 mM PMSF
	0,25 µl	RiboLock™ RNase-Inhibitor [40 U/µl]
	+	Protein
	ad 20 µl	H_2O_{dd}

(*) Heparinkonzentration variabel [0,5-16 µg/µl]

Zunächst werden der 10x EMSA-Puffer, die $tRNA^{Weizen}$, das [α-^{32}P]-UTP-markierte Transkript und H_2O_{dd} zusammenpipettiert und für 5 min bei 80 °C denaturiert. Nach weiteren 5 min auf Eis werden die anderen Komponenten in der oben angegebenen Reihenfolge zugesetzt. Wichtig dabei ist, dass das Protein zuletzt zugegeben wird. Die Bindungsreaktion erfolgt für 20 min bei Raumtemperatur. Daraufhin werden die Ansätze mit 2 µl EMSA-Ladepuffer versetzt und auf ein 6 % PAA-Gel (nicht-denaturierend) geladen. Der Gellauf erfolgt unter Kühlung bei 4 °C. Das Einlaufen der Proben wird durch 30 min bei 30 V gewährleistet, dann wird die Spannung für 3-4 h auf 60 V erhöht. Nach der Gelelektrophorese wird das PAA-Gel in Frischhaltefolie gewickelt und mit einem autoradiografischen Film exponiert.

2.3.4. Arbeiten mit Proteinen

2.3.4.1. Proteinüberexpression in *E.coli* BL21-AI™ und Zellaufschluss

E.coli BL21-AI™ Zellen werden mit etwa 100 ng des Überexpressions-Plasmids transformiert. Für die Vorkultur 1 werden 5 ml LB-Medium (inklusive entsprechender Antibiotika) mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit 150 µl dieser Kultur werden am nächsten Tag wiederum 5 ml LB-Medium (Vorkultur 2) angeimpft, wobei zusätzlich 0,05 g Glucose zugesetzt und die Kultur bei 30 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert wird. Die Hauptkultur wird mit 10 µl Vorkultur 2 pro ml Medium angeimpft, bis zu einer $O.D._{600\ nm}$ = 0,4 bei 37 °C und dann 20 min bei der optimalen Überexpressions-Temperatur (im Vorfeld testen) inkubiert. Die Proteinexpression wird durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) und Arabinose (Endkonzentration: 0,2 %) induziert. Nach 4 h werden die Zellen durch eine Zentrifugation für 7 min bei 5.000 rpm [BECKMAN J2-21 M/E Centrifuge, Rotor: JLA-10.500] und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wird in 1x Lysispuffer (bei 200 ml Hauptkultur: 8 ml) aufgenommen.

Zum Zellaufschluss wird eine Ultraschallbehandlung bei 20-30 Hz unter Eiskühlung durchgeführt. Die Zellen werden etwa 30 s beschallt, dann folgen 90 s Regenerationszeit auf Eis. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt. Nach einer Zentrifugation bei 5.100 rpm [BECKMAN COULTER™ Allegra™ 25R Centrifuge, Rotor: TS-5.1-500] für 20 min bei 4 °C wird der Überstand (Probe „Lysat“) abgenommen und ein kleiner Teil des Pellets in 380 µl 1x Lysispuffer + 20 µl 20 % SDS aufgekocht (Probe „Pellet“).

2.3.4.2. Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wird zunächst 1 h in der Fixierlösung, dann für mindestens 3 h in der Färbelösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Zum Entfärben wird das SDS-Gel mehrmals mit H_2O_{dd} gewaschen. Danach wird das Gel in 6 % Glycerin eingeweicht und zwischen zwei ebenfalls mit 6 % Glycerin getränkten Cellophanblättern getrocknet und eingeschweißt.

2.3.4.3. Western-Blot-Analyse

A: *Semi-Dry*-Blot

Zur Vorbereitung des Blots wird die Membran (Roti®-PVDF) equilibriert, indem diese 30 s in Methanol, 2 min in H_2O_{dd} und anschließend in Transferpuffer inkubiert wird. Zusätzlich werden vier Whatman®-Papiere in Transferpuffer eingeweicht. Der Blot erfolgt bei 400 mA und 300 V für 2 h im Kühlraum (Abbildung 5). Die Membran wird anschließend kurz in 1x TTBS geschwenkt. Wird nicht unmittelbar danach eine Immunodetektion durchgeführt, kann die Membran bei 4 °C gelagert werden.

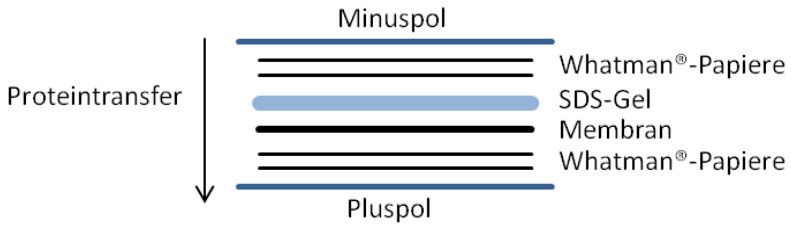


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des *Semi-Dry*-Blots.

B: Detektion

Die Membran wird 1 h mit der Blockierungs-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Daraufhin wird sie dreimal mit 1x TTBS für je 5-10 min gewaschen und für 1 h mit dem Primär-Antikörper inkubiert (Tabelle 10). Die Membran wird wiederum dreimal mit 1x TTBS gewaschen und 1 h mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert (Tabelle 10). Bei Verwendung des His-Tag® Antibody HRP Conjugate entfällt die Inkubation mit einem zweiten Antikörper. Nach einem erneuten Waschschritt wird die Membran 1 min mit der Chemilumineszenz-Lösung inkubiert und ein autoradiografischer Film aufgelegt.

Tabelle 10: Antikörper mit Puffer.

Antikörper	Puffer
Anti rabbit IgG mit HRP-Konjugat (Sekundär-Antikörper)	1:1.000 in 1x TTBS
His-Tag® Antibody HRP Conjugate	1:1.000 in 5 % Alkali-soluble Casein
*Nad*9-Antikörper (Primär-Antikörper)	1:1.000 in 1x TTBS
PsbA(D1)-Antikörper (Primär-Antikörper)	1:1.000 in 1x TTBS

2.3.4.4. His-Tag-Aufreinigung

Bei der Aufreinigung von Proteinen mit einem His-Tag (Abfolge von sechs Histidinen) wird sich die Wechselwirkung zwischen Histidin und Metallionen zu Nutze gemacht. In dieser Arbeit wird Nickel-Agarose (Protino® Ni-NTA Agarose) verwendet. Vor der eigentlichen Aufreinigung wird die Nickel-Agarose equilibriert, wobei pro 2 ml Zelllysat 200 µl Protino® Ni-NTA Agarose in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt werden. Nach einer Zentrifugation bei 9.675 rpm [BECKMAN GS-15R Centrifuge, Rotor: F3602] für 5 min bei 4 °C (Angaben gelten für alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte) wird der Überstand verworfen. Dann werden 500 µl 1x Waschpuffer zugegeben und die Nickel-Agarose wird 5 min unter leichtem Schütteln bei 4 °C gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abpipettiert und der Waschschritt zweimal wiederholt. Daraufhin werden in jedes Reaktionsgefäß etwa 2 ml Zelllysat gegeben und die Proben 1 h unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Es folgt die Zugabe von je 300 µl 1x Waschpuffer, eine Inkubation für 10 min unter leichtem Schütteln bei 4 °C und eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und vereinigt (Probe „Waschen 1“). Der Waschschritt wird zweimal wiederholt (Proben „Waschen 2“ und „Waschen 3“). Danach erfolgt die Zugabe von 100 µl 1x Elutionspuffer. Die Ansätze werden 15 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wird wiederum vor-

sichtig abgenommen und vereinigt (Probe „Eluat 1“). Der Elutionsschritt wird zweimal wiederholt (Proben „Eluat 2“ und „Eluat 3“). Optional werden die Elutionsschritte vereinigt und unter Verwendung von Amicon Ultra - 4 Ultracel 50k durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 7.500 rpm [BECKMAN J2-21 M/E Centrifuge, Rotor: JA-14] aufkonzentriert, wobei das verwendete Ausschlussvolumen dem jeweiligen rekombinanten Protein angepasst wird (Proben „Filtrat“ und „Durchfluss“).

2.3.4.5. Isolierung von Proteinlysat aus grünem Blattgewebe

Pro *A.thaliana* Linie werden etwa 400 mg grünes Blattgewebe von 3-4 Wochen alten Pflanzen verwendet. Alle benötigten Lösungen werden bei 4 °C vorgekühlt. Das Probenmaterial wird mit flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Extraktionspuffer versetzt. Der Ansatz wird 1-2 min gevortext. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min werden 750 µl Phenol zugegeben und die Probe 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 rpm [BECKMAN GS-15R Centrifuge, Rotor: F3602] für 10 min bei 4 °C, werden 450 µl der oberen Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 450 µl Extraktionspuffer gemischt (gevortext). Der Ansatz wird erneut zentrifugiert (Bedingungen siehe oben). Daraufhin werden 400 µl der oberen Phase in ein zuvor gewogenes 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1600 µl Fällungslösung zugegeben. Der Ansatz wird gemischt (invertiert) und bei -20 °C über Nacht oder bei -80 °C für 30 min inkubiert. Anschließend folgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm [BECKMAN GS-15R Centrifuge, Rotor: F3602] für 5 min bei 4 °C (Angaben gelten für alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte). Das Pellet wird dreimal in 1 ml Fällungslösung aufgenommen, dazwischen zentrifugiert und dann in 1 ml Acetonlösung aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird das Proteinpellet 1 min bei Raumtemperatur getrocknet, gewogen und in 100 µl 1x SDS-Ladepuffer gelöst. Das Proteinlysat wird bei -20 °C gelagert.

2.3.5. Arbeiten mit *A.thaliana*

2.3.5.1. Kultivierung von *A.thaliana*

A.thaliana wird entweder auf Erde oder MS-Medium (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1.2.1.) kultiviert. Die Lagerung von Samen erfolgt bei 4 °C. Zur Gewährleistung einer möglichst gleichzeitigen Keimung aller Samen, werden Töpfchen, Wannen, Platten usw. nach der Aussaat zunächst 1-2 Tage bei 4 °C inkubiert (Vernalisation). Die eigentliche Kultivierung er-

folgt bei 21 °C (relative Luftfeuchtigkeit: 50 %, Lichtmenge: 80-140 µmol/m^2s) und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h/8 h.

2.3.5.2. Kreuzen von *A.thaliana*

Auf Grund der Tatsache, dass es sich bei *A.thaliana* um eine überwiegend selbstbefruchtende Spezies handelt, muss bei einer Kreuzung der Eizell-Donor (Mutterpflanze) zunächst präpariert werden. Alle Blüten mit bereits sichtbarem Stempel, zu kleine Knospen und Nebentriebe werden beseitigt. Zum Kreuzen können nur solche Knospen verwendet werden, die noch geschlossen sind, wobei die weißen Kronblätter an der Spitze bereits sichtbar sein sollten. Unter Verwendung einer spitzen Pinzette wird die entsprechende Knospe geöffnet und alle Blütenblätter sowie die Staubgefäße werden vollständig entfernt. Nach zwei Tagen wird mit Blüten (genauer: Staubbeutel) des Pollen-Donors (Vaterpflanze) über den präparierten Stempel der Mutterpflanze gestreift. Die Mutterpflanze wird bis zur Samenreife weiterkultiviert.

Der Erfolg der Kreuzung wird in der F_1-Generation durch entsprechende Genotypisierungs-PCRs überprüft.

2.3.5.3. Transformation von *A.thaliana* (*Floral Dip*)

Die hier beschriebene Methode erfolgt in Anlehnung an Clough and Bent [1998]. Zunächst wird die Primärinfloreszenz der zu transformierenden *A.thaliana* Pflanzen (T_0-Generation) direkt über der Rosette abgeschnitten. Die sich anschließend bildenden Sekundärinfloreszenzen sollten am Tag der Transformation 2-10 cm hoch sein und möglichst viele geschlossene Knospen aufweisen. Am Tag der Transformation werden alle Schoten und Blüten mit sichtbaren Kronblättern entfernt.

Zwei Tage vor der Transformation werden zwei 5 ml Kulturen mit *A.tumefaciens* (zuvor mit dem entsprechenden Transformations-Plasmid transformiert, siehe Abschnitt 2.3.7.3.) angeimpft und bei 28 °C im Schüttler für 24 h kultiviert. Dabei ist zu beachten, dass durch die Wahl der Antibiotika sowohl auf das Helferplasmid (mit Resistenzgen gegen Carbenicillin) als auch auf das Transformations-Plasmid selektioniert wird. Am Vortag der Transformation werden 200 ml Medium mit den Vorkulturen angeimpft. Die Kultivierung erfolgt analog zu den Vorkulturen. Die Bakterien werden 20 min bei 4.500 rpm [BECKMAN J2-21 M/E Centrifuge, Rotor: JLA-10.500] (Raumtemperatur) abzentrifugiert. Das Pellet wird in Infiltrationsmedium resuspendiert und die präparierten Pflanzen 3-5 s in die Zellsuspension getaucht. Anschlie-

ßend werden die Pflanzen waagrecht in eine Wanne gelegt und mit einer Haube abgedeckt, dies soll die Verdunstung minimieren. Die Pflanzen werden 24 h bei gedämpftem Licht/Dunkelheit inkubiert und dann wieder aufgestellt. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wird 4-6 Tage später das beschriebene Vorgehen wiederholt, wobei keine Schoten etc. mehr entfernt werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch die Agrobakterien werden die Infloreszenzen in Fotoschutztaschen eingepackt. Nach 6-8 Wochen können die Samen (T_1-Generation) geerntet werden.

2.3.5.4. Selektion transformierter *A.thaliana* Pflanzen nach *Floral Dip*

Je nach Transformations-Plasmid erfolgt die Selektion transformierter Pflanzen unterschiedlich. Wird durch das Plasmid (z.B. bei pMDC123) eine Resistenz gegen das Herbizid Basta® (Wirkstoff: 120 mg/l Glufosinat-Ammonium, Bayer CropScience Deutschland GmbH) vermittelt, werden die T_1-Samen auf Erde in einer Wanne ausgebracht und bis zum Zweiblattstadium kultiviert. Die Keimlinge werden daraufhin dreimal im Abstand von drei bis vier Tagen mit einer Basta®-Lösung (300 µl Basta® in 500 ml H_2O_{dd}) besprüht. Alternativ dazu kann die Selektionierung auch auf MS-Platten (Vorgehen siehe unten) erfolgen, wobei neben Basta® (Endkonzentration: 10 µg/ml) auch Cefotaxin (Endkonzentration: 200 mg/ml) zugesetzt wird, um das Wachstum von *A.tumefaciens* zu unterbinden.

Weist das Transformations-Plasmid kein Basta®-Resistenzgen auf oder ist eine Selektionierung mit dem Herbizid nicht möglich, werden die durch die Plasmide vermittelten Antibiotika-Resistenzen ausgenutzt (z.B. Kanamycin-Resistenzgen in pMDC100). Die T_1-Samen werden zunächst einer Oberflächensterilisation unterzogen. Dabei werden die Samen mit 70 % EtOH für 5 min unter Schütteln inkubiert, dann 5 min mit H_2O_{dd} gewaschen, wobei nach jedem Schritt der Überstand abgenommen wird. Danach werden die Samen 20 min mit der *Bleaching*-Lösung inkubiert und dreimal für je 5 min mit H_2O_{dd} gewaschen. Unter Verwendung von 0,1 % Topagar erfolgt das Ausbringen der Samen auf MS-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (inklusive Cefotaxin).

Die vermeintlich transformierten T_1-Pflanzen werden mittels PCR-Analyse auf das Vorhandensein des Transformationskonstrukts untersucht.

2.3.6. Arbeiten mit *N.tabacum*

2.3.6.1. Kultivierung von *N.tabacum*

Die Kultivierung erfolgt auf Erde (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1.2.1.) bei 23 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h.

2.3.6.2. Isolation von Protoplasten aus *N.tabacum*

Die beschriebene Vorgehensweise erfolgt in Anlehnung an Koop et al. [1996]. Am Vortag der der Protoplastenisolation wird eine Tabakpflanze bei 21 °C über Nacht im Dunkeln inkubiert, um den Stärkeabbau zu stimulieren. Am nächsten Tag werden etwa 5 cm breite Streifen von Tabakblättern 3-5 min in der *Bleaching*-Lösung, dann für 45 s in 70 % EtOH inkubiert und mit H_2O_{dd} gespült. Die Blätter werden in möglichst schmalen Streifen eingeschnitten und in einer Petrischale mit 9 ml F-PIN (+ je 500 µl 10 % Cellulase und Macerozym) großflächig ausgelegt. Der Verdau erfolgt über Nacht im Dunkeln bei 21 °C. Die Protoplasten werden sehr vorsichtig behandelt und es wird stets mit abgeschnittenen Pipettenspitzen gearbeitet. Nach dem Verdau werden nicht verdaute Blattreste entfernt und das Medium mit den Protoplasten in ein Rundbodentube überführt. Dann erfolgt eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 600 rpm ohne Bremse [BECKMAN GS-15R Centrifuge, Rotor: S4180]. Die Protoplasten in der oberen Phase werden in zwei Rundbodentubes mit je 8 ml vorgelegtem Transformationsmedium pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min und 500 rpm ohne Bremse [BECKMAN GS-15R Centrifuge, Rotor: S4180]. Der Überstand wird bis auf ca. 1 ml abgenommen.

2.3.6.3. Transformation von *N.tabacum* Protoplasten

In einer kleinen Petrischale werden zu 100 µl Protoplastensuspension 50-60 µg DNA (gelöst in 18 µl H_2O_{dd}), dann 7 µl F-PCN und 125 µl 40 % PEG gegeben. Durch leichtes Schwenken werden die einzelnen Komponenten gemischt. Nach 7,5 min werden 125 µl F-PCN zugesetzt und die Proben 2 min inkubiert. Dann werden 2,6 ml F-PCN dazupipettiert und die Protoplasten über Nacht im Dunkeln bei 21 °C inkubiert. Am Folgetag wird die Suspension in ein Rundbodentube überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 500 rpm [BECKMAN GS-15R Centrifuge, Rotor: S4180] zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen. Nach der Zugabe von 3 ml F-PCN werden die Proben erneut zentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand bis auf ca. 125 µl abgenommen.

2.3.7. Arbeiten mit Bakterien

2.3.7.1. Kultivierung von *E.coli* und *A.tumefaciens*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgt bei 37 °C in LB-Medium bei 200 rpm bzw. auf LB-Platten im 37 °C Brutschrank. Die Kultivierung von *A.tumefaciens* wird analog bei 28 °C durchgeführt.

2.3.7.2. Transformation von *E.coli*

Kompetente *E.coli* DH5α Zellen werden mittels Elektroporation transformiert, wobei ein *E.coli* Pulser (BIORAD) und eine my-Budget 2 mm Küvette (Bio-Budget Technologies GmbH) zum Einsatz kommen. Durch einen kurzen Strompuls von 2,5 kV wird die Bakterienmembran lokal depolarisiert. Dies führt zur Entstehung von Löchern, durch die Plasmid-DNA in das Innere der Zelle gelangen kann. Nach der Elektroporation werden die Zellen in 1 ml LB-Medium für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Ein Teil der Zellen wird auf LB-Platten (inklusive Antibiotikum zur Selektionierung der erfolgreichen Aufnahme des Transformations-Plasmids) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.7.3. Transformation von *A.tumefaciens*

Zu kompetenten *A.tumefaciens* GV2260 Zellen wird 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Die Zellen werden 5 min auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff, dann 5 min bei 37 °C inkubiert. Das Einfrieren und anschließende Auftauen bewirkt, dass sich lokal Poren in der Bakterienmembran bilden, die ein Eindringen der Plasmid-DNA in das Zellinnere ermöglichen. Die Zellen werden vorsichtig in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 2-4 h bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Ein Teil der Zellsuspension wird auf LB-Platten mit Carbenicillin (Selektion auf Helferplasmid) und einem weiteren Antibiotikum (zur Selektionierung der erfolgreichen Aufnahme des Transformations-Plasmids) ausplattiert und zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung und Charakterisierung von RNA PROCESSING FACTOR 7 in *Arabidopsis thaliana*

3.1.1. Mitochondrialer *nad*2-mRNA-Polymorphismus zwischen den *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Col, Can-0 und Chat-1

Im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit wurde der mitochondriale *nad*2-mRNA-Polymorphismus zwischen den *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) Ökotypen Col und Can-0 beschrieben [Stoll et al. 2013]. Bei Can-0 wird im Gegensatz zum Referenzökotyp Col eine Akkumulation von größeren *nad*2-Transkripten beobachtet. Die Sequenzierung der entsprechenden CR-RT-PCR-Produkte ergab in Can-0 zwei neue 5‘-Enden (-292 und -409 bezüglich des Translations-Startkodons), wobei das 3‘-Ende (+35 bezüglich des Translations-Stoppkodons) jeweils dem im Referenzökotyp beschriebenen entspricht (Abbildung 6) [Stoll et al. 2013].

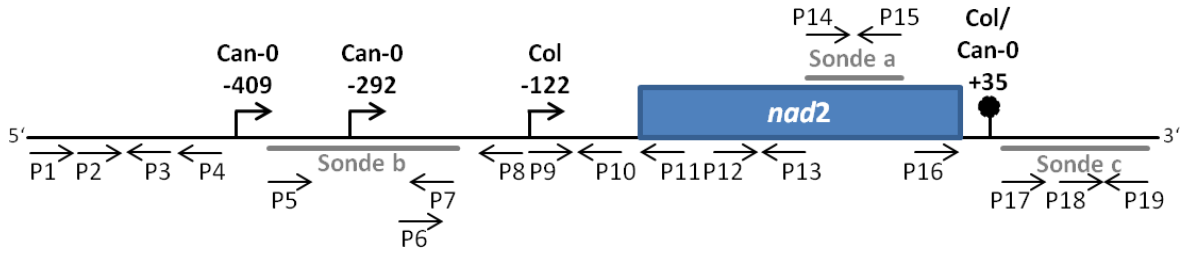


Abbildung 6: Schematische Genkarte von *nad*2. Der blaue Kasten entspricht dem Leseraster des *nad*2-Gens. 5‘-Enden sind durch abgewinkelte Pfeile dargestellt, wobei neben dem Hauptende in Col auch die zusätzlichen in Can-0 angegeben sind. Das in Col und Can-0 identische 3‘-Ende ist durch einen schwarz ausgefüllten Kreis symbolisiert. Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich des *nad*2-Gens sind mit horizontalen Pfeilen angedeutet. Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: Atnad2ab-9; P2: Atnad2ab-16; P3: Atnad2ab-15; P4: Atnad2ab-14; P5: Atnad2ab-10; P6: Atnad2-T7-1; P7: Atnad2ab-13; P8: Atnad2ab-6; P9: Atnad2-T7-2; P10: Atnad2ab-12; P11: Atnad2ab-2; P12: Atnad2QPCR.2; P13: Atnad2QPCR.1; P14: nad2dNS.R; P15: nad2dNS.H; P16: Atnad2cde-3; P17: Atnad2cde-5; P18: Atnad2cde-7; P19: Atnad2cde-6. Die verwendeten Northern-Blot-Sonden sind als graue Balken dargestellt, wobei Sonde a mit dem Primerpaar P14/P15, Sonde b mit P5/P7 und Sonde c mit P17/P19 amplifiziert wurde.

Durch die Analyse weiterer *A.thaliana* Ökotypen bezüglich des *nad*2-mRNA-Polymorphismus konnte mit Chat-1 ein zusätzlicher Vertreter des Can-0-spezifischen *nad*2-mRNA-Phänotyps identifiziert werden. So treten auch bei diesem Ökotyp in der CR-RT-PCR auf *nad*2-Transkripte drei Produkte mit etwa der gleichen Intensität auf. Neben dem Col-spezifischen Produkt (Produkt a, Abbildung 7; korreliert mit dem *nad*2-Haupttranskript mit einem 5‘-Ende bei -122) sind hier auch die beiden Can-0-spezifischen Banden (Produkte b + c, Abbildung 7; korrelieren mit *nad*2-Transkripten mit 5‘-Enden bei -292 und -409) vorhanden.

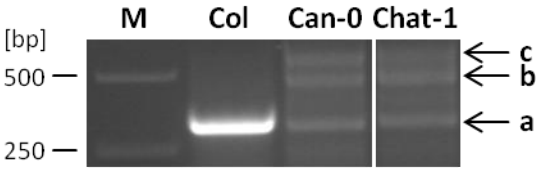


Abbildung 7: CR-RT-PCR-Analyse des *nad*2-mRNA-Polymorphismus. Die untersuchten *A.thaliana* Ökotypen sind am oberen Bildrand angegeben. Am rechten Rand sind auftretende PCR-Produkte mit Pfeilen markiert, dabei ist Produkt a ≈340 bp, Produkt b ≈510 bp und Produkt c ≈620 bp groß. Die am linken Rand angegebenen Zahlen entsprechen den DNA-Fragmenten in bp des eingesetzten Größenstandards. Als Primer wurden Atnad2ab-2 und Atnad2cde-3 verwendet (P11 + P16, Abbildung 6). bp: Basenpaare; M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

Das Auftreten von mRNA-Polymorphismen zwischen verschiedenen *A.thaliana* Ökotypen kann zwei Ursachen haben. Entweder sind Unterschiede im mitochondrialen Genom oder genetische Variationen im Kerngenom ursächlich. In Bezug auf den *nad*2-mRNA-Polymorphismus konnte anhand von reziproken F_1-Hybriden zwischen Col und Can-0 eine biparentale Vererbung ermittelt werden. So trat bei der CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte in diesen Pflanzen eine „Mischung" der PCR-Produkte der Parentalökotypen auf, wobei sich zeigte, dass der *nad*2-mRNA-Phänotyp von Col gegenüber dem von Can-0 dominant ist [Stoll et al. 2013]. Auf Grund der biparentalen Vererbung ist davon auszugehen, dass der *nad*2-mRNA-Polymorphismus durch eine Variation im Kerngenom zwischen den Ökotypen Col und Can-0 bedingt ist.

3.1.2. Kartierung des Genlokus von *RNA PROCESSING FACTOR 7*

Durch die Etablierung einer Col x Can-0 bzw. Can-0 x Col F_2-*Mapping*-Population sollte der betroffene Lokus im Kerngenom, der für die unterschiedlichen *nad*2-mRNA-Phäntypen verantwortlich ist, identifiziert werden. Insgesamt wurden in 286 F_2-Pflanzen mittels CR-RT-PCR die vorliegenden *nad*2-Transkripte analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass der Großteil der F_2-Pflanzen den Col-, eine Minderheit den Can-0-spezifischen *nad*2-mRNA-Phänotyp zeigt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Phänotypisierung der F_2-Pflanzen Col x Can-0 und Can-0 x Col. Die Phänotypisierung erfolgte mittels CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte unter Verwendung der Primer Atnad2ab-2/Atnad2cde-3 (P11 + P16, Abbildung 6). Die Daten entstammen teils eigenen Vorarbeiten [Stoll 2012].

	F_2 Col x Can-0	**F_2 Can-0 x Col**	**gesamt**
Anzahl der F_2-Pflanzen mit			
-Col *nad*2-mRNA-Phänotyp	144	78	222
-Can-0 *nad*2-mRNA-Phänotyp	34	30	64
Anteil in Prozent mit			
-Col *nad*2-mRNA-Phänotyp	81	72	78
-Can-0 *nad*2-mRNA-Phänotyp	19	28	22
Verhältnis Can-0:Col	1:4,3	1:2,6	1:3,5

Tabelle 12: Zusammenstellung der genomischen Marker zur Diskriminierung zwischen dem Col- und Can-0-Genotyp. Mbp: Megabasenpaar(e)

Marker	Chromosom; Lokalisation	Primerpaar	Produktgröße in Col	Produktgröße in Can-0
CER451941	Chromosom 1; 4,51 Mbp	CER451941.H, CER451941.R	227 bp	148 bp
CER452606	Chromosom 1; 13,45 Mbp	CER452606.H, CER452606.R	325 bp	289 bp
CER449181	Chromosom 1; 20,93 Mbp	CER449181.H, CER449181.R	244 bp	197 bp
CER458621	Chromosom 2; 5,39 Mbp	CER458621.H, CER458621.R	206 bp	170 bp
CER451469	Chromosom 2; 9,05 Mbp	CER451469.H, CER451469.R	225 bp	192 bp
Chr.2 11602119	Chromosom 2; 11,60 Mbp	Chr.2 11602119.H, Chr.2 11602119.R	399 bp	347 bp
Chr.2 12383133	Chromosom 2; 12,38 Mbp	Chr.2 12383133.H, Chr.2 12383133.R	335 bp	281 bp
CER451235	Chromosom 2; 13,93 Mbp	CER451235.H, CER451235.R	223 bp	189 bp
CER460534	Chromosom 2; 17,11 Mbp	CER460534.H, CER460534.R	543 bp	455 bp
CER456162	Chromosom 3; 6,01 Mbp	CER456162.H, CER456162.R	349 bp	319 bp
CER454014	Chromosom 3; 12,56 Mbp	CER454014.H, CER454014.R	431 bp	374 bp
CER458914	Chromosom 4; 2,36 Mbp	CER458914.H, CER458914.R	222 bp	192 bp
CER455790	Chromosom 5; 1,91 Mbp	CER455790.H, CER455790.R	219 bp	192 bp
CER458039	Chromosom 5; 8,62 Mbp	CER458039.H, CER458039.R	351 bp	322 bp
CER454505	Chromosom 5; 20,25 Mbp	CER454505.H, CER454505.R	312 bp	255 bp

Das ermittelte Aufspaltungsverhältnis von etwa 1:3 (Can-0:Col *nad*2-mRNA-Phänotyp) weist gemäß der Spaltungsregel von Mendel darauf hin, dass der *nad*2-mRNA-Polymorphismus auf ein im Kerngenom kodiertes Gen zurückzuführen ist. Das hier gesuchte Gen wird im Folgenden mit *RNA PROCESSING FACTOR 7* (*RPF7*) bezeichnet. Die 64 F_2-Pflanzen mit dem rezessiven Can-0-spezifischen *nad*2-mRNA-Phänotyp (Tabelle 11) wurden zur Kartierung des gesuchten Genlokus verwendet. Die Genotypisierung erfolgt mit sogenannten Insertions/Deletions-Markern. Das Prinzip dieser genomischen Marker ist es, dass sich die Ökotypen Col und Can-0 an bestimmten Orten im Kerngenom auf Grund von DNA-Insertionen oder -Deletionen unterscheiden. Werden bei einer PCR-Analyse Primer verwendet, die diese spezifischen Orte flankieren, kann festgestellt werden welcher Genotyp vorliegt (Tabelle 12).

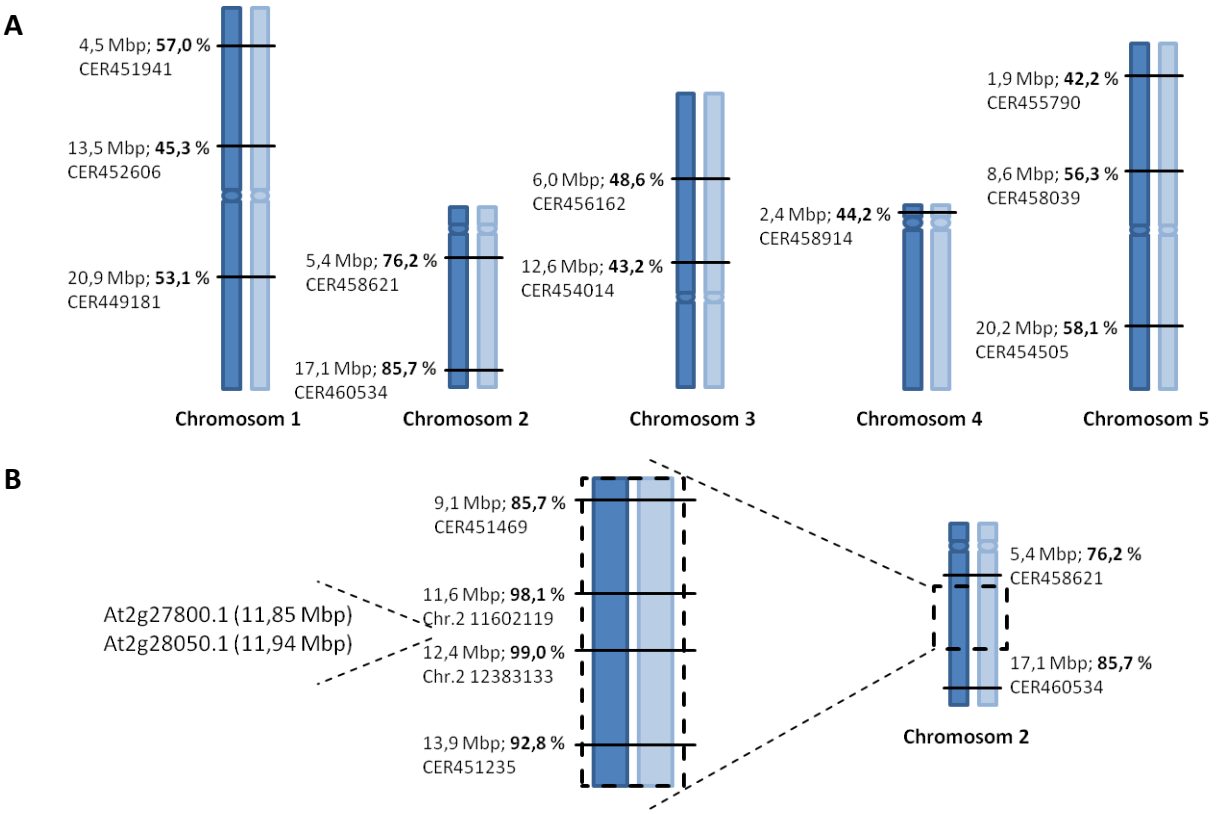


Abbildung 8: Kartierung des Lokus von *RNA PROCESSING FACTOR 7* (*RPF7*) mittels genomischer Marker. (A) Grobkartierung von *RPF7*. Die relative Position sowie die Bezeichnung der verwendeten genomischen Marker sind jeweils links der schematischen Darstellung der fünf Chromosomen von *A.thaliana* angegeben. Für die Genotypisierung wurden 64 F_2-Pflanzen Col x Can-0 bzw. Can-0 x Col, die den Can-0-spezifischen *nad*2-mRNA-Phänotyp zeigen, verwendet. Die Prozentangaben entsprechen den Can-0-Marker-Allelen an den jeweiligen Positionen. **(B)** Feinkartierung von *RPF7*. Analyse weiterer genomischer Marker auf Chromosom 2 zwischen 5,4 und 17,1 Mbp. Der gesuchte Lokus liegt zwischen 11,6 und 12,4 Mbp. In diesem Bereich sind zwei PPR-Proteine der P-Unterfamilie kodiert, wobei die Angabe in Klammern die Lage der entsprechenden Gene angibt. Mbp: Megabasenpaare

Die Analyse der Col- bzw. Can-0-Marker-Allele auf den Chromosomen 1, 3, 4 und 5 weist auf eine gleichmäßige Verteilung der beiden Genotypen (Col- und Can-0-Genotyp) hin, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich hier nicht der gesuchte Lokus befindet (Abbildung 8A). Dem gegenüber kommt es auf dem unteren Arm von Chromosom 2 zwischen 5,4 und 17,1 Megabasenpaaren (Mbp) zu einer Anhäufung von Can-0-Marker-Allelen. Durch die Analyse weiterer genomischer Marker konnte der Genort von *RPF7* auf den Bereich zwischen 11,6 und 12,4 Mbp eingegrenzt werden (Abbildung 8B). Gemäß Lurin et al. [2004] sind in diesem Abschnitt drei *Pentatricopeptide-Repeat*(PPR)-Proteine kodiert, wobei zwei dieser PPR-Proteine (AT2G27800.1, AT2G28050.1) der P-Unterfamilie angehören (Abbildung 1). Das andere Protein (AT2G27610.1) gehört zur PLS-Unterfamilie, genauer zur DYW-Unterklasse. Da alle bisher charakterisierten RPFs PPR-Proteine der P-Unterfamilie sind [Hauler et al. 2013; Hölzle et al. 2011; Jonietz et al. 2010; Jonietz et al. 2011; Stoll et al. 2015], wurden die Gene At2g27800.1 und At2g28050.1 als die besten Kandidaten für *RPF7* angesehen.

3.1.3. Identifizierung von *RPF7*

Die Col-Allele der beiden Kandidatengene sowie 5‘- und 3‘-flankierende Bereiche wurden zunächst amplifiziert. Mit dem Primerpaar At2g27800_kompl.H/At2g27800_kompl.R wurden neben dem Gen At2g27800.1 917 bzw. 502 bp der 5‘- bzw. 3‘-flankierenden Bereiche amplifiziert (≈3015 bp). Die Primerpaarung At2g28050_kompl.H2/At2g28050_kompl.R (P7-1 + P7-9, Abbildung 10) resultiert in einem DNA-Fragment (≈2150 bp), das zusätzlich zur Gensequenz 190 bzw. 540 bp der 5‘- bzw. 3‘-flankierenden Bereiche enthält. Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Sgs*I/*Pac*I wurden die DNA-Fragmente in den Pflanzen-Transformations-Vektor pMDC123 kloniert (Anhang 1A) [Curtis and Grossniklaus 2003]. Mittels *Floral Dip* erfolgte die stabile Integration der Konstrukte in das Kerngenom von Can-0 [Clough and Bent 1998]. Die durch den Vektor pMDC123 vermittelte Resistenz gegen das Herbizid Basta® wurde zur Selektionierung der T_1-Pflanzen ausgenutzt. Das Vorhandensein des jeweiligen Transgens wurde mit einer PCR unter Verwendung der Primer At2g27800.D/RS (At2g27800.1; ≈910 bp) bzw. At2g28050.A (P7-3, Abbildung 10)/US (At2g28050.1; ≈690 bp) kontrolliert. Der Primer RS bindet im Vektor pMDC123 stromabwärts, der Primer US dagegen stromaufwärts der einklonierten Sequenz. Somit wird nur dann ein PCR-Produkt generiert, wenn die T-DNA ins Kerngenom integriert wurde.

Um den Effekt der Col-Allele von At2g27800.1 bzw. At2g28050.1 im Can-0-Hintergrund zu untersuchen, wurden jeweils mehrere unabhängige T_1-Pflanzen mittels CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte phänotypisiert (Abbildung 9). Das Einbringen des Col-Allels von At2g27800.1 in Can-0 resultiert bei drei unabhängigen Pflanzen (T_1 Can-0 + At2g27800.1(Col) 1, 2, 4) in einem unveränderten *nad*2-mRNA-Phänotyp. Alle drei T_1-Pflanzen zeigen das Can-0-spezifische Produktmuster (Abbildung 9A). Somit kann das Gen At2g27800.1 als Kandidatengen für *RPF7* ausgeschlossen werden. Dem gegenüber kommt es nach Integration des Col-Allels von At2g28050.1 in Can-0 zu einer Veränderung des Produktmusters im Vergleich zu den nicht-transformierten Can-0-Pflanzen. So zeigen zwei unabhängige Pflanzen (T_1 Can-0 + At2g28050.1(Col) 2, 3) das Col-spezifische Produktmuster (Abbildung 9B links). Zusätzlich wurde in Chat-1 das Col-Allel von At2g28050.1 eingebracht. Wie im Fall von Can-0, kommt es auch hier in zwei unabhängigen Pflanzen (T_1 Chat-1 + At2g28050.1(Col) 1, 2) zu einer vollständigen Wiederherstellung der Wildtyp-Situation (Col-spezifischer *nad*2-mRNA-Phänotyp) (Abbildung 9B rechts). Ausgehend von diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass es sich bei dem Gen At2g28050.1 wahrscheinlich um *RPF7* handelt.

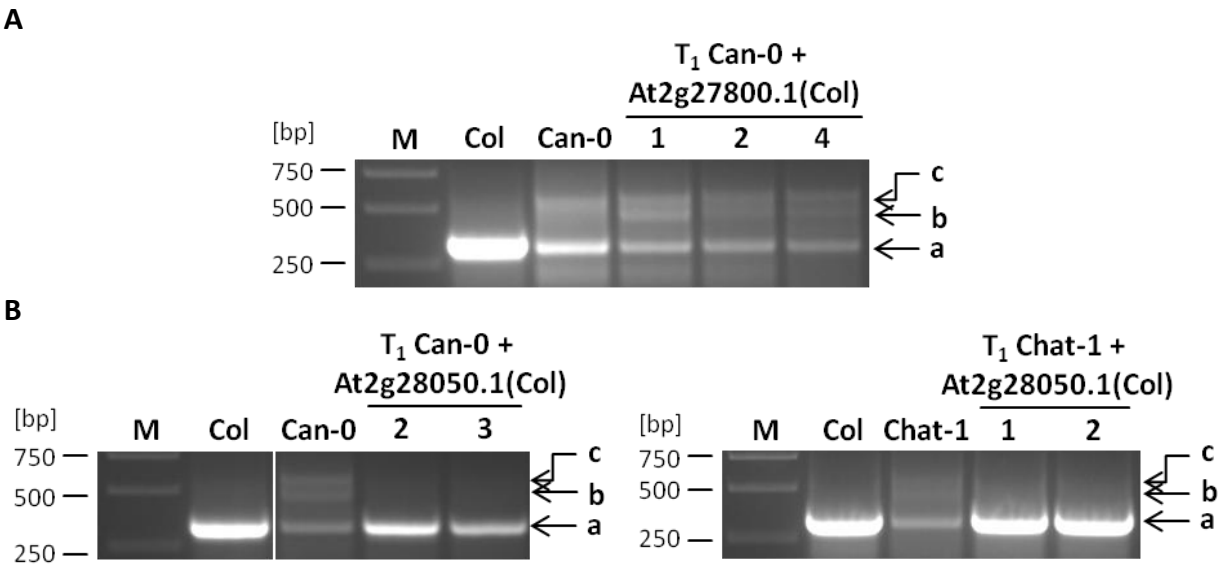


Abbildung 9: Analyse von komplementierten Can-0 und Chat-1 T_1-Pflanzen. **(A)** Untersuchung von drei unabhängigen T_1-Pflanzen Can-0 + At2g27800.1(Col). **(B)** Untersuchung von zwei unabhängigen T_1-Pflanzen Can-0 + At2g28050.1(Col) sowie Chat-1 + At2g28050.1(Col). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Um diese Schlussfolgerung zu untermauern, wurde die T-DNA-Mutante SALK058434 herangezogen. Diese Linie trägt eine T-DNA-Insertion innerhalb des Leserasters von At2g28050.1 an Position +499 bezüglich des Translations-Startkodons (ATG; A = +1) (Abbildung 10). Zunächst wurden drei unabhängige Pflanzen dieser Linie genotypisiert (Abbildung 11).

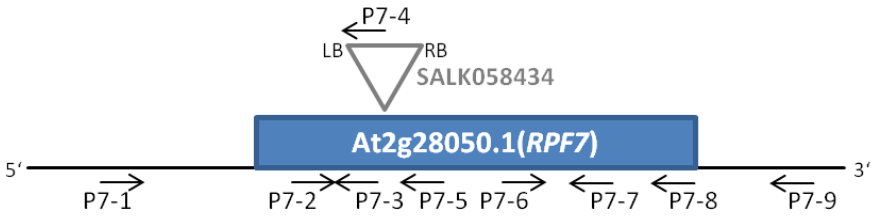


Abbildung 10: Schematische Genkarte von At2g28050.1(*RPF7*). Der blaue Kasten entspricht dem Leseraster von At2g28050.1(*RPF7*). Der Insertionsort der T-DNA in der Linie SALK058434 ist durch ein graues Dreieck symbolisiert. Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich des Gens At2g28050.1 sind mit horizontalen Pfeilen dargestellt. Die Primer entsprechen im Einzelnen: P7-1: At2g28050_kompl.H2; P7-2: At2g28050UEx.H1; P7-3: At2g28050.A; P7-4: LB-XL; P7-5: At2g28050.B; P7-6: At2g28050.D; P7-7: At2g28050.C; P7-8: At2g28050UEx.R; P7-9: At2g28050_kompl.R. LB: *Left-Border*; RB: *Right-Border*

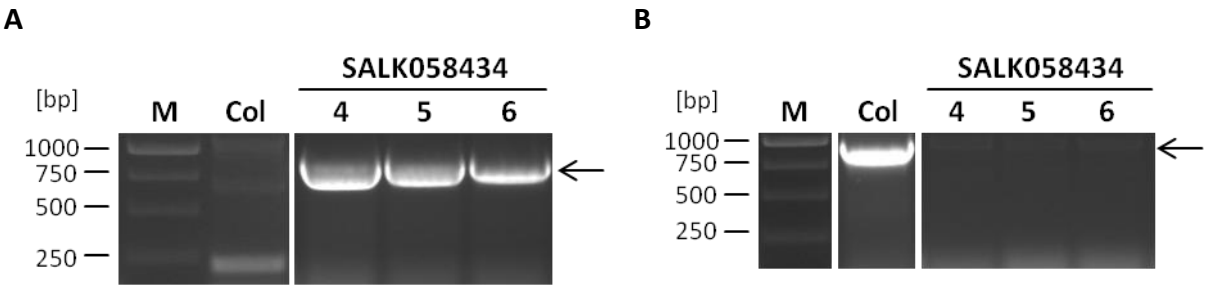


Abbildung 11: Genotypisierung von SALK058434. Untersuchung von drei unabhängigen Pflanzen der Linie SALK058434. **(A)** *Left-Border*-PCR zum Nachweis der T-DNA-Insertion im Gen At2g28050.1 unter Verwendung der Primer At2g28050_kompl.H2 und LB-XL (P7-1 + P7-4, Abbildung 10). Bei Vorhandensein einer T-DNA-Insertion wird ein PCR-Produkt von etwa 990 bp generiert (Pfeil). **(B)** PCR auf At2g28050.1 zum Nachweis des Wildtyp-Allels unter Verwendung der Primer At2g28050_kompl.H2 und At2g28050.B (P7-1 + P7-5, Abbildung 10). Das Wildtyp-Allel von At2g28050.1 wird durch ein etwa 1020 bp großes PCR-Produkt repräsentiert (Pfeil). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Alle untersuchten Pflanzen der Linie SALK058434 tragen die T-DNA im Gen At2g28050.1 auf beiden Allelen und sind somit homozygot bezüglich dieser Mutation. Um den Effekt der T-DNA-Insertion auf die Transkription des Gens At2g28050.1 zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Bei der RT-PCR auf At2g28050.1 zeigt Col nach 32 Zyklen ein Produkt der erwarteten Größe. Dem gegenüber kann kein entsprechendes PCR-Produkt bei SALK058434 detektiert werden (Abbildung 12A). Somit ist davon auszugegehen, dass in der Linie SALK058434 ein vollständiger *Knockout* des Gens At2g28050.1 vorliegt.

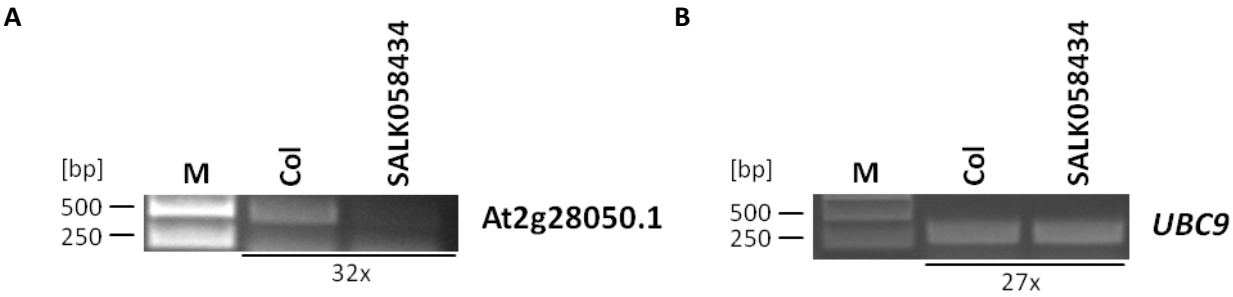


Abbildung 12: RT-PCR auf At2g28050.1 in SALK058434. **(A)** Als Primer wurden At2g28050.B und At2g28050UEx.H1 verwendet (P7-5 + P7-2, Abbildung 10), wobei ein DNA-Fragment von ≈480 bp amplifiziert wird. **(B)** Die eingesetzte cDNA-Menge wurde durch eine RT-PCR gegen die mRNA von *UBC9* überprüft. Das mit den Primern UBC9.H2 und At4g27960_2 amplifizierte PCR-Produkt ist etwa 290 bp groß. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Zur weiteren Charakterisierung der Linie SALK058434 wurde die CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte mit drei unabhängigen Pflanzen durchgeführt, wobei ein ähnliches Produktmuster wie bei Can-0 auftritt (Abbildung 13A). Diese Tatsache, sowie die vollständige Komplementierung des *nad*2-mRNA-Phänotyps durch Einbringen des Wildtyp-Allels in SALK058434 (Abbildung 13B), sind weitere Hinweis dafür, dass es sich bei dem Gen At2g28050.1 um *RPF7* handelt.

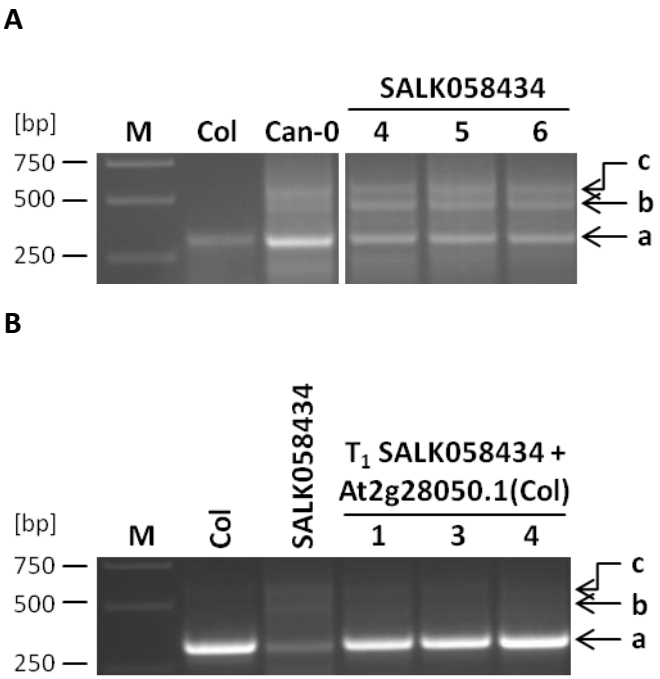


Abbildung 13: CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte mit der Linie SALK058434 (A) und mit T_1 SALK058434 + At2g28050.1(Col) (B). Es wurden jeweils drei unabhängige Pflanzen untersucht. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Zur Vervollständigung der bisher nur auf Grundlage von PCR-Analysen beschriebenen Ergebnisse wurde eine Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer zum Leseraster von *nad*2 komplementären DNA-Sonde durchgeführt (Sonde a, Abbildung 6 + Abbildung 14). Mit Col und Can-0 wurde eine analoge Northern-Blot-Analyse bereits im Rahmen einer vorherigen Arbeit durchgeführt [Stoll et al. 2013]. Übereinstimmend mit dieser Arbeit tritt in Col ein etwa 1650 Nukleotid (nt) großes *nad*2-Transkript auf, das der reifen *nad*2-mRNA mit einem 5‘-Ende bei -122 entspricht (Transkript 1, Abbildung 14). Dieses Transkript wird auch bei Can-0 detektiert, wobei die Intensität deutlich schwächer ist. Zusätzlich tritt hier ein Signal von etwa 1950 nt auf, das einer *nad*2-mRNA mit einem 5‘-Ende bei -409 zugeordnet werden kann (Transkript 2, Abbildung 14). Die Intensität dieser zwei *nad*2-Transkripte in Can-0 ist etwa gleich. Bei Chat-1 und SALK058434 verhält es sich, wie bereits auf CR-RT-PCR-Ebene gezeigt (Abbildung 7 + Abbildung 13A), ähnlich wie bei Can-0. Desweiteren resultiert das Einbringen des Col-Allels von At2g28050.1 in Can-0 bzw. SALK058434 in einer Veränderung des Transkriptmusters. Jeweils wird lediglich das reife *nad*2-Transkript detektiert (Transkript 1, Abbildung 14). Unter Berücksichtigung der Ladekontrolle scheint es, dass die Intensität dieses Transkripts bei Col stärker ausgeprägt ist als bei den komplementierten Linien. Zusätzlich kommt es in Can-0, Chat-1 und SALK058434 zu einer Akkumulation eines ≈3000 nt großen *nad*2-Transkripts (Transkript 3, Abbildung 14). In Col kann kein diesem Transkript ent-

sprechendes Signal detektiert werden. In den komplementierten Linien ist dagegen ein schwaches Signal auf der gleichen Höhe wie bei Can-0, Chat-1 und SALK058434 vorhanden.

