

Analyse der Expression und Funktion von RNA-Helikasen in
Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für
Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von
Stephanie Schmidt-Gattung
aus Langen

Ulm im November 2005

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften:

Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Erstgutachter:

PD Dr. Stefan Binder, Abteilung Molekulare Botanik

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Axel Brennicke

Datum der Promotion:

23.02.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle des RNA-Metabolismus in Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2 RNA-Helikasen: Struktur und Aktivität.....	1
1.3 RNA-Helikasen: Funktionen im RNA-Metabolismus.....	4
1.4 Die RNA-Helikasen SUV3 aus Hefe und Mensch.....	7
1.5 RNA-Helikasen in den Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	10
2. Material	11
2.1 Bakterienstämme.....	11
2.2 Versuchspflanzen.....	11
2.3 Primer.....	11
2.4 Benutzte Kits.....	13
2.5 Lösungen und Medien.....	13
2.5.1 Medien zur Anzucht von Bakterien.....	13
2.5.2 Lösung zur DNA-Isolation aus Pflanzen.....	13
2.5.3 Lösungen für Northern-Blot-Analysen.....	14
2.5.4 Medien und Puffer für die Herstellung und Transformation von Protoplasten.....	14
2.5.5 Lösungen für die Isolation von Mitochondrien aus einer Zellkultur von <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.5.6 Lösungen für die Präparation von Proteinen aus Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.5.7 Lösungen für die Aufreinigung von Proteinen aus "inclusion bodies".....	18
2.5.8 Lösung für histochemische β -Glucuronidase-Färbungen.....	19
2.5.9 Medien für die Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.5.10 Medien für die <i>in vitro</i> -Transkription und den Entwindungsassay.....	19
3. Methoden	21
3.1 Molekularbiologische Standard-Methoden.....	21

3.1.1	DNA-Präparation aus Pflanzen mit CTAB.....	21
3.1.2	Northern Hybridisierung.....	21
3.1.3	RT-PCR.....	22
3.2	Transiente Protoplasten-Transformation mit GFP-Fusionsproteinen.....	23
3.3	Isolation von Mitochondrien aus einer <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur.....	25
3.4	Präparation von Proteinen aus Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.4.1	Aufschluss der Mitochondrien mit Natriumdodecylsulfat.....	27
3.4.2	Herstellung von S-100 Lysat.....	27
3.4.3	Aufschluss der Mitochondrien durch Einfrieren und Auftauen.....	27
3.5	Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus "inclusion bodies".....	28
3.5.1	Überexpression des rekombinanten Atmmh-Proteins in <i>Escherichia coli</i>	28
3.5.2	Aufreinigung rekombinanten Atmmh Proteins aus "inclusion bodies".....	29
3.6	Histochemische β -Glucuronidase Färbungen.....	31
3.7	Anzucht von Pflanzen.....	31
3.8	Herstellung von transgenen Pflanzen.....	31
3.8.1	Transformation von Agrobakterien.....	31
3.8.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.9	<i>In vitro</i> -Transkription des Substrates und Entwindungs-Assay.....	33
3.9.1	<i>In vitro</i> -Transkription und Annealing der RNA-Fragmente.....	33
3.9.2	<i>In vitro</i> -Entwindungs-Assay.....	35
4.	Ergebnisse.....	36
4.1	Subzelluläre Lokalisation von AtPMH3.....	36
4.1.1	Klonierung der Atpmh3-Präsequenz in den Vektor psmGFP4.....	36
4.1.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation des AtPMH3-Proteins mit einem Präsequenz-GFP-Fusionsprotein.....	38
4.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen der fünf untersuchten Helikasen.....	38
4.3	Analyse der Steady-State-Transkriptmengen.....	40
4.3.1	Analyse der Transkriptmengen in verschiedenen Geweben und Test auf Induktion durch Kälte.....	41
4.3.2	Detaillierte Analyse der Kälteinduktion von Atpmh1.....	43

4.3.3	Zeitverlauf der Kälteinduktion von Atpmh2.....	45
4.4	Charakterisierung der Promotoraktivität.....	47
4.4.1	Klonierung der Promotor::GUS-Fusionsvektoren.....	47
4.4.2	Analyse der Promotoraktivität mit histochemischen β -Glucuronidase-Färbungen.....	50
4.4.3	Analyse der Promotoraktivität von Atmmh und Atpmh2 nach mechanischer Verwundung.....	54
4.5	Detektion der Helikasen in mitochondrialen Protein-Extrakten.....	56
4.5.1	Herstellung der Antikörper für AtMMH und AtPMH1/2.....	56
4.5.2	Analyse von mitochondrialen Proteinextrakten mit AntiMMH und AntiPMH1/2...60	60
4.6	Untersuchung von transgenen Pflanzen.....	64
4.6.1	Charakterisierung der Atmmh T-DNA-Insertionsmutante Atmmh-1.....	64
4.6.2	Charakterisierung einer Atmmh T-DNA-Insertionsmutante Atmmh-2.....	68
4.6.3	Charakterisierung einer Atmmh-RNAi-Linie.....	70
4.6.4	Charakterisierung einer Atmmh-Überexpressions-Linie.....	73
4.6.5	Charakterisierung von Atpmh1 T-DNA-Insertionspflanzen.....	79
4.7	Etablierung eines RNA-Entwindungs-Assays zur Analyse der RNA Helikase-Aktivität.....	84
4.7.1	Klonierung und Herstellung des Substrates für den Entwindungs-Assay.....	84
4.7.2	Entwindungs-Assay um die Helikase-Aktivität zu untersuchen.....	86
5.	Diskussion.....	89
5.1	Mitochondriale RNA-Helikasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
5.2	Die mitochondrial lokalisierte DEAD-Box RNA-Helikase Atmmh.....	89
5.2.1	Atmmh ist wundinduziert und zeigt eine geringe Expression in Wurzeln.....	89
5.2.2	AtMMH ist möglicherweise mit Membranen assoziiert.....	92
5.2.3	Beobachtungen an transgenen Pflanzen.....	92
5.2.3.1.	Die Atmmh T-DNA-Insertionslinie 1 (atmmh-1) bildet ein Atmmh-T-DNA-Hybridtranskript und zeigt keinen veränderten Phänotyp.....	93
5.2.3.2.	Die Atmmh T-DNA-Insertionslinie 2 (atmmh-2) zeigt Embryo-Letalität.....	94

5.2.3.3.	<i>Bei den Atmmh RNAi-Linien ist der RNAi-Effekt nicht ausreichend, um einen veränderten Phänotyp zu bewirken.....</i>	94
5.2.3.4.	<i>Atmmh-Flag-Linien zeigen einen veränderten Phänotyp durch Überexpression von Atmmh.....</i>	96
5.2.4	Überlegungen zu der Funktion von Atmmh im RNA-Metabolismus von Mitochondrien.....	97
5.3	Die mitochondrial lokalisierten DEAD-Box RNA-Helikasen Atpmh1 und Atpmh2.....	99
5.3.1	Atpmh1 und Atpmh2 zeigen zum Teil ähnliche Expressionsmuster und beide sind kälteinduziert.....	99
5.3.2	Atpmh2 ist wundinduziert.....	103
5.3.3	In mitochondrialen Membranfraktionen wird AtPMH2-Protein detektiert.....	104
5.3.4	Die Atpmh1- Knock-Out-Linie atpmh1-1 zeigt keinen veränderten Phänotyp....	105
5.3.5	Haben AtPMH1 und AtPMH2 redundante Funktionen im RNA-Metabolismus?.....	105
5.4	Die mitochondrial lokalisierten RNA-Helikasen Atpmh3 und Atsuv3.....	106
5.4.1	Atpmh3 ist mitochondrial lokalisiert.....	106
5.4.2	Atpmh3 und Atsuv3 sind schwach exprimiert.....	106
5.4.3	Überlegungen zu den zusätzlichen Signalen in der Northern-Blot-Analyse von Atsuv3.....	107
5.4.4	Mögliche Entwindungsaktivität des AtSUV3-Proteins.....	107
6.	Zusammenfassungen.....	109
6.1	Zusammenfassung.....	109
6.2	Summary.....	110
7.	Literaturverzeichnis.....	112
8.	Anhang.....	118
8.1	Abkürzungen.....	118
8.2	Publikationsliste.....	119
8.3	Lebenslauf.....	120
8.4	Erklärung über die in Anspruch genommenen Hilfen.....	121
8.5	Danksagung.....	122

1. Einleitung

1.1 Die Rolle des RNA-Metabolismus in Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

Der RNA-Metabolismus in Mitochondrien ist für die Pflanze von enormer Bedeutung, da die Mitochondrien und ihre genetische Information für den Energiehaushalt und das Überleben der Zelle essentiell sind. Obwohl das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* mit 57 Genen nur einen minimalen Teil der gesamten genetischen Information einer Zelle enthält, existiert in den Mitochondrien ein vollständiges System zur Gen-Expression. Dazu müssen über 90% der 2000-3000 benötigten Proteine aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien importiert werden. Bei der Transkription der mitochondrialen Gene kommen sowohl mono- als auch polycistronische Transkripte vor. Die vorkommenden Introns gehören alle zur Gruppe II und benötigen vermutlich Co-Faktoren um effizient gespleißt zu werden. Zur Entfernung einiger Introns aus den Genen des Komplex I ist Trans-Spleißen nötig. Die Reifung der mRNA beinhaltet somit aufwendige Spleißvorgänge. Zur Prozessierung der RNA gehören auch über 400 Editing-Ereignisse (Giegé und Brennicke, 1999). Die Halbwertszeit der Transkripte wird unter anderem über stabilisierende Sekundärstrukturen und Degradation verursachende Polyadenylierung am 3'-Ende gesteuert (Kuhn *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass in Mitochondrien in besonderem Maße post-transkriptionale Vorgänge für die Regulation der Gen-Expression verantwortlich sind (Giegé *et al.*, 2000). Der RNA-Metabolismus in Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* ist also hoch kompliziert und interessant. Trotzdem ist über die einzelnen Mechanismen noch sehr wenig bekannt.

1.2 RNA-Helikasen: Struktur und Aktivität

Helikasen werden aufgrund von konservierten Motiven in ihren Aminosäuresequenzen in Superfamilien und Untergruppierungen eingeteilt. DNA-Helikasen und auch einige virale RNA-Helikasen gehören zur Superfamilie I, während DEAD-Box Proteine und DExH-Box Proteine zur Superfamilie II gehören. Die Namensgebung der DExH/D-Box Proteine erfolgt nach der Aminosäuresequenz von Motiv II, bei den DEAD-Box Proteinen z.B. nach der Ein-Buchstaben-Kodierung der konservierten Abfolge Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat (DEAD). Die Helikase-Motive I und II werden auch als Walker A- und Walker B-Motive bezeichnet. Sie dienen der Bindung und Hydrolyse von NTP. Walker A- und Walker B-Motive kommen in einer großen Menge anderer Enzyme mit NTPase-Aktivität vor (Walker *et al.*, 1982) und sind für die Identifizierung von RNA-Helikasen nicht ausreichend. Außer diesen beiden Motiven existieren in RNA-Helikasen aber noch 6-7 weitere konservierte Motive (Tanner und Linder, 2001; Tanner *et al.*, 2003). In Abbildung 1 sind alle konservierten Motive

der DEAD-Box RNA-Helikasen gezeigt. Das Q-Motiv (Tanner *et al.*, 2003) ist wie Motiv I und II in die NTP-Bindung und Hydrolyse involviert. Versuche mit Mutationen in Motiv III zeigten, dass dieses Motiv die NTPase-Aktivität und die Helikase-Aktivität verbindet (Schwer und Meszaros, 2000). Motiv VI ist vermutlich an der NTP-Bindung beteiligt und die verbleibenden Motive (Ia, Ib, IV und V) sind wahrscheinlich an der Substrat-Bindung beteiligt.

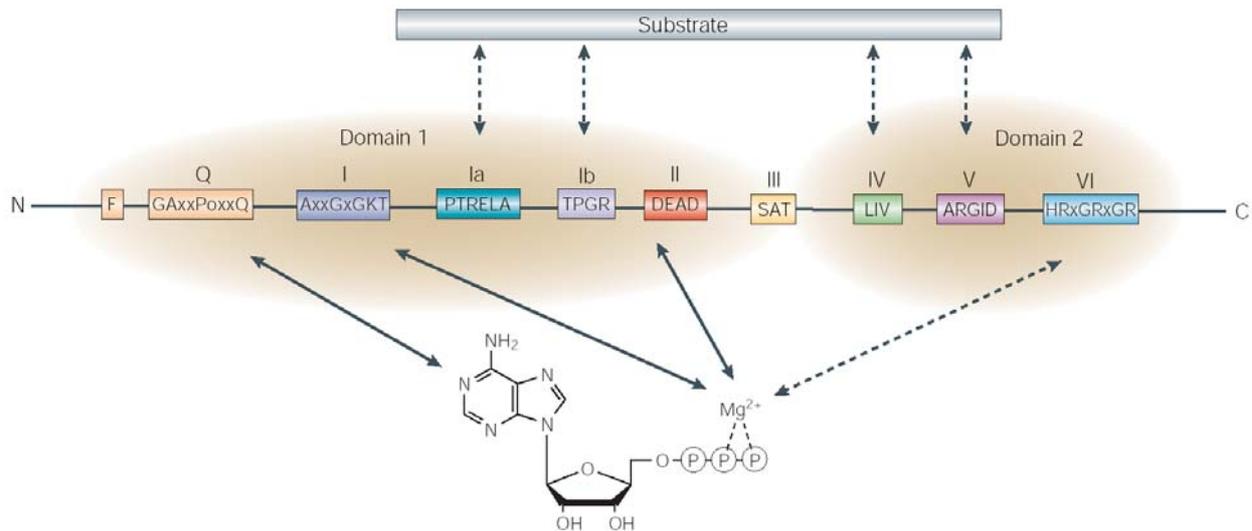


Abbildung 1: Skizze der Struktur von DEAD-Box-Proteinen. Die Abbildung stammt aus der Veröffentlichung von Rocak und Linder, 2004. Die Pfeile zeigen, ob die Motive für die Interaktion mit dem Substrat (RNA) oder für die NTPase-Aktivität wichtig sind.

Durch Kristallisation konnte die Tertiärstruktur einiger DNA-Helikasen und des viralen DExH-Box Proteins NS3 aufgeklärt werden (Yao *et al.*, 1997). Kürzlich konnte auf diese Weise auch die Struktur zweier DEAD-Box Proteine, eIF4a aus Hefe und MjDEAD aus *Methanococcus janaschii*, aufgeklärt werden (Caruthers *et al.*, 2000; Story *et al.*, 2001). Diese Proteine zeigen eine Aufteilung in zwei Domänen, die durch eine Linker-Region verbunden sind (Abbildung 1). Für die DEAD-Box Helikase DbpA aus *E. coli* wurde mit Fluoreszenz-Spektroskopie und partieller Proteolyse gezeigt, dass sie zwei verschiedene Konformationen annehmen kann. Eine "geschlossene" Konformation, bei der die beiden Domänen sich näher sind und eine "offene" Konformation, je nachdem, ob das Enzym ATP und RNA gebunden hat oder nicht (Henn *et al.*, 2002). Im Spalt zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum, sowohl der ATPase-Aktivität, als auch der Helikase-Aktivität. Alle konservierten Motive sind in diesem Spalt lokalisiert. EIF4a und MjDEAD gehören zu den kleinsten bisher gefundenen DEAD-Box Proteinen. Es wird daher angenommen, dass sie das Minimal-Protein darstellen, das noch Helikase-Aktivität besitzen kann, sozusagen den Helikase-Kern.