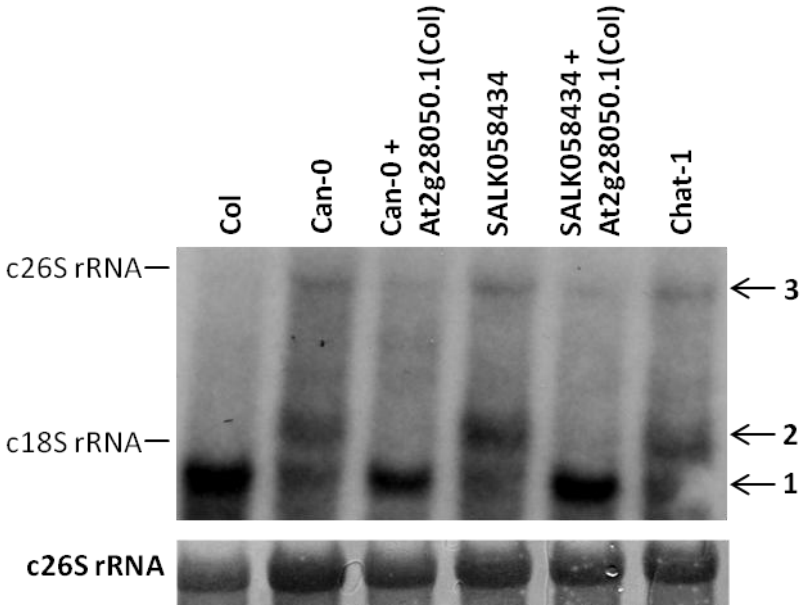


Abbildung 14: Northern-Blot-Analyse mit einer zu einem Teil des Leserasters von *nad*2 komplementären Sonden-DNA. Pro Linie wurden 15 µg gRNA eingesetzt und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Am linken Rand sind die Positionen der cytosolischen 18S und 26S rRNA (c18S rRNA, c26S rRNA) angegeben. Die DNA-Sonde wurde mit den Primern nad2dNS.H/nad2dNS.R amplifiziert (Sonde a, Abbildung 6). Am rechten Rand sind auftretende *nad*2-Transkripte mit Pfeilen markiert, dabei ist Transkript 1 ≈1650 nt, Transkript 2 ≈1950 nt und Transkript 3 ≈3000 nt groß. Als Ladekontrolle ist im unteren Teil der Abbildung die mit Methylenblau angefärbte c26S rRNA gezeigt. Erstveröffentlichung in Stoll et al. [2014].

Zusammenfassend kann festgestellt werde, dass RPF7(Col) für die 5‘-Reifung des *nad*2-Transkripts mit einem 5‘-Ende bei -122 benötigt wird und durch das Gen At2g28050.1 kodiert ist. Das Gen At2g28050.1 wird ab sofort mit *RPF7* bezeichnet. Dementsprechend ist die T-DNA-Insertionslinie SALK058434 eine Mutante von *RPF7* und wird im Folgenden in *rpf7-1* umbenannt.

Um der Frage nachzugehen, ob RPF7 eventuell auch in die Reifung oder Prozessierung anderer mitochondrialer Transkripte involviert ist, wurde eine CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte mit Col, Can-0 und *rpf7-1* sowie den jeweils mit dem *RPF7*(Col)-Allel komplementierten Pflanzen durchgeführt (Anhang 2). Die CR-RT-PCR-Daten geben keinerlei Hinweise auf eine zusätzliche Funktion von RPF7(Col) in *A.thaliana*. Somit ist davon auszugehen, dass RFP7 lediglich an der 5‘-Prozessierung von *nad*2-mRNAs beteiligt ist.

3.1.4. Analyse 5‘- und 3‘-verlängerter *nad*2-Transkripte

Wie bereits im Abschnitt 1.1. erläutert, ist die Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) wesentlich an der 3‘-Prozessierung mitochondrialer mRNAs beteiligt. Darüber hinaus ist bekannt, dass dieses Enzym auch in die Beseitigung von nicht (mehr) benötigten mitochondrialen Transkripten involviert ist [Perrin et al. 2004a; Perrin et al. 2004b]. Um der Frage nachzugehen, ob es eine Verbindung zwischen der 5‘-Prozessierung und dem Abbau von unreifen mitochondrialen Transkripten gibt, wurde zunächst eine Northern-Blot-Analyse analog zur in Abbildung 14 gezeigten Analyse durchgeführt, wobei zusätzlich gRNA von amiR-PNP-3 verwendet wurde (Abbildung 15A). Bei der Linie amiR-PNP-3 handelt es sich um eine transgene *A.thaliana* Linie, die eine *artificial microRNA* (amiRNA) gegen die mRNA der PNPase exprimiert [Zendler 2013].

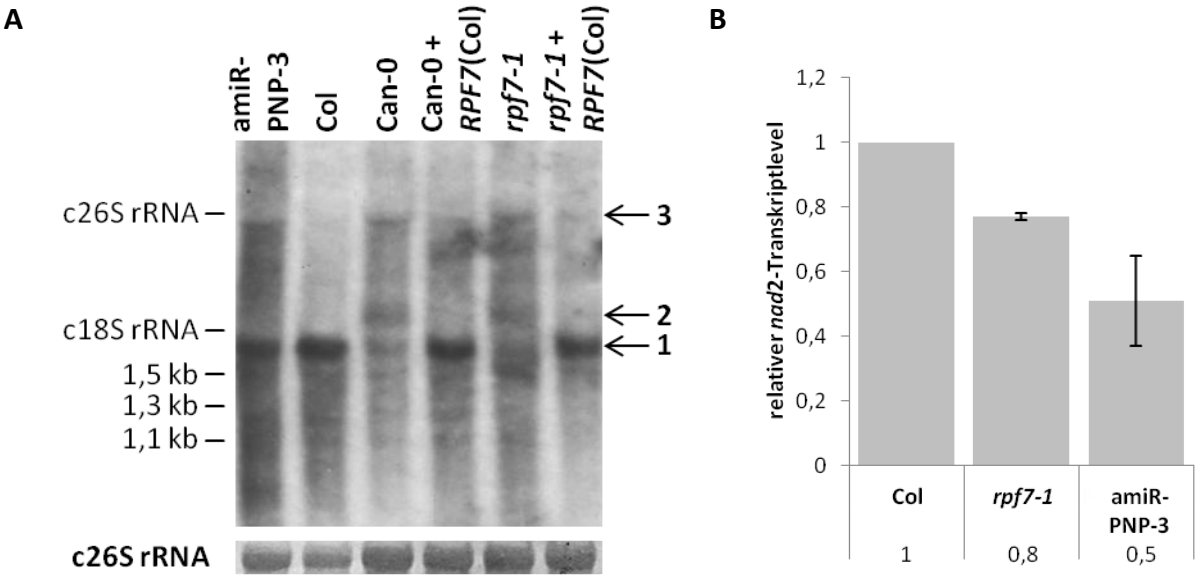


Abbildung 15: Northern-Blot- (A) und *Real-Time* qRT-PCR-Analyse (B) gegen das *nad*2-Leseraster. (A) Pro Linie wurden 12 µg gRNA eingesetzt und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Am linken Rand sind neben der cytosolischen 18S und 26S rRNA (c18S rRNA, c26S rRNA) die Positionen bekannter RNA-Fragmente markiert [Nishimura et al. 2010]. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14. **(B)** Als Primer kamen Atnad2QPCR.1/Atnad2QPCR.2 zum Einsatz (P13 + P12, Abbildung 6). Das generierte DNA-Fragment ist 96 bp groß. Der *nad*2-Transkriptlevel ist relativ zu dem in Col angegeben, wobei für Col willkürlich der Wert 1 angenommen wird. Die Daten für *rpf7-1* und amiR-PNP-3 stammen jeweils von zwei voneinander unabhängigen biologischen, in je vier technischen, Replikaten. kb: Kilobasenpaare. Erstveröffentlichung in Stoll et al. [2014].

Wie bereits zuvor gezeigt, tritt immer bei Vorhandensein des *RPF7*(Col)-Allels ein starkes, dem *nad*2-Haupttranskript entsprechendes, Signal auf (Transkript 1, Abbildung 15A). Dies ist auch bei amiR-PNP-3 der Fall, wobei die Intensität im Vergleich zu Col geringer ist. Darüber hinaus wird bei amiR-PNP-3 wie bei Can-0 und *rpf7-1* eine *nad*2-mRNA von ≈3000 nt detektiert (Transkript 3, Abbildung 15A). Zusätzlich deuten in allen Proben Signale zwischen 1,1 und 1,5 Kilobasenpaaren (kb) auf *nad*2-Transkripte hin, die kleiner als das Haupttranskript

(≈1650 nt) sind. Eine *Real-Time* qRT-PCR gegen einen Teil des *nad*2-Leserasters bestätigt die erwähnten Beobachtungen bezüglich einer Reduzierung der *nad*2-Transkriptmenge in *rpf7-1* und amiR-PNP-3. Sowohl in *rpf7-1* als auch in amiR-PNP-3 ist der relative *nad*2-Transkriptlevel in Bezug auf Col verringert (Abbildung 15B), wobei hier zu beachten ist, dass bei dieser RT-PCR auch solche Moleküle detektiert werden, die 5‘- oder 3‘-verlängert sind. Eine Differenzierung zwischen reifen, 5‘- und/oder 3‘-verlängerten Molekülen ist nicht möglich. Auch bei der in Abbildung 15A gezeigten Northern-Blot-Analyse kann nicht eindeutig definiert werden, ob die detektierten Moleküle reifen oder unreifen (5‘- und/oder 3‘-verlängerten) *nad*2-Transkripten entsprechen.

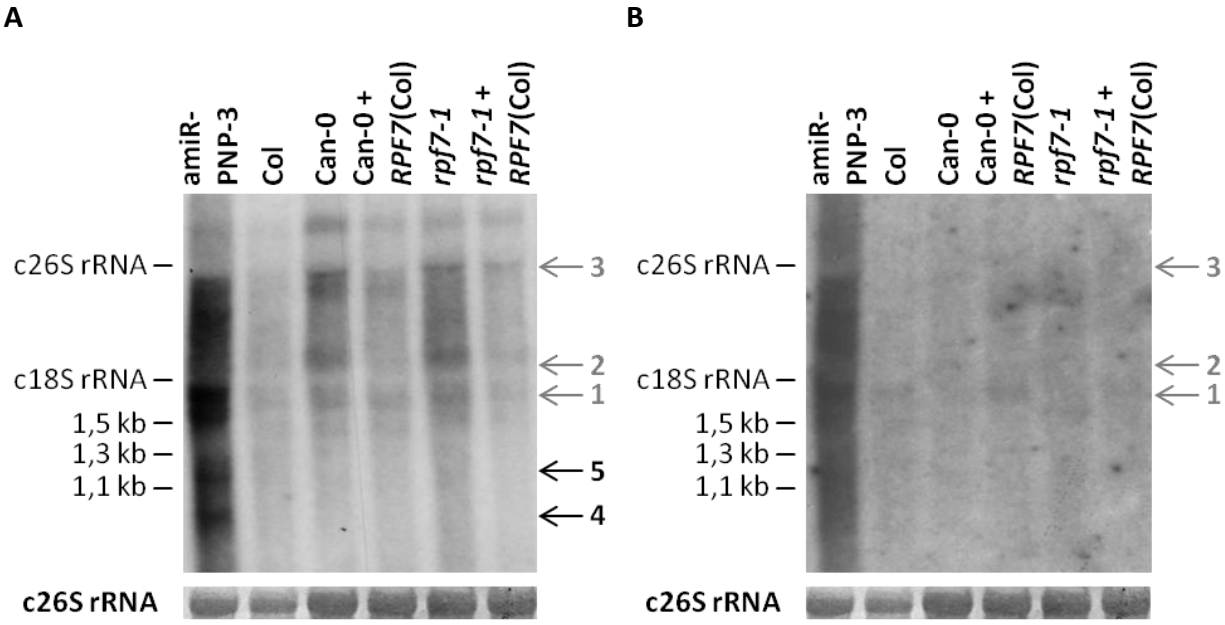


Abbildung 16: Northern-Blot-Analyse gegen Bereiche stromaufwärts des reifen 5‘-Endes (A) und stromabwärts des reifen 3‘-Endes (B) der *nad*2-mRNA. Die hier gezeigten Blots wurden mit der Membran aus Abbildung 15A durchgeführt. Die grauen Pfeile am rechten Rand markieren die Positionen der detektierten Transkripte bei Einsatz von Sonde a (Abbildung 15A). **(A)** Sonde b wurde mit den Primern Atnad2ab-10 und Atnad2ab-13 amplifiziert (P5 + P7, Abbildung 6). In schwarz sind am rechten Rand zwei in amiR-PNP-3 zusätzlich auftretende *nad*2-Transkripte markiert (Transkript 4 ≈800 nt, Transkript 5 ≈1200 nt). **(B)** Sonde c wurde mit dem Primerpaar Atnad2cde-5/Atnad2cde-6 generiert (P17 + P19, Abbildung 6). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 15A. Erstveröffentlichung in Stoll et al. [2014].

Um die größeren bzw. kleineren auftretenden *nad*2-Transkripte genauer zu charakterisieren, wurden zunächst Northern-Blot-Analysen mit Sonden, die Bereiche stromaufwärts des 5‘-Endes (Sonde b, Abbildung 6) bzw. stromabwärts des 3‘-Endes (Sonde c, Abbildung 6) der reifen *nad*2-mRNA repräsentieren, durchgeführt (Abbildung 16). Bei Vorhandensein von *RPF7*(Col) treten mit Ausnahme von amiR-PNP-3 5‘-verlängerte *nad*2-Transkripte in geringerer Menge als bei Abwesenheit (Can-0, *rpf7-1*) dieses Allels auf (Transkripte 1-3, Abbildung

16A). Die in Can-0 und *rpf7-1* detektierten Signale weisen die gleiche Größe wie in Abbildung 15A auf (grau in Abbildung 16A). Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus vorherigen CR-RT-PCR-Analysen (Produkte b + c, Abbildung 7 und Abbildung 13A) kann somit gefolgert werden, dass hier verstärkt 5‘-verlängerte *nad*2-mRNAs existieren. Obwohl bei amiR-PNP-3 ein intaktes *RPF7*(Col)-Allel vorliegt, kommt es hier zu einer starken Akkumulation von 5‘-verlängerten Molekülen. Dies beinhaltet sowohl Moleküle, die denen in Can-0 und *rpf7-1* entsprechen, als auch RNAs, die deutlich kleiner als die reife *nad*2-mRNA sind (Transkripte 4 + 5, Abbildung 16A). 3‘-verlängerte *nad*2-Transkripte können unabhängig vom Vorhandensein des *RPF7*(Col)-Allels mit Ausnahme von amiR-PNP-3 nur in sehr geringem Maße detektiert werden (Abbildung 16B). So kommt es lediglich bei amiR-PNP-3 zu einer sehr starken Akkumulation 3‘-verlängerter *nad*2-mRNAs. Die mit Sonde b und c detektierten RNAs bei amiR-PNP-3 ähneln sich teilweise, wobei jeweils RNAs auftreten, die von der Größe her zwischen der cytosolischen 18S und 26S rRNA einzuordnen sind.

Die im Northern-Blot beobachteten Anhäufungen 5‘- bzw. 3‘-verlängerter *nad*2-Transkripte wurde zusätzlich mit RT-PCR-Analysen untersucht. Stellvertretend für Linien ohne ein intaktes *RPF7*(Col)-Allel wurde *rpf7-1* verwendet. Es wurden RT-PCR-Analysen auf einen Bereich stromaufwärts des 5‘-Endes sowie einen Bereich stromabwärts des 3‘-Endes der reifen *nad*2-mRNA durchgeführt. Die RT-PCR-Analyse des 5‘-Bereichs weist auf eine geringe Akkumulation von 5‘-verlängerten Molekülen in *rpf7-1* und amiR-PNP-3 hin (Abbildung 17A). Zur genauen Quantifizierung dieser Beobachtung wurde eine *Real-Time* qRT-PCR durchgeführt (Abbildung 17B). Die erhaltenen Ergebnisse deuten sowohl bei *rpf7-1* als auch bei amiR-PNP-3 auf eine Anhäufung von Molekülen (*rpf7-1*: 1,6x; amiR-PNP-3: 1,7x), die den Bereich stromaufwärts des reifen 5‘-Endes der *nad*2-mRNA beinhalten, hin. Bei der RT-PCR-Analyse auf den 3‘-Bereich kann bei *rpf7-1* im Vergleich zu Col kein Unterschied festgestellt werden. Dem gegenüber weist diese Analyse auf eine starke Akkumulation 3‘-verlängerter *nad*2-mRNAs in amiR-PNP-3 hin (Abbildung 17C). Eine *Real-Time* qRT-PCR bestätigt dies, so kann eine fast 22-fache Anreicherung im Vergleich zu Col beobachtet werden. Die entsprechende Analyse mit *rpf7-1* weist dagegen auf eine Verringerung um 30 % hin (Abbildung 17D).

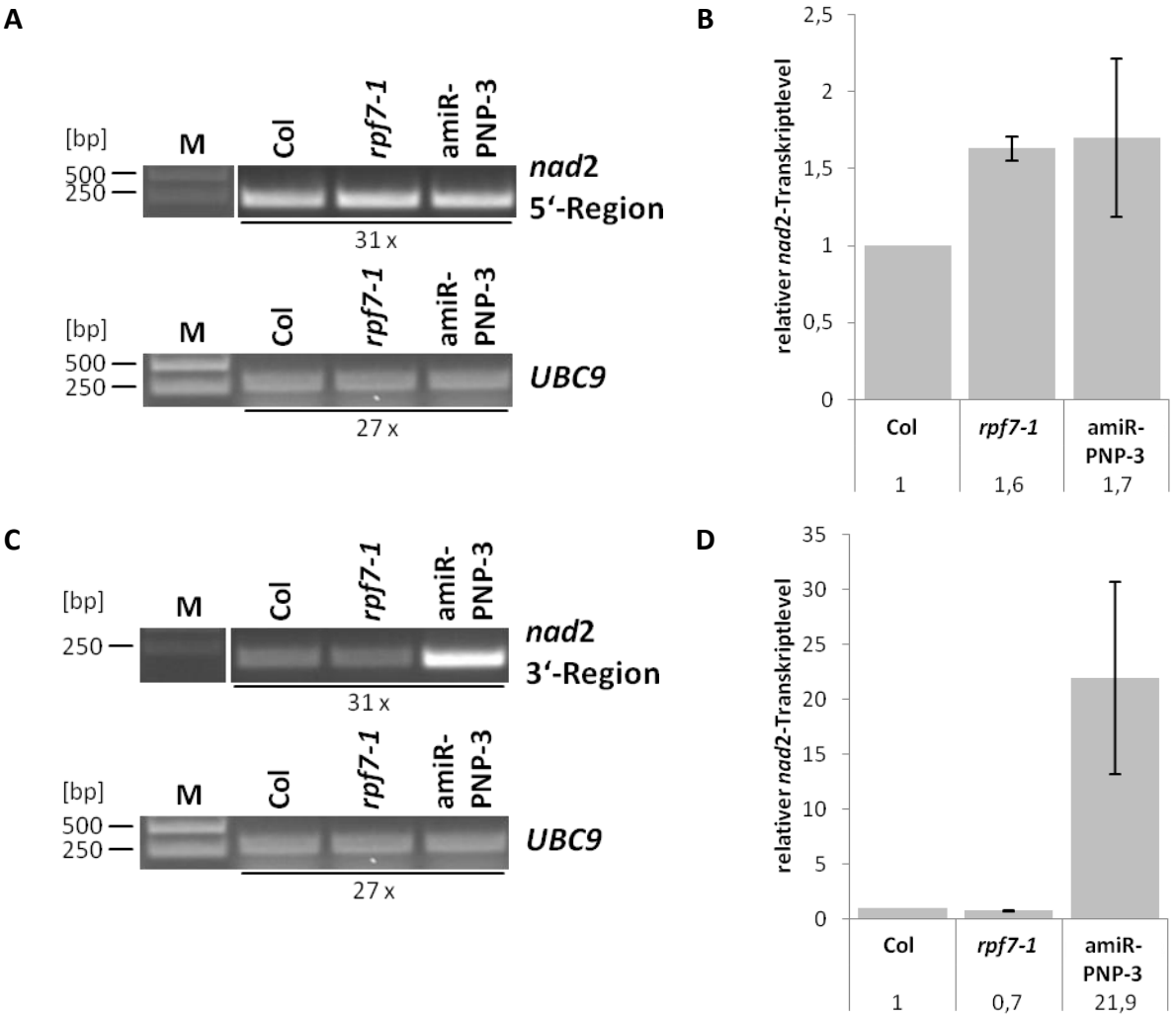


Abbildung 17: RT-PCR (A, C) und *Real-Time* qRT-PCR (B, D) auf *nad*2-Transkripte. **(A)** RT-PCR auf einen Sequenzabschnitt stromaufwärts des reifen 5'-Endes der *nad*2-mRNA. Mit dem Primerpaar Atnad2ab-9/Atnad2ab-14 wird ein ≈230 bp großes DNA-Fragment generiert (P1 + P4, Abbildung 6). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7 und Abbildung 12. **(B)** Als Primer wurden Atnad2ab-16/Atnad2ab-15 verwendet (P2 + P3, Abbildung 6), wobei ein 61 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wird. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 15B. **(C)** RT-PCR auf einen Bereich stromabwärts des reifen 3'-Endes der *nad*2-mRNA, wobei mit dem Primerpaar Atnad2cde-5/Atnad2cde-6 ein ≈235 bp großes PCR-Produkt erhalten wird (P17 + P19, Abbildung 6). Weitere Erläuterungen siehe (A). **(D)** Hier wurde das Primerpaar Atnad2cde-7/Atnad2cde-6 verwendet (P18 + P19, Abbildung 6). Das generierte PCR-Produkt weist eine Größe von 72 bp auf. Weitere Erläuterungen siehe (B). B + D: Erstveröffentlichung in Stoll et al [2014].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es bei Abwesenheit eines intakten *RPF7*(Col)-Allels zu einer Verringerung von reifen *nad*2-Transkripten kommt. Dem gegenüber sind jedoch 5'-verlängerte Moleküle angereichert, was auf die Beteiligung von RPF7 an der 5'-Prozessierung von *nad*2-mRNAs hinweist. Auch bei amiR-PNP-3 kommt es zu einer Anhäufung von 5'-verlängerten Molekülen. Die hier beschriebenen Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass 5'-verlängerte Transkripte normalerweise elimiert werden und die PNPase dabei ein entscheidender Faktor ist. Darüber hinaus werden bei amiR-PNP-3 3'-verlängerte

*nad*2-mRNAs sehr stark angereichert, dies unterstreicht die wichtige Rolle der PNPase bei der 3‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte.

3.1.5. Untersuchung der *RPF7*-Allele in den *A.thaliana* Ökotypen Can-0 und Chat-1

Die bisher beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass Can-0, Chat-1 und *rpf7-1* das gleiche, im Vergleich zu Col veränderte, *nad*2-Transkriptmuster zeigen (Abbildung 14). Der Grund dafür ist bei *rpf7-1* der durch die T-DNA-Insertion bedingte komplette *Knockout* von *RPF7* (Abbildung 12). Um die Ursache des veränderten *nad*2-mRNA-Phänotyps in Can-0 und Chat-1 zu ermitteln, wurden die entsprechenden *RPF7*-Allele untersucht.

Eine RT-PCR auf *RPF7* liefert in Col und Can-0 ein PCR-Produkt mit ähnlicher Intensität, somit ist davon auszugehen, dass sich der *RPF7*-Transkriptlevel in diesen Ökotypen nicht signifikant voneinander unterscheidet (Abbildung 18).

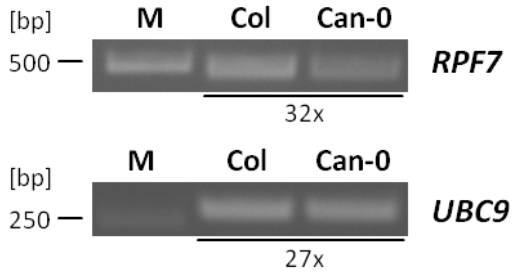


Abbildung 18: RT-PCR auf *RPF7* in Can-0. Erläuterungen siehe Abbildung 7 und Abbildung 12.

Zusätzlich wurden die Sequenzen von *RPF7*(Can-0), *RPF7*(Chat-1) und *RPF7*(Col) miteinander verglichen (Abbildung 19A). Die entsprechenden Allele von *RPF7* in Can-0 und Chat-1 wurden mit dem Primerpaar At2g28050_kompl.H2/At2g28050_kompl.R amplifiziert (P7-1 + P7-9, Abbildung 10). Das resultierende PCR-Produkt bei Can-0 weist gemäß gelelektrophoretischer Auftrennung die gleiche Größe wie bei Col (≈2150 bp) auf (Daten nicht gezeigt) und wurde mit den Primern At2g28050.A, At2g28050.B, At2g28050.C und At2g28050.D (P7-3, P7-5, P7-7 + P7-6, Abbildung 10) sequenziert (Anhang 3A). *RPF7*(Can-0) ist wie das entsprechende Allel aus Col 1389 nt lang. Beim Vergleich mit der Col-Sequenz (NC_003071) können vier Nukleotidaustausche identifiziert werden: 11939474 $A_{(Col)}$ → $C_{(Can-0)}$, 11939453 $T_{(Col)}$ → $C_{(Can-0)}$, 11939125 $T_{(Col)}$ → $C_{(Can-0)}$, 11938524 $T_{(Col)}$ → $A_{(Can-0)}$ (Positionen bezüglich NC_003071). Diese Unterschiede werden auch von Gan et al. [2011] beschrieben. Zwei dieser Nukleotid-austausche bedingen eine Veränderung in der Kodierung der Aminosäuren (AS). Zum einen an Position 60: Lysin (Col) → Asparagin (Can-0) und zum anderen an Position 177: Arginin

(Col) → Cystein (Can-0). Darüber hinaus bewirkt der Nukleotidaustausch 11938524 $T_{(Col)}$ → $A_{(Can-0)}$ einen Abbruch der AS-Sequenz, da ein Stoppkodon generiert wird. Dies hat zur Folge, dass RPF7(Can-0) eine Größe von 376 AS aufweist und somit 86 AS kleiner als RPF7(Col) ist. RPF7(Can-0) besitzt folglich nur sieben PPR-Motive, wobei das letzte auf Grund des Stoppkodons am C-Terminus verkürzt ist ($P_{6'}$, Abbildung 19B).

Das entsprechende PCR-Produkt bei Chat-1 ist gemäß der gelelektrophoretischen Auftrennung im Vergleich zu Col eindeutig kleiner (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzierung mit den Primern At2g28050_kompl.H2 und At2g28050_kompl.R bestätigt diese Beobachtung, wobei das *RPF7*(Chat-1)-Allel 1029 nt lang ist und hier somit im Vergleich zu *RPF7*(Col) eine Deletion von 360 nt vorliegt (Anhang 3B). Die ersten 780 nt sowie die letzten 221 nt der Sequenz von *RPF7*(Chat-1) sind übereinstimmend mit *RPF7*(Col) (11939653-11938874 bzw. 11938485-11938265 bezüglich NC_003071). Die restlichen 28 nt zwischen diesen zwei konservierten Bereichen sind identisch zu einer Nukleotidabfolge im 780 nt langen Sequenzabschnitt (11938938-11938907 bezüglich NC_003071). Die hier ermittelte Sequenz von *RPF7*(Chat-1) widerspricht den im Rahmen des „1001 Genomes Project“ generierten Daten (http://1001genomes.org). Gemäß diesen Daten existieren lediglich einige Nukleotidaustausche direkt am Anfang bzw. am Ende der identifizierten Deletion (http://1001genomes.org/data/Salk/releases/current/TAIR10/strains/Chat-1). Entsprechend der ermittelten Nukleotidsequenz ist RPF7(Chat-1) 342 AS groß (Deletion von 120 AS im Vergleich zu RPF7(Col)), wobei die ersten 260 und die letzten 69 AS denen in RPF7(Col) entsprechen. Die Deletion in RPF7(Chat-1) hat zur Folge, dass hier lediglich drei vollständige PPR-Motive (P_1, P_2 + S, Abbildung 19) und zwei verkürzte vorliegen ($P_{3'}$ + $P_{7''}$, Abbildung 19).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion bei *RPF7*(Chat-1) vermutlich ähnlich wie die T-DNA-Insertion bei *rpf7-1* einen kompletten Ausfall des Gens verursacht. Can-0 zeigt bezüglich des *nad*2-mRNA-Phäntyps das gleiche Muster wie Chat-1 und *rpf7-1*. Dies deutet ebenfalls auf ein nicht-funktionales RPF7-Protein hin. RPF7(Can-0) scheint auf Grund des Stoppkodons im vorletzten PPR-Motiv nicht-funktional zu sein. Somit kann geschlossen werden, dass die zwei letzten PPR-Motiven bzw. die letzten 86 AS essentiell für die Funktion von RPF7(Col) sind.

A

```
Col       1   MTPQCFLKTLKTAKQTYTFSIYKLLLNSSSINQTLASPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIK  60
Can-0     1   MTPQCFLKTLKTAKQTYTFSIYKLLLNSSSINQTLASPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIN  60
Chat-1    1   MTPQCFLKTLKTAKQTYTFSIYKLLLNSSSINQTLASPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIK  60
              ************************************************************:

Col      61   SWKCISLFNFILENPSLFSFQPDLRTHLSLTFRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
Can-0    61   SWKCISLFNFILENPSLFSFQPDLRTHLSLTFRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
Chat-1   61   SWKCISLFNFILENPSLFSFQPDLRTHLSLTFRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
              ************************************************************
                            |PPR1-------------------------------||PPR2---
Col     121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRFFNSMIMVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTCTLH  180
Can-0   121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRFFNSMIMVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTRTLH  180
Chat-1  121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRFFNSMIMVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTCTLH  180
              ************************************************************ ***
              -------------------------|  |PPR3-------------------------|
Col     181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVTVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
Can-0   181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVTVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
Chat-1  181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVTVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
              ************************************************************
                  |PPR4-------------------------------||PPR5---------------
Col     241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWDFEELDLVLKLMEKESVMLDLDSYKVLIDGFTSYGKVEEA  300
Can-0   241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWDFEELDLVLKLMEKESVMLDLDSYKVLIDGFTSYGKVEEA  300
Chat-1  241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWLKGLRLILLRTLS--------------------------  273
              ********************      ::*: :.
              -------------||PPR6-----------------------------||PPR7------
Col     301   ERLVLMMHDKKLRVESYLYNLIMNGYSRFGLVEKVIELYSEMSSRGVTPNKDTYWVLMNG  360
Can-0   301   ERLVLMMHDKKLRVESYLYNLIMNGYSRFGLVEKVIELYSEMSSRGVTPNKDTYWVLMNG  360
Chat-1        ------------------------------------------------------------

              ------------------------||PPR8------------------------------|
Col     361   LCKAGKVCEAMSFLNELRVNEFEIDEEMYSTLSEECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  420
Can-0   361   LCKAGKVCEAMSFLNE*RVNEFEIDEEMYSTLSEECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  420
Chat-1  274   ----------------------------------EECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  300
                                                ****************************

Col     421   ATICERLADSLFEVNRKEAQMLITIVVKCGIKPKSCSQYGLK-                    462
Can-0   421   ATICERLADSLFEVNRKEAQMLITIVVKCGIKPKSCSQYGLK-                    462
Chat-1  301   ATICERLADSLFEVNRKEAQMLITIVVKCGIKPKSCSQYGLK-                    342
              ******************************************
```

B

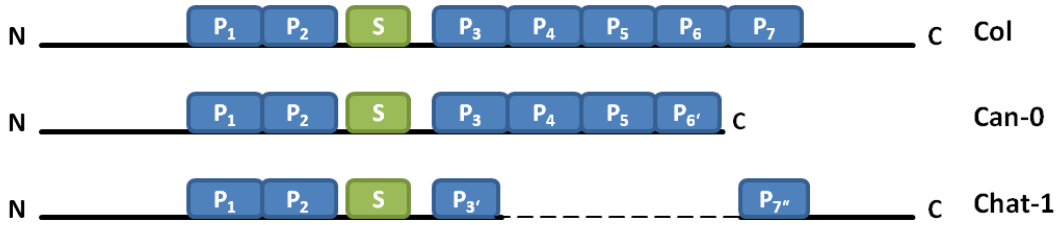


Abbildung 19: Vergleich von RPF7(Col), RPF7(Can-0) und RPF7(Chat-1). **(A)** Vergleich der AS-Sequenz von RPF7, wobei die Daten für RPF7(Can-0) und RPF7(Chat-1) eigenen Sequenzierergebnissen entstammen (Anhang 3). Die AS sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die grünen Zahlen am Rand entsprechen den Positionen der AS im jeweiligen Protein. Die Symbole unterhalb der Sequenzen geben Auskunft über die Ähnlichkeit der AS an den einzelnen Positionen („*“ = AS identisch; „:“ = AS ähnlich; „.“ = AS weniger ähnlich; „“ = AS verschieden). Unterschiedliche AS im Vergleich zu RPF7(Col) sind rot geschrieben. RPF7(Can-0) weist an Position 377 ein Stoppkodon auf (markiert durch einen roten „*****“). Fehlende AS bei RPF7(Can-0) und RPF7(Chat-1) im Vergleich zu RPF7(Col) sind durch „-“ symbolisiert. Oberhalb der Sequenzen ist die Lage der PPR-Motive gemäß Lurin et al. [2004] angegeben, wobei Anfang und Ende durch ein „|“ markiert sind. Wichtige Positionen (3, 6 und 1‘) innerhalb der PPR-Motive sind in blau geschrieben [Barkan et al. 2012; Yagi et al. 2013]. **(B)** Struktur von RPF7 in Col, Can-0 und Chat-1. Die PPR-Motive sind durch Rechtecke symbolisiert. In blau sind P-Motive ($P_{1\text{-}7}$) und in grün ist ein S-Motiv (S) dargestellt. $P_{6'}$ bei Can-0 und $P_{3'}$ bei Chat-1 sind am N-, $P_{7''}$ bei Chat-1 ist am C-Terminus verkürzt. Die gestrichelte Linie bei RPF7(Chat-1) entspricht einer Deletion von 120 AS im Vergleich zu RPF7(Col). Erstveröffentlichung in Stoll et al. [2014].

Bei der Analyse der RPF7-Sequenz in weiteren *A.thaliana* Ökotypen mit Hilfe der durch das „1001 Genomes Project“ verfügbaren Daten, wurden bei Sf-2, Sg-1 und Wei-0 einzelne AS-

Austausche innerhalb der letzten 86 AS in Bezug auf RPF7(Col) identifiziert. So tritt bei Sf-2 und Wei-0 jeweils innerhalb des letzten PPR-Motivs ein AS-Austausch auf, wobei bei RPF7(Sf-2) die AS an Position 2 von P_7 (Position 386: Glutamat (Col) → Lysin (Sf-2), Anhang 4) und bei Wei-0 diejenige an Position 6 (Position 390: Serin (Col) → Threonin (Wei-0), Anhang 4) betroffen ist. Sg-1 weist drei Veränderungen nach PPR-Motiv P_7 auf. Zwei davon resultieren in einem AS-Austausch (Position 442: Leucin (Col) → Methionin (Sg-1), Position 456: Cystein (Col) → Valin (Sg-1), Anhang 4). Darüber hinaus ist RPF7(Sg-1) sechs AS kürzer als RPF7(Col), da nach Position 456 ein Stoppkodon kodiert ist. In der CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte zeigen die drei Ökotypen Sf-2, Sg-1 und Wei-0 den Col-spezifischen *nad*2-mRNA-Phänotyp (Abbildung 20). Somit ist davon auszugehen, dass die oben beschriebenen Veränderungen in der AS-Sequenz von RPF7 keine negativen Auswirkungen auf die Funktion dieses Proteins haben.

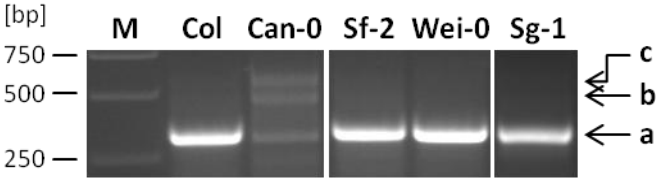


Abbildung 20: CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*2-Transkripte in Sf-2, Sg-1 und Wei-0. Erläuterungen siehe Abbildung 7.

3.1.6. Analyse der Interaktion von RPF7 mit *nad*2-Transkripten *in vitro*

Die bisher beschriebenen Daten lassen vermuten, dass RPF7 in irgendeiner Art und Weise mit der *nad*2-mRNA interagiert. Um diese Hypothese mit *in vitro*-Analysen (*Electro-Mobility-Shift-Assay*, EMSA) zu untermauern, wurde zunächst RPF7 rekombinant erzeugt. Zusätzlich wurden künstliche *nad*2-Transkripte generiert.

3.1.6.1. Überexpression und His-Tag-Aufreinigung des rekombinanten Proteins rRPF7$^{\Delta N117}$

Mittels des TargetP 1.1 Server konnte keine eindeutige mitochondriale Lokalisationssequenz im N-terminalen Teil von RPF7 identifiziert werden. Auf Grund dessen wurde das rekombinante RPF7-Protein so konstruiert, dass die ersten 117 AS des nativen RPF7 deletiert sind. So sollte gewährleistet sein, dass das rekombinante Protein (rRPF7$^{\Delta N117}$) nicht mehr die N-terminale Lokalisationssequenz aufweist.

Zunächst wurde unter Verwendung der Primer At2g28050UEx.H1 und At2g28050UEx.R ein ≈1060 bp DNA-Fragment generiert (P7-2 + P7-8, Abbildung 10). At2g28050UEx.H1 bindet innerhalb des Leserasters von RPF7 und At2g28050UEx.R am Ende des Leserasters, wobei

der Primer auch das Stoppkodon abdeckt. Nach einem Restriktionsverdau mit *BamH*I und *Sal*I, wurde das DNA-Fragment in den Vektor pET32a kloniert (Anhang 1C). Für die daraufhin folgende Sequenzanalyse kamen die Primer T7prom und T7term zum Einsatz. Diese Primer sind komplementär zu Abschnitten außerhalb der *Multiple Cloning Site* von pET32a. T7prom bindet stromaufwärts der *BamH*I- und T7term stromabwärts der *Sal*I-Schnittstelle.

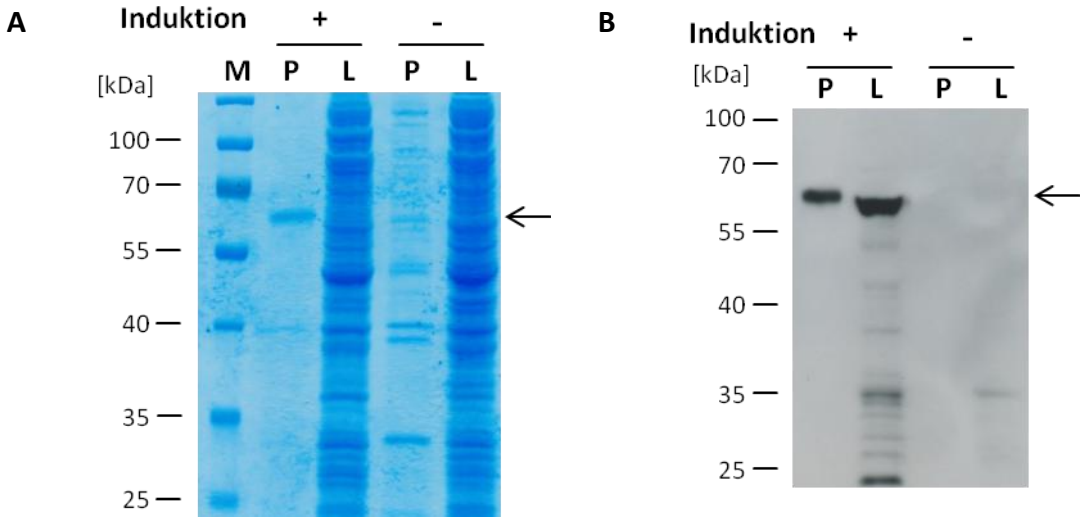


Abbildung 21: Überexpression von rRPF7$^{\Delta N117}$ in *E.coli* BL21-AI^{TM}. Die Überexpression erfolgte bei 30 °C für 4 h. Neben Proben der Überexpressionskultur (+) wurden auch solche einer parallel kultivierten, nicht mit IPTG und Arabinose induzierten Kultur (-) aufgetragen. Die Größen des eingesetzten Größenstandards sind in kDa jeweils am linken Rand angegeben. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich im Pellet (A) bzw. zusätzlich im Lysat (B) an. **(A)** Coomassie-Färbung. Von den Lysaten (L) wurden jeweils 30 µg Protein, vom aufgekochten Pellet (P) 5 µl geladen. **(B)** Immunodetektion. Von den Lysaten (L) wurden jeweils 100 µg Protein, vom aufgekochten Pellet (P) 5 µl geladen. Die Detektion erfolgte mit dem His-Tag® Antibody HRP Conjugate. kDa: Kilodalton; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Die Überexpression von rRPF7$^{\Delta N117}$ erfolgte für 4 h bei 30 °C. Als Kontrolle wurde eine uninduzierte Kultur (keine Zugabe von Arabinose und IPTG zur Induktion der Proteinexpression) parallel kultiviert. Das apparente Molekulargewicht von rRPF7$^{\Delta N117}$ beträgt 63,4 Kilodalton (kDa), wobei 19,1 kDa auf die vorhanden Tags (His-, S- und Trx-Tag) am N-Terminus des rekombinanten Proteins zurückzuführen sind. Auf dem mit Coomassie angefärbten SDS-Gel tritt in der unlöslichen Fraktion („Pellet“) eine Bande zwischen 55 und 70 kDa auf, die vermutlich rRPF7$^{\Delta N117}$ repräsentiert („←“, Abbildung 21A). Im Gegensatz dazu ist in der löslichen Fraktion („Lysat“) keine entsprechende Bande vorhanden (Abbildung 21A). Die erhaltenen Signale bei der Immunodetektion mit einem Antikörper gegen den His-Tag weisen dagegen darauf hin, dass rRPF7$^{\Delta N117}$ auch in der löslichen Fraktion vorliegt. So tritt neben einem Signal im Pellet auch beim Lysat ein starkes Signal zwischen den 55 und 70 kDa Markerbanden auf („←“, Abbildung 21B). Diese Signale repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit rRPF7$^{\Delta N117}$.

Allerdings ist anzumerken, dass bei der löslichen Fraktion neben dem rRPF7$^{\Delta N117}$-spezifischen Signal noch weitere kleinere Proteine detektiert werden.

Mit Hilfe des am N-Terminus von rRPF7$^{\Delta N117}$ vorhandenen His-Tags wurde das rekombinante Protein aufgereinigt (Vorgehen siehe Abschnitt 2.3.4.4.). Erwartungsgemäß kann nach der Coomassie-Färbung in den Eluaten 1-3 eine Anreicherung der etwa 60 kDa großen Bande im Vergleich zum Lysat beobachtet werden („←“, Abbildung 22A). Allerdings sind auch noch zahlreiche weitere Proteinbanden verschiedener Größen in beträchtlichem Maße vorhanden. Im Gegensatz dazu zeigen die Eluate 1-3 bei der His-Tag-Detektion lediglich eine klare Bande zwischen den 55 und 70 kDa Markerbanden („←“, Abbildung 23). Im Vergleich dazu treten sowohl beim Lysat als auch beim Pellet zusätzliche kleinere Proteine auf, die vermutlich durch die His-Tag-Aufreinigung elimiert werden konnten (Abbildung 23).

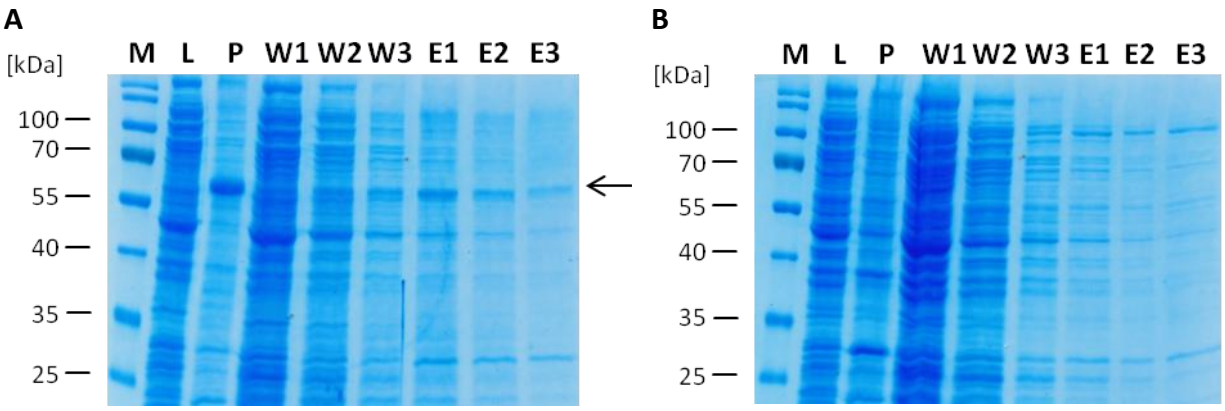


Abbildung 22: Coomassie-Färbung nach His-Tag-Aufreinigung von rRPF7$^{\Delta N117}$. **(A)** His-Tag-Aufreinigung nach Induktion mit IPTG und Arabinose. Vom Lysat (L) wurden 30 µg Protein geladen. Von den Wasch- und Elutionsschritten (W1-W3, E1-E3) wurden jeweils 22,5 µl aufgetragen, wobei dies bei E1 14 µg Protein entspricht. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich in den Eluaten an. **(B)** His-Tag-Aufreinigung einer nicht mit IPTG und Arabinose induzierten Kontrollprobe. Vom Lysat wurden 30 µg und vom Eluat 1 10,5 µg Protein geladen. Ansonsten analog zu (A). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 21A.

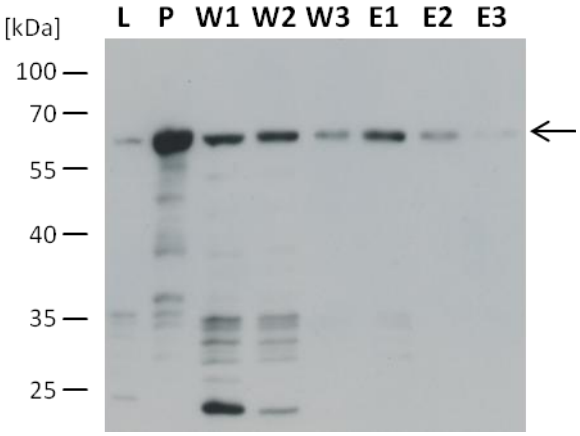


Abbildung 23: Immunodetektion nach His-Tag-Aufreinigung von rRPF7$^{\Delta N117}$. Vom Lysat (L) wurden 45 µg Protein geladen. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 21B und Abbildung 22A.

Bei einer analog durchgeführten Immunodetektion mit der uninduzierten Probe treten keine Signale auf (Daten nicht gezeigt). Allerdings weist ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel auf eine spezifische Anreicherung einer Proteinbande von etwa 100 kDa hin (Abbildung 22B). Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Histidin-reiches *E.coli*-Protein.

Um für *in vitro*-Bindungsanalysen eventuell störende kleinere Proteine zu beseitigen, wurden die nach der His-Tag-Aufreinigung erhaltenen Eluate vereinigt und unter Verwendung von Amicon Ultra - 4 Ultracel 50k aufkonzentriert. Dies sollte theoretisch dazu führen, dass sich im Filtrat Proteine mit einer molaren Masse >50 kDa anreichern. Die durchgeführte Immunodetektion weist zwar auf eine Anreicherung der Proteinbande zwischen 55 und 70 kDa hin („←“ Abbildung 24), jedoch tritt eine zusätzliche Bande bei etwa 40 kDa auf.

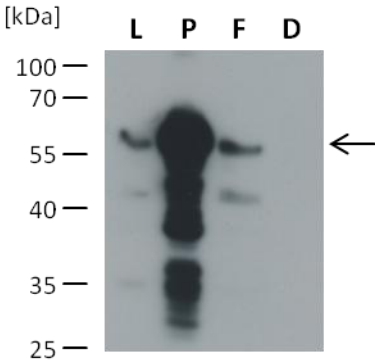


Abbildung 24: Immunodetektion mit nach der His-Tag-Aufreinigung aufkonzentriertem rRPF7$^{\Delta N117}$. Vom Lysat (L) wurden 37,5 µg Protein aufgetragen. Nach der Aufkonzentrierung der Eluate 1-3 mit Amicon Ultra - 4 Ultracel 50k wurden vom Filtrat 7 µg Protein (F) sowie 7,5 µl des Durchflusses (D) geladen. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich im Filtrat an. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 21B.

3.1.6.2. Erzeugung von *nad*2-Transkripten für die *in vitro*-Bindungsanalysen

Wie bereits im Abschnitt 1.2. erwähnt, kann unter Verwendung eines kombinatorischen Codes die Bindung eines PPR-Proteins an eine spezifische Nukleotidabfolge eines RNA-Moleküls vorhergesagt werden [Barkan et al. 2012; Yagi et al. 2013]. Auf diese Weise konnten für RPF1, 2, 3, 5 und 6 Bindungsstellen prognostiziert werden. Letztere sind 11-14 nt lang und liegen stromaufwärts des jeweiligen reifen 5‘-Endes, wobei der Abstand zwischen dem 3‘-terminalen Nukleotid der Bindungsstelle und dem reifen 5‘-Ende zwischen 29 und 121 nt beträgt [Binder et al. 2013; Stoll et al. 2015]. Eine entsprechende Vorhersage für die Bindungsstelle von RPF7 ist nicht möglich. Dies liegt vermutlich daran, dass hier nur acht PPR-Motive vorhanden sind. Theoretisch können somit lediglich sieben Nukleotide definiert werden, was für eine spezifische Bindung wahrscheinlich nicht ausreicht. Trotz der fehlenden Vorhersage der Bindungsstelle, wurde versucht, eine Interaktion von RPF7 mit der *nad*2-mRNA *in vitro* nachzuweisen.

Für die Protein-RNA-Bindungsanalysen wurden drei Transkripte generiert. Transkript 1 umfasst einen 56 nt großen Bereich stromaufwärts und Transkript 3 einen 61 nt großen Bereich stromabwärts des 5‘-Endes bei -122 der reifen *nad*2-mRNA. Transkripts 2 deckt die Sequenzabschnitte der zwei anderen Transkripte ab, wobei die Position -122 beinhaltet ist (Abbildung 25). Die verwendeten Primer, die Länge der generierten PCR-Produkte sowie die Größe der daraus resultierenden Transkripte können Tabelle 13 entnommen werden.

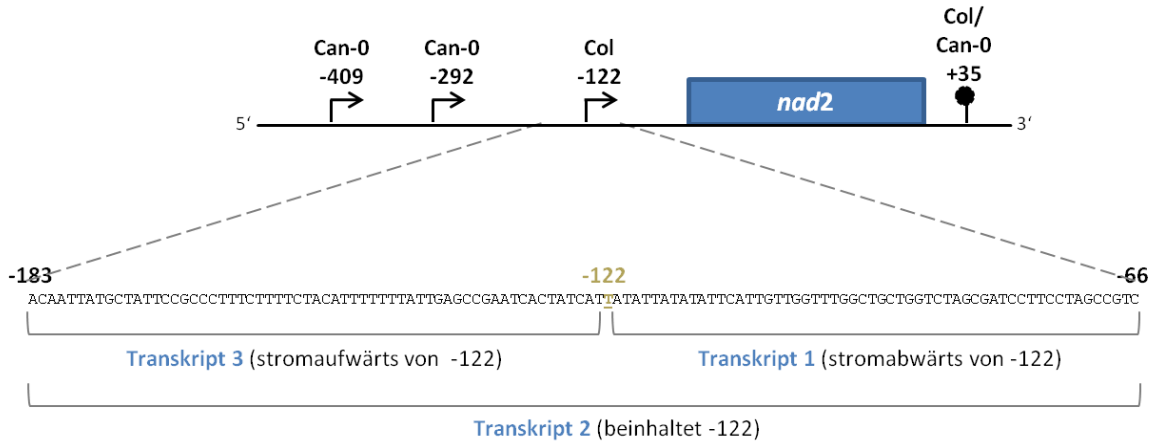


Abbildung 25: Transkripte für RNA-Protein-Bindungsanalysen. Der vergrößerte Sequenzausschnitt gibt die Lage der Transkripte 1-3 an. Transkript 1 umfasst den Bereich -66 bis -121 stromabwärts des Start-ATG (NATG, N = -1), Transkript 2 den Bereich -66 bis -183 und Transkript 3 den Bereich -123 bis -183. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 6.

Tabelle 13: Generierung von Transkripten.

	Primer	Größe PCR-Produkt	Größe Transkript
Transkript 1	Atnad2-T7-2/Atnad2ab-12 (P9 + P10, Abbildung 6)	79 bp	56 nt
Transkript 2	Atnad2-T7-1/Atnad2ab-12 (P6 + P10, Abbildung 6)	141 bp	118 nt
Transkript 3	Atnad2-T7-1/Atnad2ab-6 (P6 + P8, Abbildung 6)	84 bp	61 nt

3.1.6.3. *in vitro*-Bindungsanalysen zwischen rRPF7$^{\Delta N117}$ und *nad*2-Transkripten

Unter Verwendung von rRPF7$^{\Delta N117}$ (Eluat 1, Abbildung 22A + Abbildung 23) und den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Transkripten wurden *in vitro* EMSA-Analysen durchgeführt. Als Kontrolle wurde zunächst Eluat 1 (His-Tag-Aufreinigung) einer Kultur, bei der die Proteinexpression nicht mit IPTG und Arabinose induziert wurde, verwendet (Eluat 1, Abbildung 22B).

Bei Einsatz von Transkript 1 (-66 bis -121 stromabwärts des Start-ATG (NATG, N = -1), Abbildung 25) kann in allen Ansätzen ein Protein-RNA-Komplex detektiert werden (K1, Abbildung 26A). Sowohl bei Verwendung von rRPF7$^{\Delta N117}$ als auch bei den Kontrollproben tritt dieses

Signal unabhängig von der eingesetzten Heparinkonzentration auf. Da die Heparinkonzentration scheinbar keinen Einfluss auf die Ausbildung des Protein-RNA-Komplexes hat, wurde diese im Weiteren konstant gehalten. Zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung von Transkript 1 bzw. zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen, wurde $tRNA^{Weizen}$ in aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt (Abbildung 26B). Dies hat zur Folge, dass der zuvor aufgetretene Protein-RNA-Komplex nicht mehr gebildet wird. Dem gegenüber tritt nun in allen Proben ein anderer Komplex auf (K2, Abbildung 26B). Ähnlich wie zuvor eine aufsteigende Heparinkonzentration die Bildung des Komplexes nicht beeinflusst, kann auch hier keine signifikante Veränderung bzw. kein Unterschied zwischen dem Einsatz von $rRPF7^{\Delta N117}$ und der Kontrolle bei verschiedenen Konzentrationen an $tRNA^{Weizen}$ festgestellt werden. Auf Grund der beschriebenen Beobachtungen muss davon ausgegangen werden, dass $rRPF7^{\Delta N117}$ Transkript 1 nicht (spezifisch) bindet bzw. mit diesem interagiert.

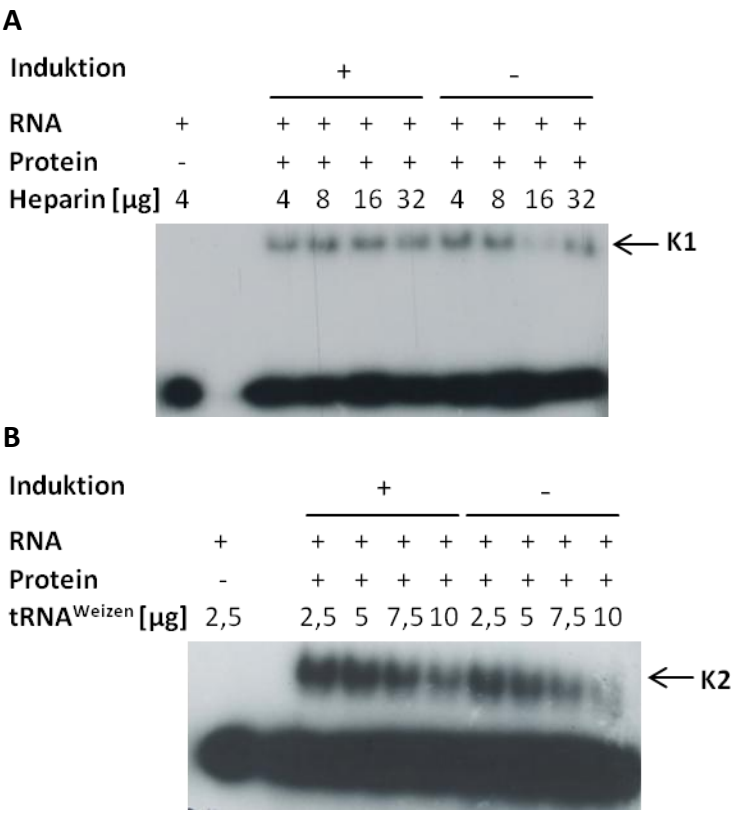


Abbildung 26: EMSA mit $rRPF7^{\Delta N117}$ und Transkript 1. Jeweils am rechten Rand sind auftretende Protein-RNA-Komplexe mit einem Pfeil markiert („K1“ und „K2“). **(A)** Bindungsreaktion mit aufsteigender Heparin-, konstanter Transkript- (0,12 ng) und Proteinmenge (0,6 µg). Die eingesetzten Proteine entstammen der Überexpression von $rRPF7^{\Delta N117}$ mit anschließender His-Tag-Aufreinigung (Induktion „+“) bzw. einer analog behandelten, nicht-induzierten Kultur (Induktion „-“) (Abbildung 22 + Abbildung 23). Die Bindungsreaktion wurde ohne $tRNA^{Weizen}$ durchgeführt. **(B)** Bindungsreaktion mit aufsteigenden Mengen an $tRNA^{Weizen}$, konstanter Heparin- (2 µg), Transkript- (1 ng) und Proteinmenge (1,8 µg). Die Eluate wurden nach der His-Tag-Aufreinigung mit Amicon Ultra - 4 Ultracel 50k aufkonzentriert (Abbildung 24), wobei neben Proben einer induzierten Kultur (Induktion „+“) auch solche einer nicht-induzierten Kultur (Induktion „-“) verwendet wurden.

Analog zur Vorgehensweise mit Transkript 1 wurden Bindungsanalysen mit Transkript 3 (-123 bis -183 stromabwärts des Start-ATG (NATG, N = -1), Abbildung 25) durchgeführt. Zunächst wurden unterschiedliche Heparinkonzentrationen eingesetzt. Dies hat zur Folge, dass bei allen Proben zwei Signale auf die Bildung von Protein-RNA-Komplexen hindeuten (K3 + K4, Abbildung 27A). Auffällig ist dabei, dass der kleinere Komplex (K3, Abbildung 27A) in den

Kontrollproben angereichert ist. Ähnlich wie bei Transkript 1 (Abbildung 26A) hat eine Erhöhung der Heparinkonzentration keinerlei Auswirkung auf die Ausbildung der Protein-RNA-Komplexe. Wie zuvor wurde auch hier versucht die unspezifischen Bindungen durch den Einsatz von $tRNA^{Weizen}$ zu unterdrücken. Jedoch kommt es wiederum in allen Ansätzen zur Bildung eines unspezifischen Komplexes (K6, Abbildung 27B), bei dem es sich gemäß der Laufstrecke vermutlich um einen von der Größe her mit Komplex 3 (Abbildung 27A) vergleichbaren Protein-RNA-Komplex handelt. Darüber hinaus kann in den Kontrollproben ein weiterer Protein-RNA-Komplex detektiert werden (K5, Abbildung 27B), der erneut unabhängig von der Konzentration an $tRNA^{Weizen}$ auftritt. Somit ist auch hier keine spezifische Interaktion zwischen $rRPF7^{\Delta N117}$ und Transkript 3 feststellbar.

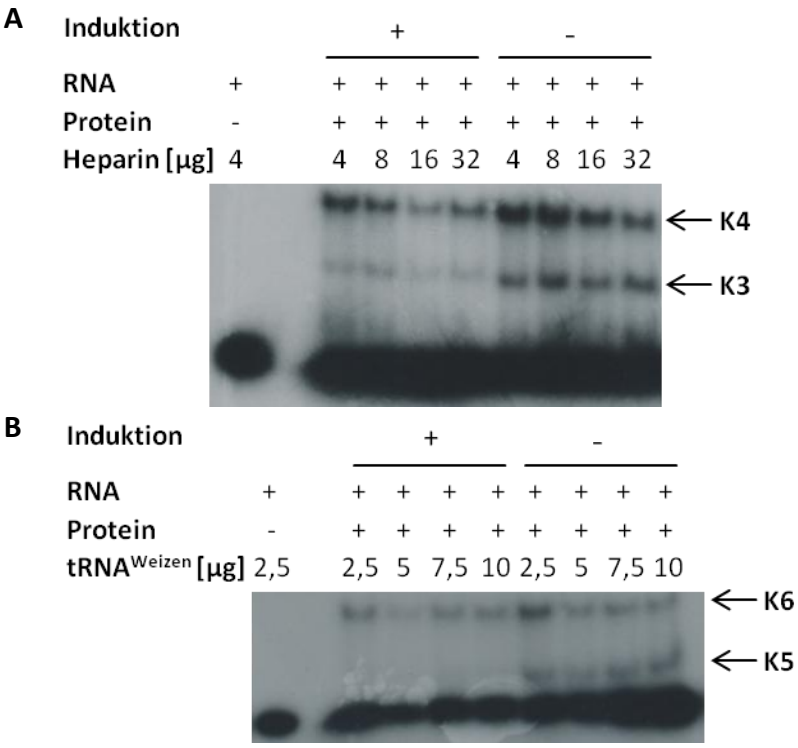


Abbildung 27: EMSA mit $rRPF7^{\Delta N117}$ und Transkript 3. Jeweils am rechten Rand sind auftretende Protein-RNA-Komplexe mit Pfeilen markiert („K3"-„K6"). **(A)** Erläuterungen siehe Abbildung 26A. **(B)** Bindungsreaktion mit aufsteigenden Mengen an $tRNA^{Weizen}$, konstanter Heparin- (1 µg), Transkript- (0,5 ng) und Proteinmenge (0,9 µg). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 26B.

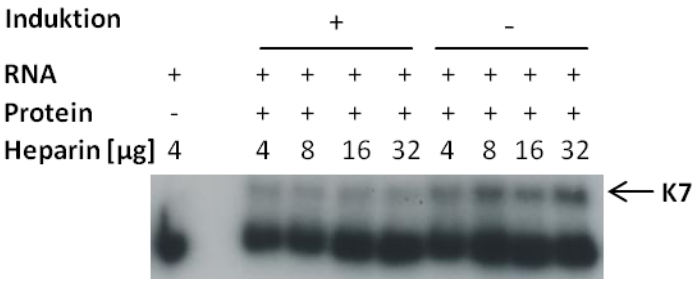


Abbildung 28: EMSA mit $rRPF7^{\Delta N117}$ und Transkript 2. Am rechten Rand ist ein auftretender Protein-RNA-Komplex mit einem Pfeil markiert („K7"). Die Bindungsreaktion wurde mit einer aufsteigenden Heparin-, konstanter Transkript- (0,5 ng) und Proteinmenge (0,6 µg) durchgeführt. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 26A.

Auch mit Transkript 2 (-66 bis -183 stromaufwärts des Start-ATG (NATG, N = -1), Abbildung 25) wird lediglich ein unspezifischer Protein-RNA-Komplex (K7, Abbildung 28), der unabhängig von der Heparinkonzentration auftritt, gebildet. Somit muss gefolgert werden, dass es unter den hier getesteten Bedingungen zu keiner spezifischen Wechselwirkung zwischen bzw. Bindung von Transkript 2 und rRPF7$^{\Delta N117}$ kommt.

Bei allen bisher gezeigten EMSA-Analysen wurden in den Kontrollproben und in den Ansätzen mit rRPF7$^{\Delta N117}$ die gleichen Protein-RNA-Komplexe ausgebildet. Da auch eine minimale Expression von rRPF7$^{\Delta N117}$ in der uninduzierten Kultur nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, wurde für die weiteren Bindungsanalysen eine andere Kontrolle eingesetzt. Die im Folgenden verwendeten Kontrollproben wurden von einer Kultur gewonnen, die den „leeren“ Vektor pET32a überexprimiert. Jedoch kommt es auch bei Einsatz der pET32a-Kontrolle sowohl mit Transkript 1 als auch mit Transkript 3 lediglich zur Ausbildung eines unspezifischen Protein-RNA-Komplexes (K8 + K9, Abbildung 29A + B). Der Vergleich der beiden Komplexe deutet an, dass es sich bei den jeweils detektierten Signalen um von der Größe her ähnliche Protein-RNA-Komplexe handelt.

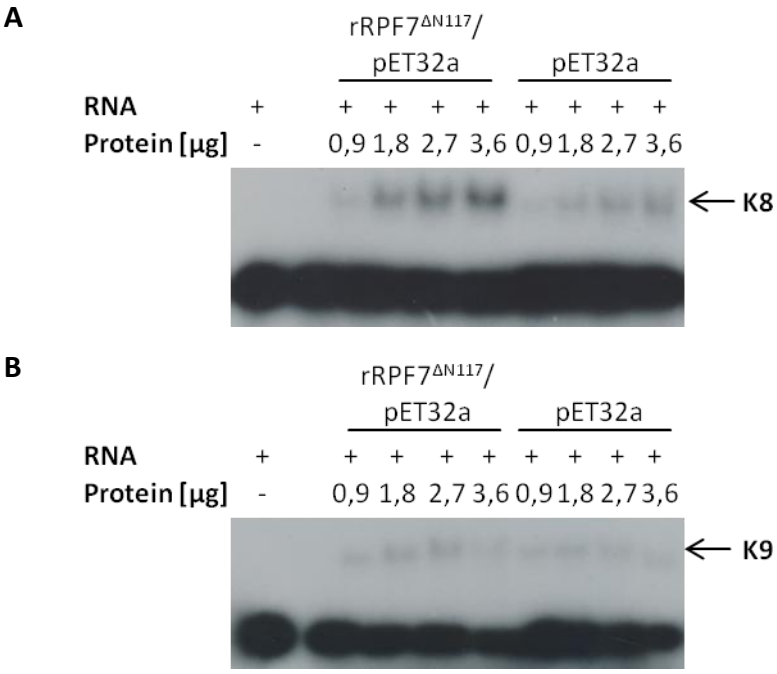


Abbildung 29: EMSA mit rRPF7$^{\Delta N117}$ und Transkript 1 (A) bzw. Transkript 3 (B). Jeweils am rechten Rand ist ein auftretender Protein-RNA-Komplex mit einem Pfeil markiert („K8“ + „K9“). Die Bindungsreaktion wurde mit einer konstanten Heparin- (1 µg), tRNA^{Weizen}- (1 µg) und Transkript- (12 ng) sowie einer aufsteigenden Proteinmenge durchgeführt. Als Kontrolle wurden Protein-Proben einer Kultur, die den „leeren“ Vektor pET32a überexprimiert, verwendet.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei keiner der gezeigten EMSA-Analysen eine spezifische Interaktion zwischen rRPF7$^{\Delta N117}$ und den verwendeten RNA-Molekülen auftritt.

3.2. Identifizierung von MITOCHONDRIAL NUCLEASE 1 und 2 in *A.thaliana*

Mit dem im vorherigen Kapitel beschriebenen RPF7 konnte ein Vertreter der an der 5‘-Prozessierung von mitochondrialen mRNAs beteiligten PPR-Proteine der P-Unterfamilie identifiziert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass selbst in Abwesenheit von RPF7 beträchtliche Mengen an *nad*2-Haupttranskript vorhanden sind. Dies weist auf die Beteiligung anderer Proteine bei der 5‘-Prozessierung hin. Einige Hinweise lassen die Gegenwart von Endonukleasen vermuten (Abbildung 2) [Binder et al. 2013]. Um diese Endonuklease(n) zu identifizieren, wurden *in silico*-Analysen (u.a. Coexpressions-Analysen mit *RPF*s, Vorhersage der subzellulären Lokalisation) durchgeführt. Zwei auf diese Weise identifizierte Gene (At5g09840.1, At5g64710.1) kodieren auf Grund vorhandener konservierter Domänen vermutlich für Endonukleasen oder Hydrolasen und wurden deshalb als die besten Kandidaten für die gesuchte Endonuklease erachtet (Abbildung 30). So weist die limkain_b1_N_like-Domäne Ähnlichkeiten zu einer entsprechenden Domäne bei zwei Gruppen von Nukleasen (PIN und FLAP/5‘→3‘ Exonukleasen) auf [Anantharaman and Aravind 2006]. Drei andere Domänen deuten auf eine Beteiligung im RNA-Metabolismus hin. Beispielsweise tritt die LOTUS-Domäne häufig in Proteinen des RNA-Metabolismus auf, dies wird mit einer möglichen Funktion bei der RNA-Bindung gedeutet [Callebaut and Mornon 2010]. Darüber hinaus wird postuliert, dass die OST-HTH-Domäne ebenfalls eine RNA-Bindungs-Domäne ist [Anantharaman et al. 2010].

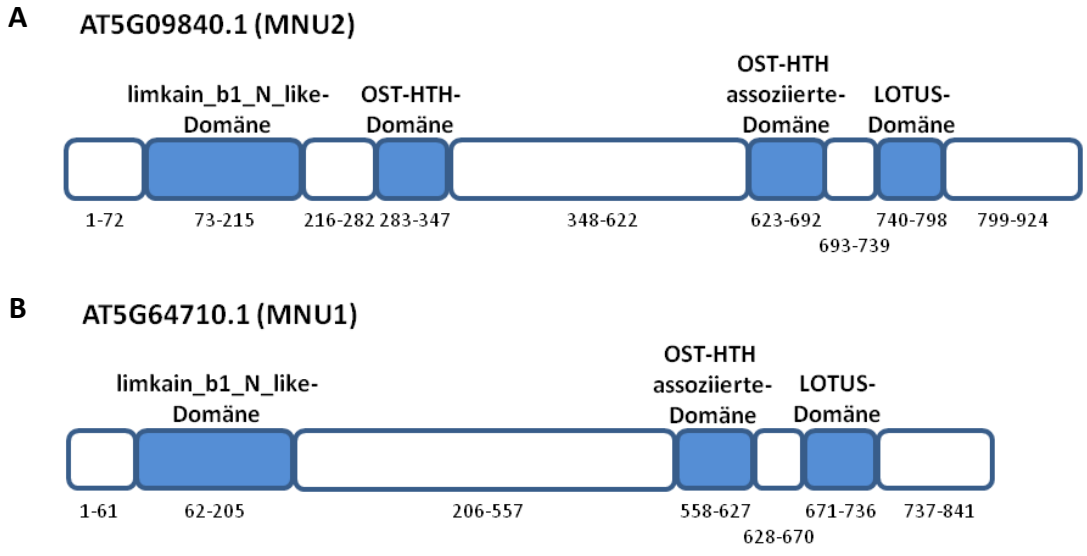


Abbildung 30: Schematische Struktur von AT5G09840.1 (A) und AT5G64710.1 (B) mit konservierten Domänen. Die blauen Boxen repräsentieren bekannte Domänen. Die Zahlen unterhalb entsprechen den AS-Positionen innerhalb des jeweiligen Proteins. Die Angabe bezüglich der Länge der Domänen entstammt www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AED91454.1 (AT5G09840.1) bzw. www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AED97941.1 (AT5G64710.1).

3.2.1. Subzelluläre Lokalisation von AT5G64710.1

Gemäß dem TargetP 1.1 Server entsprechen die ersten 50 AS von AT5G64710.1 der subzellulären Lokalisationssequenz, wobei die SUBA-Datenbank eine Lokalisation in den Mitochondrien angibt (www.suba3.plantenergy.uwa.edu.au). Unter Verwendung der Primer At5g64710.EGFP.2 und At5g64710.EGFP.3 (P2 + P4, Abbildung 32B) wurde ein die ersten 211 Nukleotide und ein Nukleotid stromaufwärts des Start-ATGs umfassendes DNA-Fragment amplifiziert (entspricht den ersten 70 AS von AT5G64710.1). Mittels der Restriktionsschnittstellen *Sac*I/*Sal*I wurde das DNA-Fragment in den Vektor pSAT6-EGFP-N1 kloniert [Tzfira et al. 2005] (Anhang 1B) und die Sequenz durch eine Sequenzierung mit dem Primer CFPseq (bindet innerhalb der EGFP-Sequenz) überprüft. Das Konstrukt wurde transient in Tabakprotoplasten transformiert. Der hierfür verwendete transgene Tabak (*N.tabacum*) exprimiert stabil ein Fusionsprotein zwischen der N-terminalen Lokalisationssequenz der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase und dem Rot-fluoreszierenden-Protein der Seeanemone *Entacmaea quadricolor*. Dieses Fusionsprotein wurde als mitochondrialer Marker etabliert [Forner and Binder 2007].

Die Protoplasten wurden am Leica Fluoreszenz-Mikroskop DM 5500B betrachtet. Die Auswertung erfolgte mit der *Software* Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite.

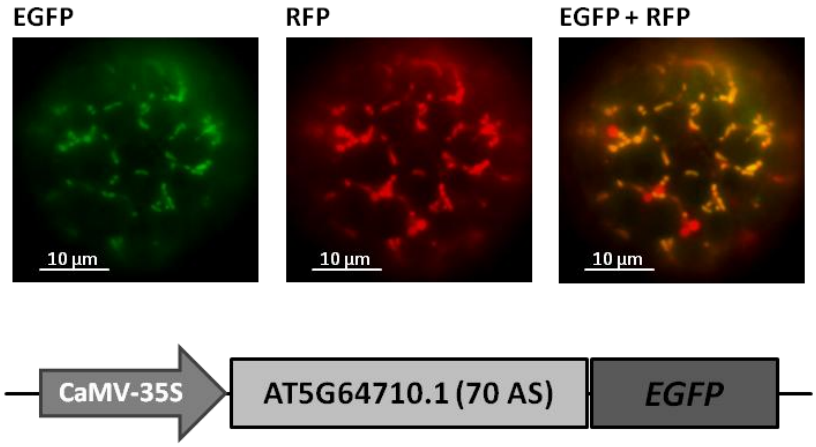


Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisation von AT5G64710.1-N_{Term}:EGFP. Die ersten 70 AS von AT5G64710.1 (mitochondriale Lokalisationssequenz) sind am C-Terminus mit EGFP fusioniert. Dieses Fusionsprotein wird transient in Tabakprotoplasten unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors (CaMV-35S) exprimiert (Anhang 1B). Die Fluoreszenz von EGFP (links) sowie die von RFP (Mitte) werden durch verschiedene Filter visualisiert. Bei Überlagerung der beiden Bilder erscheinen kolokalisierte Strukturen gelb (rechts). Kleine Unterschiede bzw. Unschärfen bei der Überlagerung sind mit der schnellen Bewegung der Mitochondrien in den Protoplasten zu erklären. Der jeweils eingefügte weiße Balken entspricht einer Länge von 10 µm.

Die Mitochondrien der präparierten Tabakprotoplasten erscheinen unter Verwendung eines RFP-Filters rot. Im Gegensatz dazu sind alle Strukturen, die das Fusionsprotein AT5G64710.1-

N_{Term}:EGFP enthalten, mit einem GFP-Filter grün. Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt, dass jeweils die gleichen Strukturen leuchten (Abbildung 31 rechts). Somit ist davon auszugehen, dass das Fusionsprotein in die Mitochondrien der Tabakprotoplasten transportiert wurde. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass auch das native AT5G64710.1 *in vivo* in die Mitochondrien importiert wird.

3.2.2. Genotypisierung von *A.thaliana* T-DNA-Insertionslinien bezüglich At5g09840.1 (SAIL663D05) und At5g64710.1 (SALK071821, SALK094849)

Um erste Hinweise bezüglich der molekularen Funktion der Gene At5g09840.1 und At5g64710.1 zu erhalten, wurde nach geeigneten T-DNA-Insertionslinien gesucht. Gemäß den bei SIGNAL SALK zur Verfügung stehenden Daten wurden die Linien SAIL663D05, SALK071821 und SALK094849 ausgewählt. Die erste Mutante weist eine T-DNA-Insertion im Gen At5g09840.1 auf, die anderen zwei besitzen jeweils eine T-DNA-Insertion im Gen At5g64710.1 (Abbildung 32).

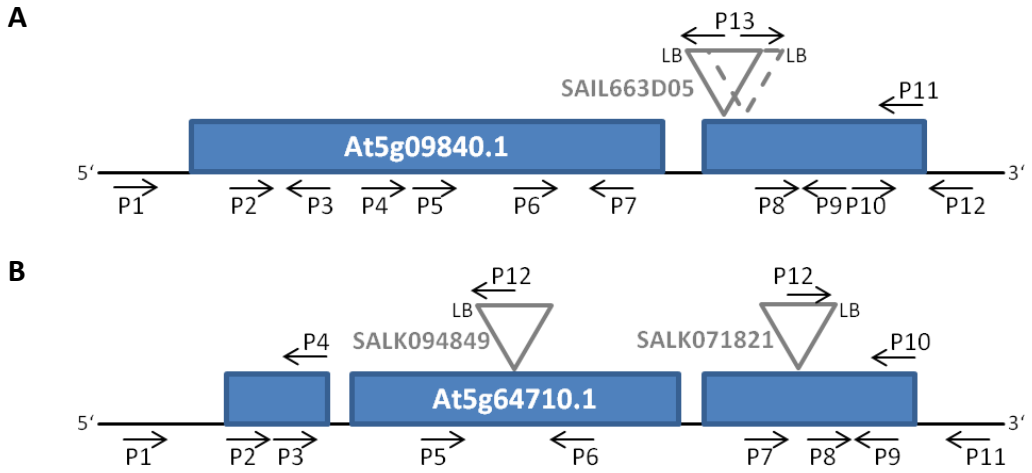


Abbildung 32: Schematische Genkarte von At5g09840.1 (A) und At5g64710.1 (B). Die blauen Boxen entsprechen den Exonsequenzen des Leserasters der Gene At5g09840.1 und At5g64710.1. Die Insertionsorte der T-DNA in den Linien SAIL663D05, SALK071821 und SALK094849 sind durch graue Dreiecke symbolisiert. Die Linie SAIL663D05 weist zwei fast unmittelbar neben einander lokalisierte T-DNA-Insertionen auf (zusätzlich grau-gestricheltes Dreieck). Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich der Gene At5g09840.1 und At5g64710.1 sind mit horizontalen Pfeilen dargestellt. **(A)** Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: At5g09840_kompl.H; P2: At5g09840.UEx.H; P3: At5g09840.EGFP.1; P4: At5g09840.G; P5: At5g09840.H; P6: At5g09840.A; P7: At5g09840.C; P8: At5g09840.I; P9: At5g09840.B; P10: At5g09840.E; P11: At5g09840.UEx.R; P12: At5g09840_ kompl.R; P13: SynLB4. **(B)** Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: At5g64710_kompl.H; P2: At5g64710.EGFP.2; P3: At5g64710.1.UEx.H; P4: At5g64710.EGFP.3; P5: At5g64710.A; P6: At5g64710.B; P7: At5g64710.E; P8: At5g64710.D; P9: At5g64710.C; P10: At5g64710.1.UEx.R; P11: At5g64710_kompl.R; P12: LB-XL. LB: *Left-Border*

Jeweils drei unabhängige Pflanzen der Linien SAIL663D05 bzw. SALK071821 und SALK094849 wurden auf das Vorhandensein einer T-DNA-Insertion im Gen At5g09840.1 bzw. At5g64710.1 getestet, wobei sich zeigt, dass die T-DNA-Insertion jeweils homozygot vorliegt

(Abbildung 33). Durch eine Sequenzierung (mit SynLB4 bei SAIL663D05 bzw. mit LB-XL bei SALK071821 und SALK094849) der jeweiligen PCR-Produkte der *Left-Border*-PCR wurden die exakten Insertionsorte ermittelt. Die Linie SAIL663D05 besitzt zwei T-DNA-Insertionen im Gen At5g09840.1. Die eine befindet sich an Position +2203 bezüglich des Translations-Startkodons (ATG; A = +1) mit der *Left-Border* Richtung 5‘-Ende (graues Dreieck, Abbildung 32A). Zur Ermittlung der genauen Lokalisation der zweiten T-DNA-Insertion wurde eine *Left-Border*-PCR mit dem Primerpaar At5g09840.B/SynLB4 (P9 + P13, Abbildung 32A) durchgeführt. Die Sequenzierung des ≈670 bp großen Produkts mit dem Primer SynLB4 weist darauf hin, dass sich die T-DNA-Insertion an Position +2217 (ATG; A = +1), mit der *Left-Border* Richtung 3‘-Ende, befindet (grau-gestricheltes Dreieck, Abbildung 32A). Die Linie SALK071821 trägt eine T-DNA im Gen At5g64710.1 an Position +2324 bezüglich des Translations-Startkodons (ATG; A = +1), wobei die *Left-Border* Richtung 3‘-Ende zeigt (Abbildung 32B). Die Linie SALK094849 weist ebenfalls im Gen At5g64710.1 eine T-DNA-Insertion auf, hier an Position +1324 (ATG; A = +1). Die *Left-Border* zeigt in Richtung 5‘-Ende (Abbildung 32B).

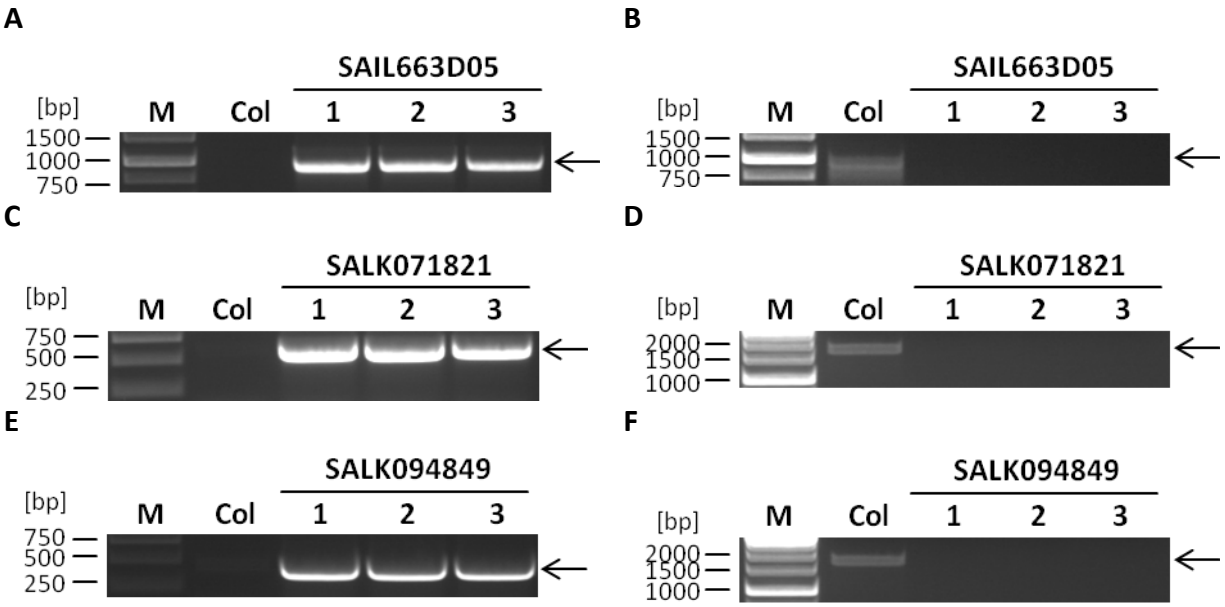


Abbildung 33: Genotypisierung von SAIL663D05 (A + B), SALK071821 (C + D) und SALK094849 (E + F). Untersuchung von jeweils drei unabhängigen Pflanzen. **(A)** *Left-Border*-PCR mit den Primern At5g09840.A und SynLB4 (P6 + P13, Abbildung 32A) zum Nachweis der T-DNA-Insertion im Gen At5g09840.1. Eine T-DNA-Insertion wird durch ein ca. 890 bp großes PCR-Produkt angezeigt (Pfeil). **(B)** PCR auf At5g09840.1 zum Nachweis des Wildtyp-Allels unter Verwendung der Primer At5g09840.A und At5g09840.B (P6 + P9, Abbildung 32A). Es wird ein ca. 1050 bp großes Produkt amplifiziert (Pfeil). **(C)** *Left-Border*-PCR mit den Primern At5g64710.C und LB-XL (P9 + P12, Abbildung 32B) zum Nachweis der T-DNA-Insertion im Gen At5g64710.1. Bei Vorhandensein einer T-DNA-Insertion wird ein PCR-Produkt von ca. 665 bp generiert (Pfeil). **(D)** PCR auf At5g64710.1 zum Nachweis des Wildtyp-Allels unter Verwendung der Primer At5g64710.A und At5g64710_kompl.R (P5 + P11, Abbildung 32B). Das Wildtyp-Allel von At5g64710.1 wird durch ein ca. 1750 bp großes PCR-Produkt repräsentiert (Pfeil). **(E)** *Left-Border*-PCR mit den Primern At5g64710.A und LB-XL (P5 + P12, Abbildung 32B) zum Nachweis der T-DNA-Insertion im Gen At5g64710.1. Bei Vorhandensein einer T-DNA-Insertion wird ein ca. 540 bp großes PCR-Produkt amplifiziert (Pfeil). **(F)** Erläuterungen siehe (D). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Nachfolgend wurde der Effekt der T-DNA-Insertion auf die Transkription des entsprechenden Gens durch eine RT-PCR-Analyse untersucht. Die Primerpaare wurden dabei so gewählt, dass ein Sequenzabschnitt stromaufwärts des Insertionsortes amplifiziert (SAIL663D05) bzw. der Insertionsort durch die Primer flankiert (SALK071821, SALK094849) wird (Abbildung 32). Bei Col kann bei der RT-PCR auf At5g09840.1 nach 35 Zyklen ein PCR-Produkt der erwarteten Größe detektiert werden, bei SAIL663D05 jedoch nicht (Abbildung 34). Somit kann davon ausgegangen werden, dass in der T-DNA-Insertionsmutante ein vollständiger Gen*knockout* (in diesem Fall des Gens At5g09840.1) vorliegt. Vergleichbares kann bei den RT-PCRs auf At5g64710.1 beobachtet werden. Wiederum wird bei Col nach 35 Zyklen ein PCR-Produkt der erwarteten Größe detektiert. Im Gegensatz dazu zeigt weder SALK071821 noch SALK094848 ein entsprechendes Signal (Abbildung 35). Dies deutet darauf hin, dass in den T-DNA-Insertionslinien SALK071821 und SALK094849 jeweils ein vollständiger *Knockout* des Gens At5g64710.1 vorliegt.

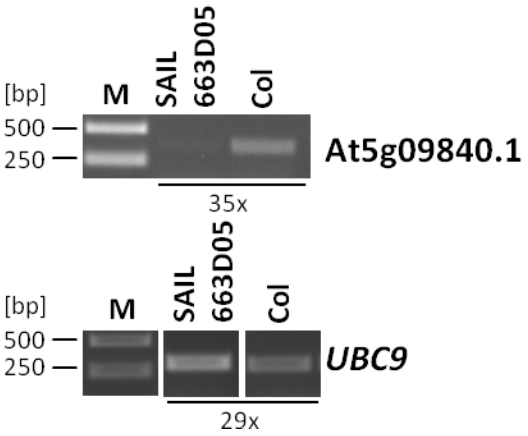


Abbildung 34: RT-PCR auf At5g09840.1 in SAIL663D05. Als Primer wurden At5g09840.A und At5g09840.C verwendet (P6 + P7, Abbildung 32A), wobei ein DNA-Fragment von ca. 365 bp generiert wird. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7 + Abbildung 12.

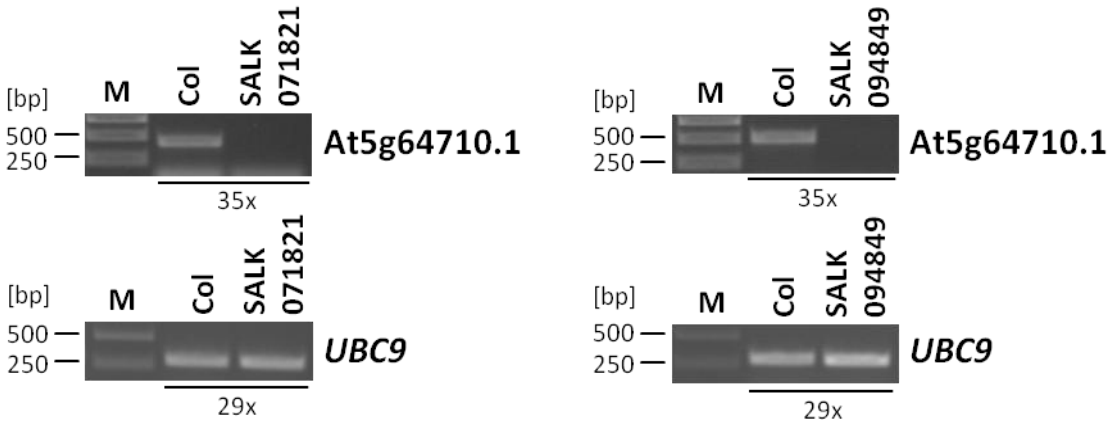


Abbildung 35: RT-PCR auf At5g64710.1 in SALK071821 und SALK094849. Zur Untersuchung der Linie SALK071821 (links) kamen die Primer At5g64710.E und At5g64710.C zum Einsatz (P7 + P9, Abbildung 32B). Hier wird ein ≈450 bp großes PCR-Produkt generiert. Zur Untersuchung der Linie SALK094849 (rechts) wurden die Primer At5g64710.A und At5g64710.B verwendet (P5 + P6, Abbildung 32B), wobei ein DNA-Fragment von ca. 500 bp amplifiziert wird. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7 + Abbildung 12.

3.2.3. Komplementierung von SAIL663D05, SALK071821 und SALK094849 mit den Col-Allelen von At5g09840.1 und At5g64710.1

In einem mit den Linien SAIL663D05, SALK071821 und SALK094849 durchgeführten CR-RT-PCR-Screening aller mitochondrialer Haupttranskripte treten in einigen Fällen (*atp*6-2, *atp*8, *atp*9, *ccmF*$_{N2}$, *cox*1, *nad*3-*rps*12, *nad*6, *nad*9) im Vergleich zu Col andere PCR-Produktmuster auf (Anhang 5). Bemerkenswert dabei ist, dass die Effekte bei SAIL663D05 im Vergleich zu SALK071821 und SALK094849 stets deutlicher bzw. stärker ausgeprägt sind. Die beschriebenen Auffälligkeiten in den CR-RT-PCR-Analysen lassen vermuten, dass die Ursache der veränderten PCR-Produktmuster im *Knockout* der Gene At5g09840.1 bzw. At5g64710.1 zu suchen ist. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden Komplementations-Konstrukte mit dem jeweiligen Wildtyp-Allel erzeugt.

Zunächst wurden die Col-Allele der beiden Gene sowie 5‘- und 3‘-flankierende Bereiche amplifiziert. Unter Verwendung der Primer At5g09840_kompl.H und At5g09840_kompl.R (P1 + P12, Abbildung 32A) wurden neben dem Gen At5g09840.1 172 bzw. 31 bp der 5‘- bzw. 3‘-flankierenden Bereiche amplifiziert (≈3170 bp). Dem entsprechend wurde mit den Primern At5g64710_kompl.H und At5g64710_kompl.R (P1 + P11, Abbildung 32B) ein DNA-Fragment (≈3275 bp) erzeugt, das neben der Gensequenz von At5g64710.1 390 bzw. 127 bp der 5‘- bzw. 3‘-flankierenden Bereiche enthält. Die generierten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Sgs*I/*Pac*I in die Pflanzen-Transformations-Vektoren pMDC100 (At5g09840.1) bzw. pMDC123 (At5g64710.1) kloniert (Anhang 1A) [Curtis and Grossniklaus 2003]. Um eine stabile Integration der Konstrukte in das Kerngenom von *A.thaliana* zu gewährleisten, wurde ein *Floral Dip* durchgeführt [Clough and Bent 1998]. In die Linie SAIL663D05 wurde das At5g09840.1/pMDC100-, in die Linien SALK071821 und SALK094849 das At5g64710.1/pMDC123-Konstrukt eingebracht. Die Verwendung unterschiedlicher Transformations-Vektoren beruht darauf, dass die Linie SAIL663D05 auf Grund der T-DNA-Insertion im Gen At5g09840.1 bereits ein Basta®-Resistenzgen aufweist und somit der Vektor pMDC123 (kodiert für ein Basta®-Resistenzgen) hier nicht eingesetzt werden konnte. Die durch die T-DNA im Vektor pMDC100 vermittelte Kanamycin- bzw. im Vektor pMDC123 vermittelte Basta®-Resistenz wurde zur Selektionierung der T_1-Pflanzen verwendet. Die Überprüfung der Anwesenheit des jeweiligen Transgens erfolgte durch eine PCR-Analyse, wobei die Primerpaare At5g09840.A (P6, Abbildung 32A)/RS (At5g09840.1; ≈1640 bp) bzw. At5g64710.D (P8, Abbildung 32B)/RS (At5g64710.1; ≈580 bp) zum Einsatz kamen.

Da der Primer RS stromabwärts der einklonierten Sequenz bindet, wird nur dann ein PCR-Produkt generiert, wenn die T-DNA ins Kerngenom integriert wurde.

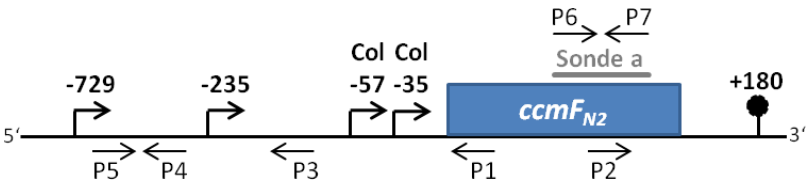


Abbildung 36: Schematische Genkarte von *ccmF*$_{N2}$. Der blaue Kasten entspricht dem Leseraser des *ccmF*$_{N2}$-Gens. 5'-Enden sind durch abgewinkelte Pfeile dargestellt, wobei neben den zwei Hauptenden in Col zwei weitere in SALK094849 x SAIL663D05 sequenzierte 5'-Enden markiert sind. Das 3'-Ende aller *ccmF*$_{N2}$-Transkripte ist durch einen schwarz ausgefüllten Kreis symbolisiert. Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich des *ccmF*$_{N2}$-Gens sind mit horizontalen Pfeilen angedeutet. Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: Atccb6n2-5; P2: Atccb6n2-6; P3: Atccb6n2-7; P4: Atccb6n2-14; P5: Atccb6n2-13; P6: Atccb6n2-9; P7: Atccb6n2-10. Die verwendete Northern-Blot-Sonde (Sonde a) ist als ein grauer Balken dargestellt und wurde mit dem Primerpaar P6/P7 amplifiziert.

Zur Untersuchung der Wirkung der eingebrachten Komplementations-Konstrukte, wurden ein oder zwei unabhängige T_1-Pflanzen mittels CR-RT-PCR-Analyse auf *ccmF*$_{N2}$-Transkripte phänotypisiert (Abbildung 37A). Die Mutanten zeigen im Vergleich zu Col ein verändertes Produktmuster. Die in Col bekannten *ccmF*$_{N2}$-Transkripte mit einem 5'-Ende bei -35 bzw. -57 und einem 3'-Ende bei +170 werden durch zwei sehr eng beieinander liegende PCR-Produkte repräsentiert (Produkte b + c, Abbildung 37) [Forner et al. 2007]. Die Intensität dieser PCR-Produkte ist in den Mutanten schwächer. Zusätzlich tritt in den Mutanten mindestens ein größeres DNA-Fragmente auf, das so in Col nicht vorhanden ist (Produkt d, Abbildung 37). Darüber hinaus wird bei allen Proben ein etwa 350 bp großes PCR-Produkt detektiert (Produkt a, Abbildung 37). Die beschriebenen Veränderungen im Produktmuster sind in SAIL663D05 im Vergleich zu SALK071821 und SALK094849 deutlich stärker ausgeprägt. Das Einbringen des Wildtyp-Allels resultiert bei allen drei Mutanten in einer Veränderung des Produktmusters, das nun dem von Col ähnelt (Abbildung 37A). Dies weist auf eine vollständige Wiederherstellung der Wildtyp-Situation hin.

Um der Frage nachzugehen, ob evt. nur eines der beiden Gene ausreicht, um den Col-Phänotyp wieder herzustellen, wurden zusätzlich so genannte „Kreuz-Komplementationen" durchgeführt. Dies bedeutet im Einzelnen, dass in die Linie SAIL663D05 ein At5g64710.1/pMDC100-Konstrukt und in die Linien SALK071821 bzw. SALK094849 ein At5g09840.1/pMDC123-Konstrukt eingebracht wurde (Anhang 1A). Die Klonierungs- und Selektionierungsstrategien entsprechen dem beschriebenen Vorgehen bei den „normalen" Komplementationen. Der biologische Effekt dieser Konstrukte wurde wiederum durch eine

CR-RT-PCR-Analyse auf *ccmF*$_{N2}$-Transkripte untersucht (Abbildung 37B), wobei keine Veränderungen der Produktmuster im Vergleich zur jeweiligen Mutante auftreten. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Gene (At5g09840.1 und At5g64710.1) wichtig sind, um den Col-spezifischen *ccmF*$_{N2}$-mRNA-Phänotyp zu generieren bzw. eine vollständige Prozessierung der *ccmF*$_{N2}$-Transkripte zu gewährleisten.

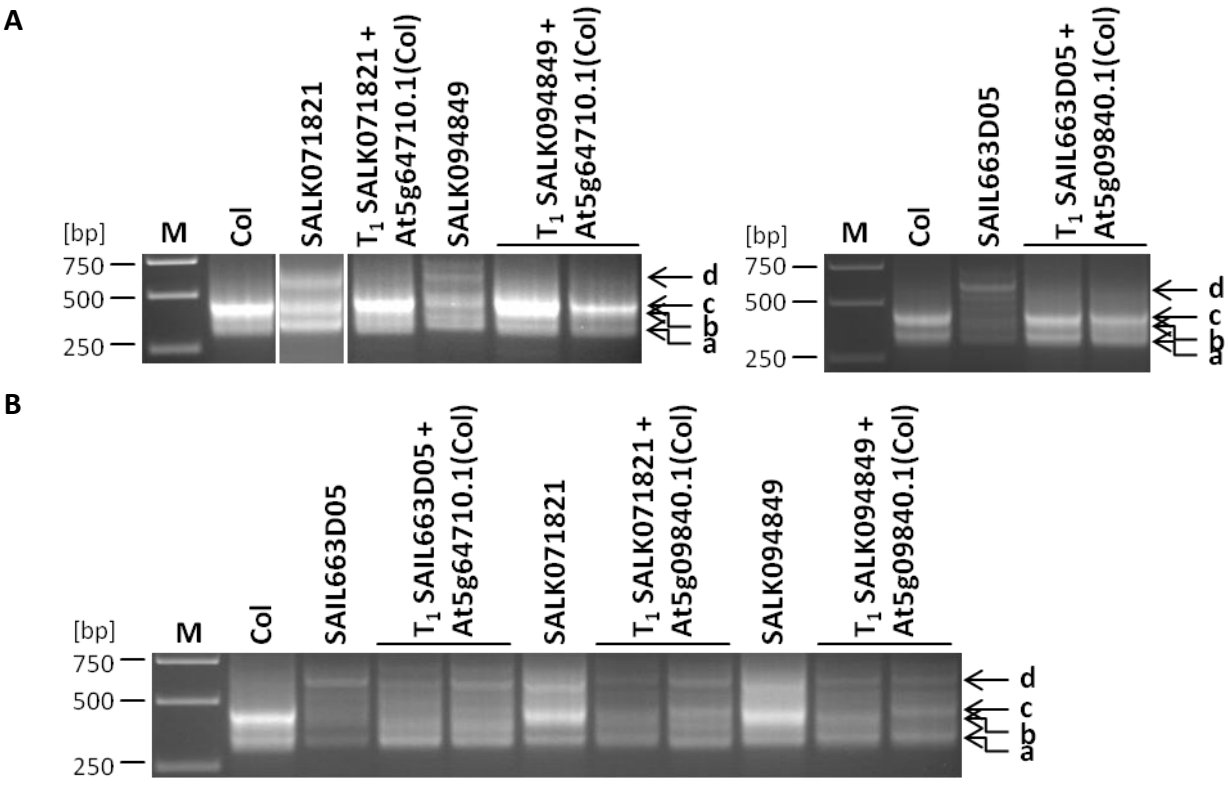


Abbildung 37: CR-RT-PCR-Analyse von *ccmF*$_{N2}$-Transkripten in komplementierten T$_1$-Pflanzen. Es wurden ein oder zwei voneinander unabhängige T$_1$-Pflanzen untersucht. Jeweils am rechten Rand sind auftretende PCR-Produkte mit Pfeilen markiert, dabei ist Produkt a ≈350 bp, Produkt b ≈435 bp, Produkt c ≈460 bp und Produkt d ≈630 bp groß. Als Primer wurden Atccb6n2-5 und Atccb6n2-6 verwendet (P1 + P2, Abbildung 36). **(A)** „Normale" Komplementation. **(B)** „Kreuz-Komplementation". Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Zur Verifizierung der bisher lediglich auf CR-RT-PCR-Ebene beschriebenen Beobachtungen wurde zusätzlich eine Northern-Blot-Analyse mit einer Sonde, die zu einem Teil des Leserasters von *ccmF*$_{N2}$ komplementär ist, durchgeführt (Sonde a, Abbildung 36 + Abbildung 38). Die sich zuvor in der CR-RT-PCR-Analyse angedeuteten Unterschiede im *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmuster zwischen Col und den drei Mutanten werden bestätigt. Bei Col tritt ein starkes Signal bei ≈820/840 nt auf, das den Haupttranskripten (5'-Ende -35/-57) entspricht (Transkript 1, Abbildung 38). Diese Transkripte sind in SAIL663D05 nicht und in SALK071821 bzw. SALK094849 kaum detektierbar. Dem gegenüber kommt es in allen drei Mutanten zu einer Anhäufung eines ≈1000 nt großen Transkripts, welches beim Wildtyp (Col) nur sehr schwach detektierbar ist (Transkript 2, Abbildung 38). Zusätzlich tritt bei allen Proben ein Transkript

von ≈1500 nt auf (Transkript 3, Abbildung 38). Das Einbringen des jeweils fehlenden Wildtyp-Allels führt zur Wiederherstellung des Col-spezifischen *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmusters, wobei das ≈1000 nt große Transkript zumindest bei SAIL663D05 + At5g09840.1(Col) und SALK094849 + At5g64710.1(Col) noch in beträchtlichem Maße vorhanden ist. Wie die CR-RT-PCR-Analyse in Abbildung 37B bereits angedeutet hat, wirkt sich dagegen das Einbringen des noch intakten Col-Allels nicht auf das *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmuster der Mutanten aus (SAIL663D05 + At5g64710.1(Col), SALK094849 + At5g09840.1(Col) und SALK071821 + At5g09840.1(Col), Abbildung 38).