Wofür sind dann aber die langen und sehr variablen Aminosäuresequenzen, die sich in den meisten anderen RNA-Helikasen C-Terminus und N-Terminus von diesem Helikase-Kern

erstrecken? RNA-Helikasen zeigen *in vitro* kaum Substratspezifität, zudem kommen sie *in vivo* meist in Komplexen mit anderen Proteinen vor. Es wird daher angenommen, dass die C-terminalen und N-terminalen Bereiche für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich sind und dass die hohe Substratspezifität, die RNA-Helikasen *in vivo* zeigen, durch diese Interaktionen vermittelt wird. Was ist nun genau die Aktivität von RNA-Helikasen? Eigentlich handelt es sich dabei um eine energieabhängige Entwindung von RNA-RNA-Doppelsträngen. *In vitro* wurde für viele der untersuchten Proteine eine NTPase-Aktivität nachgewiesen, bei der sich häufig keine Präferenz für ein bestimmtes NTP zeigte. Trotzdem wird vermutet, dass die DExH/D-Box Proteine *in vivo* die Energie der ATP-Hydrolyse für ihre Aktivität nutzen. Diese NTPase-Aktivität wurde in den meisten Fällen durch Anwesenheit von RNA verstärkt. Während diese RNA-abhängige NTPase-Aktivität für einige analysierte DExH/D-Box Proteine gezeigt wurde und als guter experimenteller Nachweis einer Helikase-Aktivität gilt, gelingt die *in vitro*-Analyse der eigentlichen Helikase-Aktivität, der Entwindung von RNA-RNA-Doppelsträngen, in vielen Fällen nicht. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Möglicherweise fehlen in diesen Analysen wichtige Co-Faktoren oder interagierende Proteine, oder die Aktivität der meist heterolog exprimierten Proteine ist vermindert. Außerdem ist im Gegensatz zu den DNA-Helikasen die Prozessivität der RNA-Helikasen sehr gering. Während DNA-Helikasen lange DNA-DNA-Doppelstränge entwinden, sind die doppelsträngigen Bereiche, die RNA-Helikasen entwinden können sehr viel kürzer, oft nur etwa 10 Basenpaare. Diese geringe Prozessivität ist durchaus mit den Aufgaben der RNA-Helikasen im RNA-Metabolismus zu begründen, worauf im Abschnitt 1.3 näher eingegangen wird. Zudem können RNA-Helikasen nicht nur RNA-RNA-Doppelstränge entwinden, sondern auch RNA-Protein-Bindungen auftrennen (Jankowsky *et al.*, 2001). Diese Aktivität der RNA-Protein-Trennung (RNPase-Aktivität) ist dabei unabhängig von einer RNA-RNA-Entwindungsaktivität (Fairman *et al.*, 2004). Der genaue Mechanismus der Entwindungsaktivität ist noch nicht aufgeklärt. Es ist aber sicher, dass die Enzyme einen einzelsträngigen Bereich von 8-10 bp brauchen, um an die RNA zu binden. Einige RNA-Helikasen zeigen eine 5'-3'-Aktivität, einige eine 3'-5'-Aktivität und einige zeigen Bi-Direktionalität. *In vitro* lässt sich das mit Substraten mit 3'- oder 5'- Überhängen demonstrieren. Es wurde bereits erwähnt, dass RNA-Helikasen *in vitro* nur selten eine Substratspezifität zeigen. Interaktionen zwischen Substrat und Protein, die in der Kristallstruktur zu erkennen sind, beinhalten nur das Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA (Caruthers *et al.*, 2000; Lin und Kim, 1999). Dadurch wird klar, warum die Helikasen zwar in der Lage sind, RNA und DNA zu unterscheiden, nicht aber spezifische Sequenzen zu erkennen. Für den eigentlichen Mechanismus der NTP-abhängigen Entwindung der Doppelstränge gibt es drei unterschiedliche Modelle (Rocak und Linder, 2004):

1. Bei Modell 1 destabilisiert die RNA-Helikase die RNA-RNA-Bindung durch ihre Assoziation an die RNA während eines kurzzeitigen thermalen Aufschmelzens der Doppelstrang-Enden. Die NTPase-Aktivität ist dabei nötig, um das Enzym nach der Trennung der Doppelstränge wieder von der RNA zu lösen.
2. Bei Modell 2 wird die Energie aus der NTP-Hydrolyse zur Translokation des Enzyms entlang des einzelsträngigen Bereiches benötigt. Auch hier wird die RNA-RNA-Bindung dadurch gelöst, dass die RNA-Helikase während eines vorübergehenden Auseinanderdriftens der Doppelstränge dazwischen geht und ein Re-Annealing verhindert. Dieses Modell würde eher erklären, warum die RNA-Helikasen einzelsträngige Bereiche brauchen.
3. In Modell 3 wird die NTPase-Aktivität direkt zur Translokation und zur aktiven Trennung der Doppelstränge verwendet. Dieses Modell liegt vielleicht der Aktivität von DNA-Helikasen zugrunde.

Die Trennung von RNA-Protein-Komplexen ohne RNA-RNA-Entwindungsaktivität wurde an zwei verschiedenen RNA-Helikasen, einem viralen DExH-Box Protein und einem DEAD-Box Protein aus Hefe, untersucht. Beide benötigen auch für ihre RNase-Aktivität freie einzelsträngige RNA-Bereiche. Beide sind außerdem in der Lage *in vitro* RNA-RNA-Doppelstränge zu entwinden (Fairman *et al.*, 2004). Diese zwei unterschiedlichen Aktivitäten lassen sich am wahrscheinlichsten durch Modell 2 erklären. Dabei würden die RNA-Helikasen in beiden Fällen an einzelsträngige RNA binden und unter Verbrauch von NTP entlang dieses Stranges translozieren. Die RNA-Helikasen könnten auf die beschriebene Weise sowohl die Bindung von komplementärer RNA als auch von assoziierten Proteinen destabilisieren.

1.3 RNA-Helikasen: Funktionen im RNA-Metabolismus

Generell kann man sagen, dass RNA-Helikasen an allen Prozessen im RNA-Metabolismus von Pflanzenzellen beteiligt sind. Im Folgenden sind die einzelnen Prozesse aufgelistet und die Beteiligung von RNA-Helikasen teilweise durch Beispiele näher erläutert.

Für einige RNA-Helikasen wurde eine Assoziation an die Transkriptionsmaschinerie gezeigt (Yan *et al.*, 2003; Rajendran *et al.*, 2003; Rossow und Janknecht, 2003), aber die eigentliche Funktion der Helikase-Aktivität in diesem Zusammenhang ist noch unbekannt. Für das Spleißen von prä-mRNA ist die Bildung des Spleißosoms nötig, in Hefe z.B. einem Komplex aus fünf kleinen nukleären RNAs (snRNA) und über 70 Proteinen zu denen auch acht RNA-Helikasen gehören (Moore *et al.*, 1993; Will und Lührmann, 1997). Dann kommt es zum eigentlichen Spleißvorgang mit zwei Umesterungsreaktionen und danach werden sowohl die reife mRNA als auch das Lasso-Intron vom Komplex gelöst und das Intron

degradiert (Nilsen, 1994). Es wird vermutet, dass die Helikasen zum Großteil für die Entwindung kurzer RNA-RNA-Doppelstrang-Bereiche zwischen den einzelnen snRNAs oder der prä-mRNA gebraucht werden. Diese Doppelstrang-Bereiche würden sonst die nötigen strukturellen Umlagerungen während des Spleißens behindern. Das DExH-Box-Protein Prp22 ist z.B. für die zweite Umesterungsreaktion und das ATP-abhängige Entlassen der fertigen mRNA aus dem Spleißosom nötig (Schwer und Meszaros, 2000). Das DExH-Box-Protein Prp43 ist nötig, um nach dem Spleißen das Lasso-Intron vom Spleißosom zu trennen und es so für die Degradation zugänglich zu machen (Martin *et al.*, 2002). Auch in den Mitochondrien von Hefe ist ein DEAD-Box Protein, Mss116p, nötig für das korrekte Spleißen von Gruppe I-Introns und Gruppe II-Introns (Huang *et al.*, 2004). Helikasen könnten aber auch aufgrund ihrer RNase-Aktivität am Spleißvorgang beteiligt sein. So wurde von Fairman *et al.*, 2004 gezeigt, dass Helikasen in der Lage sind, *in vitro* den "exon junction complex", der bei der Verbindung zweier Exons gebildet wird, von seinem RNA-Substrat zu trennen. Beim Editing in Mitochondrien von *Trypanosoma brucei* ist ein DEAD-Box-Protein nötig (Missel *et al.*, 1997). Aber auch in anderen Organismen ist zu vermuten, dass RNA-Helikasen für den Editing-Prozess als Transfaktoren notwendig sind. Für Mitochondrien von Erbsen wurden Hinweise für die Beteiligung einer RNA-Helikase am Editing-Prozess gefunden (Takenaka und Brennicke, 2003). Für die Ribosomen-Biogenese sind z.B. in Hefe 18 RNA-Helikasen nötig. Auch bei der eigentlichen Translation an den Ribosomen ist wahrscheinlich eine Helikase-Aktivität nötig, um die Sekundärstrukturbildung der mRNA zu unterbinden. Hier gibt es aber Untersuchungen, die zeigen, dass die Ribosomen selbst eine Helikase-Aktivität aufweisen, ohne dass dazu DExH/D-Box Proteine nötig sind und ohne dass Proteine aus den Ribosomenuntereinheiten konservierte Motive von RNA-Helikasen aufweisen (Takyar *et al.*, 2005). Am Transport der poly(A)⁺-RNA aus dem Zellkern von Hefe ist das DEAD-Box-Protein Dbp5 beteiligt (Snay-Hodge *et al.*, 1998). Letztendlich sind RNA-Helikasen natürlich auch an der Degradation von RNA beteiligt. Das wohl am Besten untersuchte Beispiel ist das DEAD-Box-Protein RhlB. Dieses Protein bildet in *E.coli* zusammen mit einer RNaseE und einer PNPase das Degradosom (Py *et al.*, 1996). Für RhlB wurde eine *in vitro* Entwindungsaktivität gezeigt. Außerdem ist die PNPase nur in Anwesenheit von RhlB in der Lage RNAs mit Stamm-Schleifen-Strukturen zu degradieren (Liou *et al.*, 2002). Auch in *Rhodobacter capsulatus*, einem α -Purpurbakterium und damit laut Endosymbiontentheorie einem der nächsten Verwandten der Mitochondrien, existiert ein degradosom-ähnlicher Komplex. Er besteht zumindest aus einer RNaseE, dem Transkriptions-Terminations-Faktor Rho und zwei DEAD-Box RNA-Helikasen. Zellfraktionen mit dem Degradosom-Komplex waren nur in Anwesenheit von ATP in der Lage, RNAs mit Stamm-Schleife-Strukturen zu degradieren (Jäger *et al.*, 2001). Es wird daher vermutet, dass RNA-Helikasen beim RNA-Abbau vor allem an der Degradation von RNAs mit

Sekundärstrukturen beteiligt sind. Über den mitochondrialen Degradations-Komplex in Hefe, mtEXO wird in Abschnitt 1.4 ausführlich berichtet. RNA-Helikasen sind möglicherweise auch an der Regulation von Genexpression beteiligt. Der Exosom-Komplex in Hefe benötigt für seine volle Aktivität einen Aktivator. Ein solcher ist der "Trf4/Air2p/Mtr4p polyadenylation complex" oder TRAMP-Komplex, der aus Poly(A)-Polymerasen und einem DExH-Box-Protein (Mtr4p, LaCava *et al.*, 2005) besteht. *In vitro* ist der Exosom-Komplex nicht in der Lage RNA komplett zu degradieren, während bei Anwesenheit von Exosom und TRAMP-Komplex RNA-Substrate zu 4 bp langen Fragmenten degradiert werden. Sowohl in Hefe-Mutanten ohne funktionales Exosom als auch in Mtr4p-Mutanten häufen sich aberrante rRNAs und snRNAs. Es wird vermutet, dass der TRAMP-Komplex an abzubauen RNAs assoziiert und durch langsame Polyadenylierung das Exosom rekrutiert, das dann die RNA abbaut (LaCava *et al.*, 2005). Diese Beispiele zeigen, dass RNA-Helikasen nicht nur unverzichtbar für die RNA-Degradation sind, sondern auch eine Möglichkeit bieten, diese zu regulieren. In Mitochondrien, wo die Genexpression nicht nur durch die Transkriptionsrate, sondern in hohem Maße auch durch die Degradationsrate reguliert wird, käme dieser Möglichkeit besondere Bedeutung zu. Ein weiterer Fall, indem eine RNA-Helikase als Regulator auftritt, ist die Kälte-Akklimatisierung (Thomashow, 1999): *Arabidopsis thaliana* kann dadurch in die Lage versetzt werden, Temperaturen unter 0°C zu überleben. Im Zuge der Kälte-Akklimatisierung werden viele Gene induziert, die ein C-Repeat-Motiv als *cis*-Element in ihrem Promotor enthalten. An diese Motive binden bestimmte Proteine und aktivieren die Transkription. Die Gene dieser C-Repeat-Binde-Faktoren (CBF1-3) werden ebenfalls durch Kälte induziert, aber auf welche Weise ist noch unklar. Bei der *los4*-Mutante ist durch eine Punktmutation in der DEAD-Box-RNA-Helikase LOS4 die Transkript-Akkumulation der CBF-Gene bei Kälte gestört. Pflanzen mit dieser Mutation sind nicht mehr in der Lage, nach Kälte-Akklimatisierung Temperaturen unter 0°C zu überleben. Die LOS4 RNA-Helikase scheint somit ein früher Regulator von Transkriptionsfaktoren für die pflanzliche Kälte-Toleranz zu sein (Gong *et al.*, 2002). Die Expression von RNA-Helikasen wird sehr präzise reguliert. Die Regulation ist nicht nur auf verschiedene Entwicklungsstadien und Gewebe beschränkt, sondern reagiert auch auf Umwelteinflüsse. Häufig werden RNA-Helikasen durch Kälte-Schock induziert, z.B. in vielen Bakterien und Archaeen (Chamot und Owtrim, 2000; Lim *et al.*, 2000). Für eine Cyanobakterielle DEAD-Box RNA-Helikase wurde gezeigt, dass ihre Expression durch den Redox-Status der Zelle reguliert wird (Kujat und Owtrim, 2000). Die Funktionen der DExH/D-Box RNA-Helikasen im RNA-Metabolismus der Zelle sind also vielfältig und eine nähere Untersuchung wird noch viele interessante Ergebnisse hervorbringen.

1.4 Die RNA-Helikasen SUV3 aus Hefe und Mensch

Da eine der in dieser Arbeit analysierten Helikasen, Atsuv3, ein Homolog der beiden DExH-Box ähnlichen RNA-Helikasen SUV3 aus Hefe und Mensch ist, soll an dieser Stelle erläutert werden, was über diese beiden Proteine bereits bekannt ist. Eine *Saccharomyces cerevisiae* Mutante mit einer Punktmutation in einem konservierten Motiv des *suV3*-Gens zeigt eine Akkumulation von ausgeschnittener Intron-RNA des rRNA-Gens und von 7 untersuchten mitochondrialen Gruppe I Introns, die in Wildtyp RNA nicht nachzuweisen sind. Außerdem sind in dieser Mutante die Transkriptmengen von *cob*, *cox1* und 21S rRNA reduziert (Zhu *et al.*, 1989; Conrad-Webb *et al.*, 1990; Stepien *et al.*, 1992). Das SUV3-Protein ist ein funktionaler Teil einer mitochondrialen NTP-abhängigen 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die Gruppe I Intron RNA degradiert (Margossian *et al.*, 1996). Ein weiterer Bestandteil dieser Exonuklease-Aktivität ist DSS1p, ein RNase II-Homolog (Dziembowski *et al.*, 1998). Inaktivierung jedes der beiden Gene führt zum gleichen Phänotyp: Störungen in der RNA-Prozessierung und Stabilität, die zum Verlust des mitochondrialen Genoms führt. Auch die mitochondriale Translation ist in diesen Mutanten gestört. In der Veröffentlichung von Dziembowski *et al.* (2003), wurde die Analyse der Exoribonukleaseaktivität beschrieben: Der als mitochondriales Degradosom oder mtEXO bezeichnete Komplex besteht nur aus den beiden Proteinen SUV3p und DSS1p. Er weist eine RNA-Helikase-Aktivität auf, auf die eine Exoribonuklease-Aktivität folgt, wobei DSS1p für die RNase-Aktivität verantwortlich ist. Für SUV3p aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde somit gezeigt, dass es einen Komplex mit einer RNase bildet und an der Degradation von mitochondrialen RNAs beteiligt ist.

Das humane *Suv3*-Gen wurde aufgrund seiner Homologie zum *Suv3*-Gen aus Hefe identifiziert. Es ist in Mitochondrien lokalisiert und hat eine 46 Aminosäuren lange Präsequenz. Es gibt aber Hinweise, dass hSUV3 zusätzlich auch im Kern lokalisiert ist. Das humane SUV3-Protein (hSUV3) kann den Phänotyp einer Hefe-SUV3-Null-Mutante komplementieren (Shu *et al.*, 2004). Das humane Protein scheint somit auch ein funktionales Homolog des Hefe-Proteins zu sein. Aufgereinigtes hSUV3 zeigt *in vitro* allerdings nicht nur eine ATPase-Aktivität und eine Entwindungsaktivität von RNA-RNA-Doppelsträngen, sondern auch Entwindungsaktivität von DNA-DNA-Doppelsträngen und DNA-RNA-Doppelsträngen. Welche Funktion hSUV3 *in vivo* hat ist noch unklar (Shu *et al.*, 2004).

1.5 RNA-Helikasen in den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

In dieser Arbeit sollen fünf mitochondrial lokalisierte DExH/D-Box Proteine analysiert werden. Im Folgenden ist aufgeführt, was über diese Proteine zu Beginn der Arbeit bereits bekannt war. Das *Atsuv3*-Gen wurde aufgrund seiner Homologie zu den in Abschnitt 1.4 beschriebenen *Suv3*-Genen aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* identifiziert. Aufgrund dieser

Homologie wurde es als *Atsuv3* bezeichnet. Das *Atsuv3*-Gen besteht aus 16 Exons mit insgesamt 1713 Nukleotiden. Nach Übersetzung in die Aminosäuresequenz zeigt *AtSUV3* 39% und 45% Identität mit den Proteinen aus Hefe und Mensch. Genau wie die beiden anderen enthält das *AtSUV3*-Protein die konservierten Motive einer DExH-Box RNA-Helikase, allerdings ist es im Vergleich etwa 76 bis 215 Aminosäuren kürzer. Northern-Blot-Analysen deuteten, da ein Transkript von etwa 2,3-2,5 kb Länge nur in Poly(A)⁺-RNA detektiert wurde, auf eine schwache Expression von *Atsuv3* hin. Eine "primer-extension"-Analyse ergab ein 5'-Ende, welches etwa 540 Nukleotide stromaufwärts des Translations-Initiations-Codons liegt und mit einer geschätzten Transkriptlänge von 2,5 kb gut mit dem Ergebnis der Northern-Blot-Analyse übereinstimmt. Die Herkunft eines weiteren, schwächeren Signals, das auf ein 5'-Ende 150 Nukleotide stromaufwärts des ATG hindeutet, konnte nicht geklärt werden. Um die vom Computerprogramm PSORT getroffene Vorhersage einer mitochondrialen Lokalisation zu überprüfen, wurden transgene Pflanzen, die ein Fusionsprotein aus den N-terminalen zwei Dritteln des *AtSUV3*-Proteins und dem bakteriellen β -Glucuronidase-Proteins exprimierten, analysiert. Fraktionierungsexperimente, die eine Co-Fraktionierung des Fusionsproteins mit mitochondrialen Markern zeigten, bestätigten die Vorhersage (Gagliardi *et al.*, 1999). Auch eine transiente Expression eines *AtSUV3::GFP*-Fusionsproteins in Tabakprotoplasten bestätigte eine mitochondriale Lokalisation von *AtSUV3* (Kuhn, J. und Binder. S., unveröffentlichtes Ergebnis). Ein *in vitro*-ATPase-Assay mit einem rekombinant exprimierten Teil des *AtSUV3*-Proteins (Aminosäuren 11-387) zeigte eine durch mitochondriale RNA stimulierbare ATPase-Aktivität von *AtSUV3* (Gagliardi *et al.*, 1999). Die Sequenzhomologie, die mitochondriale Lokalisation und die ATPase-Aktivität könnten Hinweise sein, dass *AtSUV3*, ebenso wie *SUV3* aus Hefe, am Abbau von RNA in Mitochondrien beteiligt ist.

Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Gene wurden aufgrund von Computeranalysen ausgewählt. Sie sollten die konservierten Motive von DExH/D-Box-Proteinen aufweisen und außerdem aufgrund von N-terminalen Präsequenzen als mitochondrial lokalisiert eingeteilt werden. *Atpmh1* zeigt die konservierten Motive einer DEAD-Box RNA-Helikase und wurde von mehreren Computerprogrammen als mitochondrial lokalisiert vorhergesagt. Allerdings schwanken die Vorhersagen der Computerprogramme für die Länge der Präsequenz zwischen 26 und 74 Aminosäuren. Die mitochondriale Lokalisation von *AtPMH1* wurde durch transiente Expression eines *ATPMH1::GFP*-Fusionsproteins in Tabakprotoplasten experimentell gezeigt (Wildum, 2003). Die Länge der *Atpmh2*-Präsequenz für den Import in Mitochondrien beträgt laut Computeranalyse 25 oder 38 Aminosäuren. Die mitochondriale Lokalisation dieser DEAD-Box RNA-Helikase wurde auf dieselbe Art gezeigt wie für *AtPMH1* (Forner, 2003). Außerdem wurde das *AtPMH2*-Protein bei einer Analyse des mitochondrialen Proteoms mit 2D-Gelelektrophorese bei einer Größe von 61 kDa detektiert (Millar *et al.*,

2001). Die Vorhersagen der verschiedenen Computerprogramme für die subzelluläre Lokalisation der DEAD-Box RNA-Helikase AtMMH waren sehr unterschiedlich. Die mitochondriale Lokalisation wurde experimentell anhand der Lokalisation eines AtMMH::GFP-Fusionsproteins in Tabakprotoplasten gezeigt (Kuhn, J. und Binder, S., unveröffentlichtes Ergebnis). Für AtPMH3, ebenfalls eine DEAD-Box RNA-Helikase, ist eine mitochondriale Lokalisation bisher nur aufgrund von Computeranalysen anzunehmen. Über die Funktion dieser fünf Helikasen im RNA-Metabolismus in Mitochondrien war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im komplizierten RNA-Metabolismus in Mitochondrien höherer Pflanzen sind viele Prozesse und Mechanismen noch unklar oder unbekannt. Aufgrund ihrer einfachen Identifizierbarkeit anhand der konservierten Motive und aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit weiteren Proteinen sind DExH/D-Box RNA-Helikasen hervorragende Kandidaten für die Erforschung des RNA-Metabolismus. Dass sie an allen Prozessen beteiligt sind, in die RNA involviert ist, ist einerseits ein weiterer Vorteil. Diese Omnipräsenz im RNA-Metabolismus macht andererseits aber ihre Zuordnung zu einem bestimmten Prozess schwierig, wodurch bei vielen bisher untersuchten RNA-Helikasen, obwohl ihre Aktivität charakterisiert wurde, ihre genaue Funktion im RNA-Metabolismus noch unklar ist. So müssen in dieser Arbeit und in den folgenden Untersuchungen der DExH/D-Box-Proteine AtSUV3, AtMMH, AtPMH1, AtPMH2 und AtPMH3 verschiedene Ansätze verfolgt werden, um ihrer Rolle im RNA-Metabolismus in Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* auf die Spur zu kommen. Zuerst soll die subzelluläre Lokalisation des AtPMH3-Proteins untersucht werden, denn nur im Fall einer mitochondrialen Lokalisation kommt Atpmh3 als Kandidat für die Erforschung des mitochondrialen RNA-Metabolismus in Frage. Eine Hauptaufgabe dieser Arbeit ist es, mit Hilfe von verschiedenen Nachweissystemen detaillierte Erkenntnisse über die Expression der fünf untersuchten DExH/D-Box RNA-Helikasen in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen zu gewinnen. Die Ergebnisse aus diesen Expressionsanalysen sollen zum einen als Grundlage dienen, die z.B. bei der späteren Mutantanalyse Ansätze zur Identifikation eines veränderten Phänotyps liefern. Zum anderen könnte die Expressionsanalyse bereits erste Hinweise liefern, für welche Prozesse im mitochondrialen RNA-Metabolismus die untersuchten Helikasen wichtig sind. Eine weitere Hauptaufgabe dieser Arbeit ist es, mit der Analyse von transgenen Pflanzen zu beginnen. Dazu sollen RNAi-Linien, T-DNA-Insertionslinien oder Überexpressionslinien der verschiedenen RNA-Helikasen untersucht werden. Die transgenen Pflanzen sollen dann auf Veränderungen im Phänotyp untersucht werden, die Hinweise auf die Funktion der jeweiligen RNA-Helikase im mitochondrialen RNA-Metabolismus geben könnten. Mit der Herstellung von Antikörpern für einen Teil der Helikasen sollte eine Analyse auf Proteinebene möglich werden, die unverzichtbar für die Identifikation von Interaktionspartnern und eine endgültige Aufklärung der Funktion ist. Außerdem sollte mit der Herstellung eines passenden Substrates und der Etablierung eines RNA-RNA-Entwindungs-Assays in diesem Labor die Grundlage für eine spätere genaue *in vitro*-Charakterisierung der Helikase-Aktivität der fünf analysierten DExH/D-Box-Proteine gelegt werden.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Escherichia coli BL21 p(Lys)S (Novagen, Madison, USA)

Agrobacterium tumefaciens GV2260 (Deblaere et al., 1985)

2.2 Versuchspflanzen

Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia (Lehle Seeds, Round Rock, USA)

Atpmh1 T-DNA Insertionsmutante (SALK035421, The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, Kalifornien, USA)

Atmmh T-DNA Insertionsmutante (atmmh-2) (SALK090774, The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, Kalifornien, USA)

Atmmh T-DNA Insertionsmutante (atmmh-1) (Syngenta)

2.3 Primer

Jeder Primer wird dem Experiment zugeordnet, in welchem es benutzt wurde. Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen innerhalb der Primer sind kursiv geschrieben. Beim SG MMH Flag Stop-Primer ist die Sequenz des Flag-Tag unterstrichen.

Name des Primers	Sequenz des Primers	Experiment
US	GTAACGCCAGGGTTTTCCC	Sequenzierung
RS	CACAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
Pmh3gfp5'	GCGGATCCACGAGTGACATGGCGGCATC	Lokalisation
Pmh3gfp3'2	TCGGATCCGAGACACTATCTCAGCTGGC	Lokalisation
Adapter Primer	GGCCACGCGTCTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	RT-PCR
AUAP	GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC	RT-PCR
Mmh5	CGAAGTCCATAAGTCATCACG	RT-PCR
Mmh-3	GGTTAGTGGTGGTTCTCGG	RT-PCR
SG MMH Eco start	GAGAA TCCGCGCGAAAGCTATGGTAGG	Überexpression mmh
SG MMHBgl	CGGTTAGAT CTAGATCGATTGCTGCGAG	Überexpression mmh
SG MMH stop	TGGAGCTCTCAAGAGGCTCTTGCCGAAGAAGAC	Überexpression mmh
SG MMH Bam	GCAATCGATCTGGATCCAACCG	Überexpression mmh
SG MMH Flag Stop	TGGAGCTCTCA CTTGT CATCGTCATCCTTGTAATCA GAGGCTCTTGCCGAAGAAGACTTGC	Mmh-Flag-Konstrukt
SG PMMH5'	CTATCTGCGATTTGTCGACTTCTG	Promotor-GUS
SG PMMH3'	GAAGCTCCTACCATAGGATCCGCGCGTG	Promotor-GUS

Name des Primers	Sequenz des Primers	Experiment
SG pmh1prom5'	ATAGTCGACTCAGAACTCTAGAATCC	Promotor-GUS
SG pmh1prom3'	ATAGTCGACTGTGCTAATCATTTTCAG	Promotor-GUS
Pmh2prom5'Xba2	ACTCTAGAATGGTAGCCATCTCAACACC	Promotor-GUS
Pmh2prom3'Xba	TATCTAGACATTTTCAGATTCAGGTGTTT	Promotor-GUS
Pmh3gfp3'1	ACGGATCCCCTTCCCAAATTTCCGTGG	Promotor-GUS
Pmh3prom5'Bam2	ATGGATCCTATCTGCTGGTGGCCAAGAG	Promotor-GUS
Pmh3prom3'Bam	TAGGATCCCATGTCACCTCGTGTGTACTTG	Promotor-GUS
At PMH2 GFP 1.3	ATGGATCCCTTTTCGCTTCAACACC	Promotor-GUS
BAR.R	GAGATCAGATCTCGGTGAC	Sonde
BAR.H	CCATGAGCCCAGAACGAC	Sonde
Atatp9-pct1	AGAGAAGACGAAGACGGATC	Sonde
Atatp9-pct2	CGACCGAAGAAATGAGTAAC	Sonde
Nad7A	ACTCATGCTATGGATGTGGG	Sonde
Nad7B	AACATTACACCACTGAATCCC	Sonde
P18SrRNA	AAGCATATGACTACTGGCAGG	Sonde
Mmh RT 3'	TAGCTTATCTTCACCACCTG	Mmh-Flag
Pmh1 RT 5'	GCCAGCGAAGCGTCAGAG	Pmh1-1
Pmh1.2hy3'	ATGGATCCGTAAGATCTTTTACCATCG	Pmh1-1
Mmh.2hy mid.down	ATGAATTCGTTTACCGTGTGGCGAAGTCC	Atmmh-2
Lba2	GTGGACCGCTTGCTGCAA	SALK
Mmhgfp5'	GAGGATCCACGCGCGAAAGCTATGGTAG	RNAi
35S.Prom	ATGACGCACAATCCCCTATCCTT	RNAi
Gw1	GTGCCACCTTATTCAACCATCAAG	RNAi
Gw1rück	ATTTAACGTGTTTGCAGGTCAGCTTG	RNAi
PK7.term	TAATCCCTTATCTGGGAAGTACTCAC	RNAi
T7+down	P-CTGTCGTCCGGGTACCGAGCTCGAATTC	Entwindung
SG T7+up	P-TTGACCTCCTCTCGCCCTATAGTGAG	Entwindung
SG SP6+down	P-TTGACCTCCTCTAGAGTCGACCTGC	Entwindung
SG SP6+up	P-CTGTCGTCCGTATTCTATAGTGTAC	Entwindung

2.4 Benutzte Kits

RNeasy plant mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

DNeasy plant mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Rediprime II DNA Labeling System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg Deutschland)

ECL Western Blotting System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg Germany)

pGEM®-T Vector System I (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)

Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Full Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg Germany)

2.5 Lösungen und Medien

2.5.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Zur Verwendung in Petri Schalen wird dem Medium 1,5 % Agar zugegeben.

LB-Medium	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
LB-Amp	Wie LB-Medium plus Ampicillin	100 µg/ml
LB-Kan	Wie LB-Medium plus Kanamycin	30 µg/ml
YEB-Medium	Bacto beef extract	5 g/l
	Bacto Yeast extract	1 g/l
	Bacto Pepton	1 g/l
	Saccharose	5 g/l

PH-Wert 7 mit Natronlauge einstellen, autoklavieren und dann folgende sterilfiltrierte Lösungen zugeben:

Magnesiumsulfat (20g/l)	10 ml/l
Magnesiumchlorid (1M)	0,5 ml/l

2.5.2 Lösung zur DNA-Isolation aus Pflanzen

CTAB Lösung (100 ml)	CTAB (2%)	2 g
	PVP (1%)	1 g
	NaCl (1,4 M)	28 ml (5 M Stammlösung)
	Tris-HCl pH 8 (10 mM)	0,5 ml (2 M Stammlösung)
	EDTA (20mM)	4 ml (0,5 M Stammlösung)
	Aqua bidest.	ad 100 ml

2.5.3 Lösungen für Northern-Blot-Analysen

Denaturierungslösung	Aqua bidest.	255 µl
	20 x PB	50 µl
	Glyoxal, 30%, deion.	195 µl
	DMSO	500 µl
Ladelösung	Glyzerin	5 ml
	Aqua bidest.	3,3 ml

	20x PB	440µl
	einige Kristalle Bromphenolblau	
20 x Phosphatpuffer (PB)	0,2 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 6,5	
20xSSC (1l)	Natriumchlorid	175,3 g
	Natriumcitrat	88,2 g
	PH 7 mit HCl einstellen	
Prähybridisierungslösung	deionisiertes Formamid	50%
	Dextransulfat	10%
	SDS	1%(w/v)
	NaCl	1M
100 µg/ml denaturierte, mit Ultraschall gescherte Heringsperma DNA		

2.5.4 Medien und Puffer für die Herstellung und Transformation von Protoplasten

Beim Ansetzen wird nur autoklaviertes und sterilfiltriertes Aqua bidest. verwendet. Die Sterilfiltration erfolgt mit einem Filter mit der Porengröße 0,2 µm. Die Lösungen werden folgendermaßen hergestellt:

F-PCN	modifiziertes Macro-MS (10x)	100 ml
	Micro-MS (100x)	10 ml
	PC-Vitamine	10 ml
	MES	1 g
	BAP (6-Benzylaminopurin)	1 mg
	NAA (Naphthalenessigsäure)	100 µg
	Glucose	ad 550 mOsm (~ 60 g)
	Aqua bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert wird mit 1 M KOH auf 5,8 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

F-PIN	modifiziertes Macro-MS (10x)	100 ml
	Micro-MS	10 ml
	PC-Vitamine	10 ml
	MES	1 g
	BAP (6-Benzylaminopurin)	1 mg
	NAA (Naphthalenessigsäure)	100 µg
	Saccharose	ad 550 mOsm (~ 128 g)
	Aqua bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert wird mit 1 M KOH auf 5,8 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

Transformationsmedium	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	609,9 mg
	MES	200 mg
	Mannitol	ad 550 mOsm (~ 16,5 g)
	Aqua bidest.	ad 200 ml

Der pH-Wert wird mit 1 M KOH auf 5,8 eingestellt und die Lösung durch autoklavieren sterilisiert.

Macro-MS (modifiziert) (10x)	KNO ₃	1012 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440 mg
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370 mg
	KH ₂ PO ₄	170 mg
	NH ₄ -Succinat (2M)	10 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Sterilfiltration der Lösung.

Micro-MS (100x)	EDTA-Fe(III)-Na-Salz	2 g
	KJ	41,5 mg
	H ₃ BO ₃	310 mg
	MnSO ₄ x H ₂ O	1,115 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	430 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	12,5 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,25 mg
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,25 mg
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Sterilfiltration der Lösung.

PC-Vitamine (100x)	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4 g
	Inosit	4 g
	Pyridoxin-HCl	40 mg
	Thiamin-HCl	20 mg
	d-Biotin (Vitamin H)	0,4 mg
	Aqua bidest.	ad 200 ml

Sterilfiltration der Lösung.

40 % PEG	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0,4133 g
----------	--	----------

Mannitol	1,2754 g
Aqua bidest.	ad 17,5 ml

Rühren bis sich alles gelöst hat, dann Zugabe von PEG.

PEG 1500:	10 g
-----------	------

lösen ohne Erwärmen unter Rühren, dann den pH-Wert mit 1 M KOH auf 9,75 einstellen und die Lösung sterilfiltrieren. Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2 M Ammoniumsuccinat	Bernsteinsäure	23,6 g
	NH ₄ Cl	10,6 g
	KOH-Plätzchen	ad pH 5,8 (~ 22,4 g)

Sterilfiltration der Lösung.

Cellulase und Macerozym

Beim Ansetzen sollten Handschuhe getragen werden.

Cellulase (Duchefa No. C8001) bzw.	
Macerozym (Duchefa No. M8002)	1 g
Aqua bidest.	10 ml

Lösen der Enzyme durch vortexen. 1,37 g Saccharose in einem Röhrchen vorlegen und das gelöste Enzym zugeben. Nach Zentrifugation für 5 –10 min wird der Überstand sterilfiltriert. Lagerung der Enzyme bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Bleach-Lösung	NaOCl	0,6%
	Triton X-100	1 %

2.5.5 Lösungen für die Isolation von Mitochondrien aus einer Zellkultur von *Arabidopsis thaliana*

Aufschlusspuffer (1l)	Saccharose	450 mM
	MOPS	15 mM
	EGTA	1,5 mM

pH-Wert 7,4 mit KOH

Vor Gebrauch Zugabe von

BSA	2 g/l
PVP 40	6 g/l
DTT	10 mM
PMSF	2 mM

5x Gradientenpuffer	Saccharose	1,5 M
---------------------	------------	-------

	MOPS	50 mM
pH Wert 7,2 mit KOH		
Waschpuffer	Saccharose	300 mM
	MOPS	10 mM
	EGTA	1 mM
pH-Wert 7,2 mit KOH		
Vor Gebrauch Zugabe von		
	PMSF	0,2 mM
Resuspensionspuffer	Mannitol	400 mM
	EGTA	1 mM
	Tricin	10 mM
PH-Wert 7,2 mit KOH		
Vor Gebrauch Zugabe von		
	PMSF	0,2 mM

2.5.6 Lösungen für die Präparation von Proteinen aus Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

SDS	SDS	20% (w/v)
-----	-----	-----------

Alle im Folgenden aufgelisteten Lösungen werden bei 4°C aufbewahrt.

Lyse Puffer	Tris-HCl	20 mM
	Glyzerin	15 %

Die Lösung wird autoklaviert. Kurz vor Gebrauch Zugabe von

	DTT	1 mM
	PMSF	1 mM
	Benzoamidin	1 mM
	Leupeptin	1 µg/ml
	Pepstatin A	1 µg/ml

Dialyse Puffer	Glyzerin	7,5 %
	Tris-HCl pH8	10 mM
	EDTA	0,1 mM
	KCl	50 mM

Die Lösung wird filtriert und autoklaviert. Kurz vor Gebrauch Zugabe von

	DTT	1 mM
--	-----	------

	PMSF	1 mM
Freeze-Thaw-Puffer	HEPES-KOH pH 7,8	20 mM
	KCl	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	EDTA	2,5 mM
	PMSF	1 mM

2.5.7 Lösungen für die Aufreinigung von Proteinen aus "inclusion bodies"

1x Binde-Waschpuffer	Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	0,1 %
IB/Gua-Puffer A	Guanidin-HCl	5M
	Tris-HCl pH8,0	0,005 M
	Tween 80	0,05%
IB-Puffer B	Tris-HCl, pH 8,0	0,05 M
	Tween 80	0,005 %
	reduziertes Gluthathion	2 mM
	oxidiertes Gluthathion	0,2 mM
IB-Puffer C	Tris-HCl pH 8,0	0,05 M
	Tween 80	0,005 %
	NaCl	0,05 M
10x IB-Waschpuffer	Tris.HCl pH 7,5	200 mM
	EDTA	100 mM
	autoklavieren	
	Triton x-100	10 %

2.5.8 Lösung für histochemische β -Glucuronidase- Färbungen

X-GlcA-Lösung	X-GlcA-Natriumsalz	1,5 mM
	Natrium-Phosphatpuffer, pH 7	100 mM

Die Färbelösung ist, lichtgeschützt und bei 4°C, mindestens eine Woche haltbar.

2.5.9 Medien für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Kultivierungserde (1l)	Fruhstorfer Erde mit Vulkanton (Archut, Lauterbach-Wallenrod, Deutschland)	0,8 l
	Vermiculite, 2-3 mm Körnung (Archut, Lauterbach-Wallenrod, Deutschland)	0,2 l
	Osmocote Exact Mini-Dünger (Skotts Deutschland GmbH, Nordhorn, Deutschland)	1,5 g
Standard MS-Medium	Murashige Skoog Salts With Gamborg B5 Vitamins (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	4,4 g/l
	MES	0,5 g/l
	Saccharose	15 mM
	Microagar	1,5 %
pH-Wert 5,7 mit KOH einstellen und autoklavieren		
Konzentration der Antibiotika für <i>Arabidopsis</i> -Selektion		
	Kanamycin	30 mg/l
	Cefotaxime	200 mg/l

2.5.10 Medien für die *in vitro*-Transkription und den Entwindungsassay

10x Ladepuffer („IVT-Ladepuffer“)	Formamid	98%
	EDTA (0,5 M pH8)	2%
	Bromphenolblau+ Xylencyanol	
10x Elutionspuffer (50 ml)	NaOAc	500 mM
	EDTA	100 µM
	SDS	0,1 %
	Phenol	1%
	pH 5,0	
Annealing-Puffer	Tris HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	100 mM
10x Unwinding-Puffer	Tris HCl pH 8,0	40 mM
	ATP	2 mM
	MgCl ₂	2 mM
	DTT	2 mM

	Rnaseinhibitor (10 U/ μ l)	1 μ l
Stop-Puffer	Tris HCl	100 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	0,5 %
	Glyzerin	50%
	Bromphenolblau+Xylencyanol	
	Nonidet P-40	0,1%

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Standard-Methoden

Alle nicht näher beschriebenen Methoden wurden nach Sambrook und Russel (2001), oder nach den Angaben der jeweiligen Kit-Hersteller durchgeführt.

3.1.1 DNA-Präparation aus Pflanzen mit CTAB

Um qualitativ einwandfreie Gesamt-DNA aus Pflanzen für z.B. Southern-Blot-Analysen zu erhalten, wurde die DNA mit dem DNeasy-plant-mini-Kit extrahiert. Eine schnellere und günstigere Alternative für Pflanzen-DNA, die nur zur PCR-Analyse benötigt wurde, ist die DNA-Isolation aus Pflanzen mit CTAB. Dazu wird das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und sofort in gefrorenem Zustand mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wird in Reaktionsgefäße mit 2 ml Fassungsvermögen überführt und in 1 ml CTAB Lösung gelöst. Die Inkubation erfolgt zuerst für 30 Minuten bei 68°C, dann und nach Zugabe von 10 µg RNaseA für 30 Minuten bei 37°C. Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgt durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Präzipitation mit Isopropanol. Die extrahierte und präzipitierte DNA wird in Aqua bidest. gelöst und die Konzentration bestimmt.

3.1.2 Northern Hybridisierung

Eine Methode zur Bestimmung der Steady-State-Transkriptmenge einzelner Gene ist die Northern-Blot-Analyse. RNA wird mit Glyoxal denaturiert und nach der Auftrennung in einem Agarosegel auf eine Membran transferiert. Die Detektion erfolgt durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden, die spezifisch für die einzelnen Transkripte sind. Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wird die durch die Radioaktivität der spezifisch gebundenen Sonden hervorgerufene Schwärzung eines Filmes gemessen. Die Standardisierung erfolgt, indem dieselbe Membran zusätzlich mit einer Sonde für eine konstitutiv exprimierte RNA hybridisiert wird. Für jedes Gewebe/jede Bedingung wird dazu die gemessene Schwärzung der gen-spezifischen Sonde durch die gemessene Schwärzung der Kontroll-Hybridisierung dividiert. Für Northern-Blots wird die ungeladene Nylon-Membran Duralon-UV (Stratagene) benutzt. Sie weist eine hohe Sensitivität und Stabilität auf, wodurch sie ohne Qualitätsverlust mehrmals hybridisiert werden kann. Jeweils 10 µg der isolierten RNA werden unter Vakuum in der Speed-Vac getrocknet und dann in 20 µl Denaturierungslösung durch auf- und abpipettieren für 1 Minute gelöst. Während der Inkubation von einer Stunde bei 55°C im Wasserbad wird die RNA durch das in der Denaturierungslösung enthaltene Glyoxal denaturiert. Anschließend wird die RNA auf Eis

abgekühlt, das Kondensat kurz abzentrifugiert und 5 µl Ladelösung zugegeben. Die Auftrennung erfolgt in einem 1%-Agarosegel mit 1x Phosphatpuffer (PB). Um einen pH-Wert von über 7, welcher der RNA schaden würde, zu vermeiden, wird der Puffer während des Gel-Laufs mit einer Peristaltikpumpe umgewälzt. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wird ein Teil des Gels mit Ethidiumbromid gefärbt. Dazu wird dieser Teil abgetrennt und 30 Minuten in 50 mM Natronlauge deglyoxyliert, dann 20 Minuten in 5x PB neutralisiert und 15 min in 5x PB mit 1 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt. Nach 15 Minuten Entfärben in 5x PB wird ein Foto gemacht. Der Teil des Gels der für die Northern-Hybridisierung verwendet werden soll, wird ohne weitere Behandlung in einen Kapillar-Northern-Transfer eingesetzt. Der Transfer erfolgt mit 20x SSC-Puffer bei 4°C über Nacht. Danach wird die RNA durch Bestrahlung mit 120 mJ/cm² UV-Licht mit der Membran kovalent verbunden („cross link“). Zur Deglyoxylierung der RNA wird die Membran anschließend in kochendes 20 mM Tris pH 8 gelegt und unter leichtem Schütteln bis auf Umgebungstemperatur abgekühlt. Die deglyoxylierte Membran kann dann prähybridisiert und hybridisiert werden. Die Prähybridisierung der Membran erfolgt mindestens 1 Stunde bei 42°C in Prähybridisierungslösung. Dann wird die denaturierte Sonde zugeben, wobei die Sondenaktivität in der resultierenden Hybridisierungslösung 5x 10⁵-5x 10⁶ cpm/ml sein sollte. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C. Danach wird die Membran mit SSC-Puffer mit je 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgt dabei mit 1x SSC für 15 Minuten. Dann wird durch Waschen mit immer geringeren SSC-Konzentrationen, z.B. 0,3x SSC und dann 0,1x SSC, die Stringenz erhöht, bis sich mit dem Geiger-Müller-Zählrohr ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis detektieren lässt. Die Membran wird dann in Plastikfolie verpackt und ein Film aufgelegt. Nach ausreichender Exposition wird der Film entwickelt und die Signale auf dem Film mit einem Densitometer vermessen.

3.1.3 RT-PCR

Die RT-PCR wird zur Amplifikation und Analyse von Transkripten benutzt. Dazu wird zuerst die mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben. Eine darauf folgende PCR resultiert in doppelsträngiger DNA, die dann kloniert und sequenziert werden kann. Zur reversen Transkription werden 2-2,5 µg RNA mit 20 pmol eines oligo(dT) Adapter-Primers in einem Volumen von 12 µl gemischt und dann für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Durch die Denaturierung wird verhindert, dass Sekundärstrukturen der RNA die cDNA-Synthese stören. Nach der Denaturierung wird das Gemisch auf Eis gehalten bevor die weiteren Komponenten zugegeben werden.

Ansatz (20 µl) :

RNA (2-2,5 µg)/ Primer (20 pmol)	12 µl	-
		Inkubation 10 Minuten bei 70°C
		Auf Eis abkühlen
5 x 1 st Strand Buffer	4 µl	-
0,1M DTT	2 µl	-
10mM dNTP	1 µl	Kurz mischen
		Inkubation 2 Minuten bei 42°C
Superscript II (RnaseH-)	1 µl	Kurz mischen
		Inkubation 90 Minuten bei 42°C
		Inkubation 15 Minuten bei 70°C

Durch die Inkubation für 15 Minuten bei 70°C wird die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms gestoppt. Je 2 µl der gebildeten cDNA werden als Template in eine PCR eingesetzt.

3.2 Transiente Protoplasten-Transformation mit GFP-Fusionsproteinen

Das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wird u.a. verwendet, um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu bestimmen. Dazu werden im psmGFP4-Vektor die Leseraster der putativen Präsequenzen der zu lokalisierenden Proteine mit dem Leseraster des GFP fusioniert. Diese Konstrukte werden transient in Tabak-Protoplasten transformiert. Das gebildete Fusionsprotein wird aufgrund der Präsequenz innerhalb der Zelle in der Regel in das gleiche Kompartiment wie das ursprüngliche Protein transportiert. Durch die Fluoreszenz des GFP kann die Lokalisation *in vivo* mikroskopisch bestimmt werden. Wenn eine mitochondriale Lokalisation aufgrund von Computer-Vorhersagen vermutet wird, werden die Mitochondrien zusätzlich mit einem spezifischen Farbstoff (MitoTracker) angefärbt. Der Vergleich der GFP-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz des Farbstoffs erlaubt eine klare Aussage bezüglich der Lokalisation des Fusionsproteins in Mitochondrien.

Präparation der Protoplasten aus Tabakblättern

Als Ausgangsmaterial dienen etwa 10 Wochen alte Tabakpflanzen, die unter Langtag-Bedingungen auf Erde angezogen wurden. Zum Stärkeabbau werden die Pflanzen vor Beginn des Experiments 24 Stunden bei Dunkelheit gehalten. Einige Blätter werden in Stücke von etwa 5 cm x 5 cm zerschnitten. Zur Sterilisation werden die Blattstücke zuerst 5 Minuten in Bleach-Lösung und 45 Sekunden in 70% Ethanol inkubiert, danach werden sie dreimal mit Aqua bidest. gespült. Um die Angriffsfläche für die Zellwand abbauenden Enzyme zu vergrößern, werden die Blätter mit einem sterilem Skalpell parallel zu Nervatur in ca. 1 mm breite Streifen geschnitten. Dabei sollte die Mittelrippe intakt bleiben, um nach dem Verdau die Zellwandreste leichter entfernen zu können. Zum Verdau der Zellwand werden die Blattstücke in einer Petrischale mit einem Ansatz aus 9 ml F-PIN /500 µl Cellulase /500 µl

Macerozym überschichtet und bei 22°C für 12-16 Stunden im Dunkeln inkubiert. Da die Protoplasten sehr empfindlich gegenüber Scherstress sind, werden sie ausschließlich mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert. Die Petrischale wird geschwenkt, um die Protoplasten von den Zellwandresten zu lösen. Dann wird die Lösung mit den Protoplasten in ein 13 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 650 rpm (70x g) im S4180 Rotor der Firma Beckman für 10 Minuten bei 22°C zentrifugiert. Die nicht sedimentierte Bande mit intakten Protoplasten wird in ein neues Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Transformationsmedium überführt und vorsichtig gemischt. Die Protoplasten werden durch Zentrifugation bei 50x g für 10 min bei 4°C sedimentiert.

PEG vermittelte Transformation der Protoplasten

Die Transformation erfolgt bei Raumtemperatur in Petrischalen (Durchmesser = 10 cm), die zum Sammeln der Flüssigkeit schräg gestellt werden. Die folgenden Lösungen werden in der unten angegebenen Reihenfolge zugegeben und jeweils vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt.

Protoplastensuspension	100 µl
Plasmid-DNA(50 – 65 µg in TE pH 5,6)	18 µl
F-PCN	7 µl
PEG (handwarm)	125 µl
	Inkubation 7.5 Minuten bei RT
F-PCN	125 µl
	Inkubation 2 Minuten RT
F-PCN	2.6 ml
	Inkubation 12-16 Stunden 22°C, im Dunkeln

Anfärbung der Mitochondrien

Die Mitotracker-Färbelösung ist lichtempfindlich und wird daher möglichst im Dunkeln gehalten. Zum Lösen wird eine Ampulle des MitoTracker® Red CM-H₂Xros-Farbstoffes in 100 µl 100 DMSO (1mM) gelöst. Zur Färbung werden 1,5 ml Protoplasten-Suspension mit 0,75 µl Mitotracker Färbelösung gemischt und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wird durch Waschen mit F-PCN entfernt. Dazu wird der Ansatz mit F-PCN auf 3 ml aufgefüllt, gemischt und 5 Minuten bei 550 rpm (50x g) im S4180 Rotor der Firma Beckman bei 22°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Das Sediment aus gefärbten Protoplasten wird in 50 µl F-PCN aufgenommen. Bis zur mikroskopischen Auswertung sollten die Protoplasten in einer Kühlbox bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden. Die Auswertung der transformierten und

gefärbten Protoplasten erfolgt an einem Fluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung der Filtereinsätze FITC (HQ 470/40 HQ 500 LP) und MitoTracker (HQ 545/30 HQ610/75) (AHF, Tübingen).

3.3 Isolation von Mitochondrien aus einer *Arabidopsis thaliana* Zellkultur

Die Isolierung wird in abgewandelter Form nach Werhahn *et al.*, 2001 durchgeführt. Vor der Isolation werden zuerst die benötigten Puffer fertiggestellt und die Gradienten für die Dichtegradienten-Zentrifugation geschichtet (siehe Tabelle 1). Alle Arbeiten werden bei 4°C durchgeführt.

Stufe	Gesamt-Volumen	Percoll	5xGradienten-puffer	Aqua bidest.	Je Gradient
13.5%	48,8 ml	6,5 ml	9,8 ml	32,5 ml	6 ml
21%	97,5 ml	20,5 ml	19,5 ml	57,5 ml	12 ml
45%	121,9 ml	54,8 ml	24,4 ml	42,7 ml	15 ml

Tabelle 1: Zusammensetzung der Percoll-Gradienten. Die Mengen sind ausreichend für 6 Gradienten.

Die Zellkulturen werden durch 4 Lagen Mull und 2 Lagen Miracloth abfiltriert und sorgfältig ausgepresst. Der Mull wird zuerst mit den Zellen und später noch einmal ohne die Zellen gewogen, um aus der Differenz das Frischgewicht des Pflanzenmaterials zu bestimmen. Dann werden die Zellen in den Waring Blendor überführt und so lange mit Aufschlusspuffer aufgegossen bis die Zellen fast vollständig mit Puffer bedeckt sind. Um die Zellen aufzuschließen, wird mit dem Waring Blendor dreimal je 5 Sekunden bei der höchsten Stufe homogenisiert. Zwischendurch wird je 2 Minuten pausiert, damit sich der gebildete Schaum abtrennt und Gewebeteile die noch nicht ausreichend zerkleinert sind, sich unten im Bereich der Klingen sammeln. In den Siebeinsatz einer Eimerpresse werden zwei Lagen Miracloth und zwei Lagen Mull gelegt, wobei die Enden über den Siebeinsatz hinaus ragen sollen. Das Homogenisat wird durch den Mull und das Miracloth filtriert. Die Zellreste werden 5 Minuten in der Eimerpresse gründlich ausgepresst. Das Zelllysat wird auf 500 ml Zentrifugenbecher verteilt und die Becher mit Aufschlusspuffer aufgefüllt. Durch eine differentielle Zentrifugation werden zuerst grobe Zelltrümmer und dann vor allem Zellkerne und Zelltrümmer von den Organellen getrennt.

Differentielle Zentrifugation:

Die einzelnen Schritte der differentiellen Zentrifugation werden im JA 10 Rotor der Firma Beckman durchgeführt.