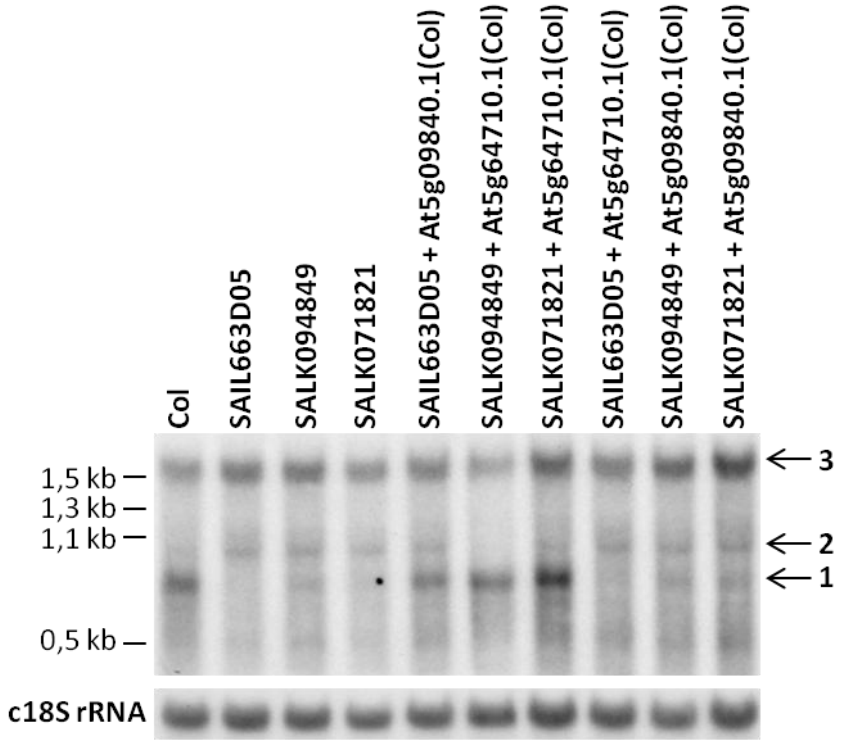


Abbildung 38: Northern-Blot-Analyse gegen das *ccmF*$_{N2}$-Leseraster in komplementierten T$_1$-Pflanzen. Pro Linie wurden 10 µg gRNA eingesetzt und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die verwendete DNA-Sonde wurde mit den Primern Atccb6n2-9 und Atccb6n2-10 amplifiziert (Sonde a, Abbildung 36). Am rechten Rand sind auftretende *ccmF*$_{N2}$-Transkripte mit Pfeilen markiert, dabei ist Transkript 1 ≈820/840 nt, Transkript 2 ≈1000 nt und Transkript 3 ≈1500 nt groß. Die Hybridisierung mit dem zur cytosolischen 18S rRNA (c18S rRNA) komplementären Oligonukleotid P18SrRNA dient als Ladekontrolle und ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 15A.

Die beschriebenen Analysen zeigen, dass die Veränderung des *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmusters in den Linien SAIL663D05 bzw. SALK071821 und SALK094849 auf das Fehlen der Gene At5g09840.1 bzw. At5g64710.1 zurückzuführen ist. Die entsprechenden Proteine AT5G09840.1 und AT5G64710.1 scheinen somit an der Prozessierung der *ccmF*$_{N2}$-mRNAs beteiligt zu sein. Analog zu der in Abbildung 37 gezeigten CR-RT-PCR-Analyse auf *ccmF*$_{N2}$-Transkripte wurden auch Analysen bezüglich der *nad*3-*rps*12- und *nad*9-Transkripte mit den

komplementierten Pflanzen durchgeführt, wobei das Einbringen des jeweiligen Wildtyp-Allels eine vollständige Wiederherstellung der Wildtyp-Situation zur Folge hat (Anhang 6.1). Diese Beobachtung kann wiederum damit gedeutet werden, dass die Proteine AT5G09840.1 und AT5G64710.1 in die Transkription oder Prozessierung von *nad*3-*rps*12- und *nad*9-mRNAs involviert sind.

Es ist davon auszugehen, dass auch die im Anhang 5 dargestellten Veränderungen im CR-RT-PCR-Muster weiterer mitochondrialer Gene auf eine Beteiligung der Proteine AT5G09840.1 und AT5G64710.1 an der Prozessierung der entsprechenden Transkripte hindeuten. Auf Grunddessen werden die Gene in *MITOCHONDRIAL NUCLEASE 1* und *2* umbenannt: At5g64710.1 = *MNU1*, At5g09840.1 = *MNU2*. Dem entsprechend wird SALK094849 ab sofort mit *mnu1-1*, SALK071821 mit *mnu1-2* und SAIL663D05 mit *mnu2-1* bezeichnet.

3.2.4. Etablierung und Phänotypisierung der Doppel*knockout*-Mutanten *mnu2-1/mnu1-1* und *mnu2-1/mnu1-2*

Wie in den vorherigen Ausführungen erwähnt, unterscheiden sich *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* vom Wildtyp in Bezug auf das Transkriptmuster einiger mitochondrialer Gene, wobei die Effekte bei *mnu2-1* stärker ausgeprägt sind. Um der Frage nachzugehen, ob sich die Transkriptmuster dieser Gene bei gleichzeitiger Abwesenheit beider Proteine zusätzlich verändern, wurden Doppel*knockout*-Mutanten von *MNU1* und *MNU2* etabliert.

Zu diesem Zweck wurden homozygote Pflanzen der Linie *mnu2-1* mit *mnu1-1* bzw. *mnu1-2* gekreuzt (jeweils reziprok). Die daraus resultierenden F_1-Pflanzen wurden analog zu den in Abbildung 33A + C + E gezeigten PCR-Analysen auf das Vorhandensein der jeweiligen T-DNA-Insertionen getestet. In der F_2-Generation wurde dann nach Pflanzen gesucht, die für beide T-DNA-Insertionen homozygot sind. Die dabei durchgeführten PCR-Analysen entsprechen den in Abbildung 33 dargestellten. Auf diese Weise konnten für alle vier Varianten (*mnu2-1* x *mnu1-1*, *mnu1-1* x *mnu2-1*, *mnu2-1* x *mnu1-2*, *mnu1-2* x *mnu2-1*) erfolgreich Pflanzen etabliert werden. Makroskopisch sind die Doppel*knockout*-Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen nicht vom Wildtyp Col zu unterscheiden. Auf molekularbiologische Unterschiede und Besonderheiten bezüglich der *atp*8-, *ccmF*$_{N2}$-, *nad*3-*rps*12- und *nad*9-Transkripte wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen. Es wird jeweils untersucht, ob im Vergleich zum Wildtyp ein signifikanter Unterschied in den Transkriptmustern zwischen Einzel- und Doppelmutanten beobachtet werden kann.

3.2.4.1. Prozessierung von *atp*8-Transkripten in *mnu2-1/mnu1-1* und *mnu2-1/mnu1-2*

Bei einer CR-RT-PCR-Analyse auf *atp*8-mRNAs wird jeweils nur ein Produkt detektiert, das ein *atp*8-Transkript mit einem 5‘-Ende bei -157 und einem 3‘-Ende bei +121 repräsentiert (Abbildung 39) [Forner et al. 2007]. Im Vergleich zu Col ist dieses PCR-Produkt sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelmutanten von der Intensität schwächer (Produkt a, Abbildung 40). Dies deutet auf eine Reduktion des *atp*8-Haupttranskripts in den Mutanten hin.

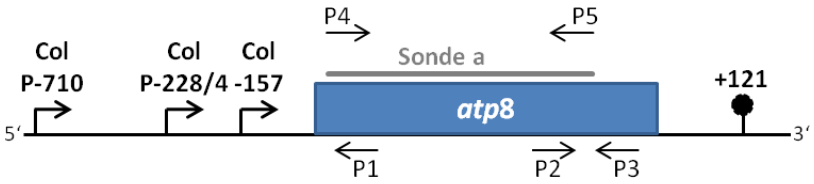


Abbildung 39: Schematische Genkarte von *atp*8. Der blaue Kasten entspricht dem Leseraster des *atp*8-Gens. 5‘-Enden sind durch abgewinkelte Pfeile dargestellt. Die zwei am weitesten stromaufwärts lokalisierten 5‘-Enden entstammen der Transkriptionsinitiation (gekennzeichnet mit einem „P“, [Kühn et al. 2005]). Das 3‘-Ende aller *atp*8-Transkripte ist durch einen schwarz ausgefüllten Kreis symbolisiert. Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich des *atp*8-Gens sind mit horizontalen Pfeilen angedeutet. Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: Atatp8-1; P2: Atatp8-4; P3: atp8-B; P4: Atatp8-NS.H; P5: Atatp8-NS.R. Die verwendete Northern-Blot-Sonde (Sonde a) ist als grauer Balken dargestellt und wurde mit dem Primerpaar P4/P5 amplifiziert.

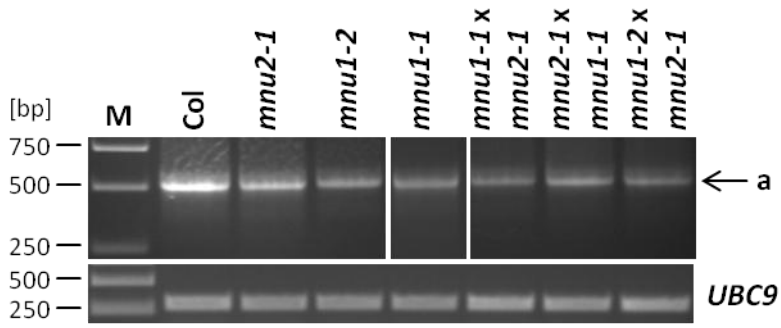


Abbildung 40: CR-RT-PCR-Analyse von *atp*8-Transkripten. Das durch den Pfeil am rechten Rand markierte Produkt a ist ≈530 bp groß. Als Primer wurden Atatp8-1 und Atatp8-4 verwendet (P1 + P2, Abbildung 39). Die cDNA-Menge wurde mit einer RT-PCR gegen *UBC9* eingestellt. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7 + Abbildung 12.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde eine Northern-Blot-Analyse mit einer zum Leseraster von *atp*8 komplementären Sonde durchgeführt (Sonde a, Abbildung 39 + Abbildung 41). Erwartungsgemäß tritt in Col ein Signal bei ≈760 nt auf, welches dem *atp*8-Haupttranskript mit einem 5‘-Ende bei -157 entspricht (Transkript 1, Abbildung 41). In allen anderen Proben wird ebenfalls nur das *atp*8-Haupttranskript detektiert, wobei die Intensität dieses Transkripts im Vergleich zu Col reduziert ist. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass sich

die Einzel- und Doppelmutanten bezüglich des Transkriptmusters nicht voneinander unterscheiden (kein additiver Effekt).

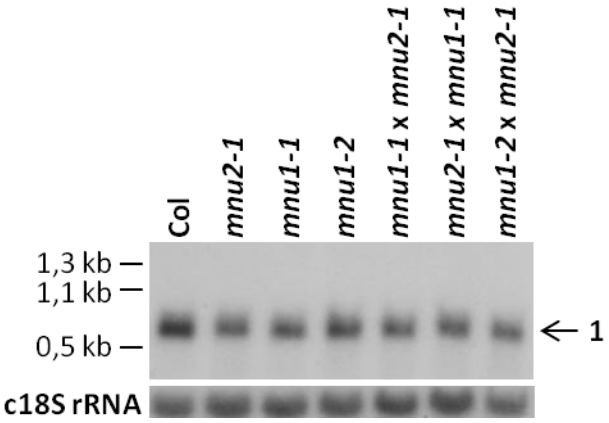


Abbildung 41: Northern-Blot-Analyse gegen das *atp8*-Leseraster. Pro Linie wurden 10 µg gRNA in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die eingesetzte Sonden-DNA wurde mit dem Primerpaar Atatp8-NS.H/Atatp8-NS.R amplifiziert (Sonde a, Abbildung 39). Das am rechten Rand mit einem Pfeil markierte Transkript 1 ist ≈760 nt groß. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 38.

Um die Reduktion des Transkriptlevels zu quantifizieren, wurde eine *Real-Time* qRT-PCR auf einen Teil des *atp8*-Leserasters durchgeführt (Abbildung 42). Übereinstimmend mit der Northern-Blot-Analyse ist der *atp8*-Transkriptlevel in *mnu1-1*, *mnu2-1* und *mnu1-1* x *mnu2-1* im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Bei den Einzelmutanten *mnu1-1* und *mnu2-1* kann eine Verringerung um etwa 60 % ermittelt werden. Der *Knockout* beider Gene führt nicht zu einer als signifikant zu bezeichnenden weiteren Reduzierung des *atp8*-Transkriptlevels (*mnu1-1* x *mnu2-1*, Abbildung 42).

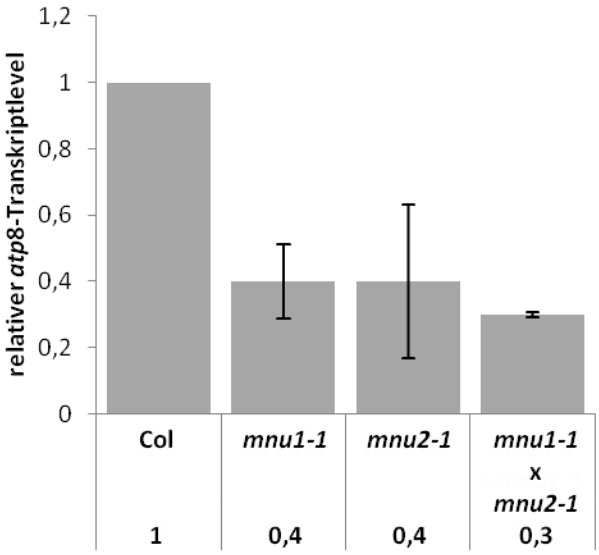


Abbildung 42: *Real-Time* qRT-PCR auf das *atp8*-Leseraster. Als Primer wurden Atatp8-4 und atp8-B verwendet (P2 + P3, Abbildung 39), wobei ein 91 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wird. Der *atp8*-Transkriptlevel ist relativ zu dem in Col angegeben. Für Col wird willkürlich der Wert 1 angenommen. Die Daten für *mnu2-1*, *mnu1-1* und *mnu1-1* x *mnu2-1* stammen jeweils von zwei voneinander unabhängigen biologischen, in je vier technischen, Replikaten.

Sowohl die Northern-Blot- als auch die *Real-Time* qRT-PCR-Analyse weisen auf eine Reduktion des *atp8*-Transkriptlevels in den Einzel- und Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp

hin. Die erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch keinen additiven Effekt bezüglich der Reduktion des *atp8*-Transkriptlevels bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU1 und MNU2 vermuten.

3.2.4.2. Prozessierung von *ccmF$_{N2}$*-Transkripten in *mnu2-1/mnu1-1* und *mnu2-1/mnu1-2*

Analog zur in Abbildung 37 gezeigten CR-RT-PCR-Analyse wurden die *ccmF$_{N2}$*-Transkripte in den Doppelmutanten untersucht. Das veränderte Produktmuster in *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* im Vergleich zu Col wird bestätigt (Abbildung 43A). Die Doppelmutanten zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Einzelmutanten, so kommt es auch hier zu einer Akkumulation mindestens eines größeren PCR-Produkts (Produkt d, Abbildung 43A) bei einer gleichzeitigen Reduktion der Produkte b + c, die die *ccmF$_{N2}$*-Haupttranskripte repräsentieren.

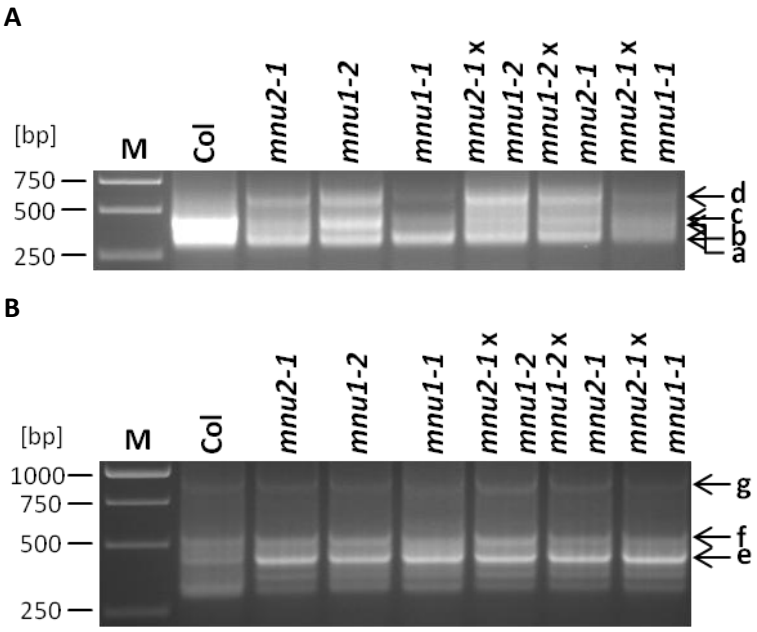


Abbildung 43: CR-RT-PCR-Analyse auf *ccmF$_{N2}$*-Transkripte mit einem im Leseraster (A) bzw. stromaufwärts (B) des reifen 5'-Endes bei -57 lokalisierten 5'-Primer. **(A)** Erläuterungen siehe Abbildung 37. **(B)** Als Primer wurden Atccb6n2-7 und Atccb6n2-6 verwendet (P3 + P2, Abbildung 36). Die am rechten Rand markierten PCR-Produkte sind im Einzelnen: Produkt e ≈460 bp, Produkt f ≈560 bp und Produkt g ≈950 bp. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Um die größeren Fragmente näher zu untersuchen, wurde eine weitere CR-RT-PCR-Analyse durchgeführt, wobei ein 5'-Primer stromaufwärts des 5'-Endes bei -57 zum Einsatz kam (P3, Abbildung 36 + Abbildung 43B). Wiederum zeigen die Einzel- und die Doppelmutanten ein einheitliches PCR-Produktmuster, wobei Produkt d (Abbildung 43A) und Produkt e (Abbildung 43B) von der Größe her korrelieren und somit vermutlich das gleiche *ccmF$_{N2}$*-Transkript repräsentieren. Die in Abbildung 43B gezeigte CR-RT-PCR-Analyse wurde zusätzlich mit *mnu1-1* x *mnu2-1* durchgeführt (Anhang 7.1C). Ein Produkt e (Abbildung 43B) entsprechendes PCR-Fragment wurde in *mnu1-1* x *mnu2-1* sequenziert und ein 5'-Ende bei -235 ermittelt. Im Vergleich zur Referenzsequenz aus Col liegt hier ein Nukleotid-Austausch (G(Col)→T(*mnu1-1* x *mnu2-1*)) sieben Nukleotide stromabwärts des 5'-Endes bei -235 vor

(Anhang 7.1A). Der 3‘-Terminus entspricht dem in Col bekannten (Anhang 7.1B). Durch die Verwendung des noch weiter stromaufwärts lokalisierten 5‘-Primers Atccb6n2-14 (P4, Abbildung 36), wurde in *mnu1-1* x *mnu2-1* ein mit Produkt g (Abbildung 43B) korrelierendes PCR-Produkt von ≈650 bp generiert (Anhang 7.2C). Die Sequenzierung dieses Produkts weist auf ein 5‘-Ende bei -729 und ein 3‘-Ende bei +170 hin (Anhang 7.2A + B). Darüber hinaus tritt in allen Proben ein weiteres ca. 550 bp großes DNA-Fragment von etwa gleicher Intensität auf (Produkt f, Abbildung 43B).

Die *ccmF*$_{N2}$-Transkripte in den Doppelmutanten wurden zusätzlich analog zu der in Abbildung 38 dargestellte Northern-Blot-Analyse untersucht. Die bereits im Abschnitt 3.2.3. beschriebenen Veränderungen bezüglich des *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmusters in *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* im Vergleich zu Col werden bestätigt. Die Doppelmutanten zeigen ein ähnliches *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmuster wie *mnu2-1*. So können hier keine *ccmF*$_{N2}$-Haupttranskripte (5‘-Ende -35/-57) detektiert werden (Transkript 1, Abbildung 44). Dem gegenüber kommt es zu einer Anhäufung eines ca. 1000 nt großen Transkripts (Transkript 2, Abbildung 44). Die Intensität ist vergleichbar mit dem entsprechenden Transkript bei *mnu2-1*. Darüber hinaus tritt wie bereits in der Northern-Blot-Analyse in Abbildung 38 gezeigt in allen Proben ein ca. 1500 nt großes Transkript auf (Transkript 3, Abbildung 44). Den zwei neben dem Haupttranskript zusätzlich auftretenden *ccmF*$_{N2}$-Transkripten (Transkripte 2 + 3, Abbildung 38 + Abbildung 44) können die neu identifizierten 5‘-Enden zugeordnet werden. Transkript 2 besitzt demnach ein 5‘-Ende bei -235 und ein 3‘-Ende bei +170 und ist 1017 nt groß. Das 5‘-Ende von Transkript 3 liegt bei -729, das 3‘-Ende ist bei +170 lokalisiert. Daraus ergibt sich eine Größe von 1511 nt.

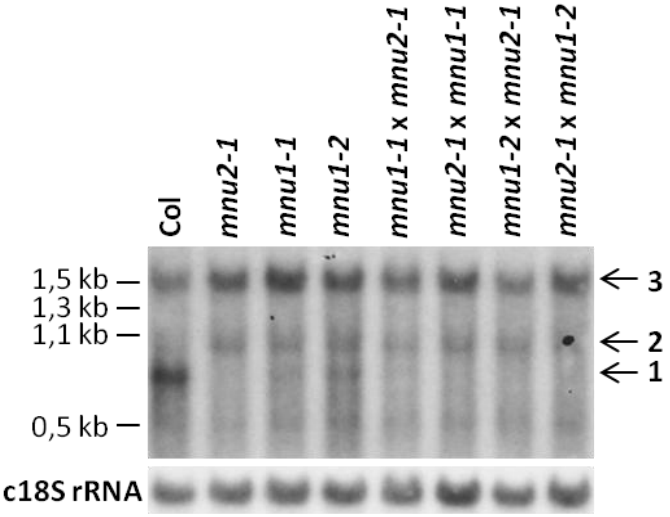


Abbildung 44: Northern-Blot-Analyse gegen das *ccmF*$_{N2}$-Leseraster. Erläuterungen siehe Abbildung 38.

Unter Berücksichtigung der Ladekontrolle lässt die in Abbildung 44 gezeigte Northern-Blot-Analyse eine schwache Anhäufung des ≈1500 nt großen Transkripts (Transkript 3, Abbildung 44) in den Mutanten im Vergleich zu Col vermuten. Auf Grund dessen wurde eine *Real-Time* qRT-PCR-Analyse auf einen Sequenzabschnitt stromaufwärts des 5‘-Endes bei -235 durchgeführt (Abbildung 45). Diese Analyse bestätigt die zuvor in der Northern-Blot-Analyse beobachtete Anhäufung von 5‘-verlängerten *ccmF*$_{N2}$-Vorläufertranskripten in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. So weist *mnu2-1* einen um 10 % und *mnu1-1* einen um 40 % erhöhten *ccmF*$_{N2}$-Transkriptlevel auf. Die Abwesenheit von MNU1 und MNU2 resultiert bei *mnu1-1* x *mnu2-1* in einer Erhöhung des *ccmF*$_{N2}$-Transkriptlevels um 20 %.

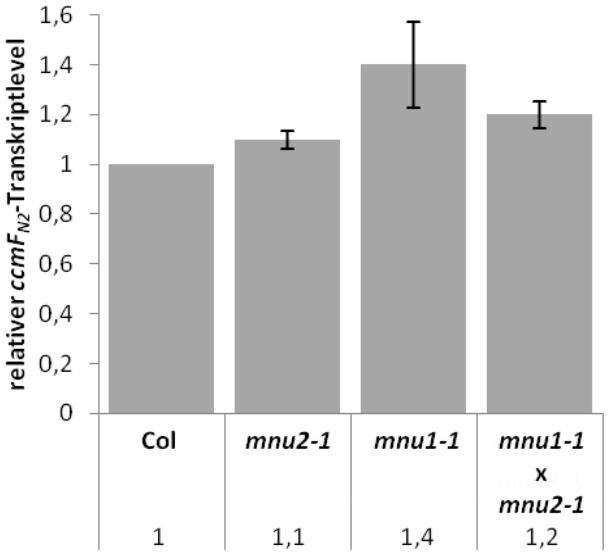


Abbildung 45: *Real-Time* qRT-PCR auf einen Bereich stromaufwärts des 5‘-Endes bei -235 der *ccmF*$_{N2}$-mRNA. Unter Verwendung der Primer Atccb6n2-13 und Atccb6n2-14 (P5 + P4, Abbildung 36) wird ein 96 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Der *ccmF*$_{N2}$-Transkriptlevel ist relativ zu dem in Col angegeben, wobei für Col willkürlich der Wert 1 angenommen wird. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 42.

Im Gegensatz zum Vorgehen bei der Analyse von *nad*3-*rps*12-Transkripten (siehe nächster Abschnitt 3.2.4.3.) wurden hier keine weiteren Northern-Blot-Analysen mit z.B. einer Sonde, die einen Bereich stromaufwärts des reifen 5‘-Endes bei -57 repräsentiert, durchgeführt. Auf Grund der Tatsache, dass die Sequenzierungsergebnisse keinerlei Hinweise auf eine Veränderung am 3‘-Ende der untersuchten *ccmF*$_{N2}$-Transkripte geben (Anhang 7.1B + Anhang 7.2B), ist davon auszugehen, dass die Akkumulation der größeren Transkripte in der in Abbildung 44 dargestellten Northern-Blot-Analyse lediglich auf eine veränderte 5‘-Prozessierung zurückzuführen ist. Dies wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass den auftretenden Transkripten die neu identifizierten 5‘-Enden zugeordnet werden können und die daraus theoretisch ermittelten Transkriptgrößen mit denen in der in Abbildung 44 gezeigten Northern-Blot-Analyse übereinstimmen. Darüber hinaus weist auch die durchgeführte *Real-Time* qRT-PCR auf eine Akkumulation von 5‘-verlängerten *ccmF*$_{N2}$-Transkripten hin (Abbildung 45).

Die hier gezeigten Daten machen deutlich, dass die gleichzeitige Abwesenheit von MNU1 und MNU2 keine signifikante Veränderung des *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmusters im Vergleich zu dem in den Einzelmutanten zur Folge hat. Somit kann hier wie bei den Analysen bezüglich der Prozessierung von *atp*8-Transkripten (siehe Abschnitt 3.2.4.1.) kein additver Effekt beobachtet werden.

3.2.4.3. Prozessierung von *nad*3-*rps*12-Transkripten in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2*

Bei der CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*3-*rps*12-Transkripte mit einem zum Leseraster komplementären 5‘-Primer wird erwartungsgemäß in Col ein PCR-Produkte von ≈385 bp amplifiziert, wobei dieses mit dem *nad*3-*rps*12-Haupttranskript (5‘-Ende -229 und 3‘-Ende +15) korreliert (Produkt d, Abbildung 47A) [Forner et al. 2007]. Zusätzlich treten zwei kleinere DNA-Fragmente auf (Produkte b + c, Abbildung 47A). Die Linien *mnu1-1* und *mnu1-2* zeigen ein zu Col ähnliches Produktmuster. Im Gegensatz dazu scheinen bei *mnu2-1* die Produkte b, c und d in geringerem Maße vorhanden zu sein. Vergleichbares kann bei den Doppelmutanten beobachtet werden. Zusätzlich deutet sich hier eine Anreicherung eines kleineren DNA-Fragments (Produkt a, Abbildung 47A) sowie größerer PCR-Produkte an, wobei für Letztere keine klar voneinander abgegrenzten Banden ausgemacht werden können.

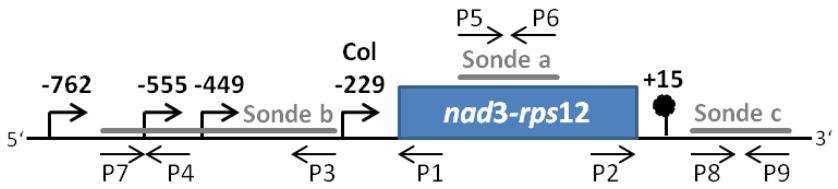


Abbildung 46: Schematische Genkarte von *nad*3-*rps*12. Der blaue Kasten entspricht dem Leseraster des *nad*3-*rps*12-Gens. 5‘-Enden sind durch abgewinkelte Pfeile dargestellt, wobei neben dem Hauptende in Col drei weitere in *mnu1-1* x *mnu2-1* sequenzierte 5‘-Enden markiert sind. Das 3‘-Ende aller *nad*3-*rps*12-Transkripte ist durch einen schwarz ausgefüllten Kreis symbolisiert. Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich des *nad*3-*rps*12-Gens sind mit horizontalen Pfeilen angedeutet. Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: Atnad3-2; P2: Atrps12-6; P3: Atnad3-8; P4: Atnad3-13; P5: Atnad3-4; P6: Atrps12-1; P7: Atnad3-11; P8: Atrps12-7; P9: Atrps12-8. Die verwendeten Northern-Blot-Sonden sind als graue Balken dargestellt, wobei Sonde a mit P5/P6, Sonde b mit P7/P3 und Sonde c mit P8/P9 amplifiziert wurde.

Zur Überprüfung der vermeintlichen Anhäufung größerer DNA-Fragmente in *mnu2-1* und den Doppelmutanten wurde eine CR-RT-PCR-Analyse mit dem weiter stromaufwärts lokalisierten 5‘-Primer Atnad3-8 durchgeführt (P3, Abbildung 46 + Abbildung 47B). Die nun auftretenden Bandenmuster in Col, *mnu1-1* und *mnu1-2* unterscheiden sich deutlich von denen in *mnu2-1* und den Doppelmutanten. So treten in Letzteren mindestens drei zusätzliche Produkte auf (Produkte g, h + i, Abbildung 47B), die vermutlich auf 5‘- und/oder 3‘-verlängerte

*nad*3-*rps*12-Transkripten hinweisen. Im Gegensatz dazu tritt ein ≈150 bp großes PCR-Produkt lediglich bei Col, *mnu1-1* und *mnu1-2* auf (Produkt e, Abbildung 47B). Darüber hinaus wird in allen Linien ein etwa 225 bp großes DNA-Fragment detektiert (Produkt f, Abbildung 47B).

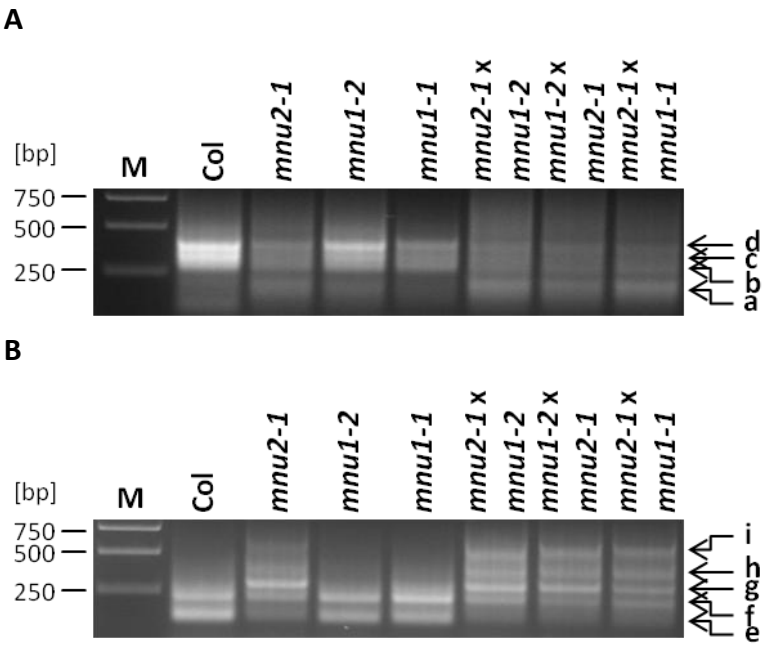


Abbildung 47: CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*3-*rps*12-Transkripte mit einem im Leseraster (A) bzw. stromaufwärts (B) des reifen 5'-Endes bei -229 lokalisierten 5'-Primer. **(A)** Als Primer wurden Atnad3-2 und Atrps12-6 verwendet (P1 + P2, Abbildung 46). Am rechten Rand sind auftretende PCR-Produkte mit einem Pfeil markiert (Produkt a ≈200 bp, Produkt b ≈275 bp, Produkt c ≈350 bp und Produkt d ≈385 bp). **(B)** Als Primer wurden Atnad3-8 und Atrps12-6 verwendet (P3 + P2, Abbildung 46). Die am rechten Rand markierten PCR-Produkte sind im Einzelnen: Produkt e ≈150 bp, Produkt f ≈225 bp, Produkt g ≈310 bp, Produkt h ≈420 bp und Produkt i ≈625 bp. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Um die Produkte g und h zu charakterisieren, wurde die in Abbildung 47B gezeigte CR-RT-PCR-Analyse zusätzlich mit *mnu1-1* x *mnu2-1* durchgeführt (Anhang 7.3C + Anhang 7.4C) und die entsprechenden Produkte sequenziert. Die ermittelten 5'-Enden liegen bei -449 (Produkt g) bzw. -555 (Produkt h). Die 3'-Enden entsprechen jeweils dem in Col beschriebenen bei +15 (Anhang 7.3 + Anhang 7.4). Unter Verwendung des weiter stromaufwärts lokalisierten 5'-Primers Atnad3-13 (P4, Abbildung 46) wurde in *mnu1-1* x *mnu2-1* ein mit Produkt i (Abbildung 47B) korrelierendes DNA-Fragment von ≈350 bp amplifiziert (Anhang 7.5C). Das hier ermittelte 5'-Ende ist bei -762, das 3'-Ende erneut bei +15 lokalisiert (Anhang 7.5). Auffällig ist, dass die Sequenzierung mit Atrps12-6 (P2, Abbildung 46) zur Ermittlung des 3'-Endes jeweils im Vergleich zur Referenzsequenz aus Col einen Nukleotid-Austausch (T(Col)→C(*mnu1-1* x *mnu2-1*)) zwei Nukleotide stromaufwärts des 3'-Endes bei +15 anzeigt (Anhang 7.3B +Anhang 7.4B +Anhang 7.5B).

Zur Verifizierung der bisher nur auf CR-RT-PCR-Ebene beobachteten Anhäufung von 5'-verlängerten *nad*3-*rps*12-Transkripten in *mnu2-1* sowie den Doppelmutanten, wurden zusätzlich Northern-Blot-Analysen durchgeführt (Abbildung 48 + Abbildung 49). Mit einer gegen das Leseraster von *nad*3-*rps*12 gerichteten Sonde kann ein deutlicher Unterschied im

Transkriptmuster zwischen Col, *mnu1-1* und *mnu1-2* auf der einen und *mnu2-1* und den Doppelmutanten auf der anderen Seite beobachtet werden. Wie bereits in einer vorherigen Analyse gezeigt, entspricht das in Col detektierte Transkript (Transkript 1, Abbildung 48) dem *nad*3-*rps*12-Haupttranskript mit einem 5‘-Ende bei -229 und einem 3‘-Ende bei +15 [Stoll et al. 2013]. Dieses Transkript kann lediglich bei *mnu1-1* und *mnu1-2* und auch hier nur sehr viel schwächer als im Wildtyp detektiert werden, was auf einen stark verminderten *nad*3-*rps*12-Transkriptlevel hindeutet. Obwohl sich bei *mnu2-1* eine leichte Akkumulation größerer mRNAs andeutet, scheinen auch hier im Vergleich zu Col insgesamt sehr viel weniger *nad*3-*rps*12-Transkripte vorhanden zu sein. Im Gegensatz dazu zeigen die Doppelmutanten eine starke Akkumulation von größeren Transkripten, wobei jeweils das stärkste Signal bei etwa 1550 nt auftritt (Transkript 4, Abbildung 48).

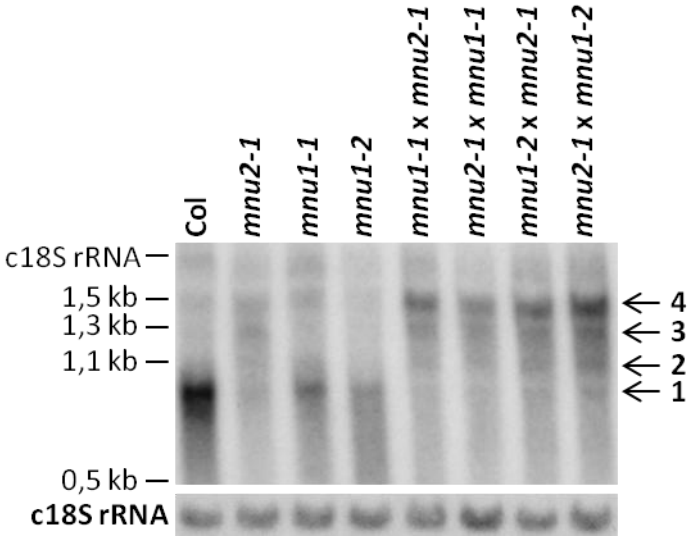


Abbildung 48: Northern-Blot-Analyse gegen das *nad*3-*rps*12-Leseraster. Pro Linie wurden 10 µg gRNA in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die verwendete Sonden-DNA wurde mit den Primern Atnad3-4 und Atrps12-1 amplifiziert (Sonde a, Abbildung 46). Am rechten Rand sind auftretende *nad*3-*rps*12-Transkripte mit Pfeilen markiert, dabei ist Transkript 1 ≈1025 nt, Transkript 2 ≈1250 nt, Transkript 3 ≈1350 nt und Transkript 4 ≈1550 nt groß. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 38.

Die Hybridisierung mit einer zu einem Bereich stromaufwärts des reifen 5‘-Endes (-229) der *nad*3-*rps*12-mRNA komplementären Sonden-DNA resultiert lediglich bei *mnu1-1*, *mnu2-1* und den Doppelmutanten in detektierbaren Signalen (Sonde b, Abbildung 46 + Abbildung 49A). Ein Größenvergleich mit den Transkripten der in Abbildung 48 gezeigten Northern-Blot-Analyse macht deutlich, dass die hier auftretenden Signale den Transkripten 2-4 entsprechen. Diesen Transkripten können die zuvor beschriebenen neu identifizierten 5‘-Enden zugeordnet werden (Anhang 7.3 + Anhang 7.4 +Anhang 7.5). Transkript 2 besitzt demnach ein 5‘-Ende bei -449, Transkript 3 eines bei -555 und Transkript 4 bei -762 auf. Demzufolge ist Transkript 2 1247 nt, Transkript 3 1353 nt und Transkript 4 1560 nt groß. Auffällig dabei ist, dass auch bei *mnu1-1* diese Transkripte vorhanden sind, obwohl die Northern-Blot-

Analyse gegen das *nad*3-*rps*12-Leseraster (Abbildung 48) dies nicht vermuten lässt. Darüber hinaus ist anzumerken, dass sich die Intensitätsverteilung bei den Doppelmutanten verschoben hat. So zeigt nicht mehr Transkript 4, sondern Transkript 2 das am stärksten ausgeprägte Signal (Abbildung 49A). Weiter fällt auf, dass die Intensität der Signale bei den Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten deutlich stärker ist. Dies beinhaltet auch RNAs, die offensichtlich kleiner als die reife *nad*3-*rps*12-mRNA sind (vergleiche hierzu auch Transkript 1, Abbildung 48).

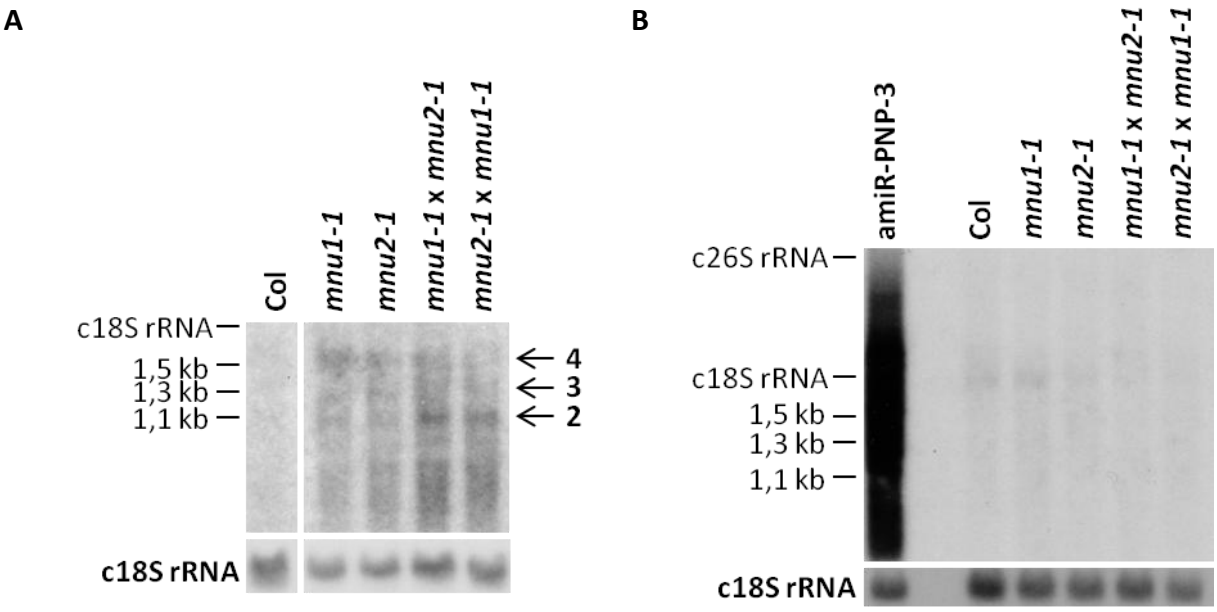


Abbildung 49: Northern-Blot-Analyse gegen Bereiche stromaufwärts des reifen 5‘-Endes (A) und stromabwärts des reifen 3‘-Endes (B) der *nad*3-*rps*12-mRNA. Pro Linie wurden 10 µg gRNA in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. **(A)** Die Sonden-DNA wurde mit dem Primerpaar Atnad3-11/Atnad3-8 amplifiziert (Sonde b, Abbildung 46). Die am rechten Rand markierten Transkripte entsprechen den Transkripten 2-4 der in Abbildung 48 dargestellten Northern-Blot-Analyse. **(B)** Die Sonden-DNA wurde mit den Primern Atrps12-7 und Atrps12-8 generiert (Sonde c, Abbildung 46). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 38.

Um zu testen, ob die detektierten 5‘-verlängerten *nad*3-*rps*12-Transkripte zusätzlich ein unreifes 3‘-Ende besitzen, wurde eine Northern-Blot-Analyse auf einen Bereich stromabwärts des 3‘-Endes der reifen *nad*3-*rps*12-mRNA durchgeführt (Sonde c, Abbildung 46 + Abbildung 49B). In Übereinstimmung mit den Sequenzierungsergebnissen (Anhang 7.3B + Anhang 7.4B + Anhang 7.5B) können bei diesem Experiment weder in den Einzel- noch in den Doppelmutanten *nad*3-*rps*12-Transkripte detektiert werden. Somit ist davon auszugehen, dass die 3‘-Prozessierung in den Mutanten nicht beeinträchtigt ist und die bei der Northern-Blot-Analyse auf das *nad*3-*rps*12-Leseraster (Abbildung 48) auftretenden Transkripte das „normale“ 3‘-Ende bei +15 aufweisen. Als Positivkontrolle wurde diese Northern-Blot-Analyse zusätzlich mit amiR-PNP-3 durchgeführt. Analog zu der in Abbildung 16B dargestellten Nor-

thern-Blot-Analyse gegen einen Bereich stromabwärts des 3‘-Endes der reifen *nad*2-mRNA, kommt es auch hier zu einer sehr starken Anreicherung von 3‘-verlängerten Molekülen. Dies unterstreicht erneut den wichtigen Einfluss der PNPase bei der 3‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte.

Unter Berücksichtigung der hier gezeigten Analysen bezüglich der *nad*3-*rps*12-Transkripte kann ein additiver Effekt in den Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten beobachtet werden. So kommt es in den Doppelmutanten zu einer starken Akkumulation von 5‘-verlängerten *nad*3-*rps*12-mRNAs, während solche Moleküle bei *mnu1-1* und *mnu1-2* fast gar nicht und bei *mnu2-1* relativ schwach angereichert sind. Es ist allerdings anzumerken, dass die in Abbildung 49A gezeigte Northern-Blot-Analyse nicht mit *mnu1-2* durchgeführt wurde. Da jedoch die CR-RT-PCR- (Abbildung 47) sowie die Northern-Blot-Analyse (Abbildung 48) gegen das *nad*3-*rps*12-Leseraster in beiden *MNU1*-Mutanten ein ähnliches *nad*3-*rps*12-Transkriptmuster vermuten lassen, können die hier gezogenen Schlussfolgerungen auch auf *mnu1-2* bezogen werden.

3.2.4.4. Prozessierung von *nad*9-Transkripten in *mnu2-1/mnu1-1* und *mnu2-1/mnu1-2*

Eine CR-RT-PCR-Analyse gegen *nad*9-mRNAs resultiert bei Col erwartungsgemäß in zwei DNA-Fragmenten, die zwei *nad*9-Transkripte mit 5‘-Enden bei -202 bzw. -243 repräsentieren (Produkte a + b, Abbildung 51A) [Forner et al. 2007]. Dem gegenüber tritt sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelmutanten lediglich das kleinere PCR-Produkt auf (Produkt a, Abbildung 51A).

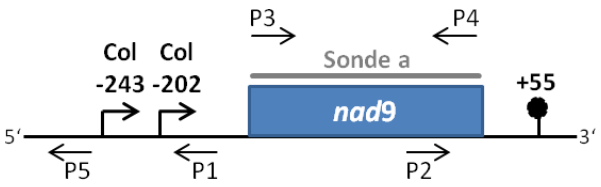


Abbildung 50: Schematische Genkarte von *nad*9. Der blaue Kasten entspricht dem Leseraster des *nad*9-Gens. 5‘-Hauptenden in Col sind durch abgewinkelte Pfeile dargestellt. Das 3‘-Ende ist durch einen schwarz ausgefüllten Kreis symbolisiert. Die relative Lage und Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten Primer bezüglich des *nad*9-Gens sind mit horizontalen Pfeilen angedeutet. Die Primer entsprechen im Einzelnen: P1: Atnad9-7; P2: Atnad9-3; P3: Atnad9-NS.H; P4: Atnad9-NS.R; P5: Atnad9-9. Die verwendete Northern-Blot-Sonde (Sonde a) ist als grauer Balken dargestellt und wurde mit dem Primerpaar P3/P4 amplifiziert.

Eine zusätzlich durchgeführte Northern-Blot-Analyse gegen das Leseraster von *nad*9 bestätigt diese Beobachtung. So können wiederum bei Col beide *nad*9-Transkripte detektiert wer-

den, wobei das ≈830 nt große Transkript ein 5‘-Ende bei -202 und das ≈870 nt große Transkript ein 5‘-Ende bei -243 aufweist (Transkripte 1 + 2, Abbildung 51B). Im Gegensatz dazu verfügen *mnu1-1*, *mnu2-1* sowie *mnu2-1* x *mnu1-1* lediglich über das ≈830 nt große *nad*9-Transkript.

Die Abwesenheit des *nad*9-Transkripts mit einem 5‘-Ende bei -243 in den Mutanten lässt den Schluss zu, dass MNU1 und MNU2 für die Generierung dieses Transkripts essentiell sind. In einer vorherigen Untersuchung wurde mit RPF2 ein Protein beschrieben, das für die 5‘-Reifung von *nad*9-Transkripten mit einem 5‘-Ende bei -202 notwendig ist [Jonietz et al. 2010]. Dies hat zur Folge, dass die entsprechende Mutante (*rpf2-1*) nur das größere der in Col bekannten *nad*9-Transkripte aufweist (Transkript 2, Abbildung 51B).

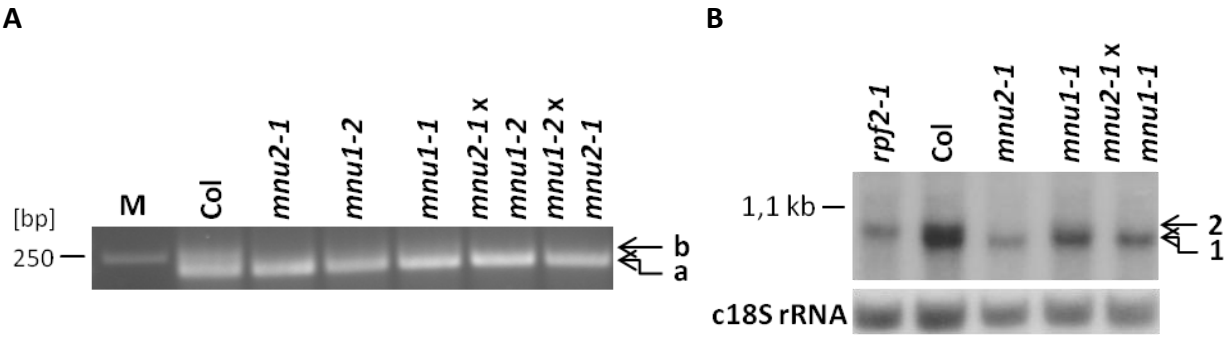


Abbildung 51: CR-RT-PCR- (A) und Northern-Blot-Analyse (B) von *nad*9-Transkripten. **(A)** Als Primer wurden Atnad9-7 und Atnad9-3 verwendet (P1 + P2, Abbildung 50). Die am rechten Rand durch Pfeile markierten bekannten PCR-Produkte sind im Einzelnen: Produkt a ≈220 bp und Produkt b ≈260 bp. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7. **(B)** Pro Linie wurden 15 µg gRNA in einem 2,2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die verwendete Sonden-DNA wurde mit den Primern Atnad9-NS.H und Atnad9-NS.R amplifiziert (Sonde a, Abbildung 50). Am rechten Rand sind bekannte *nad*9-Transkripte durch Pfeile angezeigt, dabei ist Transkript 1 ≈830 nt und Transkript 2 ≈870 nt groß. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 38.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es, ähnlich wie bei der Analyse der *atp*8- und *ccmF*$_{N2}$-mRNA-Prozessierung (siehe Abschnitte 3.2.4.1. + 3.2.4.2.) auch bezüglich der *nad*9-mRNA-Prozessierung, zu keiner zusätzlichen Veränderung des Transkriptmusters bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU1 und MNU2 im Vergleich zu den Einzelmutanten kommt (kein additiver Effekt).

3.2.4.5. Prozessierung weiterer mitochondrialer Transkripte in *mnu2-1*/*mnu1-1* und *mnu2-1*/*mnu1-2*

Zusätzlich zu den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Auswirkungen eines simultanen Fehlens von MNU1 und MNU2, wurden auch alle anderen mitochondrialen Haupttranskripte in den Doppelmutanten mittels CR-RT-PCR-Analysen untersucht (Anhang 8). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine Veränderungen bei Genen, die nicht von einem

Einzel*knockout* betroffen sind, beobachtet wurden. Darüber hinaus traten auch keine weiteren Auffälligkeiten bei Genen, mit bekannten kleineren Veränderungen in den Einzelmutanten (Anhang 5), auf. Somit ist davon auszugehen, dass MNU1 und MNU2 keinen generellen Einfluss auf die Prozessierung von mitochondrialen Transkripten haben, sondern nur spezifisch die Reifung einiger Transkripte beeinflussen.

3.2.5. Etablierung und Charakterisierung der Doppel*knockout*-Mutanten *rpf2-1/mnu1-1*, *rpf2-1/mnu1-2* und *rpf2-1/mnu2-1*

Im Abschnitt 3.2.4.4. wurde gezeigt, dass von den zwei bekannten *nad*9-Transkripten in *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* nur das kleinere vorliegt (Produkt a, Abbildung 51A + Transkript 1, Abbildung 51B). Im Gegensatz dazu besitzt *rpf2-1* lediglich das größere der beiden *nad*9-Transkripte (Transkript 2, Abbildung 51B) [Jonietz et al. 2010]. Ausgehend von diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, wie sich das *nad*9-Transkriptmuster bei gleichzeitiger Abwesenheit von RPF2 und MNU1/2 verändert.

Um diese Frage zu beantworten, wurde *rpf2-1* mit *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* gekreuzt. Die daraus resultierenden F_1-Pflanzen wurden auf das Vorhandensein jeweils beider T-DNA-Insertionen getestet, wobei bezüglich *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* analog zu den in Abbildung 33A + C + E dargestellten PCR-Analysen vorgegangen wurde. Die T-DNA-Insertion von *rpf2-1* wurde mit dem Primerpaar At1g62670.10/LB-XL durch die Generierung eines etwa 335 bp großen PCR-Produkts nachgewiesen. In der F_2-Generation wurde nach solchen Pflanzen gesucht, die für beide Mutationen homozygot sind. Die Genotypisierung in Hinblick auf *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* erfolgte analog zu den in Abbildung 33 gezeigten PCR-Analysen. Der Nachweis der T-DNA-Insertion in *rpf2-1* wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zum Nachweis des Wildtyp-Allels von *RPF2* (At1g62670.1) wurden die Primer At1g62670.3 und At1g62670.R verwendet, wobei das Wildtyp-Allel durch ein ca. 880 bp großes PCR-Produkt angezeigt wird.