1. Zentrifugation: 3.400 rpm (2.000x g) / 10 Minuten / 4°C. Der Überstand wird zügig in frische vorgekühlte Zentrifugenbecher abgegossen. Das Pellet wird verworfen.
2. Zentrifugation: 5.800 rpm (5.500x g) / 10 Minuten / 4°C. Der Überstand wird zügig in frische vorgekühlte Zentrifugenbecher abgegossen. Das Pellet wird verworfen.
3. Zentrifugation: 9.000 rpm (14.300x g) / 15 Minuten / 4°C

Durch die letzte Zentrifugation werden die Organellen sedimentiert. Das Organellen-Pellet wird in insgesamt 18 ml Waschpuffer vorsichtig mit dem Pinsel resuspendiert und in einen Teflonhomogenisator überführt. Durch 2-3 vorsichtige Streiche werden die Organellen homogenisiert. Von der Suspension werden jeweils 3 ml auf einen Percoll-Gradienten aufgetragen. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wird in der Ultrazentrifuge im SW 28 Rotor der Firma Beckman bei 4°C und 19.500 rpm (68.500x g) für 45 Minuten durchgeführt. Die Mitochondrienbande befindet sich nach der Zentrifugation an der Grenze zwischen der 21%igen und der 45%igen Percolllösung. Zunächst wird alles bis auf 1 cm über der Mitochondrienbande mit der Wasserstrahlpumpe mit einer Pasteurpipette als Aufsatz vorsichtig abgesaugt. Die Organellen werden dann vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgenommen. Die Mitochondrien aus allen Gradienten werden in einem Zentrifugenbecher, der zur Hälfte mit Resuspensionspuffer gefüllt ist, gesammelt und der Becher dann auf 500 ml aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgt im JA 10 Rotor bei 8.000 rpm (12.000x g) für 15 Minuten bei 4 °C. Um das Percoll möglichst vollständig zu entfernen, wird das Pellet erneut in Resuspensionspuffer gelöst und bei 7.000 rpm (8.500x g) für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig bis auf etwa 1 ml des Resuspensionspuffers abgesogen. Das Pellet wird durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer abgeschnittenen blauen Spitze resuspendiert. Diese Suspension wird in ein abgewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 14.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Gewicht der isolierten Mitochondrien bestimmt und diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung isolierter Mitochondrien erfolgt bei – 80°C.

3.4 Präparation von Proteinen aus Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

Proteine können auf unterschiedliche Methoden aus Mitochondrien isoliert werden, je nachdem, welche Untersuchungen mit den Proteinen geplant sind. Sollen Komplexe aufgereinigt werden, so dürfen keine hohen Salzkonzentrationen verwendet werden. Wenn Membran Proteine untersucht werden sollen, so können diese mit Detergenzien aus der Membran solubilisiert werden. Im Folgenden sind drei Methoden dargestellt wie Proteine in nativer Form oder in denaturierter Form aus Mitochondrien isoliert werden können.

3.4.1 Aufschluss der Mitochondrien mit Natriumdodecylsulfat

Um alle Proteine, die in Mitochondrien vorhanden sind, in Lösung zu bringen, werden die Mitochondrien mit Natriumdodecylsulfat aufgeschlossen. 200-300 mg isolierte Mitochondrien werden mit destilliertem Wasser und SDS auf 1 ml mit einer Endkonzentration an SDS von 4% aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und gut gemischt. Die entstandene Lösung wird aliquotiert und zur längeren Aufbewahrung bei –20°C gelagert.

3.4.2 Herstellung von S-100 Lysat

Durch einen Aufschluss mit Salz, Scherstress und geringen Konzentrationen Detergenz werden die Proteine nicht denaturiert, aber Komplexe mit schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen aufgelöst. Zum Aufschluss werden 100 mg –3 g Mitochondrien in Lysepuffer resuspendiert. Das gesamte Volumen von Mitochondrien und Lysepuffer sollte 3 ml betragen. Die resuspendierten Organellen werden in einen Homogenisator aus Glas transferiert. In diesem werden sie durch Zugabe der folgenden Chemikalien und jeweils 20maliges vorsichtiges Auf- und Abbewegen des Stempels folgendermaßen aufgeschlossen:

Zugabe	Endkonzentration	Behandlung
600 µl Aqua bidest.	-	20x Stempel
300 µl 10% Triton X-100	0,5 %	20x Stempel
2.100 µl 3 M KCl	1 M	20x Stempel

Danach wird das Lysat für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wird die Lösung nach jeweils fünf Minuten vorsichtig gemischt. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge im SW 55 Rotor der Firma Beckman bei 4°C mit 29.000 rpm (100.000x g) für 60 Minuten. Der Überstand enthält lösliche Proteine und wird aufgrund der Zentrifugationsgeschwindigkeit als S-100 Fraktion bezeichnet. Um Salz und Detergenz zu entfernen, wird der Überstand zwei mal für mindestens eine Stunde gegen 1l Dialyse-Puffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wird bestimmt und die S-100 Fraktion mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

3.4.3 Aufschluss der Mitochondrien durch Einfrieren und Auftauen

Durch wechselndes Auftauen und Einfrieren werden die löslichen Proteine aus dem Periplasma und der mitochondrialen Matrix entlassen. Die Proteine werden bei dieser Methode nicht denaturiert, Komplexe bleiben bestehen. Etwa 200 mg isolierte Mitochondrien werden in 500 µl Freeze-Thaw-Puffer aufgenommen. Zur vollständigen Resuspendierung wird mit drei Pulsen Ultraschall von je 10 Sekunden bei Stufe 5 beschallt (Branson

sonifier 250, Firma G.Heinemann, Gmünd, Deutschland). Zwischen den einzelnen Pulsen werden jeweils mindestens 30 Sekunden Pause gemacht, damit die Lösung nicht zu warm wird. Zum Aufschluss der Mitochondrien werden drei Freeze-Thaw-Zyklen durchgeführt. Dazu werden die Mitochondrien jeweils in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei 37°C in einem Wasserbad wieder aufgetaut. Nicht lysierte Mitochondrien werden bei 10.000x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Um die Membranfraktion zu sedimentieren, werden zwei Ultrazentrifugationsschritte bei 150.000x g für je 90 Minuten durchgeführt. Im Überstand befinden sich nun die löslichen Proteine. Das Pellet beinhaltet die Membranen mit gebundenen und unlöslichen Proteinen.

3.5 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus “inclusion bodies“

Die Überexpression rekombinanter Proteine in heterologen Wirtssystemen und die anschließende Aufreinigung wird benutzt, um Material in ausreichender Menge und Qualität für Aktivitätstests oder zur Herstellung von Antikörpern zu gewinnen. Dabei kommt es häufig zur intrazellulären Ablagerung der Proteine in unlöslichen Aggregaten, die als “inclusion bodies“ bezeichnet werden. Diese Aggregate sind meist inkorrekt gefaltet und dadurch biologisch inaktiv. Dafür ermöglichen sie eine Aufreinigungsstrategie, die gerade auf ihrer Unlöslichkeit beruht, da lösliche cytoplasmatische Proteine gut entfernt werden können.

3.5.1 Überexpression des rekombinanten Atmmh-Proteins in *Escherichia coli*

Für die Überexpression wird die Atmmh cDNA in den bakteriellen Überexpressionsvektor pet28a der Firma Novagen kloniert. Durch die Klonierung wird an das Leseraster der mmh cDNA zusätzlich die Sequenz für einen Histidin-Tag angehängt. Aufgrund dessen kann das mit diesem Plasmid exprimierte Fusionsprotein aufgereinigt und im Western-Blot mit einem Anti-Histidin-Antikörper und dem ECL Western Blotting System detektiert werden. Das Konstrukt wurde in den *E.coli*-Protein-Überexpressions-Stamm BL21 transformiert. Zur Überexpression werden 50 ml LB-Medium, das zur Selektion auf den pet28-Vektor Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml enthält, mit einer Einzelkolonie inokuliert. Diese Vorkultur wird bei 37°C unter Schütteln mit 200 rpm etwa 16 Stunden inkubiert. Aus einem Aliquot von 16 ml werden die Bakterien abzentrifugiert und damit 1 Liter LB-Medium mit Kanamycin angeimpft. Diese Hauptkultur wird bei den oben beschriebenen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,5-0,6 inkubiert. Dann wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt und zur Induktion 2 ml 1M IPTG und 20 ml Ethanol zugegeben. Die weitere Inkubation zur Bildung des rekombinanten Proteins erfolgt bei 17°C und 200 rpm für 16-17 Stunden. Danach werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4°C und 4.500 rpm

(2500x g) im JA 20 Rotor der Firma Beckman für 15 Minuten geerntet. Der Aufschluss der Bakterien erfolgt mittels Ultraschall mit einem Branson sonifier 250 (G.Heinemann, Gmünd, Deutschland). Dazu werden die Bakterien in 20 ml 1 x Binde-Wasch-Puffer resuspendiert. Die Beschallung wird in drei Pulsen von je einer Minute bei Stufe 5 und drei Pulsen von je 30 Sekunden bei Stufe 6 durchgeführt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Lösung stets auf Eis gehalten wird und zwischen den einzelnen Pulsen 1-2 Minuten pausiert wird, damit die Lösung nicht warm wird. Durch Zentrifugation bei 18.000 rpm (39.000x g) im JA 20 Rotor für 20 Minuten wird im Überstand das lösliche Protein gewonnen, während das Pellet die "inclusion bodies" enthält. Aus diesem kann das rekombinante Protein aufgereinigt werden.

3.5.2 Aufreinigung rekombinanten Atmmh Proteins aus "inclusion bodies"

Nach der Zentrifugation befinden sich in dem Pellet intakte *E.coli* Zellen und die "inclusion bodies", Einschlusskörper aus aggregiertem Protein. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgt nun durch das schrittweise Lösen des Pellets in immer stärker denaturierenden Chemikalien. Zum Aufschluss intakt gebliebener *E.coli* Zellen und um lösliche Proteine zu entfernen, wird das Pellet dreimal gewaschen (siehe dazu auch Abbildung 2). Dazu wird dieses jeweils vorsichtig in 15 ml 1x IB-Waschpuffer resuspendiert. Zur besseren Resuspendierung kann optional mit Ultraschall in drei Pulsen von je 20 Sekunden nachgeholfen werden. Die Zentrifugation erfolgt bei 11.500 rpm (20.000x g) im JA 14 Rotor der Firma Beckman für 10 Minuten. Vor der letzten Zentrifugation wird die Suspension in ein abgewogenes 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet getrocknet und abgewogen. Das Pellet wird in IB/Gua-Puffer A aufgenommen und die Protein Konzentration auf 10-20 mg/ml eingestellt. Das in diesem Puffer enthaltene Guanidiniumchlorid bringt einige Proteine in Lösung. Der Ansatz wird unter Rühren über Nacht bei 4°C inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgt bei 6.300 rpm im JA 20 Rotor für 45 Minuten. Das Pellet enthält Proteine die unlöslich in Guanidiniumchlorid sind. Ein geringer Teil des Pellets wird mit einer Spatelspitze entnommen und zur Untersuchung im SDS Polyacrylamidgel verwendet (**PROBE 2**). Der Überstand wird zuerst mit IB-Puffer B 1:5 verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Um das Guanidiniumchlorid zu entfernen erfolgt eine Dialyse gegen IB-Puffer C. Dadurch fallen einige Proteine wieder aus und bilden im Dialysat einen Niederschlag. Durch anschließende Zentrifugation bei 6.300 rpm für 10 Minuten wird das Dialyse-Präzipitat gewonnen. Im Überstand (**PROBE 1**) wird die Proteinkonzentration bestimmt und die Zusammensetzung durch SDS-PAGE überprüft. Das Präzipitat aus der Dialyse wird in 8M Harnstoff gelöst und dann zuerst gegen IB-Puffer C mit 2M Harnstoff, dann gegen IB-Puffer C ohne Harnstoff dialysiert.

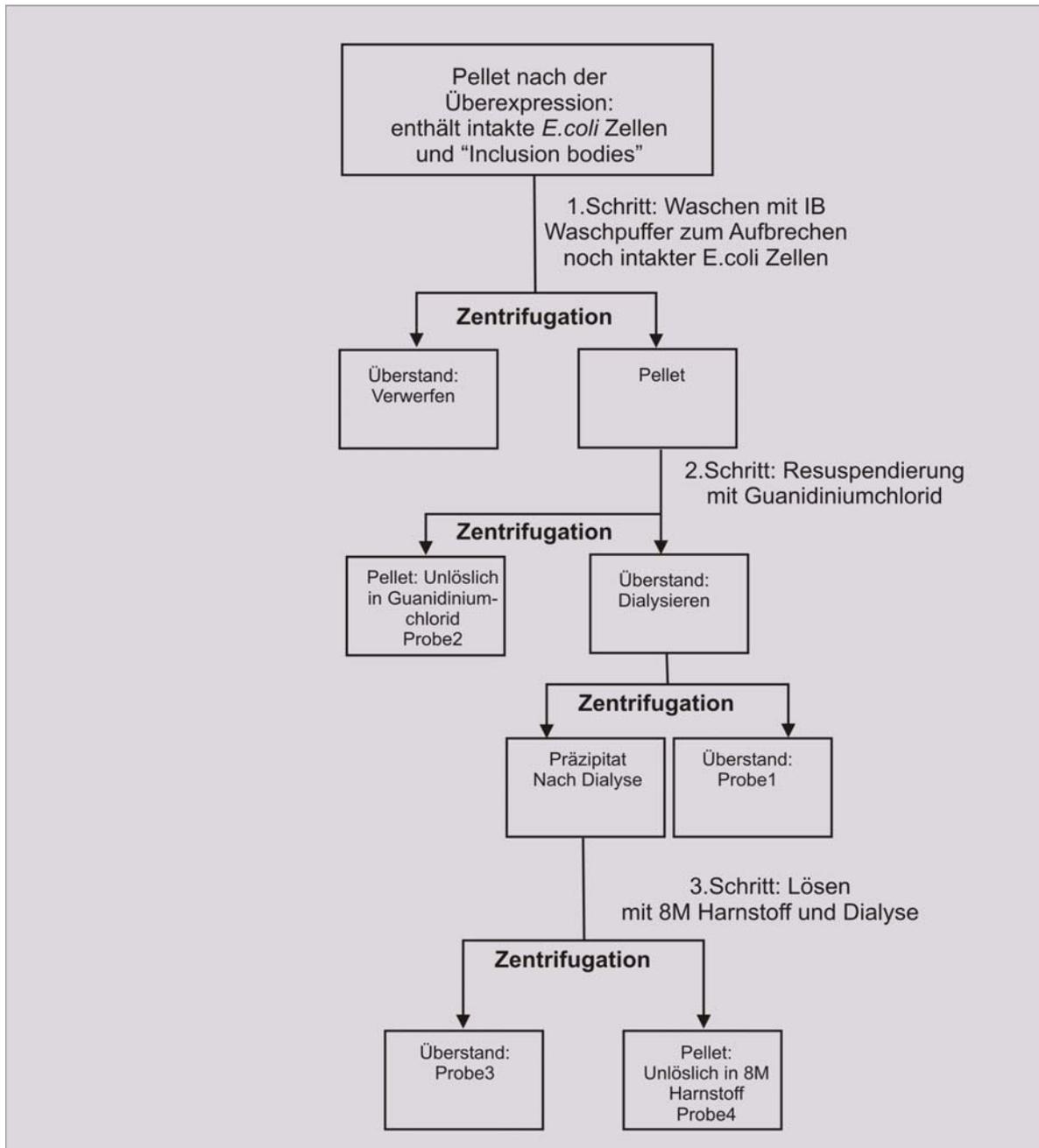


Abbildung 2: Flussdiagramm zur Aufreinigung rekombinanten Proteins aus "inclusion bodies". Von den als Probe1-4 bezeichneten Endprodukten dieser Aufreinigung werden Aliquots mit SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot auf Anwesenheit des überexprimierten Proteins untersucht.

Vom löslichen Überstand (**PROBE 3**) und vom Pellet (**PROBE 4**) wird jeweils ein Aliquot mit SDS-PAGE überprüft. Ein Western-Blot mit anschließender Detektion des Fusionsproteins anhand des Histidin-Tags zeigt, in welcher Fraktion sich der Hauptteil des überexprimierten Proteins befindet. Ist das Protein zum Beispiel in der Probe 4 in ausreichender Qualität und Quantität vorhanden, wird die Probe zur Herstellung von Antikörpern benutzt.

3.6 Histochemische β -Glucuronidase Färbungen

Histochemische β -Glucuronidase Färbungen werden zur Untersuchung der Promotoraktivität in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien der Pflanzen benutzt. In einem Pflanzen-Transformationsvektor werden Promotorbereiche des zu untersuchenden Gens stromaufwärts vor das bakterielle β -Glucuronidase-Gen kloniert. Diese Promotor::Reporter-Gen-Konstrukte werden durch Transformation stabil in das Genom von *Arabidopsis thaliana* integriert. Durch anschließende Selektion auf die mitintegrierte Antibiotikumresistenz werden die transgenen Pflanzen identifiziert. Wenn die Promotoren aktiv sind, wird β -Glucuronidase gebildet. β -Glucuronidase hydrolysiert das Substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure (X-Glc) wodurch das blaue, unlösliche Dichloro-Dibromo-Indigo entsteht. Die Aktivität des Reportergens und damit die Aktivität des Promotors ist anhand des aus dem Substrat X-Glc gebildeten blauen Farbstoffs im Pflanzengewebe erkennbar. Die untersuchten Pflanzenteile, zum Beispiel Blätter, Blüten, oder Keimlinge, werden mit Färbelösung überschichtet. Damit die Färbelösung mit dem enthaltenen Substrat besser aufgenommen wird, werden die Ansätze für 6-8 Minuten mit Vakuum behandelt. Danach werden die Ansätze zum Beispiel mit Parafilm oder Tesafilm luftdicht verschlossen, um ein Verdunsten der Lösung zu vermeiden. Die eigentliche Färbung vollzieht sich bei der anschließenden Inkubation bei 37°C für 15-16 Stunden. Zur Entfärbung des Gewebes wird die Färbelösung mit einer Pipette abgesaugt und die gefärbten Pflanzenteile mit 70% Ethanol inkubiert. Dadurch wird Chlorophyll entfernt, dessen grüne Farbe das Erkennen der Blaufärbung verhindert. Das Ethanol wird so häufig gewechselt, bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht ist.