Auf diese Weise wurden die Doppel*knockout*-Mutanten *rpf2-1* x *mnu1-1*, *rpf2-1* x *mnu1-2* und *rpf2-1* x *mnu2-1* etabliert. Makroskopisch können diese Linien unter normalen Wachstumsbedingungen nicht vom Wildtyp Col unterschieden werden. Jedoch zeigen die Doppelmutanten in einer analog zu der in Abbildung 51A gezeigten CR-RT-PCR-Analyse ein von den Einzelmutanten abweichendes Produktmuster (Abbildung 52). So treten bei *rpf2-1* x *mnu1-1* sowie *rpf2-1* x *mnu1-2* neben Produkt b, das ein *nad*9-Transkript mit einem 5‘-Ende bei -243

repräsentiert, zusätzlich größere unscharfe Banden auf, die in diesem Ausmaß in den Einzelmutanten nicht vorliegen (Produkt c, Abbildung 52). Darüber hinaus fällt auf, dass die Intensität sowie die Schärfe von Produkt b im Vergleich zu *rpf2-1* reduziert ist (Abbildung 52A). Einen noch drastischeren Effekt zeigt *rpf2-1* x *mnu2-1*. In zwei unabhängigen Pflanzen dieser Linie treten sehr schwache PCR-Produkte auf Höhe von Produkt a und b (korrelieren mit den reifen *nad*9-mRNAs mit 5'-Enden bei -202 bzw. -243) auf, wobei nicht eindeutig erkennbar ist, ob die Banden Produkt a und/oder Produkt b entsprechen. Eine (schwache) Akkumulation von größeren DNA-Fragmenten, wie es die Analyse von *rpf2-1* x *mnu1-2* und *rpf2-1* x *mnu1-1* vermuten lässt, tritt im Fall von *rpf2-1* x *mnu2-1* nicht auf (Abbildung 52B).

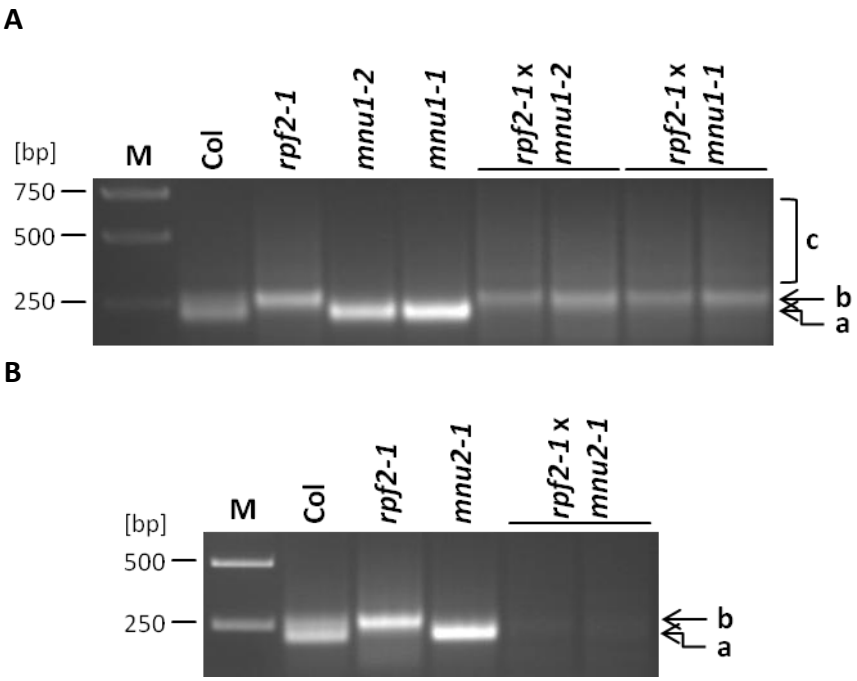


Abbildung 52: CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*9-Transkripte mit *rpf2-1* x *mnu1-2*, *rpf2-1* x *mnu1-1* (A) und *rpf2-1* x *mnu2-1* (B). Zusätzlich zu den bekannten PCR-Produkten treten teils unscharfe Banden im Bereich von etwa 350 bis 750 bp auf (Produkt c). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 51A.

Um die sich andeutende Anhäufung von größeren *nad*9-Transkripten in *rpf2-1* x *mnu1-1* und *rpf2-1* x *mnu1-2* im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten näher zu untersuchen (Produkt c, Abbildung 52A), wurde zunächst eine weitere CR-RT-PCR-Analyse durchgeführt (Abbildung 53). Der hierfür verwendete 5'-Primer Atnad9-9 ist komplementär zu einer Sequenz stromaufwärts des reifen 5'-Endes bei -243 (P5, Abbildung 50). Die erhaltenen PCR-Muster sind in allen untersuchten Linien ähnlich, wobei jeweils eine Vielzahl verschieden großer DNA-Fragmente auftritt. Darüber hinaus können auch keine Intensitätsunterschiede einzelner PCR-Produkte ausgemacht werden. Anhand dieser CR-RT-PCR-Analyse kann somit keine Aussage über eine vermeintliche Anhäufung von 5'-verlängerten Molekülen getroffen werden.

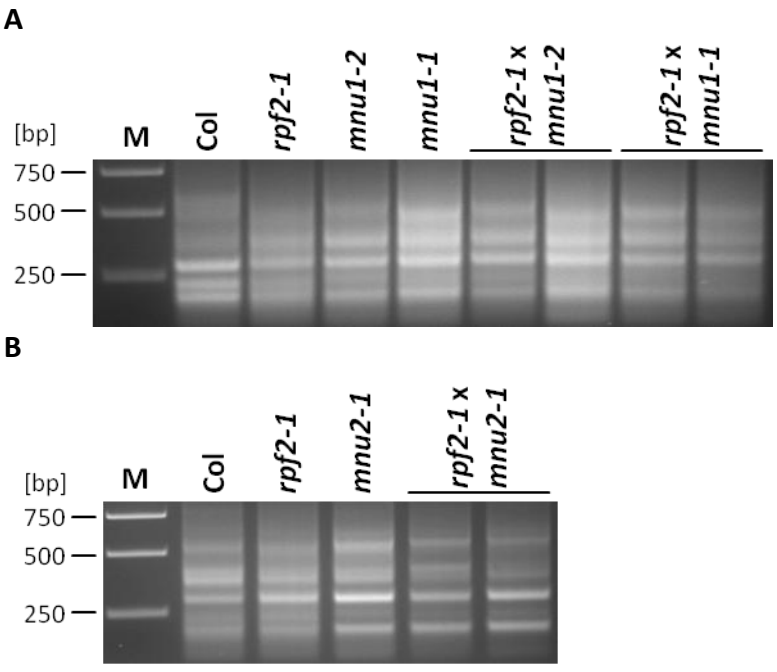


Abbildung 53: CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*9-Transkripte mit einem stromaufwärts des reifen 5'-Endes bei -243 lokalisierten 5'-Primer in *rpf2-1* x *mnu1-2*, *rpf2-1* x *mnu1-1* (A) und *rpf2-1* x *mnu2-1* (B). Als Primer wurden Atnad9-9 und Atnad9-3 (P5 + P2, Abbildung 50) verwendet. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

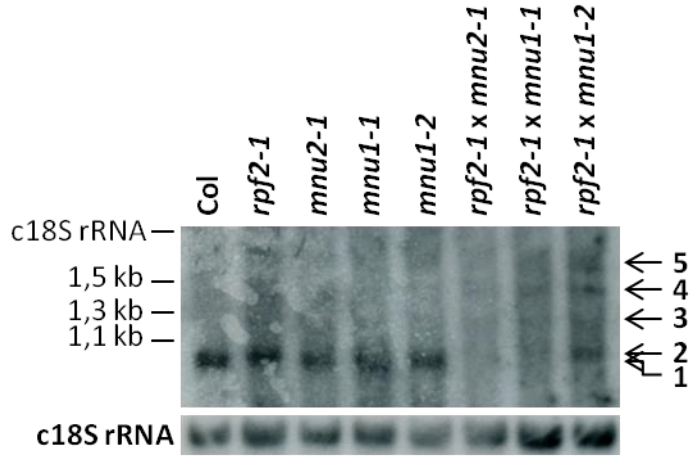


Abbildung 54: Northern-Blot-Analyse gegen das *nad*9-Leseraster mit *rpf2-1* x *mnu2-1*, *rpf2-1* x *mnu1-1* und *rpf2-1* x *mnu1-2*. Je Probe wurden 12 µg gRNA in einem 1,8 % Agarosegel aufgetrennt. Am rechten Rand sind neben den zwei bekannten drei größere *nad*9-Transkripte durch Pfeile angezeigt. Die größeren Transkripte sind im Einzelnen: Transkript 3 ≈1200 nt, Transkript 4 ≈1400 nt, Transkript 5 ≈1600 nt. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 51B.

Die sich in der CR-RT-PCR-Analyse auf *nad*9-Transkripte andeutende vermeintliche Abwesenheit von reifen *nad*9-mRNAs in *rpf2-1* x *mnu2-1* (Produkte a + b, Abbildung 52B) sowie die Anhäufung von größeren *nad*9-Transkripten in *rpf2-1* x *mnu1-1* und *rpf2-1* x *mnu1-2* (Produkt c, Abbildung 52A) wurden zusätzlich mittels Northern-Blot-Analyse mit einer gegen das *nad*9-Leseraster gerichteten Sonde überprüft (Sonde a, Abbildung 50 + Abbildung 54). Die erhaltenen Transkriptmuster von Col, *rpf2-1*, *mnu2-1* und *mnu1-1* stimmen mit den vorherigen Ergebnissen überein (Abbildung 51B). Darüber hinaus zeigt *mnu1-2* erwartungsgemäß das gleiche Transkriptmuster wie *mnu1-1* und *mnu2-1*, wobei jeweils nur das kleinere *nad*9-Haupttranskript (5'-Ende bei -202) auftritt (Transkript 1, Abbildung 54). Die Doppelzeigen ein von den Einzelmutanten stark abweichendes Transkriptmuster, der Effekt bei

rpf2-1 x *mnu2-1* ist dabei erneut am stärksten ausgeprägt. Auf Höhe der *nad*9-Haupttranskripte kann bei *rpf2-1* x *mnu1-1* und *rpf2-1* x *mnu1-2* lediglich ein schwaches Signal detektiert werden, das vermutlich dem größeren *nad*9-Haupttranskript (5‘-Ende bei -243) zuzuordnen ist (Transkript 2, Abbildung 54). Dem gegenüber scheinen bei *rpf2-1* x *mnu2-1* keine *nad*9-Haupttranskripte in detektierbaren Mengen vorhanden zu sind. Darüber hinaus kommt es bei allen drei Doppelmutanten zu einer Anhäufung von größeren Transkripten (Transkript 3-5, Abbildung 54), wobei diese Moleküle bei *rpf2-1* x *mnu2-1* im Vergleich zu *rpf2-1* x *mnu1-1*/mnu1-2 in deutlich geringerer Menge vorhanden sind.

Die CR-RT-PCR-Analyse von *nad*9-Transkripten sowie die Northern-Blot-Analyse gegen das *nad*9-Leseraster deuten darauf hin, dass bei gleichzeitiger Abwesenheit von RPF2 und MNU2 (*rpf2-1* x *mnu2-1*) fast keine reifen *nad*9-Transkripte vorhanden sind (Produkte a + b, Abbildung 52B + Transkripte 1 + 2, Abbildung 54). Um einen möglichen Einfluss der verringerten Transkriptmenge auf die Menge des entsprechenden Proteins zu untersuchen, wurde eine Immunodetektion zum Nachweis des *Nad*9-Proteins durchgeführt (Abbildung 55B). Hierfür wurden zunächst Proteinlysate von Col, *rpf2-1*, *mnu2-1* und *rpf2-1* x *mnu2-1* unter Verwendung von grünem Blattgewebe 3-4 Wochen alter Pflanzen hergestellt (Vorgehen siehe Abschnitt 2.3.4.5.). Um sicher zu stellen, dass für die Immunodetektion die gleichen Mengen an Protein geladen werden, erfolgte zunächst eine Coomassie-Färbung. Abbildung 55A kann entnommen werden, dass in allen Proben in etwa die gleiche Menge an Protein vorhanden ist. Die Immunodetektion mit einem Antiserum gegen das *Nad*9-Protein aus dem Weizen *Triticum aestivum* resultiert bei Col, *rpf2-1* und *mnu2-1* in einem etwa gleich starken Signal, bei dem es sich gemäß der Erwartung (apparentes Molekulargewicht ≈22,7 kDa) vermutlich um das *Nad*9-Protein handelt [Jonietz et al. 2010]. Dem gegenüber ist das entsprechende Signal bei *rpf2-1* x *mnu2-1* schwächer. Der Intensitätsvergleich mit einer 1:2-Verdünnung von Col sowie der Ladekontrolle lässt darauf schließen, dass bei *rpf2-1* x *mnu2-1* der *Nad*9-Proteinlevel um etwa 50 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Eine analog durchgeführte Immunodetektion mit einem Antiserum gegen die D1-Untereinheit des Photosystem II-Reaktionszentrums (*PsbA*(D1)) resultiert dagegen in allen Linien in einem gleich starken Signal etwas unterhalb der 35 kDa Markerbande (apparentes Molekulargewicht ≈39 kDa) (Abbildung 55C).

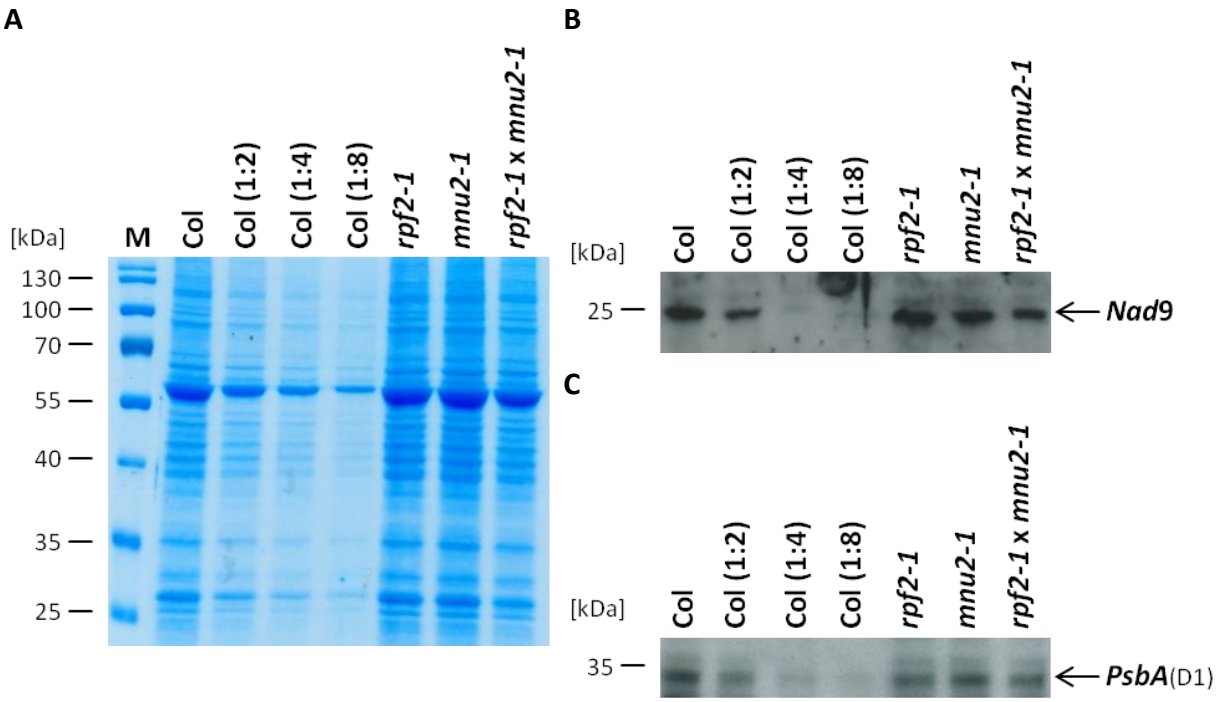


Abbildung 55: Immunodetektion mit Proteinlysaten aus grünem Blattgewebe. **(A)** Ladekontrolle mittels Coomassie-Färbung. Von allen Proben wurde 1 µl Proteinlysat geladen, wobei von Col zusätzlich eine 1:2-, 1:4- und 1:8-Verdünnung aufgetragen wurde. **(B)** Immunodetektion mit einem Antikörper gegen das *Nad9*-Protein aus dem Weizen *Triticum aestivum* [Jonietz et al. 2010]. Von allen Proben wurden 2 µl Proteinlysat geladen, wobei von Col zusätzlich eine 1:2-, 1:4- und 1:8-Verdünnung aufgetragen wurde. **(C)** Immunodetektion mit einem Antikörper gegen das *PsbA*(D1)-Protein. Ansonsten analog zu (B). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 21.

Die gezeigten Analysen lassen den Schluss zu, dass es bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU2 und RPF2 zu einer starken Abnahme an *nad*9-Haupttranskripten und einer schwachen Akkumulation von größeren *nad*9-Transkripten kommt. Dem gegenüber ist der *Nad*9-Proteinlevel im Vergleich zum Wildtyp lediglich um 50 % reduziert. Das Fehlen von MNU1 und RPF2 hat dagegen weniger drastische Konsequenzen, wobei hier eindeutig größere *nad*9-Vorläufertranskripte auftreten.

3.2.6. cDNA-Sequenz von *MNU1* und *MNU2*

Gemäß dem SSP cDNA-Klon R21707 (GenBank Accession AY090444) in der Arabidopsis Transcriptome Genomic Express Database (http://signal.salk.edu/cgi-bin/atta) ist das Gen *MNU1* in drei Exon- und zwei Intronsequenzen strukturiert. Darüber hinaus ist die Länge der 5‘-UTR mit 108 bp und die der 3‘-UTR mit 136 bp angegeben [Yamada et al. 2003].

Das Gen *MNU2* besitzt laut den bei The Arabidopsis Information Resource hinterlegten Daten zwei Exon- und eine Intronsequenz/en (https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=gene&id=136551). Die 5‘-UTR ist mit 30 bp angegeben. Eine 3‘-UTR wird nicht aufgeführt. Im Gegensatz zum Gen *MNU1* ist hier jedoch kein entsprechender cDNA-Klon vorhanden, der die beschriebene Struktur bestätigen bzw. widerlegen kann. Auf Grund der fehlen-

den Daten für die 3‘-UTR wurde eine 3‘-RACE(*Rapid Amplification of cDNA Ends*)-Analyse durchgeführt. Die dafür notwendige cDNA wurde mit DNase-verdauter gRNA von Col und dem Primer dTXSC hergestellt. Unter Verwendung des Primerpaars At5g09840.I (P8, Abbildung 32A)/XSC treten keine distinkten PCR-Produkte auf (Abbildung 56A). Eine daraufhin durchgeführte *half-nested* PCR mit dem bezüglich At5g09840.I ca. 170 bp weiter stromabwärts lokalisierten Primer At5g09840.E (P10, Abbildung 32A) resultiert jedoch in einem ≈600 bp großen DNA-Fragment (Abbildung 56B). Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts mit dem Primer At5g09840.E deutet an, dass das Gen *MNU2* eine 136 bp große 3‘-UTR besitzt (Anhang 9A).

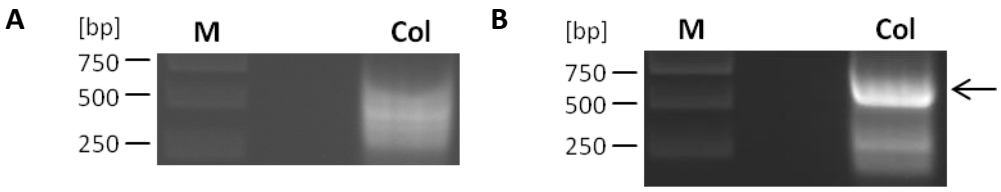


Abbildung 56: 3‘-RACE zur Ermittlung der 3‘-UTR des Gens *MNU2*. (A) 3‘-RACE mit den Primern At5g09840.I (P8, Abbildung 32A) und XSC. **(B)** 3‘-RACE mit den Primern At5g09840.E (P10, Abbildung 32A) und XSC (*half-nested*), wobei 2 µl des PCR-Ansatzes aus (A) als *Template* verwendet wurden. Das auf der rechten Seite der Abbildung mit einem Pfeil markierte PCR-Produkt wurde sequenziert. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem als At5g09840.1 annotierten *MNU2*-Gen möglicherweise um zwei Gene handelt, wurden weitere 3‘-RACE-Analysen mit Primern, die zu Bereichen innerhalb des ersten Exons komplementär sind, durchgeführt. So wurden entsprechend den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Experimenten PCR-Analysen unter Verwendung der Primerpaare At5g09840.G/XSC und At5g09840.H/XSC durchgeführt (P4 + P5, Abbildung 32A), wobei die Sequenzierung der jeweils generierten Produkte keinerlei Hinweise auf eine weitere 3‘-UTR liefert (Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei At5g09840.1 (*MNU2*) tatsächlich um ein einziges Gen handelt.

Zur Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von *MNU2* wurden verschiedene PCR-Analysen unter Verwendung der für die 3‘-RACE erzeugten cDNA durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Ein mit dem Primerpaar At5g09840.UEx.H/At5g09840.UEx.R generiertes PCR-Produkt von etwa 2500 bp wurde mit den Primern At5g09840.UEx.H, At5g09840.H, At5g09840.E und At5g09840.UEx.R sequenziert (P2, P5, P10 + P11, Abbildung 32A). Dabei konnte bestätigt werden, dass der Sequenzabschnitt 3060913-3061081 (bezüglich NC_003076) einem Intron entspricht und somit auf cDNA-Ebene nicht vorhanden ist. Darüber hinaus konnten keine weiteren Unterschiede zwischen der DNA-Referenzsequenz aus

Col (NC_003076) und der cDNA-Sequenz ermittelt werden. Um zusätzlich den Genabschnitt stromaufwärts von At5g09840.UEx.H auf cDNA-Ebene zu untersuchen, wurde ein mit den Primern At5g09840_kompl.H/At5g09840.EGFP.1 (P1 + P3, Abbildung 32A) amplifiziertes PCR-Produkt von ≈625 bp mit At5g09840_kompl.H sequenziert. Ein Vergleich mit der DNA-Sequenz des *MNU2*-Leserasters zeigt eine vollständige Übereinstimmung. Außerdem kann gefolgert werden, dass die 5'-UTR mindestens 103 bp groß ist (3058935-3058996 bezüglich NC_003076).

3.2.7. Erzeugung der rekombinanten Proteine rMNU1$^{\Delta N52}$ und rMNU2$^{\Delta N75}$

3.2.7.1. Überexpression und His-Tag-Aufreinigung von rMNU1$^{\Delta N52}$

Wie bereits im Abschnitt 3.2.1. dargestellt, entsprechen die ersten 50 AS von MNU1 der mitochondrialen Lokalisationssequenz. Durch den erfolgreichen *in vitro*-Nachweis einer mitochondrialen Lokalisation des Fusionsproteins MNU1-N_{Term}:EGFP wurde dies bestätigt (Abbildung 31). Für das Überexpressions-Konstrukt wurden die Primer so gewählt, dass das rekombinante Protein am N-Terminus um 52 AS verkürzt ist (rMNU1$^{\Delta N52}$) und das native Stoppkodon aufweist. Mit den Primern At5g64710.1.UEx.H und At5g64710.1.UEx.R (P3 + P10, Abbildung 32B) und cDNA als *Template* wurde ein ≈2395 bp großes PCR-Produkt generiert. Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Nco*I/*Eco*RI erfolgte die Klonierung des Fragments in die *Multiple Cloning Site* des Überexpressions-Vektors pET32a (Anhang 1C). Daraufhin wurde die Sequenz mittels Sequenzierung mit den Primern At5g64710.A (P5, Abbildung 32B), pETsense und pETanti überprüft. Die Primer pETsense und pETanti sind komplementär zu Sequenzabschnitten außerhalb der *Multiple Cloning Site* von pET32a und binden stromaufwärts der *Nco*I- bzw. stromabwärts der *Eco*RI-Schnittstelle.

Um die optimale Temperatur zur Expression von rMNU1$^{\Delta N52}$ in *E.coli* BL21-AI™ zu ermitteln, wurde die Überexpression zunächst bei verschiedenen Temperaturen (22 °C, 28 °C und 37 °C) für 4 h durchgeführt. Analog wurde mit einer zusätzlichen Kultur bei 37 °C verfahren, der nicht IPTG und Arabinose zugesetzt wurde (uninduzierte Kontrolle). Das apparente Molekulargewicht von rMNU1$^{\Delta N52}$ beträgt 107,5 kDa, wobei 19,1 kDa von den am N-Terminus vorhandenen Tags (Trx-, His- und S-Tag, Anhang 1C) herrühren. Auf einem mit Coomassie angefärbten SDS-Gel zeigt sich bei allen getesteten Temperaturen in der unlöslichen Fraktion („Pellet") im Vergleich zur uninduzierten Kultur eine starke Anreicherung einer Proteinbande zwischen 100 und 130 kDa („←", Abbildung 57A). Diese Bande ist vermutlich auf rMNU1$^{\Delta N52}$

zurückzuführend. Zumindest bei 28 °C deutet sich auch in der löslichen Fraktion („Lysat“) eine Anreicherung der entsprechenden Bande im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle an. Diese Beobachtung wird durch eine Immunodetektion mit einem Antikörper gegen den His-Tag unterstützt (Abbildung 57B). So lassen die Banden bei „28 °C“ vermuten, dass eine beträchtliche Menge von rMNU1$^{\Delta N52}$ in der löslichen Fraktion vorhanden ist („←“, Abbildung 57B). Wie schon die Coomassie-Färbung vermuten lässt, sind die detektierten Signale bei „37 °C“ deutlich schwächer. Zusätzlich ist anzumerken, dass neben dem rMNU1$^{\Delta N52}$-spezifischen Signal weitere kleinere Proteine detektiert werden, wobei hier jeweils eine Bande bei ca. 35 kDa am deutlichsten ausgeprägt ist. Um eventuell vorhandene „störende“ kleinere Proteine zu entfernen, wurde ein Teil der Lysate unter Verwendung von Amicon Ultra - 0,5 ml 30K aufkonzentriert („Filtrat“). Die in Abbildung 57B dargestellte Immunodetektion macht deutlich, dass sich die Ausbeute an löslichem Protein in der „28 °C“-Probe durch diesen Schritt nicht merklich erhöht hat. Das Signal in der „37 °C“-Probe ist dagegen nach der Filtration deutlich reduziert. Auffällig ist zusätzlich, dass die Intensität der unspezifischen Bande in den Filtraten bei ca. 35 kDa im Vergleich zum jeweiligen Lysat sogar noch stärker ist.

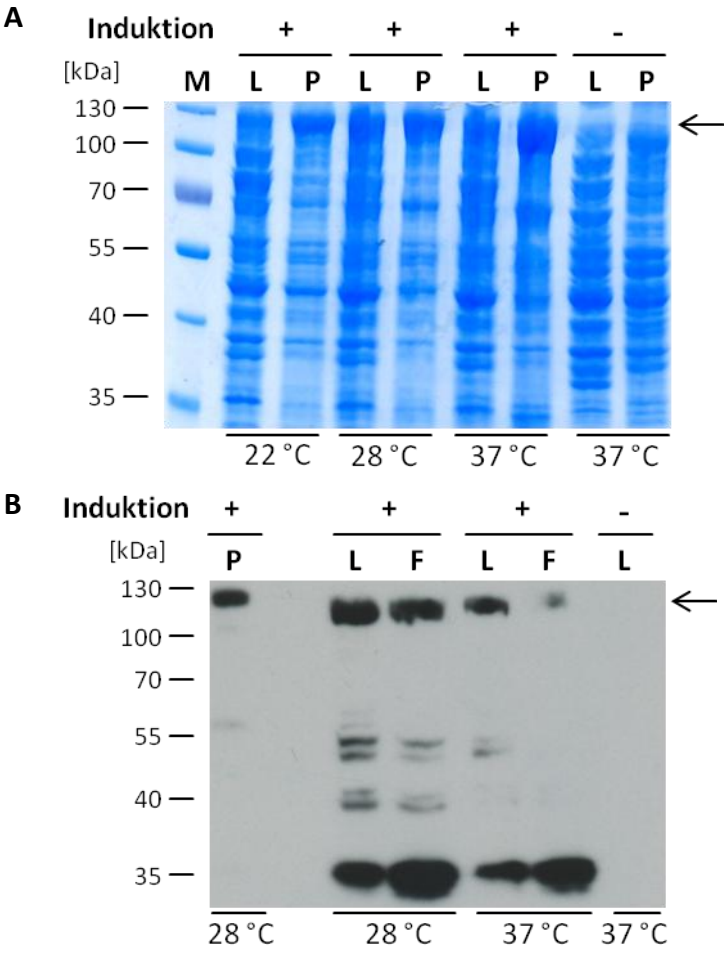


Abbildung 57: Überexpression von rMNU1$^{\Delta N52}$ in *E.coli* BL21-AI™ bei verschiedenen Temperaturen. Die Überexpression wurde bei den unterhalb der Abbildung angegebenen Temperaturen durchgeführt. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich verstärkt in den „28 °C“-Proben an. **(A)** Coomassie-Färbung. Von den Lysaten (L) wurden jeweils 30 µg Protein geladen. **(B)** Immunodetektion. Von den Lysaten (L) wurden jeweils ca. 95 µg Protein geladen. Zusätzlich wurden mittels Amicon Ultra - 0,5 ml 30K aufkonzentrierte Lysate (F) aufgetragen, wobei ca. 95 µg Protein eingesetzt wurden. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 21.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass als optimale Temperatur zur Expression von rMNU1$^{\Delta N52}$ in *E.coli* BL21-AI^{TM} 28 °C ermittelt wurde. Bei dieser Temperatur liegt ein großer Anteil des rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion vor. Auf Grund dessen wurde im Weiteren neben der Kontrollprobe (uninduziert) lediglich mit der „28 °C“-Probe weitergearbeitet.

Die Aufreinigung von rMNU1$^{\Delta N52}$ erfolgte unter Zuhilfenahme des am N-Terminus vorhandenen His-Tags (Anhang 1C). Der Erfolg der His-Tag-Aufreinigung (Vorgehen siehe Abschnitt 2.3.4.4.) wurde zunächst mittels Coomassie-Färbung überprüft, wobei sich in den Eluaten 1-3 eine Anreicherung einer etwa 110 kDa großen Proteinbande andeutet („←“, Abbildung 58A). Jedoch ist anzumerken, dass neben der vermutlich rMNU1$^{\Delta N52}$-spezifischen, zahlreiche weitere Proteinbanden verschiedener Größe noch in beträchtlichem Maße vorhanden sind. Auch die Immunodetektion weist auf eine Anreicherung der Proteinbande zwischen 100 und 130 kDa in den Eluaten im Vergleich zum Lysat hin („←“, Abbildung 59). Trotz des Aufreinigungsschritts treten allerdings noch zahlreiche, kleinere unspezifische Signale auf. Bei Vergleich mit der in Abbildung 57B dargestellten His-Tag-Detektion fällt auf, dass diese zusätzlichen Banden reproduzierbar sind, wobei wiederum das stärkste Signal bei etwa 35 kDa auftritt.

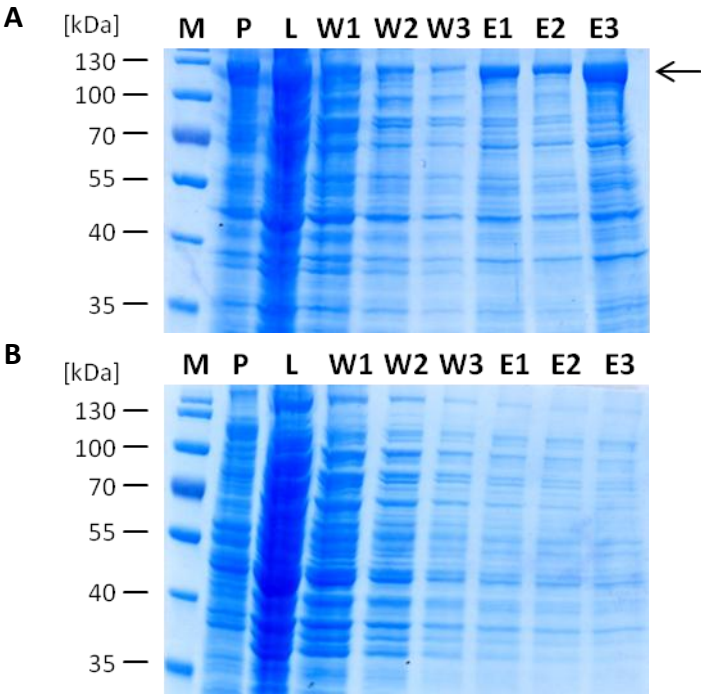


Abbildung 58: Coomassie-Färbung nach His-Tag-Aufreinigung von rMNU1$^{\Delta N52}$. **(A)** His-Tag-Aufreinigung einer bei 28 °C mit IPTG und Arabinose induzierten Kultur. Vom Lysat (L) wurden 93 µg und vom Eluat 1 (E1) 13,5 µg Protein geladen. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich in den Eluaten an. **(B)** His-Tag-Aufreinigung einer nicht mit IPTG und Arabinose induzierten Kontrollkultur. Vom Lysat (L) wurden 117 µg und vom Eluat 1 11,25 µg Protein geladen. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 22.

Die nach der His-Tag-Aufreinigung durchgeführte Coomassie-Analyse einer uninduzierten Kontrollprobe weist auf keine Anreicherung einzelner Proteinbanden hin (Abbildung 58B).

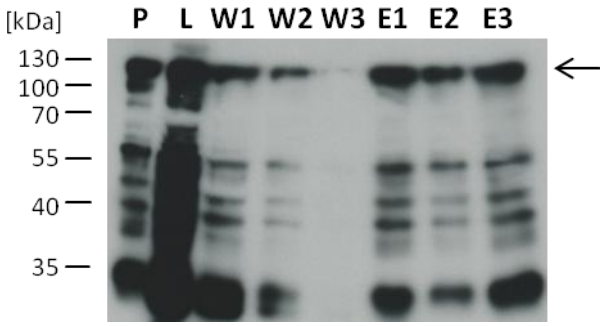


Abbildung 59: Immunodetektion nach His-Tag-Aufreinigung von rMNU1$^{\Delta N52}$. Erläuterungen siehe Abbildung 21B + Abbildung 58A.

Auf Grund der hier gezeigten Daten ist davon auszugehen, dass rMNU1$^{\Delta N52}$ in einem hohen Maße löslich ist. Darüber hinaus weist die Anreicherung der rMNU1$^{\Delta N52}$-spezifischen Bande in den Eluaten auf eine erfolgreiche His-Tag-Aufreinigung hin. Jedoch konnten die unspezifischen Signale durch diesen Aufreinigungsschritt nicht merklich reduziert werden.

3.2.7.2. Überexpression und His-Tag-Aufreinigung von rMNU2$^{\Delta N75}$

Gemäß dem TargetP 1.1 Server ist die subzelluläre Lokalisationssequenz von MNU2 72 AS lang. Die ermittelte mitochondriale Lokalisation von MNU1-N_{Term}:EGFP (Abbildung 31) sowie die Beteiligung von MNU2 am RNA-Metabolismus in Mitochondrien (siehe Abschnitte 3.2.4. + 3.2.5.) lassen vermuten, dass auch MNU2 *in vivo* in die Mitochondrien importiert wird.

Zur Generierung eines Überexpressions-Konstrukts wurden die Primer so gewählt, dass das rekombinante Protein am N-Terminus um 75 AS verkürzt ist (rMNU2$^{\Delta N75}$), jedoch das native Stoppkodon aufweist. Die Klonierung erfolgte analog zu rMNU1$^{\Delta N52}$, wobei mit dem Primerpaar At5g09840.UEx.H/At5g09840.UEx.R (P2 + P11, Abbildung 32A) ein ≈2560 bp großes DNA-Fragment erzeugt wurde. Mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *BamH*I/*Sal*I wurde dieses DNA-Fragment in die *Multiple Cloning Site* des Überexpressions-Vektors pET32a kloniert (Anhang 1C). Die Sequenz des erzeugten Plasmids wurde mittels Sequenzierung mit den Primern At5g09840.B, At5g09840.G (P9 + P4, Abbildung 32A), pETanti und pETsense überprüft. Wie bereits im Abschnitt 3.2.7.1. erwähnt, sind die Oligonukleotide pETanti und pETsense komplementär zu Bereichen außerhalb der *Multiple Cloning Site* von pET32a. In diesem Fall bindet pETsense stromaufwärts der *BamH*I- und pETanti stromabwärts der *Sal*I-Schnittstelle.

Analog zum im vorherigen Kapitel beschriebenen Vorgehen bei rMNU1$^{\Delta N52}$ (siehe Abschnitt 3.2.7.1.), wurde zunächst die optimale Temperatur zur Expression von rMNU2$^{\Delta N75}$ ermittelt. Unter Berücksichtigung der am N-Terminus von rMNU2$^{\Delta N75}$ vorhandenen Tags (Trx-, His- und S-Tag) besitzt das rekombinante Protein ein apparentes Molekulargewicht von 113,3 kDa.

Bei allen getesteten Temperaturen (22 °C, 28 °C und 37 °C) zeigt sich in einem mit Coomassie angefärbten SDS-Gel eine Anreicherung einer Proteinbande in der unlöslichen Fraktion („Pellet“) zwischen 100 und 130 kDa („←“, Abbildung 60A). Es ist anzunehmen, dass diese Proteinbande rMNU2$^{\Delta N75}$ repräsentiert. Die löslichen Fraktionen („Lysat“) deuten ebenfalls auf eine Anreicherung dieser Proteinbande im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle hin („←“, Abbildung 60A), wobei die stärkste Anreicherung bei 28 °C und 37 °C auftritt. Diese Beobachtungen werden durch eine Immunodetektion mit einem Antikörper gegen den His-Tag bestätigt. Sowohl in der löslichen Fraktion der „28 °C“- als auch in der der „37 °C“-Probe kann eine starke Akkumulation einer Proteinbande zwischen 100 und 130 kDa ausgemacht werden („←“, Abbildung 60B). In beiden Fällen wird jedoch neben dem rMNU2$^{\Delta N75}$-spezifischen Signal eine Vielzahl kleinerer Proteine detektiert, wobei die stärkste Anhäufung zwischen 50 und 60 kDa auftritt.

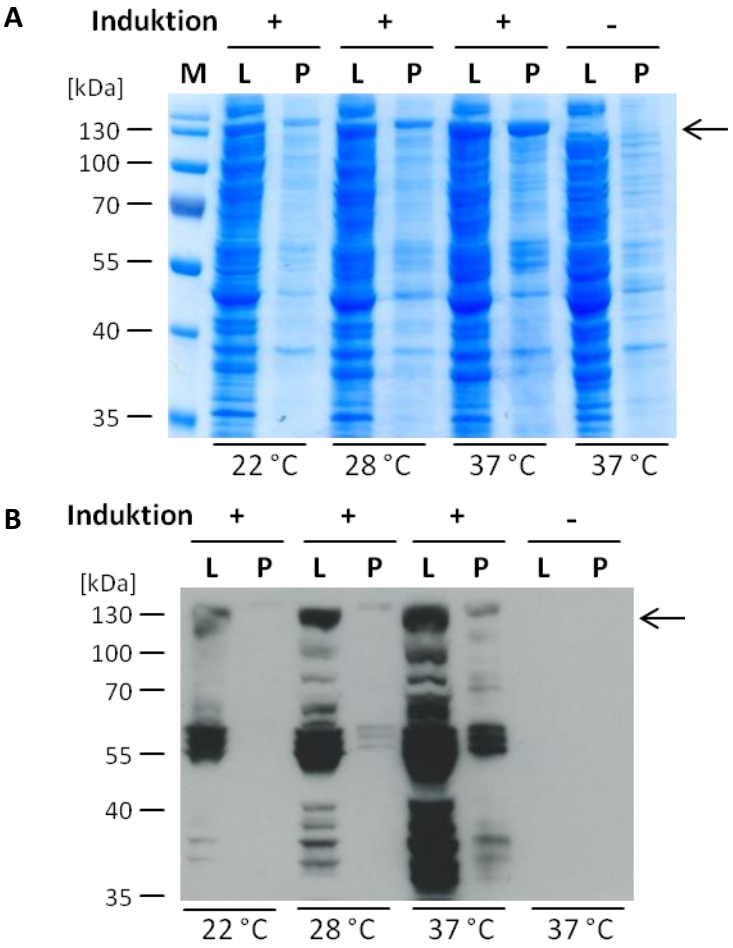


Abbildung 60: Überexpression von rMNU2$^{\Delta N75}$ in *E.coli* BL21-AI™ bei verschiedenen Temperaturen. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich verstärkt in den „28 °C“- und „37 °C“-Proben an. **(A)** Coomassie-Färbung. **(B)** Immunodetektion. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 21 + Abbildung 57.

Die gezeigten Daten weisen darauf hin, dass die Expression von rMNU2$^{\Delta N75}$ in *E.coli* BL21-AI™ optimalerweise bei 28 °C oder 37 °C erfolgt. In beiden Fällen liegt ein großer Anteil des re-

kombinanten Proteins in löslicher Form vor. Im Weiteren wurde neben der Kontrollprobe (uninduziert) lediglich die Probe der „28 °C“-Kultur verwendet.

Auf Grund des am N-Terminus von rMNU2$^{\Delta N75}$ vorhandenen His-Tags erfolgte die Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Protino® Ni-NTA Agarose (Vorgehen siehe Abschnitt 2.3.4.4.). Ein mit Coomassie angefärbtes SDS-Gel zeigt in den Eluaten 1-3 eine Anreicherung der vermutlich mit rMNU2$^{\Delta N75}$ korrelierenden Proteinbande zwischen 100 und 130 kDa („←“, Abbildung 61A). Darüber hinaus treten in allen Eluaten weitere Proteinbanden verschiedener Größe und Intensität auf. Die im Coomassie-Gel beobachtete Anreicherung der vermeintlich rMNU2$^{\Delta N75}$-spezifischen Proteinbande in den Eluaten wird durch eine Immunodetektion mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper bestätigt, wobei bei Eluat 3 das stärkste Signal erhalten wird („←“, Abbildung 62). Analog zu der in Abbildung 60B dargestellten Immunodetektion von rMNU2$^{\Delta N75}$, wird jedoch auch hier in allen Proben ein starkes Signal bei etwa 55 kDa detektiert. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein spezifisches Abbauprodukt von rMNU2$^{\Delta N75}$ oder ein nicht vollständig synthetisiertes Protein.

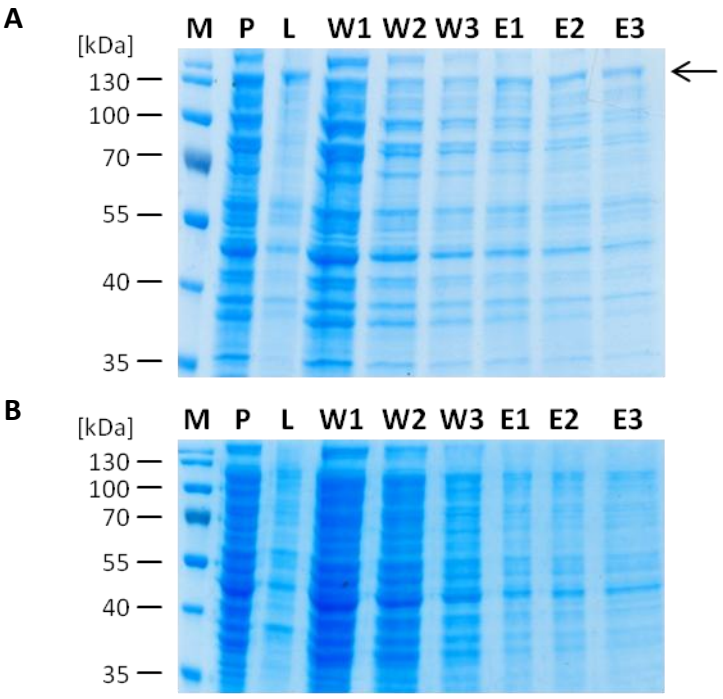


Abbildung 61: Coomassie-Färbung nach His-Tag-Aufreinigung von rMNU2$^{\Delta N75}$. **(A)** His-Tag-Aufreinigung einer bei 28 °C mit IPTG und Arabinose induzierten Kultur. Vom Lysat (L) wurden 30 µg und vom Eluat 1 (E1) 12 µg Protein geladen. Die mit einem Pfeil am rechten Rand markierte Proteinbande reichert sich in den Eluaten an. **(B)** His-Tag-Aufreinigung einer nicht mit IPTG und Arabinose induzierten Kontrollprobe. Vom Lysat wurden 30 µg und vom Eluat 1 13 µg Protein geladen. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 22 + Abbildung 58.

Eine parallel durchgeführte His-Tag-Aufreinigung und anschließende Coomassie-Analyse einer uninduzierten Kontrollprobe deuten erwartungsgemäß auf keine spezifische Anreicherung einzelner Proteinbanden hin (Abbildung 61B).

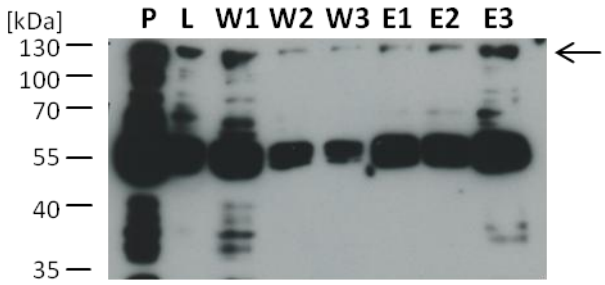


Abbildung 62: Immunodetektion nach His-Tag-Aufreinigung von rMNU2$^{\Delta N75}$. Erläuterungen siehe Abbildung 21B + Abbildung 61A

Abschließend kann festgestellt werden, dass rMNU2$^{\Delta N75}$ zu einem großen Anteil in der löslichen Fraktion vorliegt. Dies wird auch durch die Anreicherung in den Eluaten nach der His-Tag-Aufreinigung untermauert. Jedoch war es nicht möglich die unspezifischen, kleineren Signale durch diese Aufreinigung zu eliminieren.

4. Diskussion

4.1. Ein weiteres PPR-Protein der P-Unterfamilie ist an der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* beteiligt.

Anhand zahlreicher Beispiele konnte gezeigt werden, dass die *Pentatricopeptide Repeat*(PPR)-Proteine eine essentielle Rolle beim RNA-Metabolismus in Mitochondrien und Chloroplasten spielen [Barkan and Small 2014]. Einer dieser Prozesse ist die Reifung der 5‘-Enden mitochondrialer Transkripte. Obwohl über die genaue Bedeutung dieses Vorgangs bisher nur wenig bekannt ist, war es möglich einige PPR-Proteine zu benennen, die zur Generierung spezifischer mitochondrialer mRNA-5‘-Enden benötigt werden. Diese als RNA PROCESSING FACTORs (RPFs) bezeichneten Proteine gehören alle zur P-Unterfamilie der PPR-Proteine (Abbildung 1). Da neben den P-PPR-Motiven keine weiteren Domänen vorhanden sind, besitzen diese Proteine vermutlich keine enzymatische Aktivität [Binder et al. 2013].

Ausgehend vom *nad*2-mRNA-Polymorphismus zwischen den *A.thaliana* Ökotypen Col und Can-0, wurde in dieser Arbeit mit RPF7 ein weiteres PPR-Protein der P-Unterfamilie mit einer Beteiligung an der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte identifiziert. Sowohl in natürlichen *RPF7*-Mutanten (Can-0, Chat-1) als auch in der künstlich erzeugten T-DNA-Insertionslinie *rpf7-1* kommt es zur Akkumulation von 5‘-verlängerten *nad*2-Transkripten (Produkte b + c, Abbildung 7 und Abbildung 13A + Abbildung 16A + Abbildung 17B). Die damit einhergehende Reduktion von reifen *nad*2-mRNAs ist ein konkreter Hinweis dafür, dass RPF7 an der Bildung des 5‘-Endes dieser Transkripte beteiligt ist (Produkt a, Abbildung 7 und Abbildung 13A + Transkript 1, Abbildung 14 + Abbildung 15B). Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass das Einbringen des funktionalen *RPF7*(Col)-Allels in *RPF7*-Mutanten zu einer vollständigen Wiederherstellung der *nad*2-mRNA-Prozessierung führt (Abbildung 9 + Abbildung 13B + Abbildung 14). Somit kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass RPF7 für eine effiziente 5‘-Prozessierung der reifen *nad*2-mRNAs benötigt wird.

Die bisher beschriebenen Vertreter der RPFs beeinflussen die 5‘-Prozessierung von ein bis drei mitochondrialen Transkripten [Binder et al. 2013]. In Übereinstimmung mit dieser Tatsache scheint es, dass RPF7 spezifisch nur in die 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA involviert ist. So gibt ein, alle mitochondrialen Haupttranskripte umfassendes, CR-RT-PCR-Screening mit *rpf7-1* und Can-0 sowie den jeweils mit dem *RPF7*(Col)-Allel komplementierten Pflanzen keinerlei

Hinweise auf eine weitere Funktion von RPF7 in den Mitochondrien (Anhang 2). An dieser Stelle kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass RPF7 möglicherweise auch eine Funktion bei der Prozessierung plastidärer Transkripte hat. Dem widerspricht die Tatsache, dass ein Fusionsprotein zwischen der N-terminalen Lokalisationssequenz von RPF7 und dem Grün-fluoreszierenden Protein in die Mitochondrien und nicht in die Chloroplasten importiert wird [Colcombet et al. 2013]. Dies lässt vermuten, dass RPF7 auch *in vivo* ausschließlich in die Mitochondrien transportiert wird.

4.2. Die C-terminalen Aminosäuren sind essentiell für die Funktion von RPF7.

RPF7(Can-0) ist im Vergleich zum entsprechenden Allel aus Col am C-Terminus um 86 Aminosäuren (AS) verkürzt (Abbildung 19). Da Can-0 das gleiche *nad*2-Transkriptmuster wie *rpf7-1* zeigt (hier liegt ein vollständiger Gen-*Knockout* vor, Abbildung 12), ist davon auszugehen, dass RPF7(Can-0) auf Grund des durch einen einzelnen Nukleotidaustausch erzeugten Stoppkodons an AS-Position 377 nicht funktional ist (Abbildung 19A). Dies lässt den Schluss zu, dass die in Can-0 fehlenden 86 AS essentiell für ein funktionales RPF7-Protein sind. Möglicherweise sind einzelne AS innerhalb dieses Sequenzabschnittes in die spezifische Wechselwirkung mit der *nad*2-mRNA involviert. Jedoch ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die Funktionalität von RPF7 bezüglich der *nad*2-mRNA-5‘-Prozessierung nicht ausschließlich von den C-terminalen AS abhängt. Vielmehr ist vermutlich die Wechselwirkung des C-Terminus mit den restlichen AS nötig, um ein voll funktionsfähiges Protein zu gewährleisten.

Ein Vergleich der *nad*2-Transkriptmuster von Can-0, Chat-1 und *rpf7-1* legt nahe, dass auch das *RPF7*-Allel in Chat-1 nicht funktional ist (Abbildung 7 + Abbildung 13A + Abbildung 14). Wie anhand einer Sequenzanalyse gezeigt werden konnte, liegt in RPF7(Chat-1) eine 120 AS umfassende Deletion im Vergleich zu RPF7(Col) vor (Abbildung 19A + Anhang 3B). Ähnlich wie bei RPF7(Can-0) fehlt hier ein großer Teil des RPF7(Col)-Proteins. Es ist anzunehmen, dass der 120 AS umfassende Sequenzabschnitt, ähnlich wie die oben erwähnten C-terminalen 86 AS, ebenfalls benötigt wird, um die Funktionalität bezüglich der 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA zu gewährleisten. Von den bei RPF7(Can-0) fehlenden 86 AS sind bei RPF7(Chat-1) nur die ersten 17 AS deletiert (Abbildung 19A). Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass lediglich die Anwesenheit dieser kurzen AS-Abfolge für ein funktionsfä-

higes RPF7-Protein verantwortlich ist. Vielmehr scheint es, dass die Deletion eines jeweils relativ großen AS-Abschnitts bei RPF7(Can-0) und RPF7(Chat-1) dazu führt, dass sich die Proteinfaltung bzw. die Anordnung wichtiger, funktioneller AS-Reste im Vergleich zur Wildtyp-Situation gravierend verändert und somit ein nicht-funktionales RPF7-Protein vorliegt. Dies hat zur Folge, dass die 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA in Can-0 und Chat-1 im Vergleich zum Wildtyp weniger effizient erfolgt.