3.7 Anzucht von Pflanzen

Arabidopsis thaliana-Pflanzen werden entweder auf Kultivierungs-Erde oder auf Standard-MS-Medium mit 0,8 % Agar angezogen. Die Wachstumsbedingungen im Langtag sind 16 Stunden Licht (80-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$) und 8 Stunden Dunkelheit. Die Kurztag Bedingungen sind 16 Stunden Dunkelheit und 8 Stunden Licht (80-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$). Alle Pflanzen wachsen bei 23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-80%.

3.8 Herstellung von transgenen Pflanzen

3.8.1 Transformation von Agrobakterien

Kompetente Agrobakterien des Stammes GV2260 werden auf Eis aufgetaut. Dieser *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm enthält eine genomische Rifampicin-Resistenz. 1 μg der zu transformierenden Plasmid-DNA wird zu den kompetenten Zellen gegeben und durch

vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze mit ihnen vermischt. Die eigentliche Transformation erfolgt in drei Schritten:

- Der Ansatz aus kompetenten Zellen und DNA wird für fünf Minuten auf Eis gehalten.
- Der Ansatz wird für fünf Minuten in flüssigem Stickstoff gefroren.
- Der Ansatz wird für fünf Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Regeneration werden die transformierten Zellen mit 1 ml YEB-Medium verdünnt und für 2-4 Stunden bei 28°C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Zum Ausplattieren werden die transformierten Agrobakterien in zwei Aliquots aufgeteilt. 200 µl werden direkt ausplattiert und 1000 µl werden bei 3000x g für fünf Minuten abzentrifugiert, in 200 µl frischem YEB-Medium resuspendiert und dann ausplattiert. Das Ausbringen erfolgt auf YEB-Agar-Platten, welche die folgenden, zur Selektion benötigten, Antibiotika enthalten:

- Zur Selektion auf Agrobakterien GV2260 Rifampicin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml Medium
- Zur Selektion auf das Plasmid (in dieser Arbeit pBecks und pK7GWIWG2) Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml Medium

3.8.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der „Floral dip“ Methode nach Clough und Bent, 1998. Für die Anzucht von Pflanzen zur Transformation werden 20-30 Samen auf Erde ausgesät und nach Austreiben auf 5-6 Pflanzen pro Topf reduziert. Nach einer Kultivierung von etwa 3-4 Wochen werden primäre Infloreszenzen unmittelbar über der Rosette abgeschnitten. Sekundäre Infloreszenzen sollten bis zu einer Länge von ca. 2 bis 10 cm wachsen, damit bei der Transformation eine hohe Anzahl an Blüten-Knospen vorhanden ist. Zwei Tage vor der eigentlichen Transformation wird mit einer Einzelkolonie Agrobakterien eine Vorkultur in 2 mal 5 ml LB-Medium angeimpft. Zur Selektion werden folgende Antibiotika hinzugegeben:

- Kanamycin zur Selektion auf das Plasmid (z.B. pBecks) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml,
- Rifampicin zur Selektion auf die Agrobakterien in einer Endkonzentration von 100 µg/ml.

Die Inkubation erfolgt bei 28°C unter Schütteln mit 200 bis 220 rpm für 24 Stunden. Für die Hauptkultur werden 200 ml LB-Medium (Antibiotika Konzentrationen wie vorher) mit 3 ml der Vorkultur inokuliert und bei 28°C mit 200 bis 220 rpm inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgt nach etwa 24 Stunden durch Zentrifugation bei 20°C im JA 10 Rotor der Firma Beckman mit 5.800 rpm (5.500x g) für 20 Minuten. Während der Zentrifugation wird das folgende Infiltrationsmedium vorbereitet (pro Konstrukt 250 ml):

5 % Saccharose: 50 g/l
 0,05 % Silwet L-77: 500 µl/l
 pH > 6,0

Der pH-Wert wird mit Indikatorpapier überprüft. Das Bakterien-Pellet wird mit 3 ml des Infiltrationsmediums vorsichtig resuspendiert. Mit dieser Lösung wird im restlichen Infiltrationsmedium die Bakteriendichte auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 eingestellt. Zur Transformation werden die Infloreszenzen der Pflanzen 3 bis 5 Sekunden über Kopf in das Infiltrationsmedium getaucht und dann durch vorsichtiges Abtupfen auf Küchenpapier die überflüssige Flüssigkeit entfernt. Danach werden die Pflanzen waagrecht in eine Wanne gelegt und mit einer Haube abgedeckt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Nach einer Kultivierung von 24 Stunden bei gedämpftem Licht werden die Pflanzen aufgestellt und gegossen. Vier bis fünf Tage später wird eine zweite Transformation durchgeführt, damit die nachgewachsenen Knospen transformiert werden. Dies erhöht die gesamte Transformationseffizienz. Einige Tage nach der zweiten Transformation sollten die Pflanzen eingetütet werden, um Kreuzkontaminationen mit anderen Pflanzen zu verhindern.

3.9 *In vitro*- Transkription des Substrates und Entwindungs-Assay

3.9.1 *In vitro*-Transkription und Annealing der RNA-Fragmente

Am ersten Tag des Versuches wird zur Vorbereitung ein denaturierendes 15% Polyacrylamidgel (20 ml) mit Harnstoff gegossen. Am zweiten Tag des Versuches erfolgt die *in vitro*-Transkription der beiden RNA-Einzelstränge für das Substrat. Die dabei verwendete RNA-Polymerase ist, abhängig vom Transkript, die T7-RNA-Polymerase oder die SP6-RNA-Polymerase. Beide werden von der Firma MBI Fermentas bezogen und liegen in einer Konzentration von 20 U/µl vor. Für die *in vitro*-Transkription wird ein Heizblock im Isotopenlabor auf 37°C eingestellt und dann der Ansatz nach folgendem Schema pipettiert:

5x Transkriptionspuffer	5 µl
DTT (1M Stammlösung)	1 µl
RNase-Inhibitor (40 U)	1 µl
10 mM ATP	1 µl
10 mM CTP	1 µl
10 mM GTP	1 µl
0,1 mM UTP	3 µl
DNA-Template (linearisierter Vektor 2 µg)	x µl
Aqua bidest.	ad 20 µl
	Mischen und Ansatz ins Isotopenlabor bringen

[α - ³² P]UTP (40 μ Ci)	4 μ l
RNA-Polymerase	1 μ l → startet Reaktion
	Inkubation 60 Minuten bei 37°C
IVT-Ladepuffer	6 μ l
	Denaturierung 2 Minuten 85°C

Bereits während der 60 Minuten dauernden Inkubation des *in vitro*-Transkriptions-Ansatzes erfolgt der Vorlauf des denaturierenden Gels bei 18 W für maximal 1 Stunde. Nach erfolgter Transkription wird der denaturierte Ansatz auf Eis gehalten, bis er auf zwei Taschen des denaturierenden Gels geladen wird. Der Gel-Lauf erfolgt bei 13 W. Wenn die Bromphenolblau-Front etwa eine Handbreit über dem Gel-Ende ist, wird der Lauf gestoppt. Die obere Glasplatte wird vom Gel entfernt und das Gel auf der unteren Glasplatte mit Frischhaltefolie umgeben. Das auf diese Weise verpackte Gel wird in einem Folder für 2 Minuten mit einem Film exponiert. Der Film wird entwickelt und ein zweiter Film auf die gleiche Weise exponiert. Aus dem entwickelten zweiten Film werden die geschwärzten Banden ausgeschnitten. Der löchrige Film dient nun als Schablone, um aus dem Gel die Banden mit den Transkripten ausschneiden zu können. Die ausgeschnittenen Gel-Stücke werden für 30 Minuten bei -80 °C inkubiert, um die Gel-Struktur zu zerstören. Danach werden 400 μ l Elutionspuffer zu den Gel-Stücken gegeben und diese Übernacht bei 22°C inkubiert. Am dritten Tag erfolgt zuerst die Gel-Extraktion der Transkripte, dazu wird der Ansatz mit den Gel-Fragmenten auf eine Spin-X Säule (0,22 μ m, Firma Corning, USA) geladen und für 30 Minuten bei 22°C und 14.000 rpm (17.530x g, Rotor 121154, Firma Sigma) zentrifugiert. Der Durchlauf der Säule enthält die RNA-Transkripte. Die Fällung der Transkripte erfolgt durch die Zugabe von 2 Volumen 100% Ethanol. Der Fällungsansatz wird für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und dann für 20 Minuten bei 4°C wie oben zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Pellets mit 70 % Ethanol für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Zentrifugation erfolgt für 5 Minuten wie oben beschrieben. Die Pellets werden nochmals in 70 % Ethanol gewaschen. Die Pellets werden dann 1 Minute bei 37°C getrocknet und dann in je 12,5 μ l Annealingpuffer resuspendiert. Für die Annealing-Reaktion werden die beiden Transkripte in Annealingpuffer gemischt. Zum Denaturieren von Sekundärstrukturen wird das Gemisch zuerst für 10 Minuten bei 80°C inkubiert. Dann erfolgt eine Inkubation bei 45°C für 1 Stunde im Wasserbad. Nach Ablauf der 1 Stunde wird das Wasserbad abgestellt und der Annealing-Ansatz Übernacht darin inkubiert. Durch die langsame Abkühlung der Wassertemperatur im Wasserbad kommt es zu einem spezifischen Annealing der komplementären Bereiche in den beiden Transkripten. Außerdem sollte an diesem Tag noch ein natives 15 % Polyacrylamid-Gel für den vierten Tag gegossen werden. Am vierten Tag werden die hybridisierten Transkripte aufgereinigt. Dazu werden sie in einem nativen 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und dann daraus ausgeschnitten. Gel-Vorlauf, Gel-Lauf und die Gel-Extraktion wird durchgeführt wie es für die Einzel-Transkripte am 2. und 3.Tag

beschrieben wurde. Am 5. Tag wird die Fällung der aus dem Gel extrahierten hybridisierten Transkripte wie vorher beschrieben zuende geführt, das getrocknete Pellet wird diesmal in 30 µl Aqua bidest. resuspendiert. Im Szintillationsgerät (LS 5000 CE, Firma Beckman Coulter, USA) werden die Counts-Per-Minute (cpm) vermessen.

3.9.2 *In Vitro*-Entwindungs-Assay

Der Ansatz für den *in vitro*-Entwindungs-Assay wird folgendermaßen pipettiert:

Protein	20ng
hybridisiertes-RNA-Substrat	5000 cpm
10x Puffer (Tris/MgCl ₂ pH8)	2 µl
ATP (Stammlösung 10 mM)	4 µl
Rnaseinhibitor (10 U)	1 µl
DTT (Stammlösung 0,1 M)	0,5 µl
Aqua bidest.	Ad 20 µl
	30 min bei 37 °C inkubieren
Stop-Puffer	4 µl

Nach der Zugabe des Stop-Puffers werden die Proben auf Eis gehalten, bis sie auf ein natives Polyacrylamid-Gel geladen werden, das während des Laufs bei 13W gekühlt wird. Der Gel-Lauf ist beendet, wenn sich die Bromphenolblau-Front etwa einen Fingerbreit vom Gel-Ende entfernt ist. Zur Exposition wird das Gel auf einer Glasplatte in einen Folder zwischen Frischhaltefolie gepackt und ein Film aufgelegt. Die Exposition findet Übernacht bei -80 °C statt. Am nächsten Tag wird der Film entwickelt und das Ergebnis bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Subzelluläre Lokalisation von AtPMH3

Zur experimentellen Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtPMH3 wurde ein Fusionskonstrukt aus der cDNA der Atpmh3-Präsequenz mit der cDNA des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP) im Vektor psmGFP4 erstellt. Das so hergestellte Plasmid wurde als psmGFP4pmh3 bezeichnet. Das auf dem Plasmid psmGFP4pmh3 kodierte Fusionsprotein wurde transient in Tabak-Protoplasten exprimiert. Anhand der Verteilung des fluoreszierenden Fusionsproteins in Tabak-Protoplasten wurde auf die subzelluläre Lokalisation des AtPMH3-Proteins in der Pflanzenzelle rückgeschlossen.

4.1.1 Klonierung der Atpmh3-Präsequenz in den Vektor psmGFP4

Das AtPMH3-Protein wird von vier Computer-Algorithmen als mitochondrial lokalisiert vorhergesagt (Tabelle 2). Die Länge der putativen Präsequenz wird dabei mit 30 oder 38 Aminosäuren angegeben.

Computerprogramm	Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisation	Länge der Präsequenz
TargetP	0,351 (cp: 0,099)	38 Aminosäuren
Mitop	0,925	30 Aminosäuren
Psort	0,874 (mm: 0,563)	38 Aminosäuren
Predotar	0,938 (cp: 0,068)	(keine Vorhersage)

Tabelle 2: In silico-Vorhersagen zur mitochondrialen Lokalisation von AtPMH3. Für die Computerprogramme TargetP und Predotar sind in Klammern auch die Wahrscheinlichkeiten für eine chloroplastidäre Lokalisation angegeben. Das Programm Psort gibt eine Wahrscheinlichkeit von 0,874 für eine Lokalisation in der mitochondrialen Matrix an und eine Wahrscheinlichkeit von 0,563, dass AtPMH3 in der äußeren Membran, der inneren Membran oder im perimitochondrialen Raum lokalisiert ist. Cp: Chloroplasten, mm: mitochondriale Membran

Da die genaue Länge der mitochondrialen Präsequenz unklar ist, sollte das Fusionsprotein mindestens die ersten 100 N-terminalen Aminosäuren des AtPMH3-Proteins enthalten. Diese Länge umfasst mit großer Sicherheit die komplette mitochondriale Präsequenz. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass sich weitere Sequenzen die für die subzelluläre Lokalisation wichtig sind an anderer Stelle im Protein befinden. In einer PCR mit den Primern pmh3gfp5' und pmh3gfp3'2 wurde mit Gesamt-DNA als Template ein 336 bp langes DNA-Fragment des Atpmh3-Gens amplifiziert. Dieses Fragment enthält die Codon-Triplets für die ersten 106 Aminosäuren des AtPMH3-Proteins (Abbildung 3A).

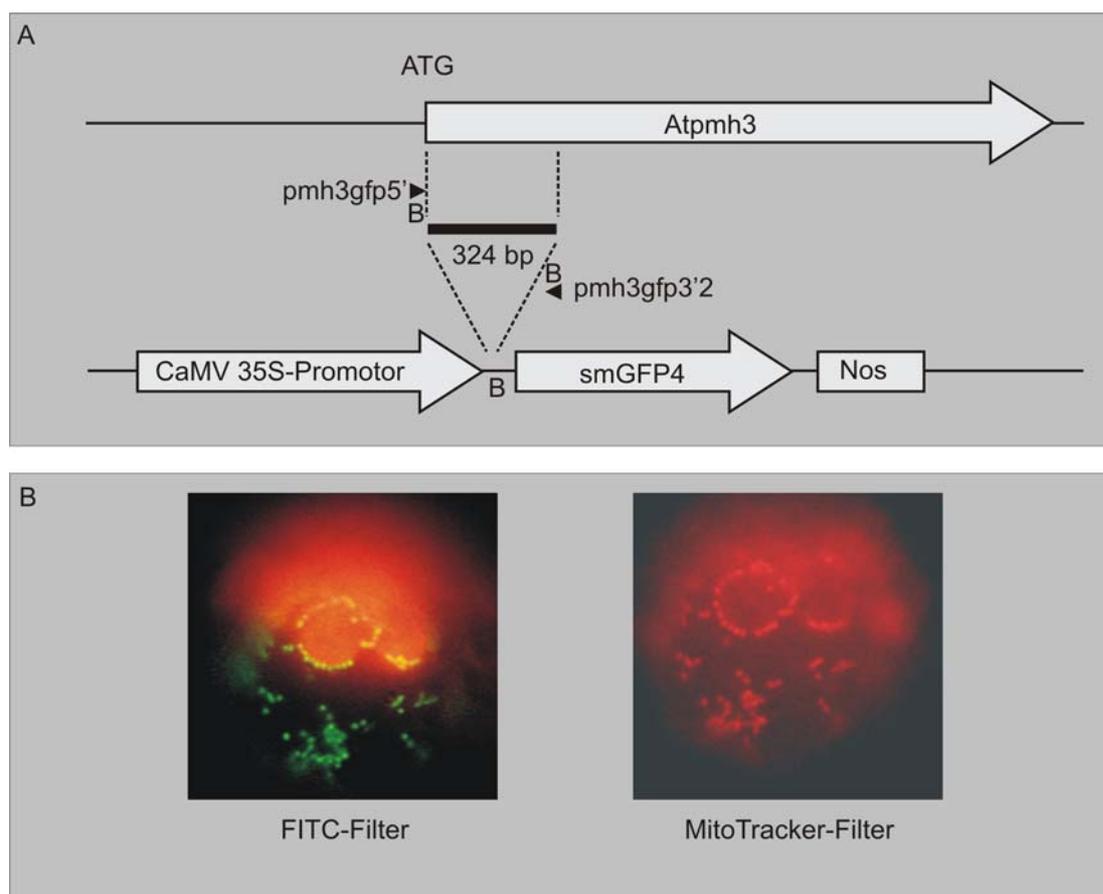


Abbildung 3: Subzelluläre Lokalisation von Atpmh3. **A.** Klonierung des Atpmh3-DNA-Fragments in den Vektor psmGFP4. Im oberen Teil ist das 1.654 bp lange Atpmh3-Gen dargestellt, das keine Introns enthält. Das in der PCR generierte Fragment von 336 bp ist nach der Restriktion mit BamHI 324 bp lang. ►◄: Primer; Nos: Nos-Terminator; B: BamHI-Schnittstelle. **B.** Aufnahmen von transient mit dem Fusions-Konstrukt transformierten Tabak-Protoplasten. Links ist eine Zelle im FITC Filter mit der grünen Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins zu sehen. Rechts wurde dieselbe Zelle mit dem MitoTracker-Filter aufgenommen. Der Vergleich der Fluoreszenz-Muster des Fusionsproteins und der Mitochondrien bestätigt die mitochondriale Lokalisation von AtPMH3 in der Pflanzenzelle.