Wie in den vorherigen Ausführungen erläutert, scheinen gemäß der Analyse von RPF7(Can-0) die C-terminalen 86 AS einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität des Proteins zu haben. Anhand der bisher durchgeführten Analysen können jedoch keine Aussagen bezüglich wichtiger Positionen bzw. Bereiche innerhalb dieses AS-Sequenzabschnittes getroffen werden. Zwar weisen die *A.thaliana* Ökotypen Sf-2, Sg-1 und Wei-0 einzelne AS-Austausche innerhalb der letzten 86 AS auf (Anhang 4), jedoch haben diese Veränderungen keine Auswirkung auf die *nad*2-mRNA-Prozessierung (Abbildung 20). Um konkretere Aussagen über vermeintlich wichtige AS-Positionen im C-terminalen Bereich von RPF7(Col) treffen zu können, ist es notwendig künstlich Mutanten zu generieren, die AS-Austausche oder -Deletionen innerhalb der letzten 86 AS aufweisen. Alternativ dazu sollten noch mehr *A.thaliana* Ökotypen anhand der Sequenzdaten des „1001 Genomes Project“ (http:// 1001genomes.org) hinsichtlich einer Veränderung in diesem Bereich des *RPF7*-Gens untersucht werden, um weitere natürliche *RPF7*-Mutanten zu identifizieren. Auf diese Weise können wichtige, von unwichtigen AS-Positionen differenziert werden. Ist beispielsweise trotz einer großen Variabilität an einer AS-Position die Effizienz der *nad*2-mRNA-5‘-Prozessierung nicht merklich verringert, kann davon ausgegangen werden, dass diese AS nicht maßgeblich zur Funktionalität von RPF7 beiträgt. Kommt es demgegenüber lediglich bei solchen *A.thaliana* Ökotypen zu einer gestörten *nad*2-mRNA-Prozessierung, die an einer bestimmten AS-Position im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede zeigen, ist dies ein starkes Indiz für eine wichtige AS-Position innerhalb des RPF7-Proteins. Führt die gezielte Punkt-Mutation einer solchen vermeintlich wichtigen AS zu Effizienzverlusten bezüglich der *nad*2-mRNA-Prozessierung, ist davon auszugehen, dass die im Wildtyp vorhandene AS an der konkreten Position essentiell für ein funktionales RPF7-Protein ist.

4.3. Zur eindeutigen Definition der endonukleolytischen Schnittstelle der *nad*2-mRNA wird neben RPF7 ein weiteres Protein benötigt.

Der Ausfall von RPF7 führt dazu, dass es zu einer Reduktion des *nad*2-Haupttranskripts und einer damit verbundenen Anhäufung von größeren *nad*2-Transkripten mit weiter stromaufwärts lokalisierten 5‘-Enden kommt (Abbildung 15 + Abbildung 16A + Abbildung 17B). Dies deutet darauf hin, dass RPF7 in irgendeiner Art und Weise an der Definition der spezifischen Schnittstelle zur (endonukleolytischen) Generierung der reifen *nad*2-mRNA mit einem 5‘-Ende bei -122 beteiligt ist. Gleichzeitig wird jedoch trotz der Abwesenheit eines intakten *RPF7*-Allels (Can-0, Chat-1, *rpf7-1*) das reife *nad*2-Transkript in noch beträchtlichem Umfang gebildet. Dieses Phänomen wird sowohl in der CR-RT-PCR- als auch in der Northern-Blot-Analyse der *nad*2-Transkripte beobachtet (Produkt a, Abbildung 7 und Abbildung 13A + Transkript 1, Abbildung 14) und lässt vermuten, dass neben RPF7 mindestens ein weiteres (PPR)-Protein an der Generierung des reifen 5‘-Endes der *nad*2-mRNA bzw. an der Festlegung der Schnittstelle beteiligt ist.

In diesem Zusammenhang soll kurz auf RPF5 eingegangen werden. Dieses Protein ist u.a. an der 5‘-Prozessierung der *atp*9-mRNA beteiligt. Die Abwesenheit von RPF5 führt zu einer Anhäufung größerer *atp*9-Transkripte. Dem gegenüber ist der Anteil an reifen *atp*9-Transkripten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Dies lässt zunächst vermuten, dass RPF5 bei der 5‘-Prozessierung der *atp*9-Transkripten nur eine unwesentliche Rolle spielt und sehr wahrscheinlich ein weiteres (PPR)-Protein in die 5‘-Prozessierung der reifen *atp*9-mRNA involviert ist [Hauler et al. 2013]. Eine nachfolgende Analyse konnte RPF5 jedoch eine weit wichtigere Bedeutung als bisher vermutet zuweisen. So gibt es Hinweise, dass RPF5 vor allem in die 5‘-Prozessierung von größeren *atp*9-Vorläufermolekülen involviert ist [Rimola 2014]. Ob RPF7 analog zu RPF5 auch an der 5‘-Prozessierung von *nad*2-Vorläufertranskripten maßgeblich beteiligt ist, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht beurteilt werden.

Mit Hilfe eines kombinatorischen Codes, der die Interaktion von RNA-Molekülen mit einzelnen AS innerhalb der PPR-Motive beschreibt (siehe Abschnitt 1.2.), kann für die RPFs eine vermeintliche Bindungsstelle definiert werden [Binder et al. 2013]. RPF1, 2, 3, 5 und 6 weisen 14-17 PPR-Motive auf. Die sich daraus ergebenden Bindungsstellen umfassen zwischen 11 und 14 nt [Binder et al. 2013; Stoll et al. 2015]. Dies stimmt größtenteils mit der Beobachtung überein, dass von PPR-Proteinen gebundene *cis*-Elemente häufig größer als 12 nt sind [Barkan

and Small 2014]. Die definierte Abfolge von 11-14 nt gewährleistet eine relativ hohe RNA-Spezifität der RPFs. Darüber hinaus befinden sich die vorhergesagten Bindungsstellen jeweils stromaufwärts des beeinflussten 5‘-Endes, wobei der Abstand zwischen dem 3‘-terminalen Nukleotid der Bindungsstelle und dem reifen 5‘-Ende 29-121 nt beträgt. Allerdings ist hier anzumerken, dass es bisher noch nicht möglich war die vorhergesagten Protein-RNA-Wechselwirkungen *in vitro* zu bestätigen [Binder et al. 2013; Stoll et al. 2015]. RPF7 ist mit acht PPR-Motiven im Vergleich zu den anderen RPFs ein eher kleines Protein. Theoretisch können diese acht PPR-Motive auf RNA-Ebene eine Sequenzabfolge von sieben Nukleotiden definieren, was aber vermutlich für eine spezifische Bindung zu wenig ist. Mit Hilfe beschriebener AS/Nukleotid-Kombinationen des oben erwähnten kombinatorischen Codes [Barkan et al. 2012] wurde trotzdem versucht die Erkennungssequenz von RPF7 vorherzusagen (Abbildung 63). Jedoch ist es lediglich möglich vier der sieben AS-Paare (6. AS von PPR-Motiv n + 1. AS von PPR-Motiv n+1) eindeutig einem Nukleotid zuzuordnen (Abbildung 63). Dies kann damit erklärt werden, dass bisher nur etwa zwei Drittel der natürlich vorkommenden PPR-Motiv/RNA-Kombinationen durch den kombinatorischen Code abgedeckt sind [Barkan et al. 2012]. Infolgedessen war es bislang noch nicht möglich die ermittelte postulierte Erkennungssequenz von RPF7 einem konkreten Sequenzabschnitt innerhalb der 5‘-UTR von *nad*2 zuzuordnen.

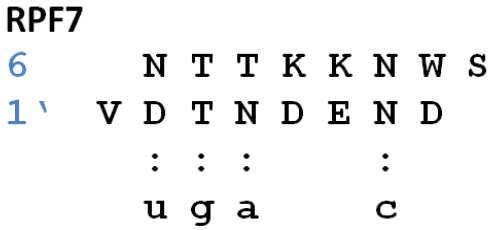


Abbildung 63: Postulierte Erkennungssequenz von RPF7. Die AS an Position 6 und 1‘ (Position 1 des nächsten PPR-Motivs) sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die gemäß Barkan et al. [2012] definierten AS/Nukleotid-Kombinationen sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Unter Berücksichtigung der relativen Lage der vorhergesagten Bindungsstellen der anderen RPFs, wurde der Versuch unternommen *in vitro* eine Interaktion zwischen rRPF7$^{\Delta N117}$ und der *nad*2-mRNA nachzuweisen, wobei dies unter den bisher getesteten Bedingungen nicht möglich war (Abbildung 26 + Abbildung 27 + Abbildung 28 + Abbildung 29). So geben die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Bindungsassays keinerlei Hinweise auf eine spezifische Interaktion zwischen rRPF7$^{\Delta N117}$ und der *nad*2-mRNA. Diese Tatsache schließt jedoch nicht aus, dass RPF7 *in vivo* in irgendeiner Art und Weise mit der *nad*2-mRNA interagiert. Vermutlich ist die alleinige Wechselwirkung des Proteins mit der mRNA nicht stark bzw. nicht effizient genug, um unter den getesteten Bedingungen einen stabilen Protein-RNA-Komplex auszubil-

den. Darüber hinaus ist es auch denkbar, dass das verwendete rekombinante Protein in zu geringer Konzentration vorlag. Obwohl nach der His-Tag-Aufreinigung von rRPF7$^{\Delta N117}$ im Western-Blot in den Eluaten lediglich eine Bande auf der erwarteten Höhe auftritt („←“, Abbildung 23), weist das entsprechende mit Coomassie gefärbte SDS-Gel auf einen noch beträchtlichen Anteil anderer Proteine hin (Abbildung 22A). Somit ist davon auszugehen, dass nur ein geringer Prozentsatz an rRPF7$^{\Delta N117}$ in der für die Bindungsassays verwendeten Proteinprobe vorlag.

Zusätzlich ist es, wie bereits zuvor angedeutet, sehr wahrscheinlich, dass *in vivo* ein weiteres (PPR)-Protein benötigt wird, um die Prozessierungsstelle zu definieren bzw. eine effiziente Wechselwirkung zwischen RPF7 und der *nad*2-mRNA sicher zustellen. Unter der Annahme, dass es sich bei dem zusätzlich involvierten Protein um ein PPR-Protein handelt, kann das Agieren als Heterodimer postuliert werden. Vermutlich vermittelt das andere PPR-Protein die spezifische Bindung innerhalb der 5‘-UTR von *nad*2 und RPF7 gewährleistet daraufhin eine effiziente 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA. Handelt es sich ebenfalls um ein eher kleines PPR-Protein, ist es natürlich auch möglich, dass beide PPR-Proteine direkt mit der RNA wechselwirken und sich somit die (durch beide Proteine definierte) Erkennungssequenz vergrößert. Dies kann, wie im Fall der anderen RPFs, zu einer Bindungsstelle in einer Größenordnung von 11-14 nt und damit zu einer relativ hohen Spezifität führen.

Das ins Spleißen involvierte PPR-Protein THA8 verhält sich in gewisser Weise ähnlich wie RPF7. Dieses Protein weist lediglich vier PPR-Motive auf und beeinflusst die Entfernung von zwei Typ II Introns in Chloroplasten [Khrouchtchova et al. 2012]. Analog zur ausbleibenden Bindung von rRPF7$^{\Delta N117}$ an die *nad*2-mRNA *in vitro*, konnte auch rekombinant erzeugtes THA8 *in vitro* kein spezifisches Spleißen des *ycf*3-2-Introns, einem Zielmolekül von THA8, vermitteln. Dies wird damit erklärt, dass vermutlich andere Proteine benötigt werden, um THA8 spezifisch zu den Ziel-Introns zu leiten [Khrouchtchova et al. 2012].

4.4. Die 5‘-Prozessierung ist wichtig für die Stabilität von *nad*2-Transkripten in *A.thaliana*.

Obwohl mit den RPFs PPR-Proteine identifiziert wurden, die die 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte maßgeblich beeinflussen, ist bisher nur wenig über die Relevanz dieses Prozesses bekannt. Die Abwesenheit eines RPF und die damit einhergehende verminderte 5‘-Prozessierung der entsprechenden Transkripte, hat in den meisten Fällen keine nachteili-

gen Auswirkungen auf das Wachstum der jeweiligen Mutanten [Binder et al. 2013]. So zeigen auch die in dieser Arbeit charakterisierten *RPF7*-Mutanten Can-0, Chat-1 und *rpf7-1* im Vergleich zum Wildtyp keine phänotypischen Veränderungen, die in Zusammenhang mit einem nicht-funktionalen *RPF7*-Allel stehen. Zwar gehört Can-0 im Gegensatz zu Col und Chat-1 zu den spät-blühenden *A.thaliana* Ökotypen, doch für den Blühstimulus ist hier vermutlich das Gen *FLOWERING LOCUS C* verantwortlich [Schwartz et al. 2009]. Darüber hinaus verändert sich das Blühverhalten auch nach dem Einbringen des *RPF7*(Col)-Allels nicht, sodass die Veränderung in der 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA als unabhängig vom Blühstimulus zu bewerten ist. Bisher gibt es auch noch keinerlei Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Blühstimulus und dem mRNA-Metabolismus in Mitochondrien. Im Gegensatz zu den *RPF7*-Mutanten sind im Fall von *rpf5-1* nachteilige Effekte auf das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp beschrieben. So kommt es bei Abwesenheit von RPF5 zu einer verringerten Keimfähigkeit der Samen [Hauler et al. 2013].

Die sich oftmals scheinbar nicht nachteilig auf die Fitness von RPF-Mutanten auswirkende verminderte 5‘-Prozessierung kann auch damit erklärt werden, dass mitochondrial-kodierte Proteine relativ stabil sind [Nelson et al. 2013]. So reicht vermutlich schon eine verhältnismäßig geringe Menge an korrekt prozessierter mRNA aus, um die benötigte Menge an Protein zu synthetisieren. Bei Abwesenheit von RPF2, der in die *nad*9-mRNA-Prozessierung involviert ist, ist beispielsweise die Menge an *Nad*9-Protein im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert [Jonietz et al. 2010]. Ähnlich ist es bei *rpf5-1*. RPF5 ist u.a. für die *nad*6-mRNA-Prozessierung erforderlich, jedoch hat die Abwesenheit dieses Proteins keine Auswirkung auf den *Nad*6-Proteinlevel [Hauler et al. 2013]. Dem gegenüber tritt bei *rpf3-1* (RPF3 ist in die *ccmC*-mRNA-Prozessierung involviert) eine starke Verminderung des *CcmC*-Proteinlevels auf [Jonietz et al. 2011]. Die ausbleibenden phänotypischen Nachteile von *rpf3-1* gegenüber dem Wildtyp können damit erklärt werden, dass die vorhandene Menge an *CcmC*-Protein auf Grund der hohen Stabilität ausreicht, um die Reifung von Cytochrom *c* zu gewährleisten. Andererseits ist es denkbar, dass das *CcmC*-Protein in *A.thaliana* keine essentielle Funktion bei der Biosynthese von Cytochrom *c* ausübt [Jonietz et al. 2011].

Beim Vergleich der Analysen der bisher bekannten RPFs treten Widersprüche bezüglich des Einflusses einer korrekten 5‘-Prozessierung auf die Stabilität der entsprechenden Transkripte auf. So scheint trotz des Fehlens von RPF1 im Ökotyp L*er* ein 5‘-verlängertes *nad*4-

Vorläufertranskript eine vergleichbare Stabilität wie das reife *nad*4-Transkript im Ökotyp Col zu besitzen [Hölzle et al. 2011]. Dem gegenüber wurde beobachtet, dass bei Abwesenheit von RPF5 ein 5‘-verlängerter Vorläufer der reifen 26S rRNA vorliegt, der deutlich instabiler als die reife 26S rRNA ist [Hauler et al. 2013]. Bei *rpf7-1* ist der Level aller *nad*2-Transkripte im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abbildung 15). Eine *Real-Time* qRT-PCR-Analyse gegen einen Bereich stromabwärts des reifen 3‘-Endes der *nad*2-mRNA weist auf eine zusätzliche Verringerung von 3‘-verlängerten *nad*2-Transkripten bei Abwesenheit von RPF7 hin (*rpf7-1*, Abbildung 17D). Dies lässt den Schluss zu, dass sich, wie im Fall der 26S rRNA beschrieben [Hauler et al. 2013], eine verminderte 5‘-Prozessierung negativ auf die Stabilität der *nad*2-mRNA auswirkt. Ob der hier beobachtete Zusammenhang zwischen einer gestörten 5‘-Prozessierung und der Stabilität von mitochondrialen Transkripten generell auf alle mitochondrialen mRNAs übertragen werden kann, bleibt jedoch fraglich.

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Relevanz einer korrekten 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte für deren Stabilität zu erhalten, wurden zusätzlich Analysen mit der Linie amiR-PNP-3, einer transgenen *A.thaliana* Linie, die eine gegen die Polynukleotid-Phosphorylase(PNPase)-mRNA gerichtete *artificial microRNA* (amiRNA) exprimiert [Zendler 2013], durchgeführt. Die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse mit einer zu einem Bereich stromabwärts des reifen 3‘-Endes der *nad*2-mRNA komplementären Sonde (Sonde c, Abbildung 6 + Abbildung 16B) sowie eine auf diesen Bereich durchgeführte *Real-Time* qRT-PCR (Abbildung 17D), zeigen deutlich, dass es bei amiR-PNP-3 zu einer sehr starken Akkumulation von 3‘-unprozessierten *nad*2-mRNAs kommt. Eine vergleichbare Anhäufung von 3‘-unreifen mRNAs kann auch in einer entsprechenden Northern-Blot-Analyse auf *nad*3-*rps*12-Transkripte beobachtet werden (Abbildung 49B). Dies bestätigt die sehr wichtige Funktion der PNPase bei der 3‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte. Die Tatsache, dass sich in amiR-PNP-3 zusätzlich eine Anhäufung von 5‘-unprozessierten *nad*2-mRNAs andeutet (Abbildung 16A + Abbildung 17B), kann damit erklärt werden, dass die PNPase am Abbau solcher Moleküle beteiligt ist. Eine Funktion der PNPase in der Beseitigung von nicht (mehr) benötigten RNA-Molekülen wurde bereits beschrieben [Perrin et al. 2004a; Perrin et al. 2004b]. Die beobachtete Anhäufung der 5‘-verlängerten *nad*2-Transkripte ist ein weiteres starkes Indiz dafür, dass 5‘-unreife Transkripte auf Grund einer verminderten Stabilität effektiv aus dem RNA-Pool entfernt werden und die PNPase dabei eine wichtige Rolle spielt.

Bisher war es noch nicht möglich Pflanzen zu etablieren, die im *rpf7-1*-Hintergrund die amiRNA gegen die PNPase-mRNA in dem Maße exprimieren, dass es zu einer ausreichenden Reduktion des PNPase-Transkriptlevels kommt. Vielleicht ist es mehr erfolgsversprechend, die amiRNA in natürlichen *RPF7*-Mutanten (Can-0, Chat-1) zu exprimieren, da möglicherweise die bei *rpf7-1* vorhandene T-DNA die Wirkungsweise der amiRNA vermindert. Mit solchen Pflanzen kann die Auswirkung einer simultan verminderten 3‘- und 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA untersucht werden. Darüber hinaus ist die analoge Etablierung solcher amiRNA-Linien bei Abwesenheit der anderen RPFs denkbar, wobei je nach Verfügbarkeit künstlich erzeugte und/oder natürlich vorkommende Mutanten verwendet werden können. Dadurch sollte es möglich sein, mehr allgemein gültige Aussagen bezüglich des Zusammenhangs zwischen 3‘- und 5‘-Prozessierung zu treffen. Ähnlich wie bei *rpf7-1*, konnten bisher auch keine *rpf5-1*/amiR-PNP-3-Pflanzen etabliert werden. Jedoch wurde gezeigt, dass die von RPF5 vermittelte 5‘-Prozessierung großer *atp*9-Vorläufertranskripte der 3‘-Prozessierung durch die PNPase vorangestellt ist [Rimola 2014].

4.5. Zwei mitochondriale Nukleasen sind in die Prozessierung einzelner mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* involviert.

Bereits in vorherigen Analysen wurde die Vermutung aufgestellt, dass viele der 5‘-Enden mitochondrialer Transkripte endonukleolytisch entstehen [Binder et al. 2013]. Auch die in dieser Arbeit untersuchte 5‘-Prozessierung der *nad*2-mRNA weist auf eine endonukleolytische Bildung des *nad*2-Haupttranskripts hin. So kommt es bei einer verminderten 5‘-Prozessierung zur Akkumulation von definierten 5‘-verlängerten *nad*2-Vorläufertranskripten. (Transkripte 2 + 3, Abbildung 14 und Abbildung 16A). Jedoch konnten bisher noch keine *nad*2-5‘-*Leader*-Moleküle, wie es etwa im Fall von *nad*4 möglich war [Hölzle et al. 2011], nachgewiesen werden (Abbildung 2).

Über die Identität der vermutlich in die 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte involvierten putativen Endonukleasen war bisher nichts bekannt. Auf Grund dessen wurde zunächst versucht mittels *in silico*-Analysen mögliche Kandidaten für die Endonuklease(n) zu benennen. Durch die Analyse von Expressionsprofilen einzelner RPFs konnte mit At5g09840.1 (*MNU2*) und At5g64710.1 (*MNU1*) eine Coexpression ermittelt werden. Das Vorhandensein von konservierten Domänen mit postulierter Nuklease- und RNA-Bindungs-Aktivität unterstützt die Vermutung [Anantharaman et al. 2006; Anantharaman et al. 2010; Callebaut

and Mornon 2010], dass die entsprechenden Proteine in den RNA-Metabolismus involviert sind und somit als mögliche Kandidaten für die gesuchte Endonuklease in Betracht gezogen werden können. Darüber hinaus weist die Lokalisations-Analyse von MNU1-N_{Term}:EGFP eindeutig darauf hin, dass MNU1 auch *in vivo* in die Mitochondrien transportiert wird (Abbildung 31). Obwohl keine entsprechende Untersuchung für MNU2 vorliegt, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch dieses Protein *in vivo* in die Mitochondrien importiert wird, da bei Abwesenheit von MNU2 im Vergleich zu MNU1 oftmals sogar stärkere Auswirkungen auf die mitochondrialen Transkriptmuster beobachtet werden (Anhang 5). Außerdem weisen entsprechende Einträge in der SUBA-Datenbank auf eine Lokalisation von MNU2 in den Mitochondrien hin (http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/flatfile.php?id=At5g09840).

Die Veränderungen im Transkriptmuster der mitochondrialen Gene *atp*8, *ccmF*$_{N2}$, *nad*3-*rps*12 und *nad*9 bei Abwesenheit von MNU1 oder MNU2 lassen vermuten, dass diese zwei Proteine in irgendeiner Art und Weise in die Transkription oder Prozessierung der entsprechenden mRNAs involviert sind. Die Ausprägungen der beobachteten Veränderungen sind dabei recht unterschiedlich. So kommt es bei *ccmF*$_{N2}$ und *nad*3-*rps*12 zur Akkumulation größerer 5‘-verlängerter Transkripte (*ccmF*$_{N2}$: Abbildung 44 + Abbildung 45; *nad*3-*rps*12: Abbildung 48 + Abbildung 49A), während im Fall von *nad*9 eines der beiden Haupttranskripte nicht gebildet wird (Abbildung 51). Dem gegenüber ist der *atp*8-Transkriptlevel im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Abbildung 42).

Das in den Mutanten (*mnu1-1*, *mnu1-2* bzw. *mnu2-1*) veränderte *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmuster gleicht nach dem Einbringen der Wildtyp-Allele von *MNU1* bzw. *MNU2* dem des Wildtyps (Abbildung 37A + Abbildung 38). Somit ist davon auszugehen, dass die gestörte *ccmF*$_{N2}$-Prozessierung in *mnu1-1*, *mnu1-2* bzw. *mnu2-1* lediglich durch das Fehlen von MNU1 bzw. MNU2 bedingt ist und nicht von weiteren T-DNA-Insertionen oder anderen Mutationen verursacht wird. Analog dazu sind Modifizierungen der anderen Transkriptmuster vermutlich ebenfalls auf die Abwesenheit eines der beiden Proteine zurückzuführen. So wird auf CR-RT-PCR-Ebene bezüglich der Gene *nad*3-*rps*12 und *nad*9 nach Einbringen der Wildtyp-Allele in die entsprechenden Mutanten jeweils die Wildtypsituation wieder hergestellt (Anhang 6.1). Auch in Bezug auf *atp*8 zeigen die komplementierten Linien den Wildtyp-Phänotyp (Anhang 6.2).

4.5.1. MNU1 und MNU2 sind an der endonukleolytischen 5‘-Prozessierung von *ccmF*$_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-Transkripten beteiligt.

Der Ausfall von MNU1 und/oder MNU2 führt zu massiven Veränderungen des *ccmF*$_{N2}$-Transkriptmusters. So können im Fall von *mnu2-1* keine *ccmF*$_{N2}$-Haupttranskripte in einer Northern-Blot-Analyse gegen das *ccmF*$_{N2}$-Leseraster detektiert werden. Dem gegenüber ist bei Abwesenheit von MNU1 (*mnu1-1*, *mnu1-2*) zumindest noch ein geringer Anteil an reifen *ccmF*$_{N2}$-Transkripten vorhanden (Transkript 1, Abbildung 44). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass MNU1 und MNU2 eine ähnliche Funktion bei der Generierung der *ccmF*$_{N2}$-Haupttranskripte haben und als Heterodimer oder als Teil eines Heteromers agieren. Die Akkumulation von größeren, 5‘-verlängerten Transkripten (Transkripte 2 + 3, Abbildung 44) in den Linien *mnu1-1*, *mnu1-2* und *mnu2-1* weist zusätzlich auf einen oder mehrere fehlende(n) endonukleolytische(n) Schnitt(e) hin.

Die im Fall von *mnu1-1* und *mnu1-2* in geringen Mengen vorhandenen reifen *ccmF*$_{N2}$-Transkripte können damit erklärt werden, dass MNU2 den endonukleolytischen Schnitt zur Generierung der 5‘-Enden dieser Transkripte auch „alleine“, jedoch im Vergleich zum MNU1/MNU2-Heterodimer mit deutlich geringerer Effizienz, vermitteln kann (Abbildung 64A). Dem gegenüber kann MNU1 diesen Schnitt nicht alleine einleiten.

Eine Northern-Blot-Analyse gegen das *ccmF*$_{N2}$-Leseraster sowie eine *Real-Time* qRT-PCR auf einen Bereich stromaufwärts des 5‘-Endes bei -235 (korreliert mit Transkript 2, Abbildung 44) weisen auf eine schwache Akkumulation eines 1,5 kb großen Moleküls sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelmutanten hin (Transkript 3, Abbildung 44 + Abbildung 45). Es ist anzunehmen, dass diese RNA ein 5‘-verlängertes Vorläufermolekül der reifen *ccmF*$_{N2}$-mRNAs darstellt, da ihm eindeutig das neu identifizierte 5‘-Ende bei -729 zugeordnet werden kann und keine Veränderungen am 3‘-Ende beobachtet wurden (Anhang 7.2B). Die leichte Anhäufung dieses *ccmF*$_{N2}$-Transkripts bei Abwesenheit von MNU1 und MNU2 kann damit erklärt werden, dass beide Proteine die Effizienz zur Generierung von Transkript 2 positiv beeinflussen. Dies setzt allerdings die Annahme voraus, dass Transkript 3 ein Vorläufermolekül von Transkript 2 ist. Der notwendige endonukleolytische Schnitt, der letzten Endes zur Bildung des 5‘-Endes bei -235 führt, wird vermutlich von einem anderen Protein mit endonukleolytischer Aktivität bewerkstelligt (Abbildung 64A). Es ist anzunehmen, dass dieses andere Protein mit MNU1 und MNU2 ein Heteromer bildet. Die Abwesenheit von Transkript 2 im Wildtyp kann damit erklärt werden, dass MNU1 und MNU2 dieses sehr effizient prozes-

sieren und folglich keine detektierbaren Mengen des *ccmF*$_{N2}$-Vorläufertranskripts vorliegen (Transkript 2, Col, Abbildung 44).

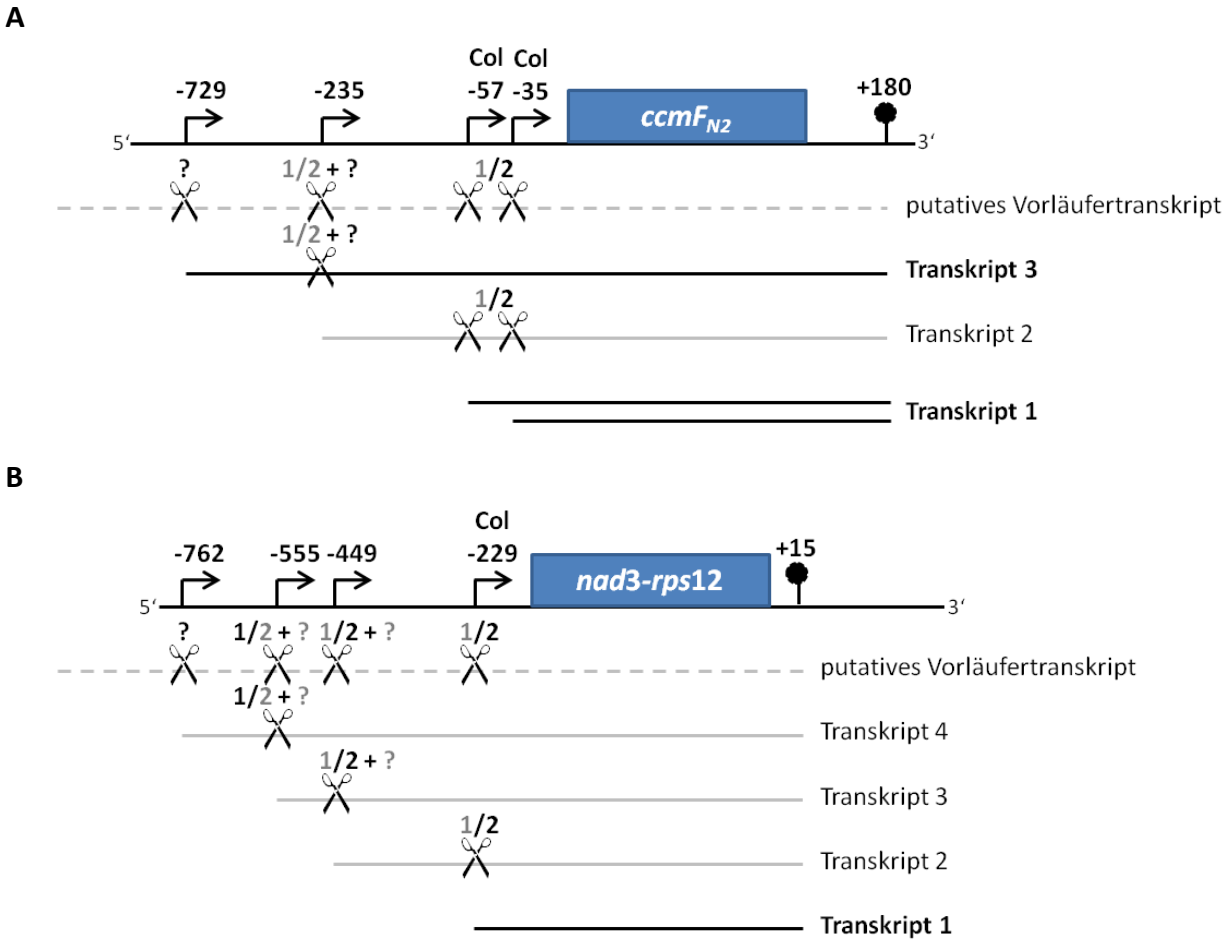


Abbildung 64: Modell der Wirkungsweise von MNU1 und MNU2 bei der 5'-Reifung von *ccmF*$_{N2}$- (A) bzw. *nad*3-*rps*12-Transkripten (B). Mit einer schwarzen Linie sind die jeweiligen Haupttranskripte dargestellt. Die grauen Linien symbolisieren 5'-unreife Transkripte. Die Bezeichnungen auf der rechten Seite entsprechen denen der Northern-Blot-Analysen gegen das jeweilige Leseraster (*ccmF*$_{N2}$, Abbildung 44 + *nad*3-*rps*12, Abbildung 48). Zusätzlich ist ein putatives Vorläufertranskript mit einer grau gestrichelten Linie angedeutet. Mögliche endonukleolytische Schnitte sind durch eine offene Schere symbolisiert. Oberhalb der putativen endonukleolytischen Schnittstellen sind die an diesem Schnitt beteiligten Proteine benannt; schwarz geschriebene Proteine sind essentiell für den jeweiligen Schnitt, in grau geschriebene nicht. 1: MNU1, 2: MNU2, ?: unbekannte Endonuklease. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 36 (*ccmF*$_{N2}$) und Abbildung 46 (*nad*3-*rps*12).

Trotz der Tatsache, dass keine weiteren Vorläufermoleküle beobachtet wurden, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass alle detektierten *ccmF*$_{N2}$-Transkripte aus einem gemeinsamen Vorläufertranskript entstehen. In diesem Fall ist für den (endonukleolytischen) Schnitt zur Generierung von Transkript 3 (5'-Ende bei -729) ein weiteres bisher unbekanntes Protein mit endonukleolytischer Aktivität erforderlich (Abbildung 64A).

In der Northern-Blot-Analyse gegen das *nad*3-*rps*12-Leseraster zeigt sich deutlich, dass MNU2 im Vergleich zu MNU1 einen stärkeren Einfluss auf die Bildung der reifen *nad*3-*rps*12-

mRNA hat. So kann bei Abwesenheit von MNU1 (*mnu1-1*, *mnu1-2*) noch eine vergleichsweise große Menge an reifem Transkript (Produkt d, Abbildung 47A + Transkript 1, Abbildung 48) detektiert werden. Im Gegensatz dazu resultiert die Abwesenheit von MNU2 (*mnu2-1*) in einem weit drastischeren Effekt. In *mnu2-1* ist das *nad*3-*rps*12-Haupttranskript fast nicht mehr detektierbar und es kommt dagegen zu einer schwachen Akkumulation von größeren Molekülen (Transkripte 3 + 4, Abbildung 48). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die beiden Proteine in verschiedene Schritte bei der Generierung des reifen *nad*3-*rps*12-Transkripts involviert oder unterschiedlich wichtig für die einzelnen Schritte sind (Abbildung 64B). Jedoch scheint die Effizienz in Abwesenheit des jeweils anderen Proteins verringert zu sein.

Möglicherweise vermittelt vorzugsweise MNU2 den finalen (endonukleolytischen) Schnitt, der zur Bildung des reifen *nad*3-*rps*12-Transkripts führt (Abbildung 64B). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass bei *mnu1-1* und *mnu1-2* zumindest geringe Mengen des *nad*3-*rps*12-Haupttranskripts vorliegen (Transkript 1, Abbildung 48). MNU1 kann dagegen die Bildung des reifen Transkripts sehr viel weniger effizient vermitteln, da bei *mnu2-1* das reife *nad*3-*rps*12-Transkript kaum vorhanden ist (Transkript 1, Abbildung 48). Das zusätzlich in den Doppelmutanten auftretende ca. 1250 nt große *nad*3-*rps*12-Transkript (Transkript 2, Abbildung 48 + Abbildung 49A) scheint ein direkter Vorläufer der reifen *nad*3-*rps*12-mRNA zu sein. Für den endonukleolytischen Schnitt zur Generierung von Transkript 2 ausgehend von Transkript 3 ist MNU2 essentiell. Dies zeigt sich daran, dass in Abwesenheit von MNU2 keine Moleküle dieser Art auftreten (Transkript 2, *mnu2-1*, Abbildung 48). MNU1 scheint lediglich die Effizienz dieses Schrittes zu beeinflussen. Die Annahme einer essentiellen Funktion von MNU2 bei der Prozessierung von Transkript 3, widerspricht allerdings der Tatsache, dass bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU1 und MNU2 detektierbare Mengen an Transkript 2 gebildet werden (Transkript 2, Abbildung 48). Somit scheint es, dass an der Bildung von Transkript 2 ein weiteres Protein beteiligt ist (Abbildung 64B).

Bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU1 und MNU2 weist die sehr starke Akkumulation von großen Vorläufertranskripten (Transkripte 3 + 4, Abbildung 48) auf zwei fehlende endonukleolytische Prozessierungsereignisse hin, wobei an beiden endonukleolytischen Schnitten vermutlich MNU1 und MNU2 maßgeblich beteiligt sind. Die Anreicherung der größeren Moleküle in *mnu2-1* deutet darauf hin (Transkript 3 + 4, Abbildung 48), dass MNU1 auch „allei-

ne“ die endonukleolytische Prozessierung von Transkript 4 einleiten kann, sich jedoch die Effizienz in Anwesenheit von MNU2 deutlich erhöht. Da in den Doppelmutanten eine relativ große Menge an Transkript 3 detektiert wird, scheint ein weiteres Protein in den endonukleolytischen Schnitt zur Generierung von Transkript 3 ausgehend von Transkript 4 involviert zu sein (Abbildung 64B).

Die hier beschriebenen Beobachtungen lassen vermuten, dass für die Bildung des reifen *nad*3-*rps*12-Transkripts mindestens drei endonukleolytische Schnitte benötigt werden, wobei MNU1 und MNU2 an allen Prozessierungsereignissen beteiligt, oftmals jedoch noch weitere bisher unbekannte Proteine involviert sind (Abbildung 64B). Wie im Fall von $ccmF_{N2}$ (Abbildung 64A) kann jedoch auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten *nad*3-*rps*12-Transkripte aus einem gemeinsamen, mit den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden jedoch nicht detektierbaren, Vorläufermolekül entstehen. Analog zu $ccmF_{N2}$ ist bei dieser Annahme ein zusätzlicher endonukleolytischer Schnitt zur Generierung von Transkript 4 mit einem 5‘-Ende bei -762, der von einem weiteren bisher unbekannten Protein bewerkstelligt wird, notwendig (Abbildung 64B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Akkumulation von größeren $ccmF_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-Transkripten bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU1 und MNU2 auf eine endonukleolytische Aktivität der beiden Proteine hinweist.

4.5.2. MNU1 und MNU2 beeinflussen gemeinsam mit RPF2 die 5‘-Prozessierung von *nad*9-Transkripten.

Im Gegensatz zur Reifung der 5‘-Enden von $ccmF_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-Transkripten ist im Fall von *nad*9 bereits ein in die 5‘-Prozessierung involviertes PPR-Protein, RPF2, bekannt [Jonietz et al. 2010]. Es wurde gezeigt, dass RPF2 essentiell für die Bildung des reifen 5‘-Endes eines der beiden *nad*9-Haupttranskripte (5‘-Ende bei -202) ist. Bei Abwesenheit dieses Proteins kommt es lediglich zur Ausbildung des größeren *nad*9-Transkripts mit einem 5‘-Ende bei -243 (Transkript 2, Abbildung 51B) [Jonietz et al. 2010]. Dem gegenüber ist der *nad*9-mRNA-Phänotyp bei Abwesenheit von MNU1 und/oder MNU2 in der Hinsicht verändert, dass nur das kleinere *nad*9-Transkript (5‘-Ende bei -202) detektiert werden kann (Transkript 1, Abbildung 51B). Dies lässt sich damit erklären, dass MNU1 und MNU2 vermutlich (in gleichem Maße) wichtig für die Bildung des 5‘-Endes bei -243 sind (Abbildung 65).

Weder auf CR-RT-PCR- noch auf Northern-Blot-Ebene wurde in den *MNU1*/*MNU2-Knockout*-Mutanten eine Anhäufung von größeren Molekülen beobachtet. Dies ist auch bei den entsprechenden Analysen mit *rpf2-1* der Fall (Abbildung 51B) [Jonietz et al. 2010]. So wurden weder in dieser noch in vorherigen Arbeiten *nad*9-Vorläufertranskripte bei Abwesenheit von RPF2 detektiert [Jonietz et al. 2010]. Diese Beobachtung spricht gegen eine endonukleolytische Generierung der 5‘-Enden bei -202 und -243. Darüber hinaus war bisher nicht klar, ob das größere *nad*9-Transkript (5‘-Ende -243) als Vorläufer der kleineren *nad*9-mRNA (5‘-Ende -202) dient [Jonietz et al. 2010]. Neben der erwähnten *nad*9-mRNA-Prozessierung beeinflusst RPF2 zusätzlich die effiziente Bildung des 5‘-Endes der reifen *cox*3-mRNA. Im Gegensatz zu den Veränderungen bei der 5‘-Reifung der *nad*9-mRNA, kommt es hier bei Abwesenheit von RPF2 zu einer Akkumulation von 5‘-verlängerten *cox*3-Transkripten bei gleichzeitig verringerter Menge an reifer *cox*3-mRNA. Dies ist ein konkreter Hinweis für eine endonukleolytische Generierung des entsprechenden 5‘-Endes [Jonietz et al. 2010].

Die Abwesenheit von RPF2 oder MNU1/MNU2 resultiert in der Ausbildung lediglich eines der beiden *nad*9-Haupttranskripte (Abbildung 51). Bei gleichzeitigem Fehlen von RPF2 und MNU1 kann nur die *nad*9-mRNA mit einem 5‘-Ende bei -243 detektiert werden (Produkt b, Abbildung 52A + Transkript 2, Abbildung 54). Im Gegensatz dazu ist bei der Linie *rpf2-1* x *mnu2-1* keines der beiden *nad*9-Haupttranskripte vorhanden (Produkte a + b, Abbildung 52B + Transkripte 1 + 2, Abbildung 54). Darüber hinaus treten im Unterschied zu den bisherigen Analysen mit den Einzel- bzw. MNU1/MNU2-Doppelmutanten bei gleichzeitiger Abwesenheit von RPF2 und MNU1/MNU2 mindestens drei Vorläufertranskripte auf (Transkripte 3-5, Abbildung 54). Diese Beobachtung weist, entgegen der obigen Ausführungen, auf eine endonukleolytische Generierung der *nad*9-Haupttranskripte hin. Vermutlich dient Transkript 3 als Vorläufermolekül zur endonukleolytischen Generierung von Transkript 2 (Abbildung 65). Die stärkere Anreicherung einer etwa 1200 nt großen *nad*9-mRNA sowie der größeren reifen *nad*9-mRNA in den *RPF2*/*MNU1*-Doppelmutanten im Vergleich zur *RPF2*/*MNU2*-Doppelmutante (Transkripte 3 + 2, Abbildung 54), zeigt wiederum, dass der Einfluss von MNU2 bei der endonukleolytischen Bildung von 5‘-Enden mitochondrialer Transkripte im Vergleich zu MNU1 größer ist (siehe hierzu auch Abbildung 64). Es ist anzunehmen, dass MNU2 den endonukleolytischen Schnitt zur Generierung von Transkript 2 ausgehend von Transkript 3 „alleine“ ausführen kann. MNU1 scheint die Effizienz jedoch deutlich zu erhöhen (Abbildung 65). Dies erklärt auch die verschiedenen CR-RT-PCR-Muster von *rpf2-1* x

mnu1-1 bzw. *rpf2-1* x *mnu1-2* und *rpf2-1* x *mnu2-1* (Abbildung 52). Nur bei Anwesenheit von MNU2 kann Produkt b detektiert werden. Im Gegensatz dazu kann MNU1 die Bildung des mit diesem PCR-Produkt korrelierenden *nad*9-Transkripts (Transkript 2, *rpf2-1* x *mnu2-1*, Abbildung 54) nicht einleiten.

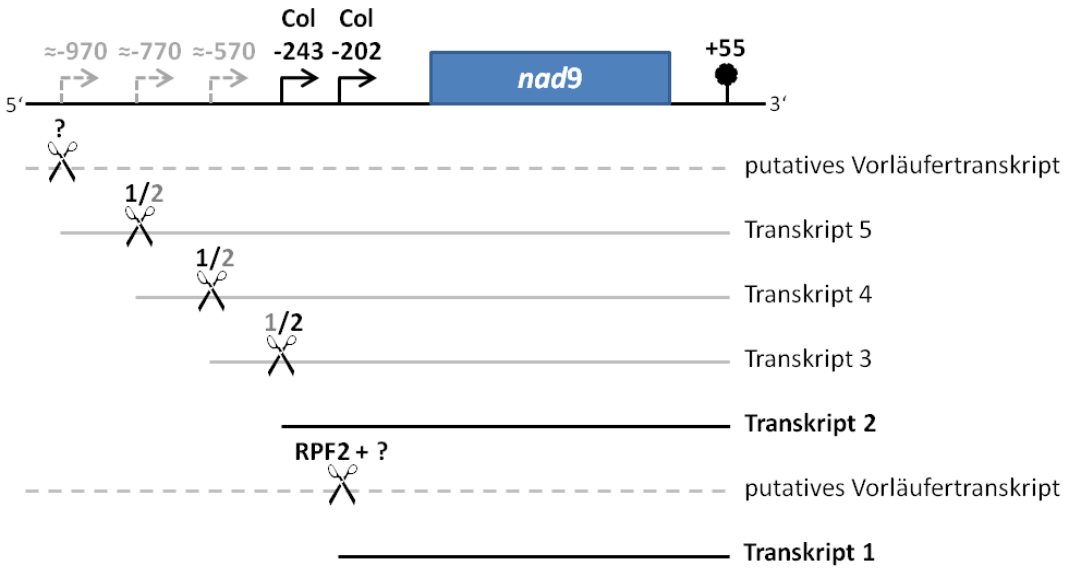


Abbildung 65: Modell der Wirkungsweise von MNU1 und MNU2 sowie RPF2 bei der Reifung von *nad*9-Transkripten. Die Bezeichnungen auf der rechten Seite entsprechen denen der Northern-Blot-Analyse auf das *nad*9-Leseraster (Abbildung 54). Die mit grauen, abgewinkelten Pfeilen angedeuteten 5'-Enden wurden gemäß der Größe der Transkripte 3-5 (Abbildung 54) abgeschätzt. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 50 + Abbildung 64.

Die Akkumulation von zwei weiteren größeren *nad*9-Transkripten bei gleichzeitiger Abwesenheit von RPF2 und MNU1 (Transkripte 4 + 5, Abbildung 54) lässt vermuten, dass diese Moleküle nicht bzw. nur ineffizient prozessiert wurden. Möglicherweise ist MNU1 hier in zwei weitere endonukleolytische Schnitte involviert, wobei anzunehmen ist, dass MNU2 in Form eines Heterodimers (MNU1/MNU2) die Effizienz deutlich erhöht (Abbildung 65). Diese Annahme kann auch mit dem Transkriptmuster bei *rpf2-1* x *mnu2-1* in Einklang gebracht werden. Da in dieser Linie MNU1 vorhanden ist, kommt es zunächst zu einer „normalen" Prozessierung. Ausgehend von einem putativen Vorläufermolekül werden sukzessive Transkript 4 und 3 generiert. Wie oben erwähnt wird vermutlich Transkript 3 durch die Aktivität von (hauptsächlich) MNU2 unter Bildung des reifen *nad*9-Transkripts mit einem 5'-Ende bei -243 geschnitten. Da MNU2 in diesem Fall jedoch nicht vorhanden ist, wird das 5'-unreife Transkript wahrscheinlich schnell abgebaut. Dies steht in Übereinstimmung mit dem im Abschnitt 4.4. diskutierten Sachverhalt, dass eine korrekte 5'-Prozessierung die Stabilität der entsprechenden Transkripte positiv beeinflusst und 5'-unreife Transkripte sehr effizient aus

dem RNA-Pool entfernt werden. Jedoch bleibt unklar, warum bei *rpf2-1* x *mnu1-1* und *rpf2-1* x *mnu1-2* die 5‘-verlängerten Vorläufertranskripte in detektierbaren Mengen vorhanden sind und nicht ebenfalls schnell abgebaut werden (Transkripte 3-5, Abbildung 54).

Wie bereits zuvor erwähnt, war bisher nicht geklärt, ob das durch die Aktivität von RPF2 generierte kleinere *nad*9-Haupttranskript (Transkript 1, Abbildung 51B + Abbildung 54) ausgehend vom größeren *nad*9-Haupttranskript (Transkript 2, Abbildung 51B + Abbildung 54) gebildet wird. Die Analyse der *MNU1*/*MNU2*-Doppelmutanten sowie die postulierten drei aufeinander folgenden endonukleolytischen Schnitte zur Generierung von Transkript 2 sprechen gegen diese Annahme. So ist gemäß CR-RT-PCR- und Northern-Blot-Analyse bei den *MNU1*/*MNU2*-Doppelmutanten kein Transkript 2 vorhanden (Produkt b, Abbildung 51A + Transkript 2, Abbildung 51B). Da es jedoch trotzdem zur Bildung des kleineren *nad*9-Haupttranskripts kommt, ist es denkbar, dass RPF2 mit einem größeren Vorläufermolekül interagiert. Auf Grund der Tatsache, dass im Wildtyp beide reifen *nad*9-mRNAs in etwa gleichem Maße auftreten (Abbildung 51), ist davon auszugehen, dass die durch MNU1 und MNU2 vermittelte (endonukleolytische) Reifung/Prozessierung zur Bildung des 5‘-Endes bei -243 und die durch RPF2 bedingte Generierung des 5‘-Endes bei -202 unabhängig voneinander erfolgen. Möglicherweise agieren die Proteine dabei am gleichen Vorläufermolekül, jedoch nicht gleichzeitig. Außerdem ist anzunehmen, dass ein durch die Aktivität von MNU1/MNU2 prozessiertes Vorläufermolekül nicht mehr von RPF2 beeinflusst wird. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die reifen *nad*9-Transkripte ausgehend von verschiedenen Vorläufermolekülen gebildet werden (Abbildung 65).

Wie im Fall von *ccmF*$_{N2}$ und *nad*3-*rps*12, scheinen MNU1 und MNU2 in die endonukleolytische Generierung von *nad*9-mRNA-5‘-Enden involviert zu sein. Es ist an dieser Stelle jedoch anzumerken, dass auf Grund der bisher durchgeführten Analysen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die detektierten *nad*9-Vorläufermoleküle nicht wie vermutet 5‘- sondern 3‘-verlängert sind. Mittels CR-RT-PCR-Analyse war es bislang nicht möglich, die Anhäufung von 5‘-verlängerten Vorläufermoleküle zu detektieren (Abbildung 53). Eine zusätzliche Northern-Blot-Analyse mit einer Sonde, die komplementär zu einem Bereich stromaufwärts der reifen 5‘-Enden der *nad*9-mRNA ist, kann weitere Erkenntnisse bezüglich der Beschaffenheit der vermeintlichen *nad*9-Vorläufertranskripte liefern.

Die drastische Reduzierung der reifen *nad*9-Transkripte bei gleichzeitiger Abwesenheit von RPF2 und MNU2 (Transkripte 1 + 2, Abbildung 54) hat auf Proteinebene einen vergleichsweise milden Effekt (Abbildung 55B). So weist eine Immunodetektion darauf hin, dass der *Nad*9-Proteinlevel um lediglich 50 % reduziert ist (*rpf2-1* x *mnu2-1*, Abbildung 55B). Da die Linie *rpf2-1* x *mnu2-1* im Vergleich zum Wildtyp unter normalen Wachstumsbedingungen scheinbar keinen phänotypischen Nachteil zeigt, ist davon auszugehen, dass die verbleibende Menge an *Nad9*-Protein ausreichend ist, um eine normale Funktion des NADH-Dehydrogenase-Komplexes aufrecht zu erhalten. Wie bereits zuvor erwähnt (siehe Abschnitt 4.4.) sind mitochondrial-kodierte Proteine oftmals sehr stabil [Nelson et al. 2013]. So ist u.a. für das *Nad*9-Protein aus *A.thaliana* eine relativ hohe Stabilität beschrieben [Nelson et al. 2013]. Dies lässt den Schluss zu, dass die bei *rpf2-1* x *mnu2-1* stark verminderte Menge an reifen *nad*9-Transkripten ausreicht, um etwa 50 % der im Wildtyp vorhandenen *Nad*9-Proteine zu synthetisieren. Interessant ist in diesem Zusammenhand die Beobachtung, dass die alleinige Abwesenheit von MNU2 und damit auch das Fehlen einer *nad*9-mRNA mit einem 5‘-Ende bei -243 scheinbar keinen Einfluss auf die Menge an *Nad*9-Protein hat (*mnu2-1*, Abbildung 55B). Wie bereits zuvor erwähnt verhält es sich bei *rpf2-1* analog [Jonietz et al. 2010], wobei dies durch die in Abbildung 55B gezeigte Immunodetektion reproduziert werden konnte. Es ist somit anzunehmen, dass beide *nad*9-Haupttranskripte mit vergleichbarer Effizienz translatiert werden.

Da das *Nad*9-Protein, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, sehr stabil ist, kann in einem relativ späten Stadium der vegetativen Phase trotz stark verminderter *nad*9-mRNA-Prozessierung vermutlich kein entsprechend starker Unterschied im Proteinlevel (mehr) detektiert werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung des *Nad*9-Proteinlevels in einem sehr frühen Stadium der vegetativen Phase. Zu diesem Zeitpunkt sind erst wenige „vollständig“ ausgestattete Mitochondrien vorhanden und es kommt verstärkt zur Synthese von mitochondrialen Proteinen. Möglicherweise wirkt sich dann die beeinträchtige *nad*9-mRNA-Prozessierung stärker als bisher beobachtet auf den *Nad*9-Proteinlevel aus.

Gemäß des in Abbildung 65 vorgeschlagenen Modells werden bei gleichzeitiger Abwesenheit der drei Proteine RPF2, MNU1 und MNU2 (*rpf2-1*/*mnu1-1*/*mnu2-1* bzw. *rpf2-1*/*mnu1-2*/*mnu2-1*) keine oder nur ein sehr geringer Anteil an reifen *nad*9-Transkripte(n) gebildet.

Darüber hinaus ist zu vermuten, dass sich verstärkt größere Vorläufermoleküle anhäufen. Unter der Voraussetzung, dass eine solche Tripelmutante überhaupt lebensfähig ist, kann mit dieser die Auswirkung der vermutlich noch stärker verminderten Bildung von reifen *nad*9-Transkripten auf die Synthese des *Nad*9-Proteins mittels Immunodetektion untersucht werden. Möglicherweise sind die Effekte auf Proteinebene in den Tripelmutanten drastischer im Vergleich zur Doppelmutante *rpf2-1* x *mnu2-1*. Somit kann die Analyse dieser Tripelmutante weitere Hinweise bezüglich der Bedeutung des *Nad*9-Proteins und damit auch der Prozessierung der *nad*9-mRNAs liefern.

4.5.3. MNU1 und MNU2 stabilisieren das *atp*8-Haupttranskript

Im Unterschied zu den Veränderungen im Transkriptmuster der mitochondrialen Gene *ccmF*$_{N2}$, *nad*3-*rps*12 und *nad*9, tritt bei Abwesenheit von MNU1 und/oder MNU2 kein verändertes *atp*8-Transkriptmuster auf. Im Gegensatz dazu kann hier in drei voneinander unabhängigen Analysen sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelmutanten eine deutliche Verringerung des *atp*8-Haupttranskripts beobachtet werden (Produkt a, Abbildung 40 + Transkript 1, Abbildung 41 + Abbildung 42). Darüber hinaus geben weder die CR-RT-PCR- noch die Northern-Blot-Analyse Hinweise auf weitere (größere) *atp*8-Transkripte (Abbildung 40 + Abbildung 41). Diese Tatsache widerspricht einer Funktion von MNU1 und MNU2 als Endonukleasen, wie es die Analysen der *ccmF*$_{N2}$-, *nad*3-*rps*12- und *nad*9-Transkripte vermuten lassen (siehe Abschnitt 4.5.1. + 4.5.2.). Dem gegenüber ist davon auszugehen, dass die beiden Proteine in die Stabilisierung des *atp*8-Haupttranskripts involviert sind und dabei vermutlich als Heterodimer oder als Teil eines Heteromers agieren. Da das Fehlen von MNU1 oder MNU2 die jeweils gleiche Auswirkung auf den relativen *atp*8-Transkriptlevel hat, kann gefolgert werden, dass die Proteine die Stabilisierung auch „alleine“, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz, bewerkstelligen können (Abbildung 42). Die gleichzeitige Abwesenheit der beiden Proteine führt dagegen nur zu einer geringfügig erhöhten Destabilisierung des *atp*8-Haupttranskripts (Abbildung 42). Da die Northern-Blot-Analyse auf das *atp*8-Leseraster auf keine kleineren Transkripte hinweist (Abbildung 41), scheint es, dass die nicht mehr ausreichend stabilisierten *atp*8-Transkripte sehr effizient aus dem RNA-Pool beseitigt werden.

Die beobachteten Veränderungen bei der *nad*9-mRNA-Prozessierung sind in gewisser Weise ähnlich zur Situation bei *atp*8. So kommt es in beiden Fällen zu einer Verringerung der Menge an Haupttranskript, wobei im Fall von *nad*9 eines der beiden Haupttranskripte nicht vor-

handen ist (Abbildung 51). Im Unterschied zur Situation bei *nad*9 können jedoch mit den bisher durchgeführten Analysen keine *atp*8-Vorläufertranskripte detektiert werden.

4.6. Was ist die genaue molekulare Funktion von MNU1 und MNU2?

Die bisherigen Ausführungen machen deutlich, dass das Protein MNU1 und sehr wahrscheinlich auch MNU2 in die Mitochondrien von *A.thaliana* importiert wird und hier den RNA-Metabolismus beeinflusst (siehe Abschnitt 4.5.). Genauer hat sich gezeigt, dass die mRNA-Prozessierung einzelner mitochondrialer Transkripte bei Abwesenheit von einem oder beiden Protein(en) im Vergleich zum Wildtyp verändert ist. Im Fall der *ccmF*$_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-Transkripte weisen die durchgeführten Analysen darauf hin, dass MNU1 und MNU2 in die 5‘-Prozessierung involviert sind und hier einen oder mehrere endonukleolytische(n) Schnitt(e) vermitteln (siehe Abschnitt 4.5.1.). Auch bezüglich *nad*9 scheinen MNU1 und MNU2 mehrere endonukleolytische Schnitte zu bewirken (siehe Abschnitt 4.5.2.). In diesem Zusammenhang kann die Phänotypisierung der Tripelmutanten *rpf2-1*/*mnu1-1*/*mnu2-1* und *rpf2-1*/*mnu1-2*/*mnu2-1* weitere Erkenntnisse liefern (siehe Abschnitt 4.5.2.). Im Gegensatz zu einer möglichen endonukleolytischen Funktion, scheinen MNU1 und MNU2 in Bezug auf die Prozessierung der *atp*8-mRNA lediglich stabilisierend zu wirken (siehe Abschnitt 4.5.3.). Auf Grund der Tatsache, dass die Abwesenheit von MNU1 und/oder MNU2 auf molekularbiologischer Ebene verschiedene Phänotypen bedingt, können bislang keine konkreten Aussagen über die tatsächliche Funktion der Proteine getroffen werden.

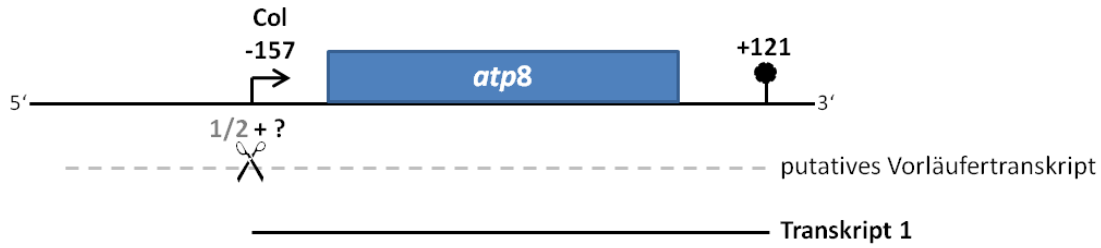


Abbildung 66: Modell der Wirkungsweise von MNU1 und MNU2 bei der Reifung von *atp*8-Transkripten. Die Bezeichnung auf der rechten Seite entspricht der der Northern-Blot-Analyse gegen das *atp*8-Leseraster (Abbildung 41). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 39 + Abbildung 64.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen molekularbiologischen Phänotypen in Abwesenheit von MNU1 und/oder MNU2 könnte sein, dass diese beiden Proteine auch während der 5‘-Prozessierung der *atp*8-Transkripte einen endonukleolytischen Schnitt vermitteln oder die Effizienz von Letzterem erhöhen (Abbildung 66). Die dafür notwendigen Vorläufer-

transkripte konnten mit den hier angewandten Methoden allerdings nicht nachgewiesen werden (Abbildung 40 + Abbildung 41). Diese Tatsache weist darauf hin, dass solche putativen Vorläufermoleküle vermutlich sehr instabil sind und somit bei einer nicht korrekt erfolgten 5‘-Prozessierung sehr effizient aus dem RNA-Pool entfernt werden (siehe hierzu auch Abschnitt 4.4.). Bei Abwesenheit von MNU1 und MNU2 sind noch beträchtliche Mengen des *atp*8-Haupttranskripts vorhanden (Transkript 1, Abbildung 41 + Abbildung 42). Unter der Annahme, dass hier ein endonukleolytischer Schnitt für die Generierung des 5‘-Endes notwendig ist, ist anzunehmen, dass neben MNU1 und MNU2 ein weiteres Protein involviert ist. MNU1 und MNU2 scheinen lediglich die Effizienz des putativen endonukleolytischen Schnitts positiv zu beeinflussen und als Teil eines Heteromers zu wirken (Abbildung 66). Dies ist in gewisser Weise ähnlich zur Generierung des *ccmF*$_{N2}$-mRNA-5‘-Endes bei -235, da auch hier MNU1 und MNU2 lediglich die Effizienz des endonukleolytischen Schnitts erhöhen, ihn vermutlich aber nicht direkt vermitteln (Abbildung 64A).

Das Vorhandensein der limkain_b1_N_like-Domäne bei MNU1 und MNU2 kann als Indiz für eine mögliche (endo)nukleolytische Aktivität der beiden Proteine betrachtet werden (Abbildung 30). Diese Domäne ist in gewissem Maße zur NYN-Domäne ähnlich. Die NYN-Domäne wurde in einigen Proteinen mit einer vermuteten Funktion im RNA-Metabolismus gefunden und weist Ähnlichkeiten bezüglich der Proteinfaltung zu den PIN- und FLAP-Nukleasen auf. Diese Proteine besitzen vier saure konservierte AS-Reste, die vermutlich das aktive Zentrum der Enzyme darstellen und im Fall der NYN- und der PIN-Domäne ein Metallion binden, bei den FLAP/5‘→3‘-Exonukleasen sind es dagegen zwei Metallionen [Anantharaman and Aravind 2006]. Darüber hinaus wird vermutet, dass die NYN-Domäne in die RNA-Prozessierung involviert ist [Anantharaman and Aravind 2006]. Als Beispiel eines Proteins mit NYN-Domäne kann hier RPORP1 erwähnt werden. Dieses Protein weist neben fünf PPR-Motiven am C-Terminus eine NYN-Domäne auf [Imai et al. 2014]. Es wurde gezeigt, dass RPORP1 in die Mitochondrien und Chloroplasten importiert wird und hier einen endonukleolytischen Schnitt bei der 5‘-Reifung von tRNAs vermittelt [Gobert et al. 2010; Gutmann et al. 2012]. Dies steht in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Erkenntnissen bezüglich der Beteiligung von MNU1 und MNU2 an der mitochondrialen mRNA-Prozessierung. Da keine allgemein gültigen Kriterien beschrieben sind, die einer Nuklease-Domäne eindeutig eine exo- oder endonukleolytische Aktivität zuordnen, ist es daher denkbar, dass die

limkain_b1_N_like-Domäne von MNU1 und MNU2 eine endonukleolytische Aktivität, wie bei RPORP1 die NYN-Domäne, vermittelt.

Auf Grund der Tatsache, dass bisher noch keine *in vitro*-Analysen mit rekombinant erzeugtem MNU1 bzw. MNU2 durchgeführt wurden, kann bezüglich der Fähigkeit einer RNA-Bindung nur spekuliert werden. Die Analyse der konservierten Domänen innerhalb der beiden Proteine lässt vermuten, dass MNU1 und MNU2 RNA-Bindeproteine sind. So konnte etwa gezeigt werden, dass Proteine mit einer OST-HTH-Domäne doppelsträngige RNA (wie miRNAs, rasiRNAs und piRNAs) binden können [Anantharaman et al. 2010]. Darüber hinaus weisen beide Proteine eine LOTUS-Domäne auf. Die genaue molekularbiologische Funktion dieser Domäne ist noch nicht bekannt. Jedoch ist die Tatsache, dass Proteine mit dieser Domäne oftmals in den RNA-Metabolismus involviert sind, ein starkes Indiz für eine mögliche Beteiligung an der RNA-Bindung [Callebaut and Mornon 2010]. Um die postulierte Fähigkeit der RNA-Bindung nachzuweisen, sind jedoch *in vitro*-Bindungsanalysen notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführte Überexpression der rekombinanten Proteine rMNU1$^{\Delta N52}$ und rMNU2$^{\Delta N75}$ deutet jeweils auf eine hohe Ausbeute an löslichem Protein hin (rMNU1$^{\Delta N52}$: Abbildung 58A + Abbildung 59; rMNU2$^{\Delta N75}$: Abbildung 61A + Abbildung 62). Da jedoch trotz der His-Tag-Aufreinigung noch beträchtliche Mengen anderer Proteine in den finalen Proben enthalten sind (Abbildung 58A + Abbildung 61A), ist es eventuell nötig, die Überexpressionskonstrukte so zu verändern, dass andere Aufreinigungen durchgeführt werden können. Darüber hinaus ist es denkbar rekombinante Proteine, die Mutationen innerhalb einer konservierten Domäne bzw. eine Deletion einer kompletten Domäne aufweisen, zu generieren. Eine sich anschließende *in vitro*-Bindungsanalyse kann dann Aufschluss über den Einfluss der Veränderungen auf die Fähigkeit der RNA-Bindung geben. Letzten Endes können so wichtige Domänen bzw. Bereiche innerhalb der Domänen bezüglich einer Funktion bei der 5‘-Reifung mitochondrialer Transkripte identifiziert werden.

4.7. MNU1 und MNU2 beeinflussen die Reifung einzelner mitochondrialer Transkripte.

Die Analyse der mitochondrialen Haupttranskripte mittels CR-RT-PCR sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelmutanten zeigt deutlich, dass jeweils nur Veränderungen bei Transkripten einzelner Gene auftreten (Anhang 5 + Anhang 8). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei MNU1 und MNU2, gemäß der Annahme einer endonukleolytischen Aktivität,

nicht um generell wirkende Endonukleasen handelt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass weitere Proteine (mit endonukleolytischer Aktivität) in die 5‘-Prozessierung der anderen mitochondrialen Transkripte involviert sind. Um derartige Proteine zu identifizieren kann es hilfreich sein, zunächst Proteine mit einer vergleichbaren Ausstattung an Domänen, wie sie bei MNU1 und MNU2 auftreten, zu untersuchen (Abbildung 30). Zur Identifizierung einer möglicherweise mehr generell wirkenden Endonuklease ist es vermutlich sinnvoll, sich zunächst auf solche Proteine zu beschränken, die über eine limkain_b1_N_like-Domäne verfügen und in die Mitochondrien transportiert werden. Anhand von *in silico*-Analysen scheinen die Proteine AT3G60904.1, AT3G61028.1, AT3G61028.2, AT3G62460.1 und AT4G12240.1 mögliche Kandidaten zu sein. Die Phänotypisierung von entsprechenden T-DNA-Insertionsmutanten kann erste Aufschlüsse über die Funktionen dieser Proteine bei der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte geben. Auf der einen Seite ist es denkbar, dass wiederum lediglich die Prozessierung einzelner mitochondrialer Transkripte von der Abwesenheit eines oder mehrerer dieser Proteine betroffen ist. Jedoch ist es auch durchaus möglich, dass stärkere, eine Vielzahl der mitochondrialen Transkripte betreffende, Effekte beobachtet werden.

5. Zusammenfassung

Zur Generierung eines reifen mitochondrialen Transkripts sind in *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) verschiedene Prozessierungsereignisse notwendig. Einer dieser Prozesse ist die 5‘-Prozessierung, in die einige *Pentatricopeptide Repeat*(PPR)-Proteine der P-Unterfamilie involviert sind. Es wird vermutet, dass an der 5‘-Prozessierung zusätzlich Proteine mit einer Endonukleaseaktivität beteiligt sind, deren Identität bislang allerdings unklar ist.

Der in dieser Arbeit identifizierte RNA PROCESSING FACTOR 7 (RPF7) ist ein weiteres PPR-Protein, das an der 5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte in *A.thaliana* beteiligt ist. RPF7 ist wichtig für die Bildung des 5‘-Endes bei -122 (bezüglich des Start-ATG) der reifen *nad*2-mRNA. Für die Funktion dieses Proteins sind die letzten 86 Aminosäuren essentiell. Im Vergleich zu den anderen bisher beschriebenen RPFs ist RPF7 ein eher kleines Protein. Dies ist vermutlich auch ein Grund dafür, dass an der Definition der (endonukleolytischen) Schnittstelle zur Generierung des 5‘-Endes der reifen *nad*2-mRNA zusätzlich ein weiteres, bisher unbekanntes, (PPR)-Protein beteiligt ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich eine korrekte 5‘-Prozessierung positiv auf die Stabilität des reifen *nad*2-Transkripts auswirkt. Bisher ist jedoch noch unklar, ob es einen generellen Zusammenhang zwischen der 5‘-Prozessierung und der Stabilität von mitochondrialen Transkripten gibt.

Mit den MITOCHONDRIAL NUCLEASEs 1 und 2 (MNU1 und MNU2) wurden zwei weitere für die 5‘-Prozessierung einzelner mitochondrialer mRNAs in *A.thaliana* wichtige Proteine identifiziert, wobei der Einfluss von MNU2 im Vergleich zu MNU1 oftmals stärker ist. Die Anreicherung von 5‘-verlängerten *ccmF*$_{N2}$- und *nad*3-*rps*12-Transkripten bei gleichzeitiger Abwesenheit von MNU1 und MNU2 lässt vermuten, dass diese Proteine einen oder mehrere endonukleolytische(n) Schnitt(e) vermitteln. Bisher war unklar, ob auch die zwei reifen *nad*9-Transkripte endonukleolytisch gebildet werden. Die in dieser Arbeit beobachtete Anreicherung von *nad*9-Vorläufertranskripten in *RPF2*/*MNU1*- bzw. *RPF2*/*MNU2*-Doppelmutanten weist auf eine endonukleolytische Bildung der *nad*9-mRNAs hin. MNU1 und MNU2 scheinen maßgeblich daran beteiligt zu sein. Dem gegenüber üben die beiden Proteine in Bezug auf die *atp*8-mRNA-Prozessierung lediglich eine stabilisierende Funktion aus. Auf Grund der Tatsache, dass das Fehlen von MNU1 und/oder MNU2 in unterschiedlichen molekularbiologischen Phänotypen resultiert, ist davon auszugehen, dass diese Proteine mehrere verschiedene Funktionen bezüglich der 5‘-Prozessierung von mitochondrialen mRNAs ausüben.

6. Literaturverzeichnis

Anantharaman V., Aravind L. (2006): The NYN Domains - Novel Predicted RNAses with a PIN Domain-Like Fold, *RNA Biology* **3** (1): 18-27.

Anantharaman V., Zhang D., Aravind L. (2010): OST-HTH: a novel predicted RNA-binding domain, *Biology Direct* **5**: 13.

Barkan A., Rojas M., Fuji 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.

Binder S., Brennicke A. (2003): Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control, *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* **358** (1429): 181-189.

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.

Callebaut I., Mornon J.-P. (2010): LOTUS, a new domain associated with small RNA pathways in the germline, *Bioinformatics* **26** (9): 1140-1144.

Chateigner-Boutin A.-L., Small I. (2010): Plant RNA editing, *RNA Biology* **7** (2): 212-219.

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.

Colcombet J., Lopez-Obando M., Heurtevin L., Bernard C., Martin K., Berthomé R., Lurin C. (2013): Systematic study of subcellular localization of Arabidopsis PPR proteins confirms a massive targeting to organelles, *RNA Biology* **10** (9): 1557-1575.

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.

Delannoy E., Stanley W.A., Bond C.S., Small I. (2007): Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles, *Biochemical Society Transactions* **35** (6): 1643-1647.

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., 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 *nad*1 intron 1 in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell* **19** (10): 3256-3265.

Forner J., Binder S. (2007): The red fluorescent protein eqFP611: application in subcellular localization studies in higher plants, *BMC Plant Biology* **7**: 28.

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.

Fukui K., Kuramitsu S. (2011): Structure and function of the small MutS-related domain, *Molecular Biology International* **2011**: 691735.

Gan X., Stegle O., Behr J., Steffen J.G., Drewe P., Hildebrand K.L., Lyngsoe R., Schultheis 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., Toomajiau C., Kover P.X., Clark R.M., Rätsch G., Mott R. (2011): Multiple reference genomes and transcriptomes for *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.

Gobert A., Gutmann B., Taschner A., Gossringer M. Holzmann J., Hartmann R.K., Rossmanith W., Giegé P. (2010): A single *Arabidopsis* organellar protein has RNase P activity, *Nature Structural & Molecular Biology* **17** (6): 740-746.

Gutmann B., Gobert A., Giegé P. (2012): PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*, *Genes & Development* **26** (10): 1022-1027.

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 *nad4* 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): 380-391.

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. (2000): One RNA polymerase serving two genomes, *EMBO Reports* **1** (5): 435-440.

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 *nad4* 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.

Ichinose M., Tasaki E., Sugita C., Sugita M. (2012): A PPR-DYW protein is required of splicing of a group II intron of *cox*1 pre-mRNA in *Physcomitrella patens*, *The Plant Journal* **70** (2): 271-278.

Imai T., Nakamura T., Maeda T., Nakayama K., Gao X., Nakashima T., Kakuta Y., Kimura M. (2014): Pentatricopeptide repeat motifs in the processing enzyme PRORP1 in *Arabidopsis thaliana* play a crucial role in recognition of nucleotide bases at TΨC loop in precursor tRNAs, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450** (4): 1541-1546.

Iyer L.M., Zhang D., Rogozin I.B., Aravind L. (2011): Evolution of the deaminase fold and multiple origins of eukaryotic editing and mutagenic nucleic acid deaminases from bacterial toxin systems, *Nucleic Acids Research* **39** (22): 9473-9497.

Jonietz C., Forner J., Hölzle A., Thuss S., Binder S. (2010): RNA PROCESSING FACTOR2 is Required for 5‘ End Processing of *nad9* and *cox3* mRNAs in Mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell* **22** (2): 443-453.

Jonietz C., Forner J., Hildebrandt T., Binder S. (2011): RNA PROCESSING FACTOR3 Is Crucial for the Accumulation of Mature *ccmC* Transcripts in Mitochondria of Arabidopsis Accession Columbia, *Plant Physiology* **157** (3): 1430-1439.

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.

Khrouchtchova A., Monde R.-A., Barkan A. (2012): A short PPR protein required for the splicing of specific group II introns in angiosperm chloroplasts, *RNA* **18** (6): 1197-1209.

Koop H.-U., Steinmüller K., Wagner H., Rössler C., Eibl C., Sacher L. (1996): Integration of foreign sequences into tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation, *Planta* **199** (2): 193-201.

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.

Kuhn J., Binder S. (2002): RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox*2 transcripts in pea mitochondria, *Nucleic Acids Research* **30** (2): 439-446.

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.

Liu Y., He J., Chen Z., Ren X., Hong X., Gong Z. (2010): *ABA overly-sensitive 5* (*ABO5*), encoding a pentatricopeptide repeat protein required for *cis*-splicing of mitochondrial *nad*2 intron 3, is involved in the abscisic acid response in Arabidopsis, *The Plant Journal* **63** (5): 749-765.

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.

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.

Nishimura K., Ashida H., Ogawa T., Yokota A. (2010): A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in Arabidopsis chloroplast 23S rRNA, *The Plant Journal* **63** (5): 766-777.

O'Toole N., Hattori M., Andrés C., Iida K., Lurin C., Schmitz-Linneweber C., Sugita M., Small I. (2008): On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene familiy in plants, *Molecular Biology and Evolution* **25** (6): 1120-1128.

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.

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.

Prikryl J., Rojas M., Schuster G., Barkan A. (2011): Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** (1): 415-420.

Rimola V. (2014): Analyse mitochondrialer *nad*6-, *atp*9- und 26S-Transkripte in *rpf5-1-Knockout*- und PNPase-*Knockdown*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, Institut für Molekulare Botanik, Universität Ulm.

Sambrook J., Russel D.W. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3. Auflage.

Schmitz-Linneweber C., Small I. (2008): Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression, *Trends in Plant Science* **13** (12): 663-670.

Schwartz C., Balasubramanian S., Warthmann N., Michael T.P., Lempe J., Sureshkumar S., Kobayashi Y., Maloof J.N., Borevitz J.O., Chory J., Weigel D. (2009): *Cis*-regulatory Changes at *FLOWERING LOCUS T* Mediate Natural Variation in Flowering Responses of *Arabidopsis thaliana*, *Genetics* **183** (2): 723-732.

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.

Stoll B. (2012): Mitochondriale mRNA-Polymorphismen in verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen + Herstellung von Konstrukten zur Expression von artificial microRNAs gegen tRNaseZ-Gene aus *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.

Takenaka M., Verbitskiy D., Zehrmann A., Brennicke A. (2010): Reverse Genetic Screening Identifies Five E-class PPR Proteins Involved in RNA Editing in Mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, *The Journal of Biological Chemistry* **285** (35): 27122-27129.

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

Tzfira T., Tian G.-W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y., Krichevsky A., Taylor T., Vainstein A., Citovsky V. (2005): pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants, *Plant Molecular Biology* **57** (4): 503-516.

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): 57-60.

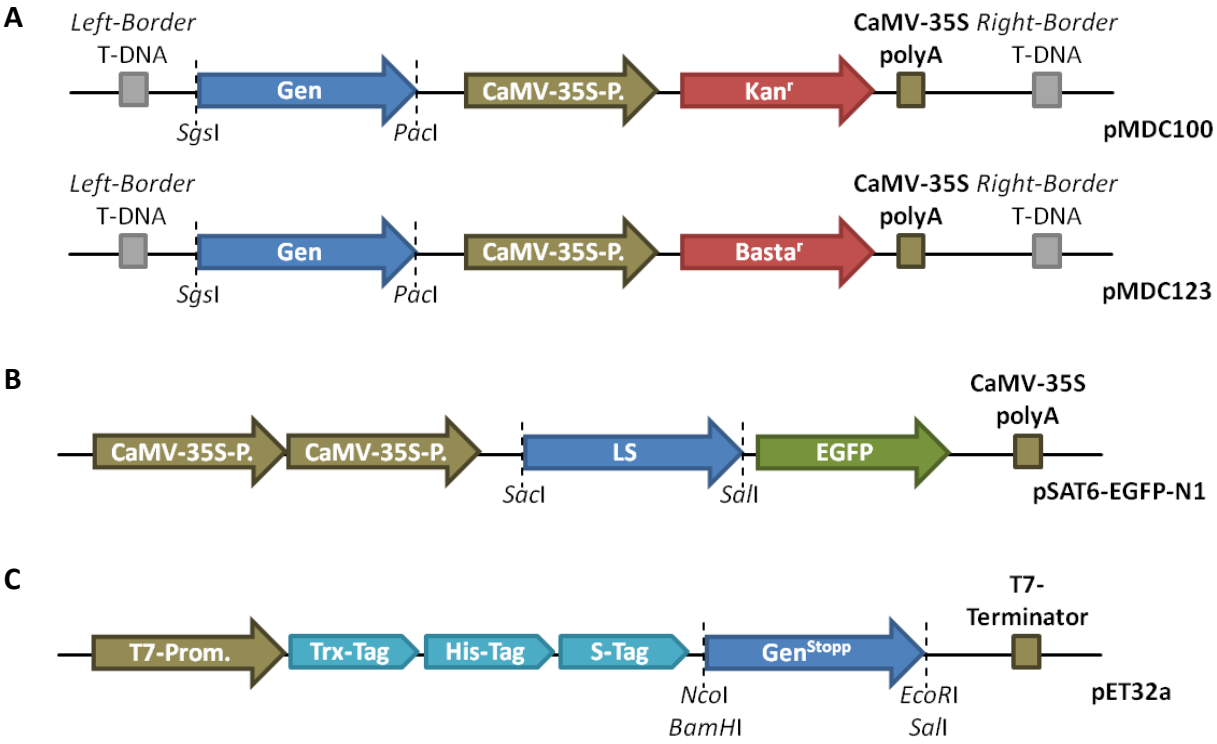
Yagi Y., Hayashi S., Kobayashi K., Hirayama T., Nakamura T. (2013): Elucidation of the RNA Recognition Code for Pentatricopeptide Repeat Proteins Involved in Organelle RNA Editing in Plants, *PLoS One* **8** (3): e57286.

Yamada K., Lim J., Dale J.M., Chen H., Shinn P., Palm C.J., Southwick A.M., Wu H.U., Kim C., Nquyen M., Pham P., Cheuk R., Karlin-Newmann G., Liu S.X., Lam B., Sakano H., Wu T., Yu G., Miranda M., Quach H.L., Tripp M., Chang C.H., Lee J.M., Toriumi M., Chan M.M., Tang C.C., Onodera C.S., Deng J.M., Akiyama K., Ansari Y., Arakawa T., Banh J., Banno F., Bowser L., Brooks S., Carninci P., Chao Q., Choy N., Enju A., Goldsmith A.D., Gurjal M., Hansen N.F., Hayashizaki Y., Johnson-Hopson C., Hsuan W., Iida K., Karnes M., Khan S., Koesema E., Ishida J., Jiang P.X., Jones T., Kawai J., Kamiya A., Meyers C., Nakajima M., Narusaka M., Seki M., Sakurai T., Satou M., Tamse R., Vaysberg M., Wallender E.K., Wong C., Yamamura Y., Yuan S., Shinozaki K., Davis R.W., Theologis A., Ecker J.R. (2003): Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome, *Science* **302** (5646): 842-846.

Zendler D. (2013): Investigation of small mitochondrial RNAs and RNA processing in *Arabidopsis thaliana*, Institut für Molekulare Botanik, Universität Ulm.

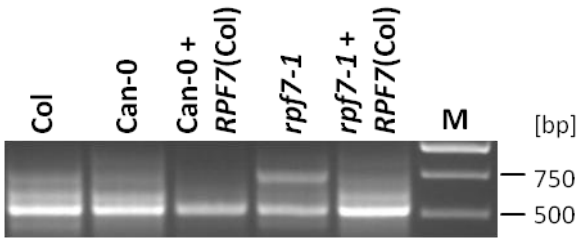
7. Anhang

Anhang 1: Schematische Genkarten klonierter Konstrukte

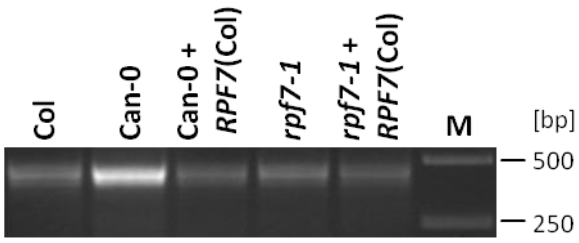


Anhang 1: Schematische Genkarten klonierter Konstrukte. **(A)** Pflanzen-Transformationskonstrukte. Neben einem Gen aus *A.thaliana* werden zusätzlich 5'- und 3'-flankierende Bereiche unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Sgs*I und *Pac*I einkloniert. Unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors (CaMV-35S-P.) wird bei pMDC100 ein Kanamycin-Resistenz-Gen (Kan^r) und im Fall von pMDC123 ein Basta®-Resistenz-Gen (Basta^r) exprimiert. In den Vektor pMDC100 wurden die Gene (inkl. 5'- und 3'-flankierender Sequenzen) At5g09840.1 und At5g64710.1 kloniert. In den Vektor pMDC123 wurden die Gene (inkl. 5'- und 3'-flankierender Sequenzen) At2g27800.1, At2g28050.1, At5g09840.1 und At5g64710.1 eingebracht. **(B)** Tabak-Transformationskonstrukte. Die N-terminale Lokalisationssequenz (LS) wird mittels der Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Sal*I vor das EGFP-Gen einkloniert. Das resultierende Fusionsprotein wird unter der Kontrolle zweier CaMV-35S-Promotoren (CaMV-35S-P.) exprimiert. In dieser Arbeit wurde auf diese Weise das Konstrukt AT5G64710.1-N_{Term}:EGFP hergestellt. **(C)** Überexpressionskonstrukte. Die cDNA-Sequenz von *MNU1*(At5g64710.1) wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Nco*I und *EcoR*I, die cDNA-Sequenz von *MNU2*(At5g09840.1) und *RPF7*(At2g28050.1) mit *BamH*I und *Sal*I in den Vektor pET32a eingebracht, wobei jeweils die N-terminale Lokalisationssequenz fehlt, jedoch das native Stoppkodon vorhanden ist (Gen^{Stopp}). Unter der Kontrolle des T7-Promotors (T7-Prom.) wurden auf diese Weise die rekombinanten Proteine rMNU1$^{\Delta N52}$, rMNU2$^{\Delta N75}$ und rRPF7$^{\Delta N117}$ (jeweils mit Trx-, His- und S-Tag am N-Terminus) hergestellt.

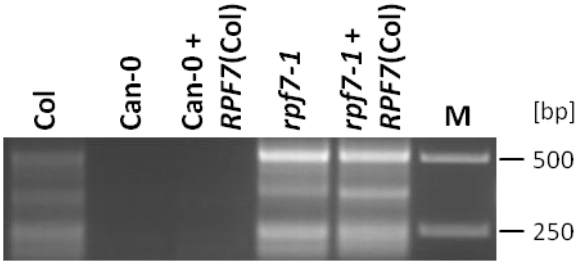
Anhang 2: CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte in Col, Can-0, Can-0 + *RPF7*(Col), *rpf7-1* und *rpf7-1* + *RPF7*(Col)



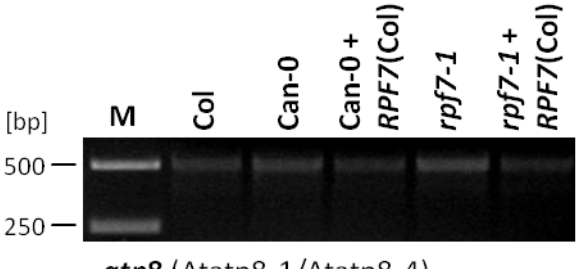
atp1 (Atatp1-8/Atatp1-9)



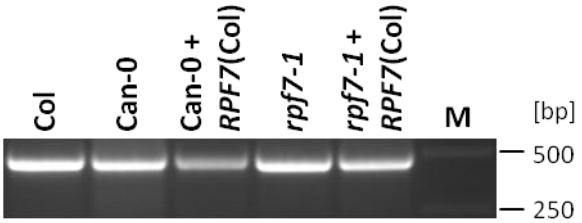
atp6-1 (Atatp6-2/Atatp6-3)



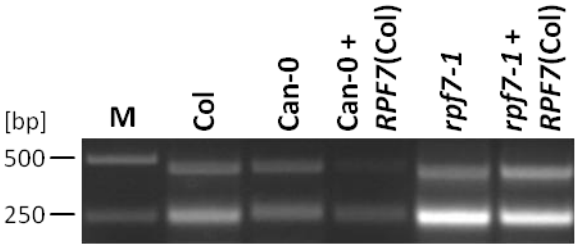
atp6-2 (Atatp6-2.Mega5'B/Atatp6.Mega3')



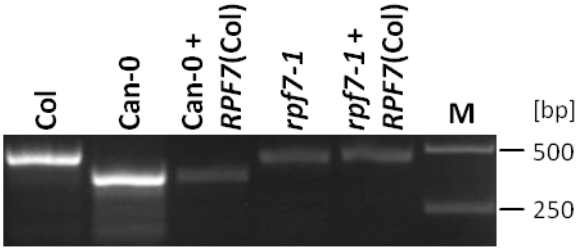
atp8 (Atatp8-1/Atatp8-4)



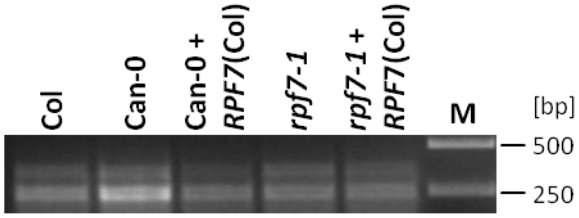
atp9 (Atatp9-Mega5'/Atatp9-Mega3')



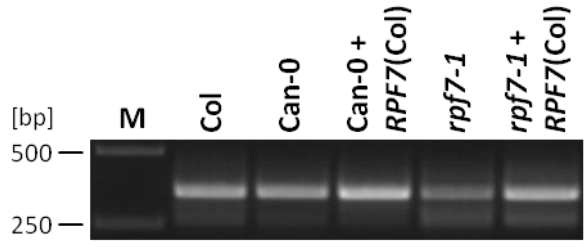
ccmB (Atccb2-3/Atccb2-6)



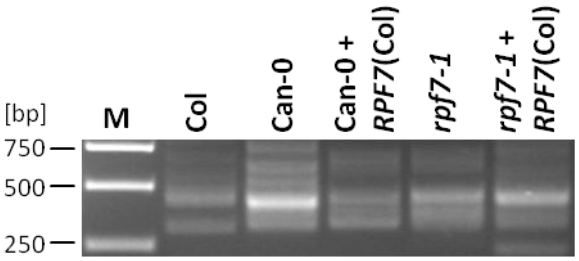
ccmC (Atccb3-3/Atccb3-Mega5'nah)



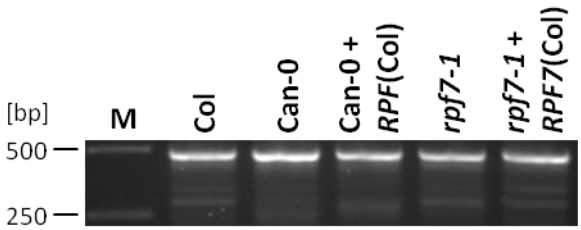
ccmF$_C$ (Atccb6-1/Atccb6-3)



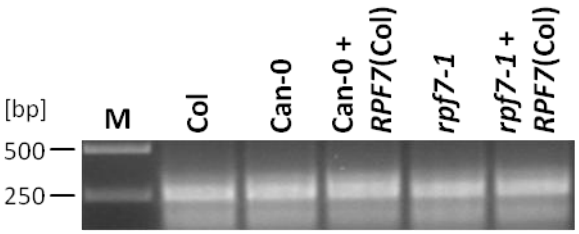
ccmF$_{N1}$ (Atccb6n1-Mega5'/ Atccb6n1-Mega3'2)



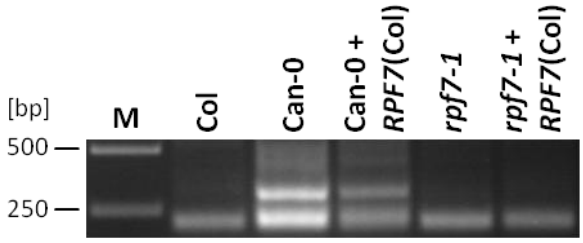
ccmF$_{N2}$ (Atccb6n2-5/Atccb6n2-6)



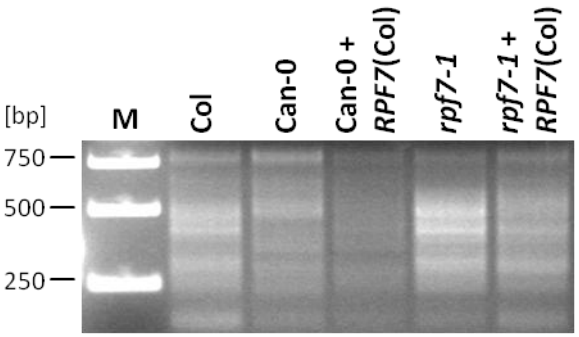
***cox*1** (Atcox1-2/Atcox1-4)



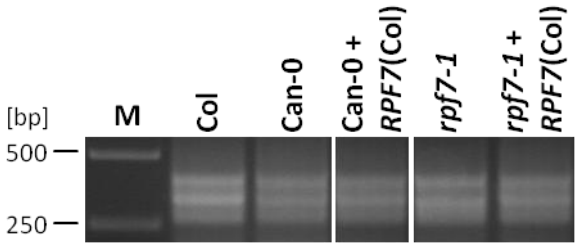
***cox*2** (Atcox2-5/Atcox2-6)



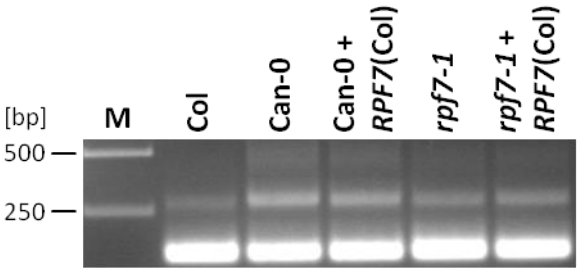
***cox*3** (Atcox3-Mega5‘/Atcox3-Mega3‘)



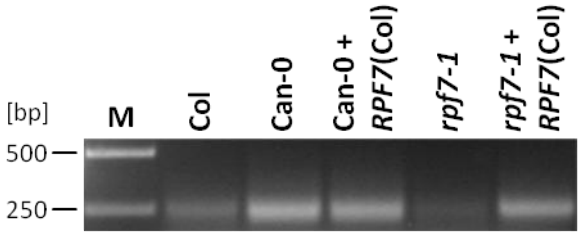
***nad*1** (Atnad1a-Mega.5‘B/
Atnad1de-Mega.3‘B)



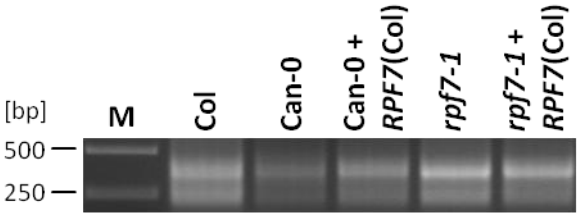
***nad*3-*rps*12** (Atnad3-2/Atrps12-6)



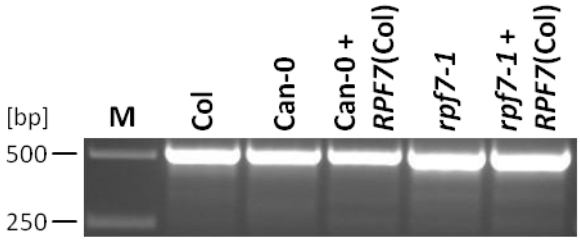
***nad*4** (Atnad4-3/Atnad4-15)



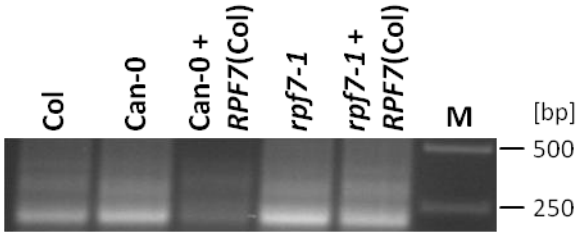
***nad*4L-*atp*4** (Atnad4L-Mega5‘neu/
Atorf25Mega3‘)



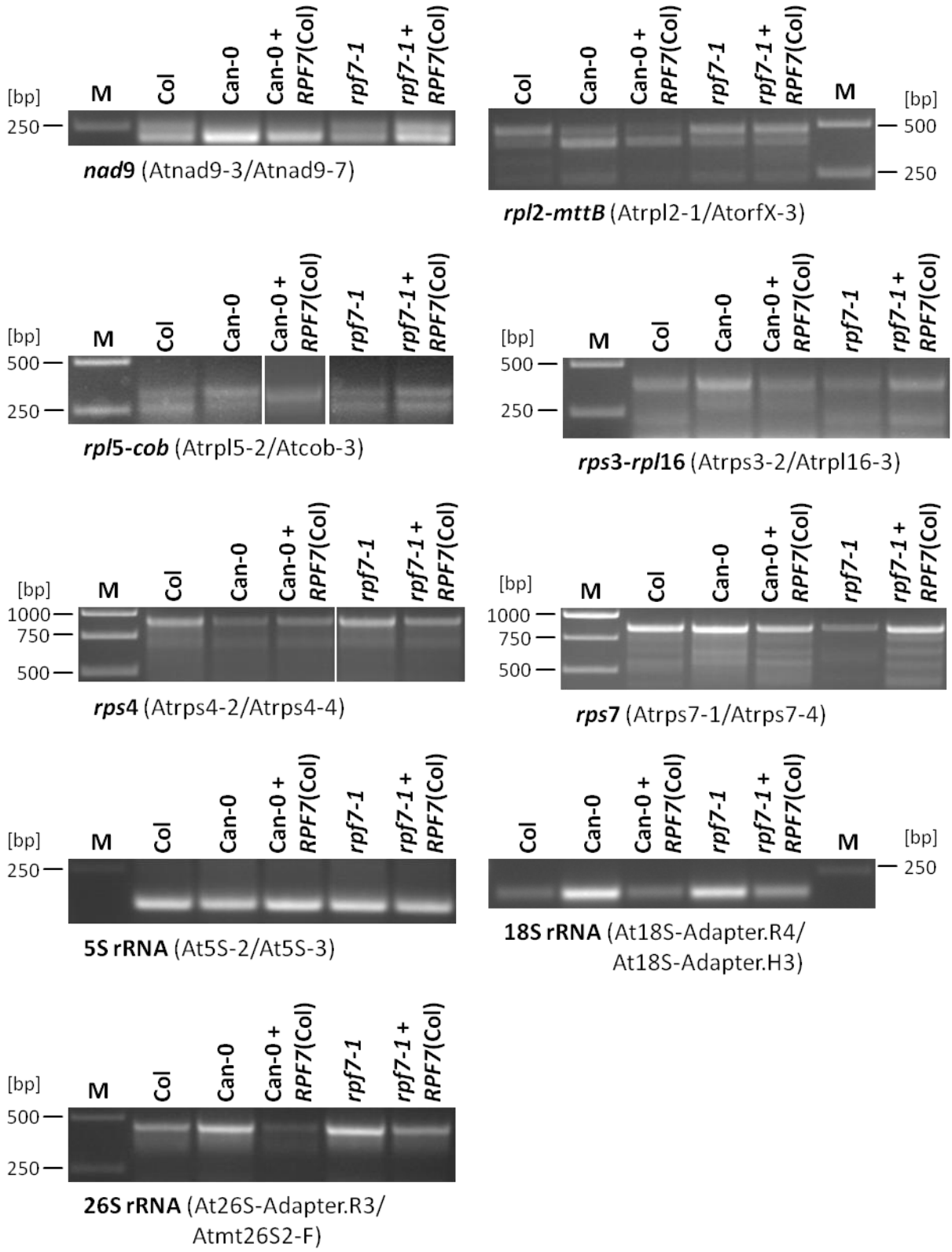
***nad*5** (Atnad5ab-1/Atnad5de-3)



***nad*6** (Atnad6-1/Atnad6-9)



***nad*7** (Atnad7-4/Atnad7-6)



Anhang 2: CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte in Col, Can-0, Can-0 + *RPF7*(Col), *rpf7-1* und *rpf7-1* + *RPF7*(Col). Die Gene sowie die verwendeten Primer sind jeweils unterhalb der Gelbilder angegeben. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Anhang 3: Nukleotidsequenz der *RPF*7-Allele aus Can-0 und Chat-1

A

```
ATGACTCCGCAATGCTTCTTGAAAACCCTGAAGACAGCTAAACAAACTTATACATTCTCAATCTA    65
CAAGCTTCTCCTCAATTCTTCCTCTATAAACCAAACTCTTGCTTCACCGGAAACACCACTCTCCG   130
ATCTCAATCTCTCCACTCTTCGCCGTATTTTATCAGACCCAGATATCAACTCCTGGAAATGCATC   195
TCCCTCTTCAATTTCATCCTGGAGAACCCATCTCTTTTCTCATTCCAACCTGATCTCAGAACTCA   260
CTTGTCTCTCACTTTCCGTGTCTTGTCGGAGAGGAGATTCTCATATGCGAAAGAACTCTTGAAGC   325
CTGTGGCTATTGATGACATTCTCAGGTACCCTTTTAATGTAATCGTCTCTAGCGTTATTGATGAA   390
TGTGGTTGTGAGAAGAAAGTTGTTGGGAGGTTCTTTAATTCGATGATTATGGTTTATTCAGACAA   455
TGGAAAATTTAGTGAAGTTGTTGAGGTTTTTGAGTATATGAAGAACAATGAAGTTAAGATTGATG   520
AAAAGACTCGTACTTTGCATTTGTTGAATCTCAAGAGATGTGATCAGATGGAACTAGCTAGAGAT   585
TTCTTTAGTCTAATGGTTGAGTCAGGGATTGATGTTGTTACTGTGTACTCTTTAACTGTTGTTGT   650
TACGGTGTTGTGTTGCAATGGGGAGATTACAAGAGCAAGAGAATTGGTGGAGGAGATGGGGTTGG   715
TTAAAGGGGTTAAGGCTAATATTGTTACGTTTAAGTCGATGATTGGTTGTTGTGTGAAAAGATGG   780
GATTTTGAAGAGTTGGATTTGGTTCTTAAGTTAATGGAGAAGGAAAGTGTGATGCTTGATCTCGA   845
TAGTTACAAGGTTTTGATTGATGGGTTTACTAGTTATGGTAAGGTTGAAGAAGCAGAGAGGTTGG   910
TTTTGATGATGCATGATAAGAAGTTAAGAGTGGAGAGTTATCTGTATAATTTGATTATGAATGGG   975
TACTCTCGGTTTGGACTAGTGGAGAAAGTGATTGAACTATATAGCGAAATGAGTTCTCGAGGTGT  1040
TACTCCGAACAAAGATACGTATTGGGTGTTGATGAATGGACTTTGCAAAGCTGGGAAAGTTTGTG  1105
AAGCGATGAGTTTTTTGAATGAGTAGCGAGTGAATGAGTTTGAGATTGATGAAGAAATGTATAGT  1170
ACATTGAGTGAAGAGTGTTACAGAGTAGGAATGATAGATAAATCTTTGGAAGTGGTGGCTGAGAT  1235
GATTAGGGATGGATTCATTCCTGGTGCTACGATATGTGAAAGATTAGCTGATTCGTTGTTTGAAG  1300
TAAACAGGAAAGAGGCACAAATGCTGATTACCATTGTGGTTAAGTGTGGTATTAAACCGAAATCG  1365
TGTTCTCAATATGGTCTGAAATGA                                            1389
```

B

```
ATGACTCCGCAATGCTTCTTGAAAACCCTGAAGACAGCTAAACAAACTTATACATTCTCAATCTA    65
CAAGCTTCTCCTCAATTCTTCCTCTATAAACCAAACTCTTGCTTCACCGGAAACACCACTCTCCG   130
ATCTCAATCTCTCCACTCTTCGCCGTATTTTATCAGACCCAGATATCAAATCCTGGAAATGCATC   195
TCCCTTTTCAATTTCATCCTGGAGAACCCATCTCTTTTCTCATTCCAACCTGATCTCAGAACTCA   260
CTTGTCTCTCACTTTCCGTGTCTTGTCGGAGAGGAGATTCTCATATGCGAAAGAACTCTTGAAGC   325
CTGTGGCTATTGATGACATTCTCAGGTACCCTTTTAATGTAATCGTCTCTAGCGTTATTGATGAA   390
TGTGGTTGTGAGAAGAAAGTTGTTGGGAGGTTCTTTAATTCGATGATTATGGTTTATTCAGACAA   455
TGGAAAATTTAGTGAAGTTGTTGAGGTTTTTGAGTATATGAAGAACAATGAAGTTAAGATTGATG   520
AAAAGACTTGTACTTTGCATTTGTTGAATCTCAAGAGATGTGATCAGATGGAACTAGCTAGAGAT   585
TTCTTTAGTCTAATGGTTGAGTCAGGGATTGATGTTGTTACTGTGTACTCTTTAACTGTTGTTGT   650
TACGGTGTTGTGTTGCAATGGGGAGATTACAAGAGCAAGAGAATTGGTGGAGGAGATGGGGTTGG   715
TTAAAGGGGTTAAGGCTAATATTGTTACGTTTAAGTCGATGATTGGTTGTTGTGTGAAAAGATGG   780
TTAAAGGGGTTAAGGCTAATATTGTTACGTACATTGAGTGAAGAGTGTTACAGAGTAGGAATGAT   845
AGATAAATCTTTGGAAGTGGTGGCTGAGATGATTAGGGATGGATTCATTCCTGGTGCTACGATAT   910
GTGAAAGATTAGCTGATTCGTTGTTTGAAGTAAACAGGAAAGAGGCACAAATGCTGATTACCATT   975
GTGGTTAAGTGTGGTATTAAACCAAAATCGTGTTCTCAATATGGTCTGAAATGA             1029
```

Anhang 3: Nukleotidsequenz der *RPF7*-Allele aus Can-0 (A) und Chat-1 (B). Die grünen Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Nukleotide innerhalb der jeweiligen Sequenz an. Die *RPF7*-Allele wurden unter Verwendung der Primer At2g28050_kompl.H2 und At2g28050_kompl.R (P7-1 + P7-9, Abbildung 10) amplifiziert. *RPF7*(Can-0) wurde mit den Primern At2g28050.A, At2g28050.B, At2g28050.C und At2g28050.D sequenziert (P7-3, P7-5, P7-7 + P7-6, Abbildung 10). *RPF7*(Chat-1) wurde mit den Primern At2g28050_kompl.H2 und At2g28050_kompl.R sequenziert.