Durch die beiden Primer wurden zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease BamHI eingeführt. Der Vektor psmGFP4 und das amplifizierte DNA-Fragment der Atpmh3 wurden mit BamHI geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Das resultierende Plasmid psmGFP4pmh3 wurde durch Transformation in *Escherichia coli*-Zellen des Stammes SURE vermehrt. Die richtige Orientierung der Atpmh3-Sequenz im psmGFP4-Vektor wurde durch eine PCR überprüft. Die korrekte Insertion der Atpmh3-Sequenz vor der smGFP4-Sequenz wurde mit einer Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid psmGFP4pmh3 enthält den konstitutiven CaMV 35S-Promotor, der die Expression des AtPMH3-GFP-Fusionsproteins steuert.

4.1.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation des AtPMH3-Proteins mit einem Präsequenz-GFP-Fusionsprotein

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurde das pmh3psmGFP4-Konstrukt transient in Tabak-Protoplasten transformiert. Die Tabak-Protoplasten wurden zusätzlich mit MitoTracker inkubiert, einem Farbstoff, der spezifisch Mitochondrien anfärbt. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops und der entsprechenden Filter wurden Aufnahmen der transformierten und gefärbten Tabak-Protoplasten angefertigt. Mit dem FITC-Filter ist die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins zu erkennen (Abbildung 3 B). Außerdem ist mit diesem Filter die rote Eigenfluoreszenz der Chloroplasten zu sehen. Mit dem MitoTracker-Filter sind die spezifisch angefärbten Mitochondrien zu sehen. Ein Vergleich der Fluoreszenz der beiden Abbildungen zeigt identische Muster. Das Fusionsprotein befindet sich also in den Mitochondrien. Die *in silico* vorhergesagte mitochondriale Lokalisation des AtPMH3-Proteins wurde somit auch experimentell gefunden.

4.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der fünf untersuchten Helikasen

Mit einem Alignment der Sequenzen der fünf Helikasen wurde deren Ähnlichkeit untereinander analysiert (Abbildung 4). AtSUV3 zeigt im Motiv II zwar die Sequenz DEIQ, ist aufgrund der Sequenzen der anderen konservierten Motive aber als DExH-Box-RNA-Helikase einzuordnen. Die anderen vier Helikasen sind DEAD-Box-Proteine. Die Aminosäuresequenzen der fünf Helikasen wurden paarweise mit dem ClustalW-Algorithmus verglichen. Der Anteil an ähnlichen und identischen Aminosäuren ist in Tabelle 3 dargestellt.

	Atmmh	Atpmh1	Atpmh2	Atpmh3	Atsuv3
Atmmh	-	20.2	20.0	17.1	11.4
Atpmh1	20.1	-	76.1	19.6	10.0
Atpmh2	19,9	75,9	-	19.6	10.9
Atpmh3	17.2	19.6	19.6	-	10.9
Atsuv3	11.4	10.0	11,0	10.9	-

Tabelle 3: Anteil an ähnlichen und identischen Aminosäuren der Helikasen in Prozent. Im oberen Bereich ist die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen, im Unteren die Identität in Prozent angegeben.

Das Alignment ist in Abbildung 4 dargestellt. Die DEAD-Box-Proteine sind in den helikase-spezifischen Motiven homolog (Abbildung 4).

Atmmh	1	-MVGASRTILSLSLSSSLFTFSKIPHVFPFLRLHKPRFHAFRPLYSAAATTSPP---TETNVTDPDQL
Atpmh1	1	-MISTVLRRSILGTSRRTLAAVTSINAALFHNLAATAATVSDLAN-GATNVKSLPSNSSPFGVKVRDFH
Atpmh2	1	-MITVLRRSILLDASKRNLSASLTSINTVLFHNLAATAATVSDLANLIGSSSDVKAG----FPFGVEAKGIH
Atpmh3	1	MAASTSTRFLVLLKDFSAFRKISWTCAATNFHRQSRFLCHVAKED--GSLTIAS-----LDLGNKPRK
Atsuv3	1	-MAYSVVRLLRKYVLSALGISRVLQADKGSLSRFRH-FEPEFGDLLRLG-VLTRNYRK-----NSGSPKFD
Atmmh	67	KH-TILLERLRRLRHLKE--SAKPPQOR-PSS--VGVVEEESIRKKSCKLVENFOELGLSEEVMGALQEL
Atpmh1	69	VK-SVPSE-FRSSIVSS--AGFAAQEYAPSYENDGGIGDSESVGSSGGGDGTAIADLGLISPEIVKALKGR
Atpmh2	66	FQ-SGPLD-FRASMVSQ--AGFAISE--SS---ERRVGDSESVG----GDGLAISELGLISPEIVKALSSK
Atpmh3	62	FG-KGKAMKLEGSFVTE--MGQGVRAVKNDKMKVVEKPKPAEIVSPLFSAKSFEELGLPDSLLDSLERE
Atsuv3	60	FTGTGTTSKFDFTDLTCPHTWYPIARK-KKR--KVIILHVGPNTNSGKT-YSAKHLHQSSSGVYCGPRLRL
		Q I Ia
Atmmh	131	NIEVPTETOCIGIP-AVMERKSVVLGSHTGSGKTLAYLLPIVQLMREDEAN----LGKKTTPRRRRTVVI
Atpmh1	135	GIEKLFPIQKAVLE-PAMEGRDMIGRARTGTGKTLAFGPIIDKIIKFNK----HGRG---KNPQCLVL
Atpmh2	123	GIEKLFPIQKAVLE-PAMEGRDMIGRARTGTGKTLAFGPIIDKIIKYNK----HGRG---RNPCLVL
Atpmh3	129	GFSVPTDVOAAVP-AIIKGDAVIQSYTGSGKTLAYLLPILSEIGPLAEKSRSSHSENDKRTETQAMIV
Atsuv3	126	AWEVAKRNLKANVPCDLITGOEKDLVEG-ATHKAVTVEMADVTSVYDCAIT---D-----EIQMVG
		Ia Ib II
Atmmh	196	CPTRELSQVYRVAKSIS-HHARFRSLVSGGS-RTRPQEDSLNN-AIDMVVGTTPGRILQHIIEGNMVG
Atpmh1	197	APTRELARQVEKEFRESA-P--SLDTICLYGGT-PIGQOMRELNY-GIDVAVGTPGRIIDLKRCADNLS
Atpmh2	185	APTRELARQVEKEFRESA-P--SLDTICLYGGT-PIGQOMRQLDY-GVDVAVGTPGRVIDLKRGCALNLS
Atpmh3	198	APSRELMQIVREVEKLLGPVHRRMVQQLVGGANRMRQEEALKKN-KPAIVVGTTPGRIAEISKGKIH
Atsuv3	183	CKQR--GFAFTRALLGIA-----ADELHLCGDPVAVPLVEDILKVTGDVVEVHTYERLSPLVP---LKVP
		II III
Atmmh	263	DIAYLVLEADTMFDRGFGPEIRKFLAPLNQALK-----TNDQGFQTVLWATMTMAVOKLVDEEFOG
Atpmh1	262	EVQFVLEADQMLQVGFADVEIILQKLP-----KQSMMSATMPSWIRSLTKKYLNN
Atpmh2	250	EVQFVLEADQMLQVGFADVEIILEKLP-----KQSMMSATMPSWIRSLTKKYLNN
Atpmh3	267	GCRFLVLEVDELLSFNREDIHRILEHVGVKRSAGPKGEVDERANRQITILVSAVPPFSVIRAAKWSHE
Atsuv3	243	VSSVSSIKTGDCLVTFS-RKDIYAYKKTIER-AG-----KHLCSVVYGSLLPETRTAQATRFN-
		IV
Atmmh	327	IEHLRT---STLHKKIANARHDFIKLSGGEDK-LEALLQVLEPSLA-----K
Atpmh1	318	PLTIDL---VGDSDQKLADGITMYSIAADSYG-RASITGPLVKEHG-----K
Atpmh2	306	PLTVDL---VGDSDQKLADGITMYSIAADSYG-RASITGPLVTEHA-----K
Atpmh3	337	PVLVQANKVTPLDTVQPSAPVMSLTPPTSEADGQIQTTIQSLPPALKHYCISKHQHKVDTLRRCVHALD
Atsuv3	299	---DE---TNDFDVLVAS--DAIGM-GLNLN-ISRILFSTLQKYD-----K
		V
Atmmh	370	GSKVMVFCNTLNSRAVDHYLSENQISTVNYHGEVPAEORVENLKKFKDEEGDCPTLVCTDI AARGLDLD
Atpmh1	361	GGKCVFTQTKRDADRLAFLAKS-YKCEALHGDISQAQRERTLAFGRD--GNFSILVATDVAARGLDVPE
Atpmh2	349	GGKCVFTQTKRDADRLSALARS-FKCEALHGDISQAQRERTLAFGRD--GHFNILVATDVAARGLDVPE
Atpmh3	407	AQSVIAFMNHSRQLKDVVYKLEARGMNSAEMHGDGKLGKGRSTVLKFKFN--GEIKVLVTNEISARGLDVA
Atsuv3	334	GSETRDLTVS--EIKOIAGRAGR--FQSKFPIGEVTCCLK-EDLPLLHS-----SLKSPSPILERAGLFE
		VI VI
Atmmh	440	-VDHVVMFDFPKNSIDYLRHRTGRTARMGAKGKVTSLVSRKQOMLAARIE-EAMRNNELESLLTDNVRRD
Atpmh1	428	NVDLVIHYELPNNTEFVHRTGRTGRAGKKGSAIILHGO-DQTRAVKMI-EKEVGSRFNELPSIAVERGS
Atpmh2	416	NVDLVIHYELPNNTEFVHRTGRTGRAGKKGSAIILYSQ-DQSRVAKII-BREVGSRFTELPSIAVERGS
Atpmh3	475	ECDLVNLELETDAVHYAHRAGRTGRGKRGTVVTVEE-SQVFIVKKM-EKQLGLPFLYCFVDGELVV
Atsuv3	394	TFDLSGYSQAHPTHGLYQILEHFVENAKLSNRYFISNVEDMMKVAATVDELPGLQEKYLFFVSPVDVN
Atmmh	508	AARTH-ITQEKGRSVKQ-----IREVSKQRN-SRDKPSSSSPPARSTGGKTPVRKSSSSSFSKPR
Atpmh1	496	ASMFEVVGARSGGSFSGG-----GRSGGGYG-SYSSSSRSGGGSYGGYGGSSGRSGGGGGSYGG
Atpmh2	484	ASMFEVIGRSRGGSFGGGMRDRGSSFGGRSGGGYGSGSGGYGGSSNRYSGSDRSRGGFSGMRS
Atpmh3	543	TEEDKALIR-----AGIVRLREILAPDRVKVPKTPTELKELESIHKVLVDLYVWLSLR
Atsuv3	464	DEISGQGLAQFAQNFESK-----AGIVRLREILAPDRVKVPKTPTELKELESIHKVLVDLYVWLSLR
Atmmh	566	KASSPPEKSSKPKRKILKTVGSRSAAR-----GKTGSDRR-PGKKLSVVGFRGKSSSARAS
Atpmh1	555	SGGSSSRYSGGSDRSRSGFSGSGSS-----GGFGSDRSSQSSGRSFGGFGSNDGKRSY
Atpmh2	554	PEGYSDRSRSGSGGRSFGGGRSGGSSNRRSSGFGDFGSDRSSQSGGRSFGGFGSNDGKRSY
Atpmh3		-----
Atsuv3	524	LEDSPFPREVAASQKSICNLLIEQFLE-----G-NRLNSPARFSRYLRRQKLSE----

Abbildung 4: Alignment der fünf Helikasen mit dem ClustalW-Algorithmus. Schwarz unterlegte Aminosäuren sind in mindestens drei Sequenzen identisch. Die roten Kästchen grenzen die konservierten Motive der DEAD-Box-Proteine ab, während rote Unterstreichungen die konservierten Motive der DexH-Box-Helikase Atsuv3 markieren. Die römischen Zahlen und das Q geben an, um welches der Motive es sich handelt.

Die Motive I und II, verantwortlich für die NTP-Bindung, und die Motive Ia, Ib und V, verantwortlich für die Bindung des RNA-Substrates, sind leicht zu identifizieren. Auch die Motive III und VI, verantwortlich für die Verbindung der NTP-Hydrolyse mit der Helikase-Aktivität, sind gut zu identifizieren, während die Lage des Motivs IV nicht eindeutig zu

bestimmen ist. Außerdem sind in den Aminosäuresequenzen der DEAD-Box-Proteine noch weitere kurze homologe Bereiche zu finden, z.B. das Motiv GSDR am C-Terminus von AtMMH, AtPMH1 und AtPMH2, deren Bedeutung unbekannt ist. Betrachtet man die Gesamtlängen der fünf Proteine, so zeigen sich zwischen AtMMH, AtPMH1 und AtPMH2 mit 620, 610 und 616 Aminosäuren kaum Unterschiede, während AtPMH3 und das DExH-Box Protein AtSUV3 mit 551 und 571 Aminosäuren etwas kürzer sind. Auffällig sind noch die sehr Glycin- und Serin-reichen C-terminalen Sequenzen von AtPMH1 und AtPMH2. Ansonsten finden sich in den anderen Teilen der Proteine, speziell N-terminal und C-terminal von den konservierten Motiven kaum Übereinstimmungen. Eine Ausnahme bilden die Aminosäuresequenzen von AtPMH1 und AtPMH2, die untereinander eine sehr hohe Sequenzidentität von 75.9 % aufweisen. Aufgrund der hohen Identität besteht die Möglichkeit, dass sie in ihrer Funktion im RNA-Metabolismus redundant sind. AtSUV3 zeigt als DExH-Box RNA-Helikase keine Übereinstimmungen mit den anderen vier Proteinen.

4.3 Analyse der Steady-State-Transkriptmengen

Northern-Blot-Analysen sollten Aufschluss über die Steady-State-Transkriptmengen der Helikasen in verschiedenen Geweben und bei unterschiedlichen Temperaturen geben. Zur Detektion der einzelnen Transkripte wurden gen-spezifische, radioaktiv markierten Sonden verwendet (Tabelle 4). Restriktionsfragmente wurden dabei mit dem "Rediprime II DNA Labeling"-System markiert, während für die Detektion der Kontroll-RNA, der 18S rRNA, ein Oligonukleotid mit einer Polynukleotidkinase am 5'-Ende markiert wurde.

Untersuchtes Gen	Sonde	Herkunfts-Plasmid	Fragmentgröße	Lage der Sonde in Bezug auf ATG
Atmmh	Restriktionsfragment	Mmh BegPCR8	1762 bp	-12 bis +1750
Atsuv3	Restriktionsfragment	Suv3pGEMT	360 bp	+61 bis +224
Atpmh1	Restriktionsfragment	Pmh1psmgfp	300 bp	+4 bis +303
Atpmh2	Restriktionsfragment	Pmh2psmgfp	320 bp	-10 bis +308
Atpmh3	Restriktionsfragment	Pmh3psmgfp lang 49	330 bp	-10 bis +312
18S rRNA	Oligonukleotid	-	18 Nukleotide	-

Tabelle 4: Aufstellung der Sonden für die Northern-Hybridisierungen. Für die Sonden der RNA-Helikasen wurden mit Restriktionsendonukleasen aus den genannten Vektoren DNA-Fragmente für die radioaktive Markierung herausgeschnitten. Für die Detektion der 18S rRNA wurde ein Primer verwendet. Die Länge der erhaltenen DNA-Fragmente und die des Primers sind angegeben. Für die Restriktions-Fragmente ist zusätzlich deren Lage in Bezug auf das ATG angegeben.

4.3.1 Analyse der Transkriptmengen in verschiedenen Geweben und Test auf Induktion durch Kälte

Um die gewebe-spezifische Regulation der Transkriptmengen der verschiedenen Helikasen innerhalb der Pflanze zu untersuchen, wurden Northern-Hybridisierungen mit RNA aus Blüten, Blättern, Keimlingen und Wurzeln durchgeführt. Die Pflanzen dafür wurden auf Erde unter Langtag-Bedingungen angezogen. Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit extrahiert. Bei Keimlingen auf Erde wurden nur die oberirdischen Gewebe zur RNA-Präparation verwendet. Zudem sollte eine mögliche Induktion der Helikasen durch Kälte untersucht werden, da für einige RNA-Helikasen aus Bakterien und Archaea gefunden wurde, dass diese erst unter Kälte-Einwirkung exprimiert werden (Chamot *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2000). Für die Untersuchung der Kälteinduktion wurden Samen auf MS-Agar-Platten ausgebracht, da aus diesen leicht die gesamten Keimlinge mit Wurzel entnommen werden können. Die Anzucht erfolgte unter Langtag-Bedingungen für sieben Tage bei 23°C. Nach einer weiteren Kultivierung für 24 Stunden bei 4°C, bzw. bei 23°C bei den Kontroll-Pflanzen, wurde Gesamt-RNA aus den Keimlingen mit dem RNeasy-Kit extrahiert. Bei Keimlingen auf MS-Agar-Platten wurden für die RNA-Präparation die gesamten Keimlinge verwendet.