Anhang 4: Vergleich der AS-Sequenz von RPF7(Col), RPF7(Sf-2), RPF7(Sg-1) und RPF7(Wei-0)

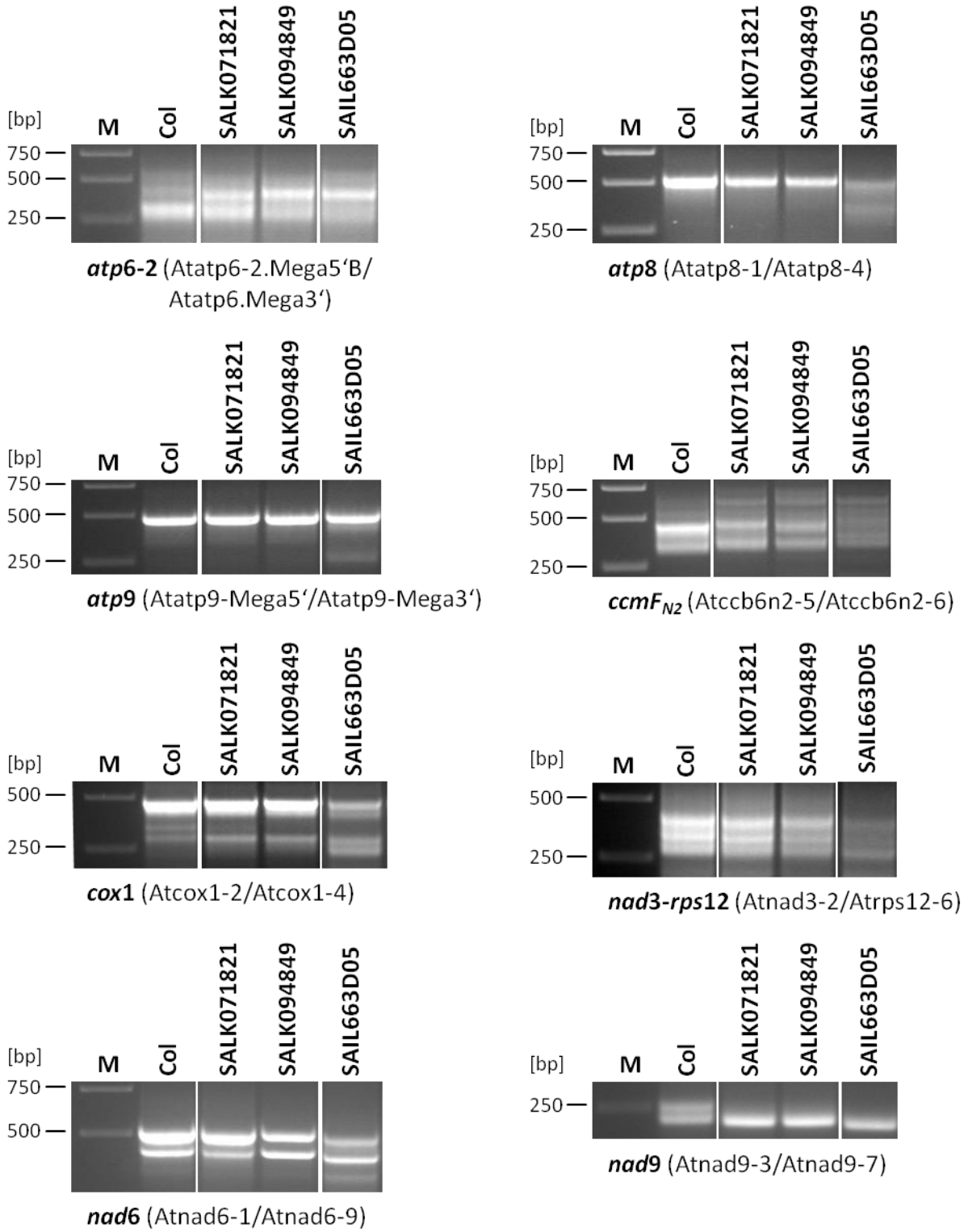
```
Col      1   MTPQCFLKTLKTAKQTYTFSIYKLLLNSSSINQTLASPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIK   60
Sf-2     1   MTPQCFLKTLKTAKQTYTFSIYKLLLNSSSINQTLASPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIK   60
Sg-1     1   MTPQSFLKTLKTAKQTYPFSIYKLLLNSSSINQTLDSPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIK   60
Wei-0    1   MTPQCFLKTLKTAKQTYTFSIYKLLLNSSSINQTLASPETPLSDLNLSTLRRILSDPDIK   60
             ****.************.**************** ************************

Col     61   SWKCISLFNFILENPSLFSFQPDLRTHLSLTFRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
Sf-2    61   SWKCISLFNFILENPSLFSFQPDLRTHLSLTFRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
Sg-1    61   SWKCISLFNFIRENPSLFSFKPDLRTHLSLTCRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
Wei-0   61   SWKCISLFNFILENPSLFSFQPDLRTHLSLTFRVLSERRFSYAKELLKPVAIDDILRYPF  120
             *********** ********:********** ****************************
                              |PPR1-----------------------------||PPR2---
Col    121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRFFNSMIMVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTCTLH  180
Sf-2   121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRLFNSMIMVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTCTLH  180
Sg-1   121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRFFNSMILVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTCTLH  180
Wei-0  121   NVIVSSVIDECGCEKKVVGRFFNSMIMVYSDNGKFSEVVEVFEYMKNNEVKIDEKTCTLH  180
             ********************:*****:**********************************
             -------------------------|  |PPR3-------------------------|
Col    181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVTVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
Sf-2   181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVTVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
Sg-1   181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVSVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
Wei-0  181   LLNLKRCDQMELARDFFSLMVESGIDVVTVYSLTVVVTVLCCNGEITRARELVEEMGLVK  240
             ************************************:**********************
                  |PPR4-----------------------------||PPR5----------------
Col    241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWDFEELDLVLKLMEKESVMLDLDSYKVLIDGFTSYGKVEEA  300
Sf-2   241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWDFEELDLVLKLMEKESVMLDLDSYKVLIDGFTSYGKVEEA  300
Sg-1   241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWDFEELDLVLKLMEKESVMLDLDSYKVLIDGFTSYGKVEEA  300
Wei-0  241   GVKANIVTFKSMIGCCVKRWDFEELDLVLKLMEKESVMLDLDSYKVLIDGFTSYGKVEEA  300
             ************************************************************
             -------------||PPR6-----------------------------||PPR7------
Col    301   ERLVLMMHDKKLRVESYLYNLIMNGYSRFGLVEKVIELYSEMSSRGVTPNKDTYWVLMNG  360
Sf-2   301   ERLVLMMHDKKLRVESYLYNLIMNGYSRFGLVEKVIELYSEMSSRGVTPNKDTYWVLMNG  360
Sg-1   301   ERLVLMMHDKKLRVESYLYDLIMNGYSRFGLVEKVFELYSEMSSRGVTPNKDTYWVLMNG  360
Wei-0  301   ERLVLMMHDKKLRVESYLYNLIMNGYSRFGLVEKVIELYSEMSSRGVTPNKDTYWVLMNG  360
             ******************:**************:************************
             -----------------------||PPR8-----------------------------|
Col    361   LCKAGKVCEAMSFLNELRVNEFEIDEEMYSTLSEECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  420
Sf-2   361   LCKAGKVCEAMSFLNELRVNEFEIDKEMYSTLSEECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  420
Sg-1   361   LCKAGKVCEAMSFLNELRVNEFEIDEEMYSTLSEECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  420
Wei-0  361   LCKAGKVCEAMSFLNELRVNEFEIDEEMYTTLSEECYRVGMIDKSLEVVAEMIRDGFIPG  420
             ************************:***:******************************

Col    421   ATICERLADSLFEVNRKEAQMLITIVVKCGIKPKSCSQYGLK-                   462
Sf-2   421   ATICERLADSLFEVNRKEAQMLITIVVKCGIKPKSCSQYGLK-                   462
Sg-1   421   ATICERLADSLFEVNRKEAQMMITIVVKCGIKPKSV*LWSEM-                   462
Wei-0  421   ATICERLADSLFEVNRKEAQMLITIVVKCGIKPKSCSQYGLK-                   462
             ********************:************    :.
```

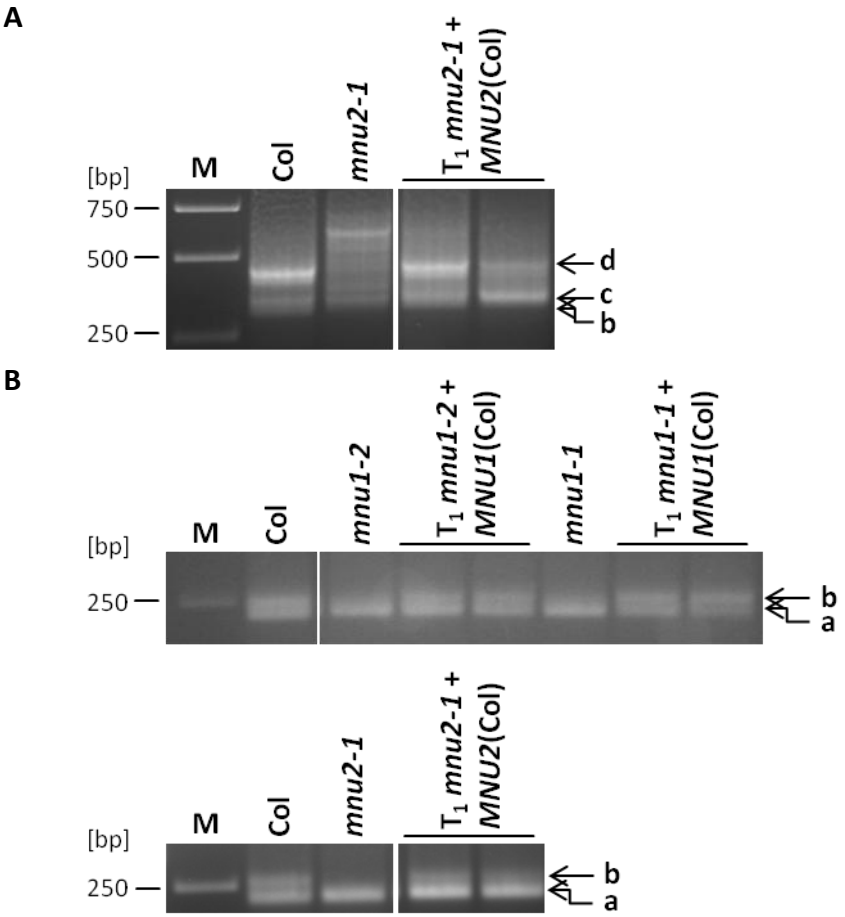
Anhang 4: Vergleich der AS-Sequenz von RPF7(Col), RPF7(Sf-2), RPF7(Sg-1) und RPF7(Wei-0). Die AS-Sequenzen von RPF7(Sf-2), RPF7(Sg-1) und RPF7(Wei-0) entstammen dem „1001 Genomes Project“ (http://1001genomes.org). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 19A.

Anhang 5: CR-RT-PCR-Analyse einzelner mitochondrialer Transkripte in Col, SALK071821, SALK094849 und SAIL663D05

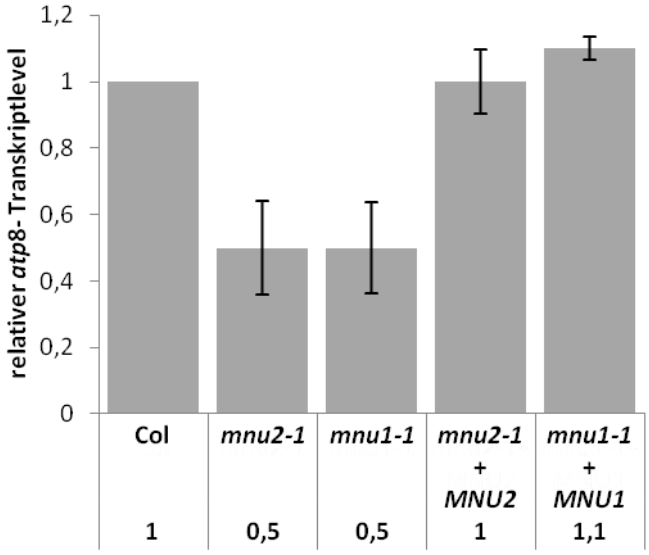


Anhang 5: CR-RT-PCR-Analyse einzelner mitochondrialer Transkripte in Col, SALK071821, SALK094849 und SAIL663D05. Erläuterungen siehe Abbildung 7 + Anhang 2.

Anhang 6: Weitere Analysen mit *mnu2-1* + *MNU2*(Col), *mnu1-1* + *MNU1*(Col) und *mnu1-2* + *MNU1*(Col)



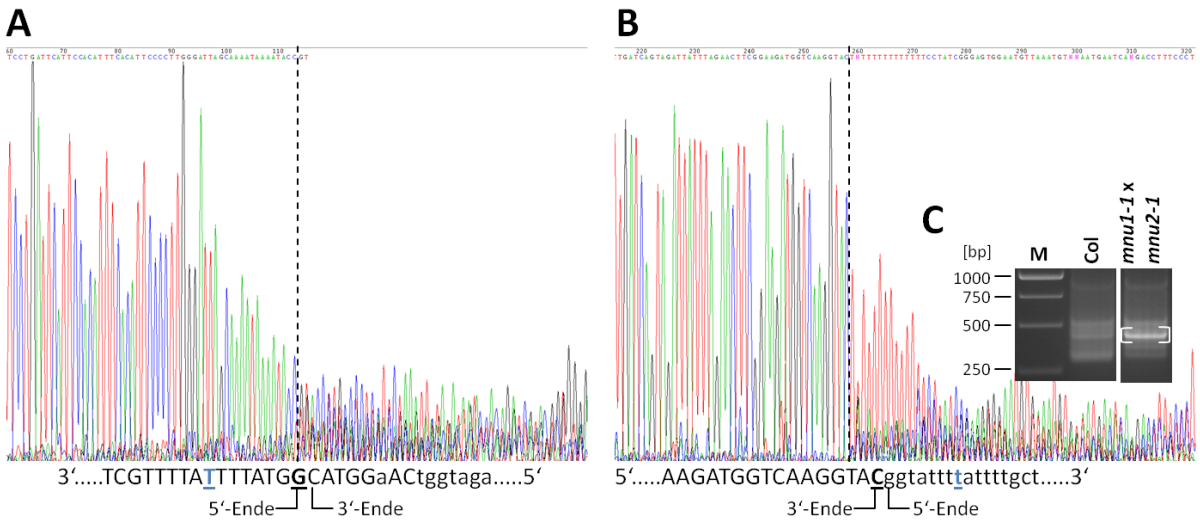
Anhang 6.1: CR-RT-PCR-Analyse von *nad*3-*rps*12- (A) und *nad*9-Transkripten (B) in komplementierten T_1-Pflanzen. **(A)** Erläuterungen siehe Abbildung 47A. **(B)** Erläuterungen siehe Abbildung 51A.



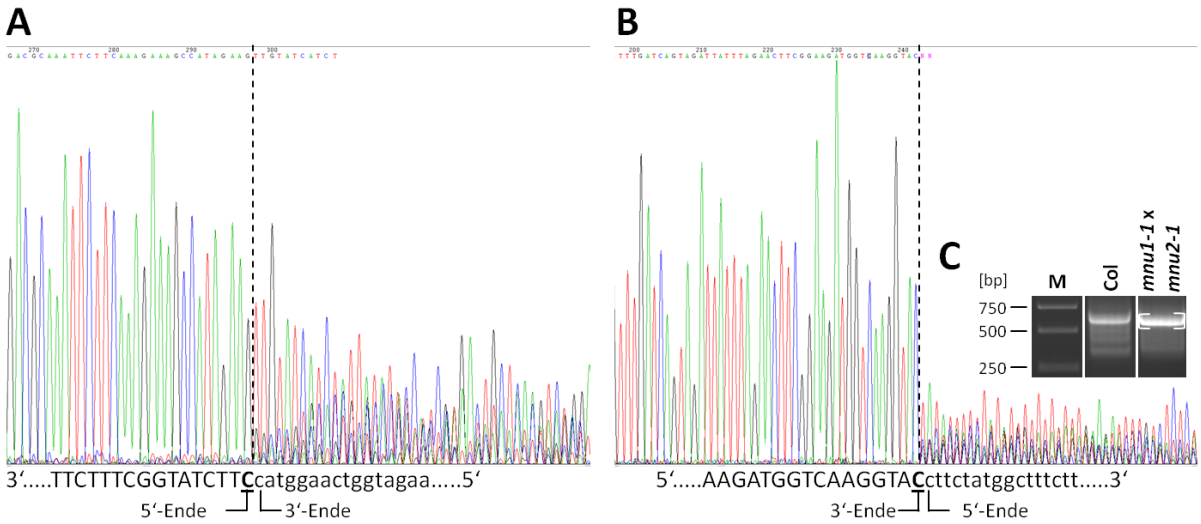
Anhang 6.2: *Real-Time* qRT-PCR-Analyse auf das *atp*8-Leseraster in komplementierten T_1-Pflanzen. Die Daten für *mnu2-1*, *mnu1-1*, *mnu2-1* + *MNU2* (T_1 *mnu2-1* + *MNU2*(Col)) und *mnu1-1* + *MNU1* (T_1 *mnu1-1* + *MNU1*(Col)) stammen jeweils von zwei unabhängigen biologischen, in je vier technischen, Replikaten. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 42.

Anhang 7: Identifizierung neuer 5‘-Enden der *ccmF$_{N2}$*- und *nad*3-*rps*12-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1*

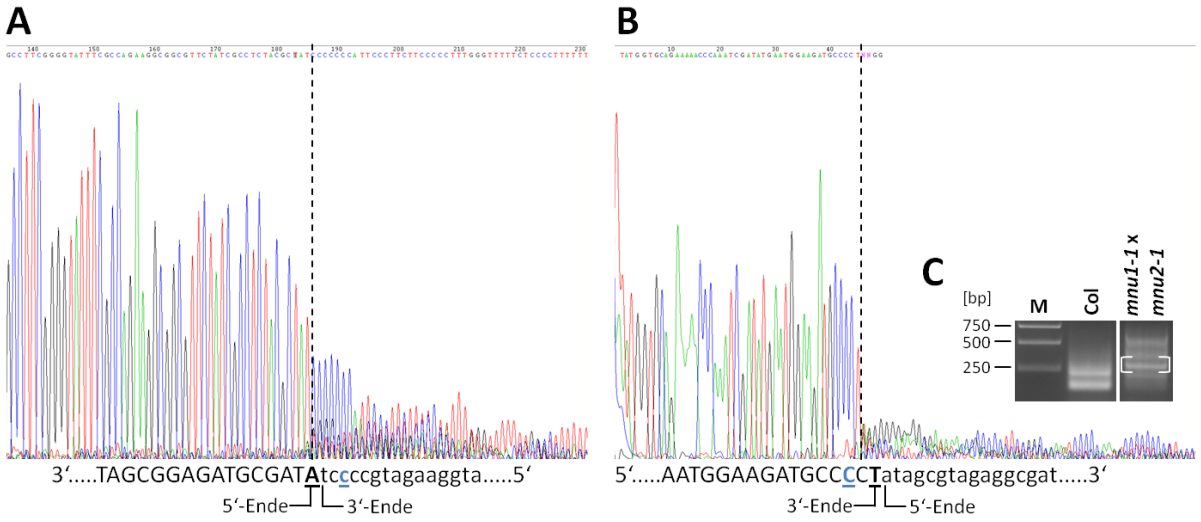
In der Linie *mnu1-1* x *mnu2-1* wurden neue 5‘-Enden der *ccmF$_{N2}$*- und der *nad*3-*rps*12-mRNA identifiziert. Das 3‘-Ende entspricht jeweils dem in Col bekannten [Forner et al. 2007]. Für die Festlegung eines Transkript-Endes wird das Sequenzchromatogramm bezüglich verschiedener Kriterien untersucht. Der Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Referenzsequenz (mitochondriale DNA von C24, NC_001284) gibt einen ersten Hinweis auf die Lage eines Endes. Weiter deuten die Zunahme von Unterpeaks und die damit zunehmend unsauber werdende Sequenz auf ein Transkript-Ende hin. Darüber hinaus nimmt oftmals stromabwärts des Transkript-Endes die Peakhöhe deutlich ab.



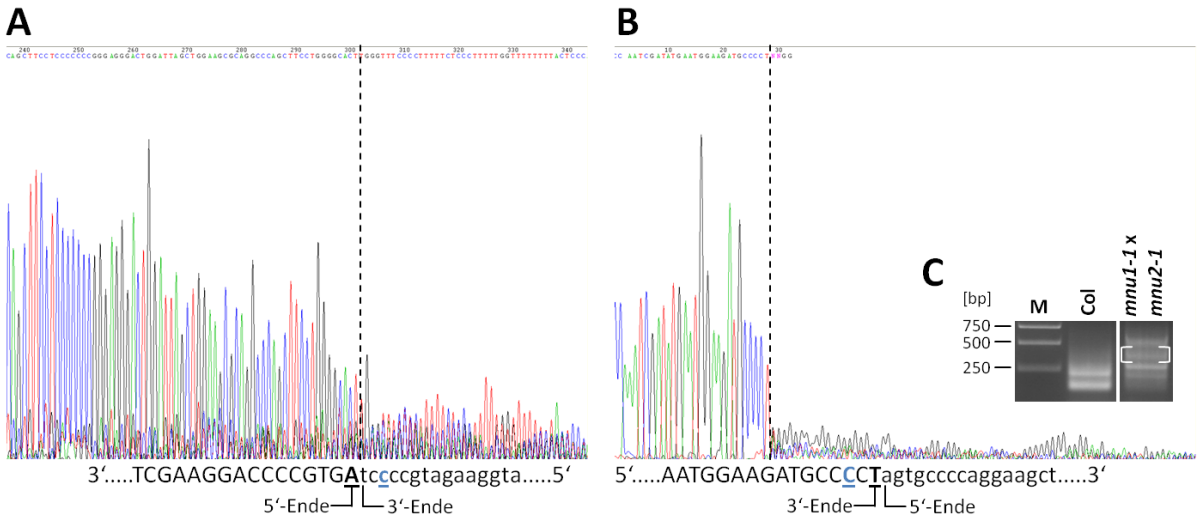
Anhang 7.1: Identifizierung eines neuen 5‘-Endes der *ccmF$_{N2}$*-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1*. **(A)** Sequenzierung mit Atccb6n2-7 (P3, Abbildung 36). Das 5‘-Ende ist bei -235 lokalisiert (markiert durch eine senkrechte Linie). Die in Großbuchstaben angegebene Sequenz entspricht den komplementären Nukleotiden im Chromatogramm. Das ermittelte 5‘-Ende ist unterstrichen. Teilweise kann die 3‘-Sequenz gelesen werden, wobei die in Kleinbuchstaben angegebenen Nukleotide dem Chromatogramm nicht entnommen werden können. Sieben Nukleotide stromabwärts des 5‘-Endes bei -235 tritt bei *mnu1-1* x *mnu2-1* im Vergleich zur Referenzsequenz aus Col ein Nukleotid-Austausch (G(Col)→T(*mnu1-1* x *mnu2-1*)) auf (blau + unterstrichen, auch bei (B)). **(B)** Sequenzierung mit Atccb6n2-6 (P2, Abbildung 36). Das 3‘-Ende bei +170 entspricht dem in Col bekannten (markiert durch eine senkrechte Linie + unterstrichen in der darunter stehenden Sequenz) [Forner et al. 2007]. Die Kleinbuchstaben geben die (hier nicht lesbare) 5‘-Sequenz wieder. **(C)** CR-RT-PCR mit Atccb6n2-7 und Atccb6n2-6. Das markierte etwa 460 bp große Produkt entspricht Produkt e in Abbildung 43B.



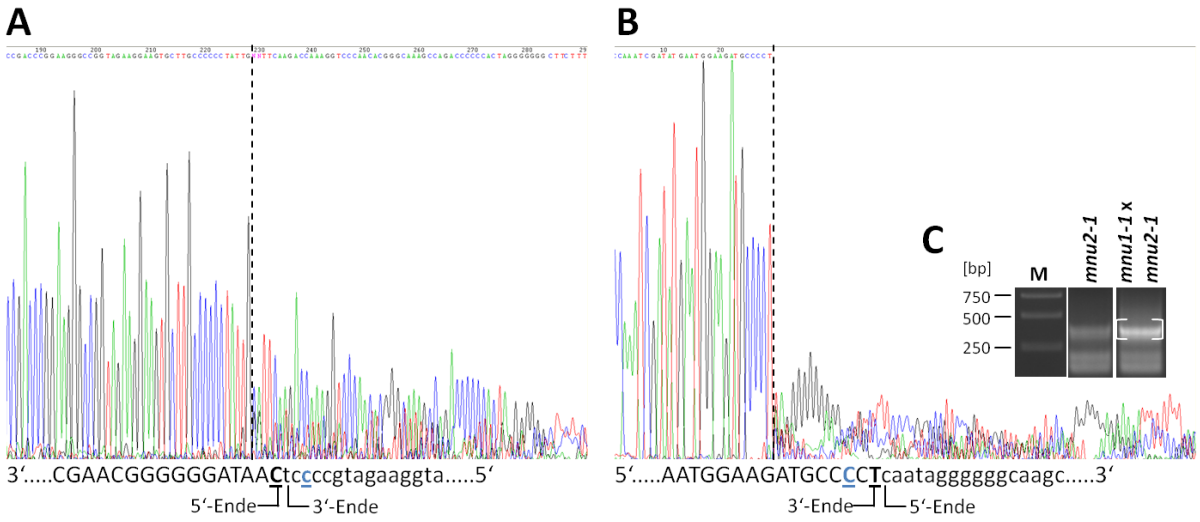
Anhang 7.2: Identifizierung eines neuen 5‘-Endes der *ccmF*$_{N2}$-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1*. **(A)** Sequenzierung mit Atccb6n2-14 (P4, Abbildung 36). Das 5‘-Ende ist bei -729 lokalisiert. Weitere Erläuterungen siehe Anhang 7.1A. **(B)** Erläuterungen siehe Anhang 7.1B. **(C)** CR-RT-PCR mit Atccb6n2-14 und Atccb6n2-6. Das markierte etwa 650 bp große Produkt korreliert mit dem ca. 950 bp großen Produkt f in Abbildung 43B.



Anhang 7.3: Identifizierung eines neuen 5‘-Endes der *nad*3-*rps*12-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1*. **(A)** Sequenzierung mit Atnad3-8 (P3, Abbildung 46). Das 5‘-Ende ist bei -449 lokalisiert. Weitere Erläuterungen siehe Anhang 7.1A. **(B)** Sequenzierung mit Atrps12-6 (P2, Abbildung 46). Das 3‘-Ende bei +15 entspricht dem in Col bekannten [Forner et al. 2007]. Zwei Nukleotide stromaufwärts des 3‘-Endes bei +15 tritt bei *mnu1-1* x *mnu2-1* im Vergleich zur Referenzsequenz aus Col ein Nukleotid-Austausch (T(Col)→C(*mnu1-1* x *mnu2-1*)) auf (blau + unterstrichen, auch bei (A)). Weitere Erläuterungen siehe Anhang 7.1B. **(C)** CR-RT-PCR mit Atnad3-8 und Atrps12-6. Das markierte etwa 310 bp große Produkt entspricht Produkt g in Abbildung 47B.

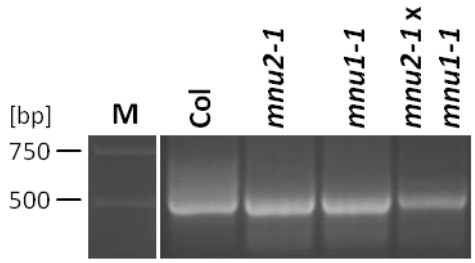


Anhang 7.4: Identifizierung eines neuen 5‘-Endes der *nad*3-*rps*12-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1*. **(A)** Das 5‘-Ende ist bei -555 lokalisiert. Weitere Erläuterungen siehe Anhang 7.3A. **(B)** Erläuterungen siehe Anhang 7.3B. **(C)** CR-RT-PCR mit Atnad3-8 und Atrps12-6. Das markierte etwa 420 bp große Produkt entspricht Produkt h in Abbildung 47B.

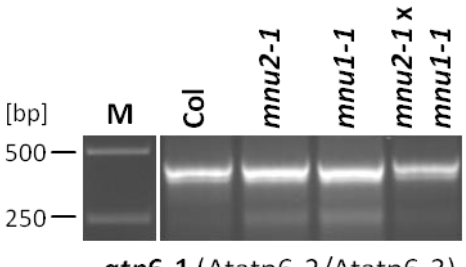


Anhang 7.5: Identifizierung eines neuen 5‘-Endes der *nad*3-*rps*12-mRNA in *mnu1-1* x *mnu2-1*. **(A)** Sequenzierung mit Atnad3-13 (P4, Abbildung 46). Das 5‘-Ende ist bei -762 lokalisiert. Weitere Erläuterungen siehe Anhang 7.1A. **(B)** Erläuterungen siehe Anhang 7.3B. **(C)** CR-RT-PCR mit Atnad3-13 und Atrps12-6. Das markierte etwa 350 bp große Produkt korreliert mit dem ca. 630 bp großen Produkt i in Abbildung 47B.

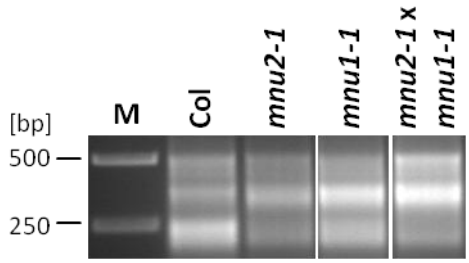
Anhang 8: CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte in Col, *mnu2-1*, *mnu1-1* und *mnu2-1* x *mnu1-1*



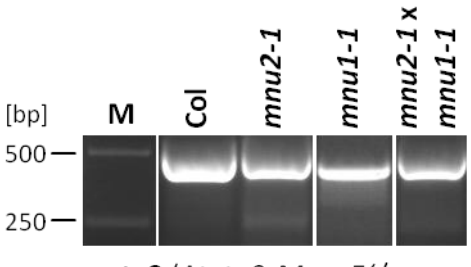
atp1 (Atatp1-8/Atatp1-9)



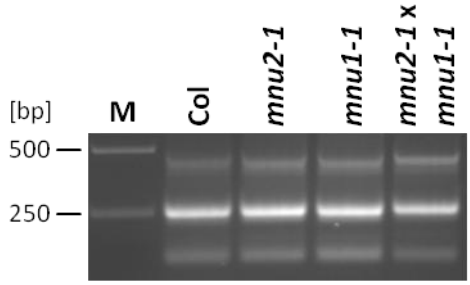
atp6-1 (Atatp6-2/Atatp6-3)



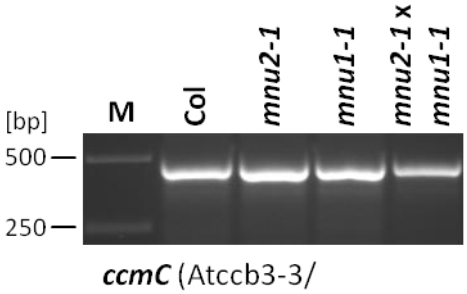
atp6-2 (Atatp6-2.Mega5'B/ Atatp6.Mega3')



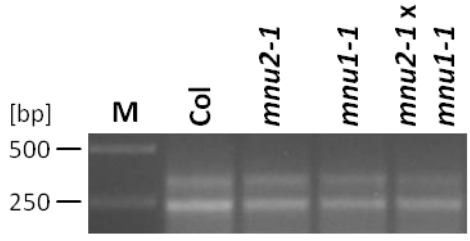
atp9 (Atatp9-Mega5'/ Atatp9-Mega3')



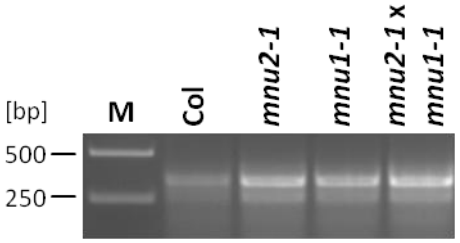
ccmB (Atccb2-3/Atccb2-6)



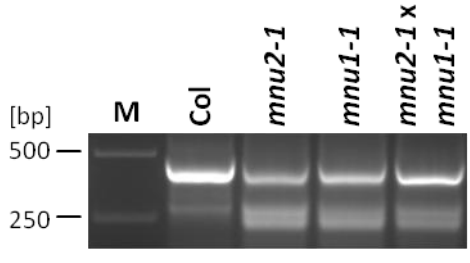
ccmC (Atccb3-3/ Atccb3-Mega5'nah)



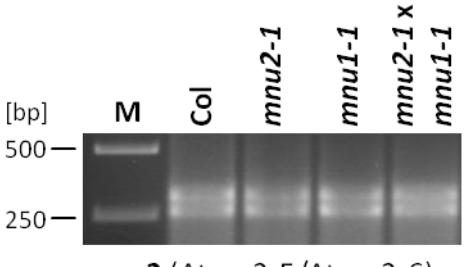
ccmF$_C$ (Atccb6-1/Atccb6-3)



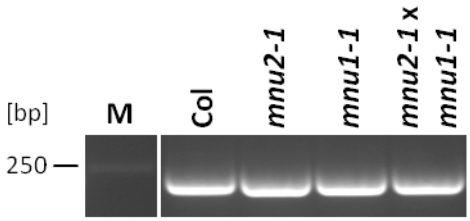
ccmF$_{N1}$ (Atccb6n1-Mega5'/ Atccb6n1-Mega3'2



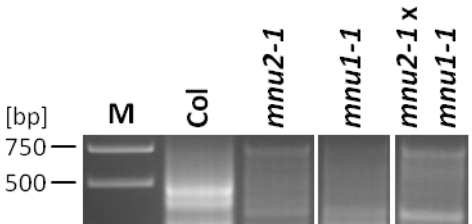
cox1 (Atcox1-2/Atcox1-4)



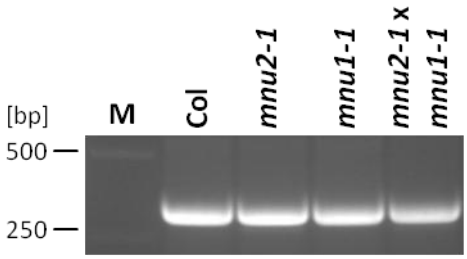
cox2 (Atcox2-5/Atcox2-6)



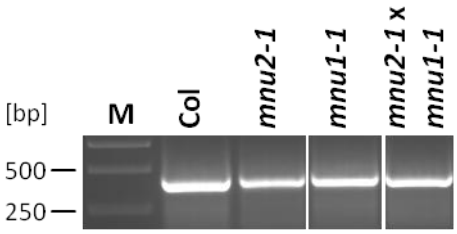
***cox*3** (Atcox3-Mega5‘/ Atcox3-Mega3‘)



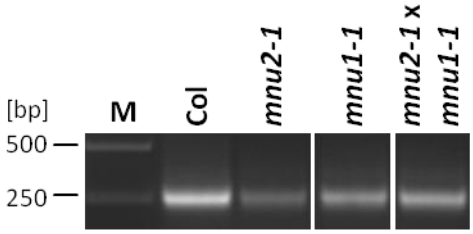
***nad*1** (Atnad1a-1/Atnad1de-3)



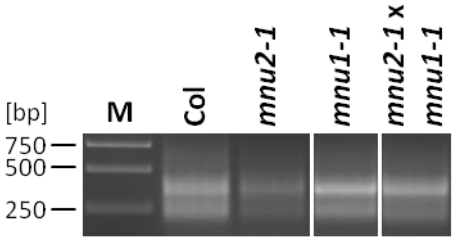
***nad*2** (Atnad2ab-2/Atnad2cde-3)



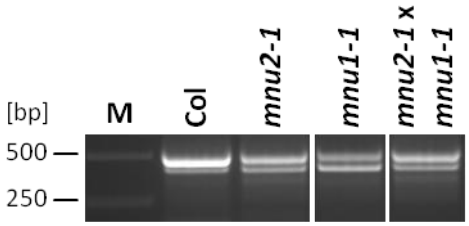
***nad*4** (Atnad4-3/Atnad4-2)



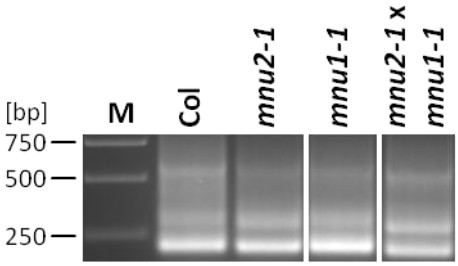
***nad*4L-*atp*4** (Atnad4L-Mega5‘neu/ Atorf25Mega3‘)



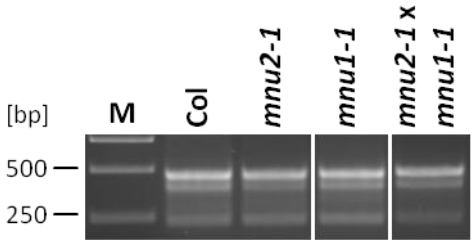
***nad*5** (Atnad5ab-1/Atnad5de-3)



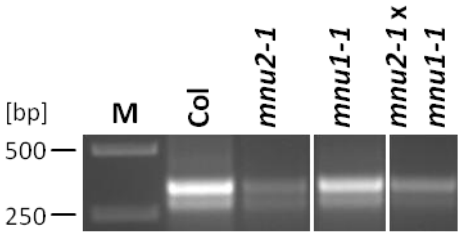
***nad*6** (Atnad6-1/Atnad6-9)



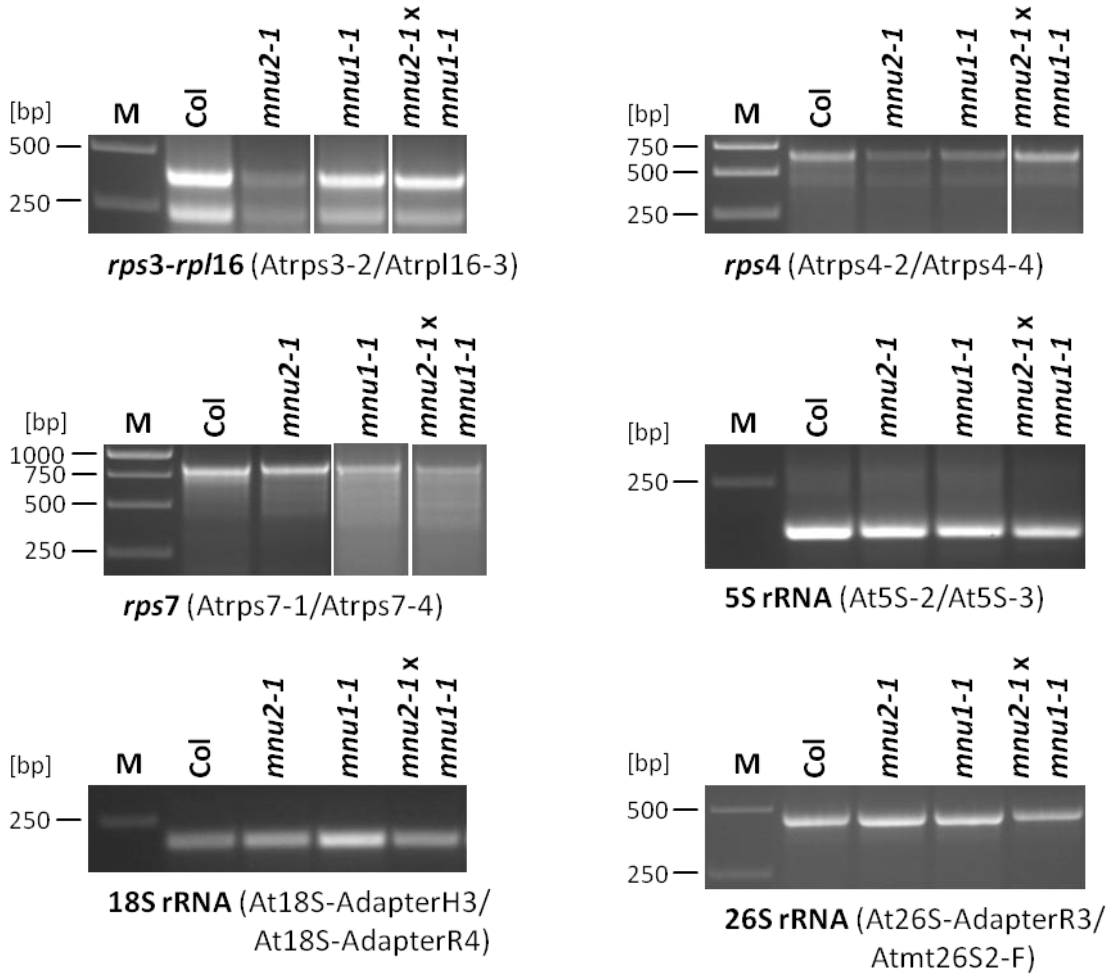
***nad*7** (Atnad7-4/Atnad7-6)



rpl*2-*mttB (Atrpl2-1/AtorfX-3)



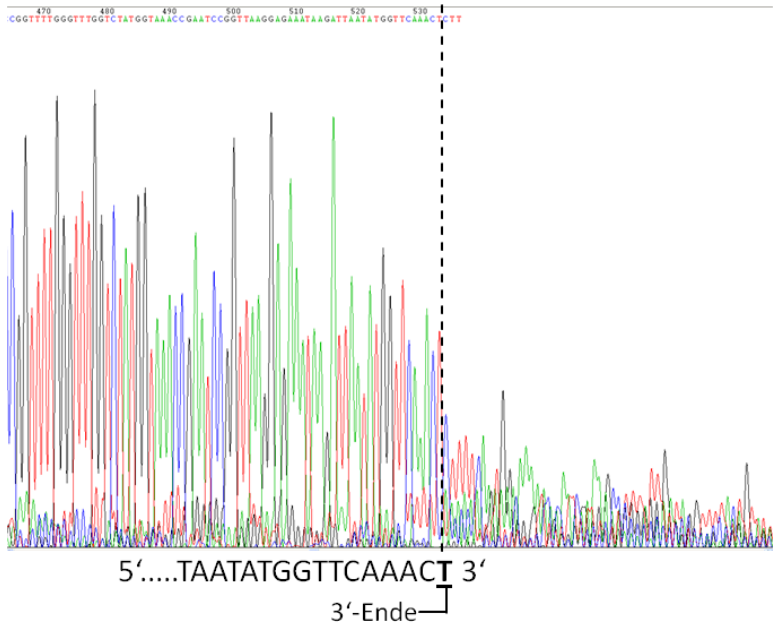
rpl*5-*cob (Atrpl5-2/Atcob-3)



Anhang 8: CR-RT-PCR-Analyse aller mitochondrialer Haupttranskripte in Col, *mnu2-1*, *mnu1-1* und *mnu2-1* x *mnu1-1*. Die entsprechenden CR-RT-PCR-Analysen bezüglich *atp*8-, *ccmF*$_{N2}$-, *nad*3-*rps*12- und *nad*9-Transkripten können den Abschnitten 3.2.4.1.-3.2.4.4. entnommen werden. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7 + Anhang 2.

Anhang 9: Analyse der cDNA-Sequenz von *MNU2*

A



B

```
ATAATAACTAGGGTTTAAGCTCTGCTTTCCTTTACTTCGTCTTCCTCACTCCTAAAACCCTCTCAGTCTCTCCA    74
TTTCCCGGAGCAAAAATAGCTCTCCGACCATGAAGTTTGGATCTTTACCATCCAAATCCCTTCTCTTCCGCCTC   148
TCTTCTTCCTCCACAACCCAATCTCACCGTCGAACAATTACCCTTTTCATCACTAACATTCATTCCTCTCCATT   222
CTCCACCACAACCACCTCCGGCTCCAATTTCGTCTCCGGATCCAGCCATTCTCCCTCTCGACGTCCTCAGCAAG   296
ACGAAGAGTCCCGATCCGTTAGGGTTTCGGTCTGGTGGGACTTCCTGAGCTGTAACTTACCTGTAGACACCAAT   370
GTCTACAAAGTAGCACAATCAATCACCGCCGCTATCAGAAACAGCGGAATCAAAGGACCAATCACAATCACAGC   444
CTTCGGTGACGTTTTACAGCTCCCCAGATCAAACCAAGACGCTCTCTCCGCTACAGGAATCAGTCTCACTCATG   518
TTCCTAACGGTGGTAAGAACAGTGCTGATAGATCTCTAATCACAGATCTTATGTGTTGGGTTTCTCAGAATCCA   592
CCACCAGCTCATCTTTTGCTAATCTCTAGTGATAAGGAGTTTGCAAGTGTGTTACATAGATTGAGGATGAACAA   666
TTACAACATTTTGCTTGCGAGTAAATCATCAGCTCCTGGTGTTTTGTGTAGTGCTGCTTCTATTATGTGGGATT   740
GGGATGCTTTGATTAAAGGAGAGTGTGTTACTGGTAAGCATTTTAATCAGCCTCCTGATGGTCCTTATAACTCT   814
TGGTATGGTCACTATAGGATTCCTCTTCTTGATCCATTTGCTATTGCTACCACTACTGAGCAATCTTCGTCTAG   888
TGTGAAAATCGAAGAACTATCCGAGTCTGTGAATTCGAATGCTGTTGTTAACCTTCGTCCTATTCCAAAAGAAG   962
TTGTTGATAAGATTCGTTCGATAGTGAGTTTATATCCCAAGGGGGCTGCCATTACAGAACTACGTGCTGAGCTG  1036
AGTAAGAGCAACTTGGCTATTGATAAAGATTTCTATGGACATAAGAAGTTTTCGAAGTTTCTTTTATCCATGCC  1110
AGATATCTTACAGGTTACTACAGTAAGTGAAGGCTTGTTTATGATTCGGGCTGTTACCGAAAAGAAGCCTCCGA  1184
TGCGGCTTGATTCTAGTCCTCGTTTGTCTACTGCTGTTGATCAGAAGATTAAAGATAAGGAAACTGTTAATGCT  1258
CCATCACCAAAGCTAATTAGCGATGTAGAGCTTGCTGCTGAAAGAAGAAGAGATGGCTTACTTGGAAAGAAGCA  1332
GGAAAAGGTATTGGAGAGTGATAAAATTGTTAAAGAAGAATCATCAGAGAGTTCTCAAGACCCAATTCTGGTCG  1406
GCCAGAAGGATGTTAAGGCAAATGTTAAACCCGTCGAGACGAATCAAGTCGCTCTTGTTGCGTGGAGTGATTCG  1480
TCCATGGAAGATGGCTTTTTTCAAAAGCTAAAAAGACTGTGGTATGGTTCACCTGAGATGGAATTAGAGCATCT  1554
CCCAGAAATGAAGAGCGTTTCTGGAAGTGGAGACACACATAGAGAGGATAATGACTTAAAGTCATCAAGTCAGG  1628
GAAGTGGAAACAAACATAAAGAGGATAAGGACTTAAAGTCATCGAGTCAGGGAACTGTGCCCATGTCTCAAATC  1702
TCACCTTCTTTCGTTGCTGAGTCGGTCGATGAGGTAAAAGTTGGAGCTGATGACGTAGACAGTAAAGATAAAGA  1776
TGCAAGTCCAGGCTTTTTAGGTCGCCTTTTGAAGAGTTTCAAGTTCTGGGGAAAGAATACAAAGTCTAGCAAAG  1850
ACTCTAGTGGGAATCAGGAGCTTGTCAATGTTGATTCTCAAGTACAAGACATATTTGCAAAAGAGTATTTTTGG  1924
AGTGATATTGAATCTTTCATTAATTCTCCAAGAGGCTTTGCTATAGTATCTCACTCGAGGACAAGGGAGGTGAT  1998
GGCTAAAAATGTGCAGGAGGAAGGGCCTTCGTGTCTCAGACTGCTCGATGAATCAAGCATGCTTCATTTAGTTA  2072
CTTTGCTAATATCAGAAAAGAAATGGATTGAAGAAACCCCATCTTCTTCTTTACCATTCAGAATCATCAAAGGA  2146
TCTAGCCCTGGCCACCGTCATGCTTCAAACGGTTTGAGCTCAATCTTCTCGGATTCTTCAAAATCACAGTGGCA  2220
GAAACAAAATGGTGAGAAAAGCGGCAAGAACGTTGCTCATGCTGGAGTTTCTGTTGGTTCTGTGGACCGGAAAG  2294
AGCTGGAAAGATACAAAAGTAATGCAATAGCGGATTGTCAGAAGATGATAAAGAAGATAACAGAGGAACACCCT  2368
GAAGGGTATAGCCTGATTCGTTTCAGGAAAGACTTCTTAGAGGAGTATGGGTACCATTTAGCGGTTGACAAGCT  2442
CGGTTACGACAACCTGCAGTCTCTGATTCGAGTCATGCATGGAGTGAGAATAGCATCTGGATACATCTTTCCTT  2516
CAACTCCTTCACCAAATGCCAAGTCAAAAGAAGATGATTCGGACTTGGCATTCGCAGAACTTGGTCCAGTTTCT  2590
GATACAACAACTACCCACCCGACGACCAAAAAGCTTCCAGTATATGAACCATCACTCTCAGAGGATGAAGAAGA  2664
TTCTGGTTCAGAGAGAGATAACCCAGAGAAGAAGAAGCAACAGATGATGAGTAAAGAAGGTAAAGAGAGCTCGT  2738
TATTGCAAATTCTGGATTCTTATTACACAAATAAAGATGGAGAATTGAAGGAGAATCCGGTGGAGAGGAAGCTT  2812
GTAAGCAACGGTAGAAAGCAAAAGCCTACAAAGACGTATTCTTTTGTGAAAGATTCAGAAGTCTAG          2878
```

Anhang 9: Analyse der cDNA-Sequenz von *MNU2*. (A) 3‘-RACE-Analyse. Das unter Verwendung der Primer At5g09840.E und XSC generierte PCR-Produkt (Abbildung 56B) wurde mit At5g09840.E (P10, Abbildung 32A) sequenziert. Das ermittelte 3‘-Ende liegt bei -136. Weitere Erläuterungen siehe Anhang 7.1B. **(B)** cDNA-Sequenz von *MNU2*. Das Start- und das Stoppkodon von MNU2 sind jeweils unterstrichen. Am rechten Rand sind in grün die Positionen der einzelnen Nukleotide innerhalb der cDNA-Sequenz angegeben.

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Eidesstattliche Versicherung

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Charakterisierung von Proteinen der
5‘-Prozessierung mitochondrialer Transkripte
in *Arabidopsis thaliana*“

selbstständig verfasst habe. Ich habe neben den angegebenen Hilfsmitteln keine weiteren verwendet und alle meiner Arbeit zugrunde liegenden Quellen in jedem einzelnen Fall erwähnt.

Ich habe diese wissenschaftliche Arbeit nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis entsprechend der gültigen „Satzung der Universität Ulm zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ angefertigt.

Ulm, den 14.07.2015

_____

(Unterschrift)

Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

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., 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.

Vorträge

Stoll B., Binder S. (2015): Involvement of P-class PPR proteins in 5' processing of mitochondrial mRNAs in *Arabidopsis thaliana*, Regio Plant Science Meeting (Ulm)

Poster

Stoll B., Binder S. (2013): RNA PROCESSING FACTOR 7 is involved in *nad*2 5' processing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, Botanikertagung (Tübingen)

Stoll B., Binder S. (2015): Two putative nucleases are involved in 5' processing of distinct mitochondrial transcripts in *Arabidopsis thaliana*, International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Breslau)

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht:

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.