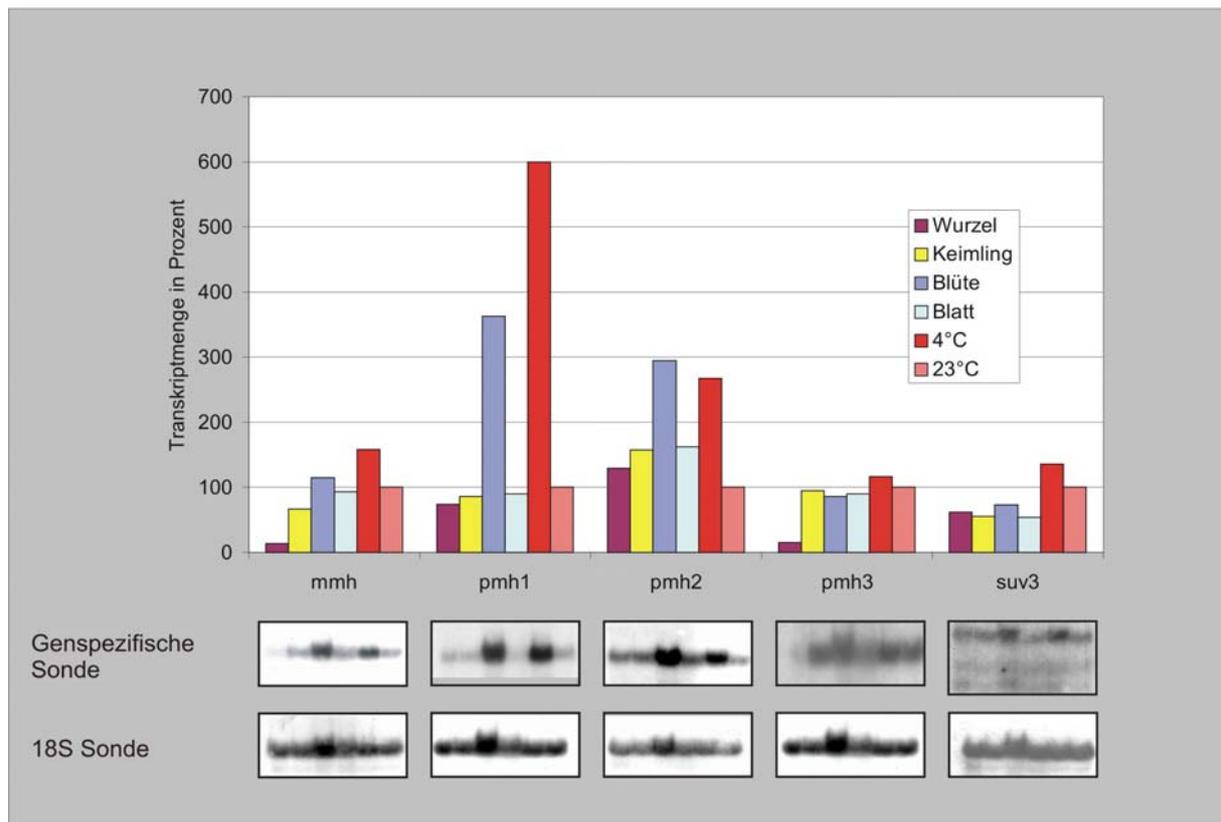


Abbildung 5: Steady-State-Transkriptmengen der Helikasen. Das Diagramm zeigt die standardisierten Werte in den verschiedenen Geweben und bei 23°C und 4°C in Prozent. Die Werte bei 23°C wurden willkürlich auf 100% gesetzt und die anderen relativ dazu dargestellt. Im unteren Teil der Abbildungen sind die Northern-Hybridisierungen mit den helicase-spezifischen Sonden (oben), und mit der 18S rRNA-Sonde (unten) gezeigt.

Die verschiedenen RNA-Proben wurden in denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Duralon-UV-Membranen transferiert. Zur Detektion der genspezifischen RNA wurde jede Membran mit einer radioaktiv markierten genspezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 5, obere Filmreihe). Die hybridisierten Membranen wurden mit einem Film exponiert. Die Expositionszeiten wurden in allen Northern-Hybridisierungen abhängig von der Stärke des resultierenden Signals optimiert. Für die anschließende Normierung wurden dieselben Membranen mit einer Sonde gegen 18S rRNA hybridisiert (Abbildung 5, untere Filmreihe). Zur Quantifizierung wurden die Signale auf den entwickelten Filmen mit einem Densitometer vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Schwärzung der vermessenen Filme nicht im Sättigungsbereich befand. Um vergleichende Aussagen treffen zu können, wurde eine zweistufige Normierung vorgenommen:

1. Die gemessene Filmschwärzung jedes helikase-spezifischen Signals wurde durch die dazugehörige Filmschwärzung der 18SrRNA-Sonde dividiert.
2. Für die Darstellung im Diagramm von Abbildung 3 wurde für jedes Gen willkürlich der Wert bei 23°C als 100% definiert.

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, wurden alle Transkripte in 10 µg Gesamt-RNA nachgewiesen, ohne dass eine Anreicherung von poly(A)⁺-RNA nötig war. Außerdem sind alle Transkripte in allen untersuchten Geweben vorhanden. Die Transkripte von *Atsuv3* und *Atpmh3* konnten dabei nur nach langen Expositionszeiten von mehreren Wochen detektiert werden. *Atmmh* zeigt in allen Geweben außer in Wurzeln (14 %) relativ ähnliche Transkriptmengen (67%-115%). Zwischen 23°C und 4°C zeigt die Transkriptmenge von *Atmmh* einen Anstieg um etwa 50 % was ein Hinweis auf eine Kälteinduktion der *Atmmh* ist. *Atpmh1* weist in Blüten mit Abstand die höchste Transkriptmenge auf (370%). Der Vergleich der Transkriptmenge bei 23°C und 4°C zeigt eine starke Kälteinduktion um den Faktor sechs. *Atpmh2* zeigt ein ähnliches Muster der Transkriptmengen wie *Atpmh1*. Allerdings ist die Differenz zwischen der Expression bei 23°C und der Expression in Blüten bzw. bei Kälte mit jeweils 2.9-fach und 2.5-fach wesentlich geringer als bei *Atpmh1*. Wegen der schwachen Signale ist es schwer, klare Aussagen über *Atpmh3* und *Atsuv3* zu treffen. *Atpmh3* wird in Wurzeln schwächer detektiert als in den anderen Geweben. Bei *Atsuv3* zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben. Weder *Atpmh3* noch *Atsuv3* zeigen eine Induktion durch Kälte.

4.3.2 Detaillierte Analyse der Kälteinduktion von Atpmh1

Die im vorangegangenen Experiment gefundene Kälteinduktion von Atpmh1 sollte mit weiteren Northern-Blot-Analysen detaillierter bestimmt werden. Um einen Zeitverlauf der Transkript-Zunahme und/oder -Abnahme bestimmen zu können, wurden RNA-Extraktionen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von Keimlingen bei Kälte durchgeführt. Dazu wurden Samen auf Erde in Töpfen ausgebracht und für sieben Tage unter Langtagbedingungen kultiviert. Am siebten Tag wurden die Töpfe mit den Pflanzen für die Kälteinduktion auf 4°C transferiert, während Töpfe mit Pflanzen für die Kontrollen bei 23°C weiter kultiviert wurden. Die Lichtbedingungen bei beiden Temperaturen waren 70-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, der Licht/Dunkel-Wechsel erfolgte weiter im Langtag-Rhythmus (16 Stunden hell, 8 Stunden dunkel). Die Probennahme erfolgte 12, 24, 36, und 48 Stunden nach dem Transfer zu 4°C. Zur Gesamt-RNA-Extraktion mit dem RNeasy-Kit wurden nur oberirdische Teile der Keimlinge verwendet.

Probe	Inkubation1	Inkubation2	Inkubation3	Experimente
12h23°C	7d 23°C	12h 23°C	-	3
12h 4°C	7d 23°C	12h 4°C	-	3
24h23°C	7d 23°C	24h 23°C	-	3
24h 4°C	7d 23°C	24h 4°C	-	3
25h23°C	7d 23°C	24h 23°C	1h 23°C	2
25h 4°C	7d 23°C	24h 4°C	1h 4°C	2
24h 4°C+1h-4°C	7d 23°C	24h 4°C	1h -4°C	2
28h23°C	7d 23°C	24h 23°C	4h 23°C	2
28h 4°C	7d 23°C	24h 4°C	4h 4°C	2
24h 4°C+4h-4°C	7d 23°C	24h 4°C	4h -4°C	3
36h23°C	7d 23°C	36h 23°C	-	3
36h 4°C	7d 23°C	36h 4°C	-	3
48h23°C	7d 23°C	48h 23°C	-	3
48h 4°C	7d 23°C	48h 4°C	-	3

Tabelle 5: Probenbehandlung für den Zeitverlauf der Kälteinduktion von Atpmh1. Die Inkubationen 1-3 folgen zeitlich aufeinander. Die Länge der Inkubation und die Temperatur sind in der Tabelle angegeben. Bei Inkubation 1 wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen angezogen. Bei Inkubation 2 wurde der Langtag-Rhythmus von 16 Stunden hell, 8 Stunden Dunkel eingehalten. Die Lichtmenge betrug jedoch 70-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Bei Inkubation 3 wurden die Pflanzen im Dunkeln gehalten. In der Spalte Experimente ist die Anzahl an unabhängig durchgeführten Versuchen angegeben. h: Stunden; d: Tage.

In einem weiteren Teil dieses Experiments sollte überprüft werden, ob ein Transfer von 4°C auf Temperaturen unter 0°C einen zusätzlichen Anstieg der Transkriptmenge bewirkt. Dazu wurden zusätzlich Pflanzen, die bereits 24 Stunden bei 4°C standen, auf Temperaturen von

–4°C bis –6°C transferiert. Zur Kontrolle dienten Pflanzen, die weiter bei 4°C standen und Pflanzen, die während der gesamten Zeit bei 23°C kultiviert wurden. Die Inkubation bei –4°C bis –6°C erfolgte für 4 Stunden. Während dieser 4 Stunden wurden die transferierten Pflanzen und die dazugehörigen Kontroll-Pflanzen bei 4°C und bei 23°C im Dunkeln gehalten. 1 Stunde und 4 Stunden nach dem Transfer auf –4°C wurden Proben genommen. Dazu wurden aus oberirdischen Teilen der Keimlinge Gesamt-RNA extrahiert. Eine zusammenfassende Darstellung der Inkubationsbedingungen des gesamten Experiments ist in Tabelle 5 zu sehen. Um die erhaltenen Werte abzusichern, wurden drei von der Anzucht von Pflanzen, über die Inkubationen und RNA-Präparationen bis zu den Northern-Blot Analysen voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. In Tabelle 4 ist für jeden Messpunkt angegeben, in wie vielen Versuchen er untersucht wurde. Jeder gemessene Wert eines Messpunktes wurde, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, auf den dazugehörigen 18S rRNA-Wert normiert. Die verschiedenen normierten Werte eines Datenpunktes wurden gemittelt. Für die Darstellung im Diagramm (Abbildung 6) wurden alle Werte bei 23°C willkürlich auf 100% gesetzt, um nur die relative Zunahme an Transkript durch Kultivierung bei 4°C oder –4°C darzustellen.

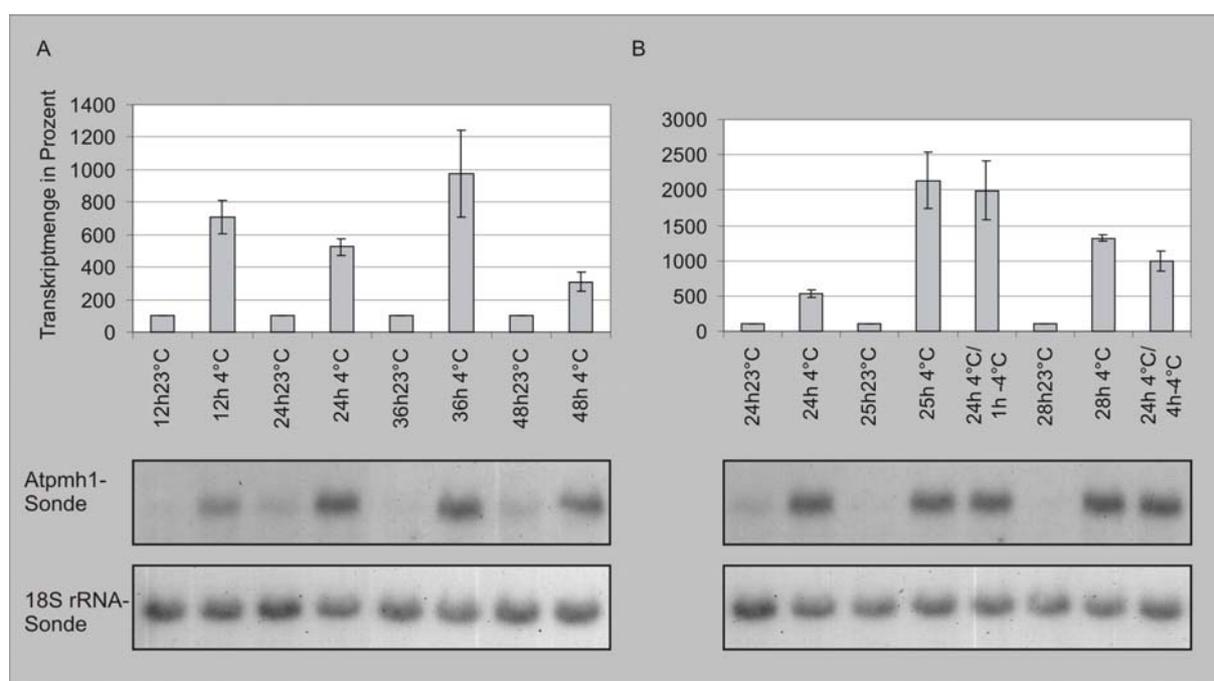


Abbildung 6: Detaillierte Analyse der Kälteinduktion von Atpmh1. Die beiden Diagramme zeigen die normierten, gemittelten Werte aus bis zu drei unabhängigen Experimenten. Die Werte bei 23°C wurden willkürlich als 100% definiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standard-Abweichung. Im unteren Teil ist eine beispielhafte Northern-Blot-Analyse zu sehen. Die obere Fotoreihe zeigt dabei die Hybridisierung mit der Atpmh1-Sonde, die untere Fotoreihe die Hybridisierung mit der 18S rRNA-Sonde. A: Zeitverlauf der Kälteinduktion von Atpmh1. B: Test auf weitere Induktion von Atpmh1 durch –4°C.

Der Steady-State-Level der RNA von Atpmh1 zeigt nach 12 Stunden bei 4°C eine Erhöhung um etwa den Faktor 6, eine weitere, geringere Zunahme der Transkriptmenge ist bis 36

Stunden nach dem Transfer auf 4°C zu beobachten. 48 Stunden nach dem Transfer auf 4°C sinkt die Atpmh1-Transkriptmenge wieder unter den 12 Stunden-Wert, ist aber noch etwa um den Faktor drei höher als bei den Kontroll-Pflanzen (Abbildung 6 A). Die Untersuchung einer weiteren Induktion durch Temperaturen unter 0°C zeigte weder nach einer Stunde, noch nach 4 Stunden bei -4°C einen signifikanten Anstieg der Atpmh1-Transkriptmenge (Abbildung 6 B). Allerdings scheint die Transkriptmenge zwischen 24 Stunden und 36 Stunden bei 4°C weiter anzusteigen. Wie das Diagramm in Abbildung 4 zeigt, ergaben sich teilweise große Standardabweichungen. Um auszuschließen, dass Unterschiede in der Umgebungstemperatur während der RNA-Extraktionen einen Einfluss haben, wurde ein zusätzlicher Test durchgeführt. Dazu wurde die RNA-Extraktion für den Wert 24h 4°C/4h -4°C auf drei verschiedene Arten durchgeführt. Normalerweise wurde das Pflanzenmaterial zum Laborplatz gebracht, wo das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff erfolgte. Zusätzlich wurde nun ein Teil des Pflanzenmaterials direkt aus -4°C in flüssigen Stickstoff transferiert und ein weiterer Teil des Pflanzenmaterials wurde vor dem Einfrieren für 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Northern-Blot-Analyse dieser RNA ergab keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptmengen von Atpmh1 (Tabelle 6). Kurze Temperaturschwankungen in einem Zeitrahmen von 5 Minuten zeigen somit keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von Atpmh1.

Probe	Relative Transkriptmenge (bezogen auf 28h 23°C)
28h 23°C	100 %
28h 4°C	1018 %
24h 4°C+4h-4°C	869 %
24h 4°C+4h-4°C, Stickstoff	854 %
24h 4°C+4h-4°C, 30°C	846 %

Tabelle 6: Untersuchung auf Einfluss von Temperaturschwankungen bei der RNA-Extraktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transkriptmenge von Atpmh1 nach der Induktion durch Kälte eine Zunahme bis zu einem Faktor von 30 zeigt. Der zeitliche Verlauf zeigt dabei einen Anstieg bis 28 Stunden nach dem Transfer auf 4°C, danach sinkt die Transkriptmenge trotz Kälte wieder. Eine weitere Induktion durch Temperaturen von -4°C wurde nicht beobachtet.

4.3.3 Zeitverlauf der Kälteinduktion von Atpmh2

Auch Atpmh2 zeigt einen Anstieg der Transkriptmenge nach dem Transfer von 23°C auf 4°C. Daher wurde auch für Atpmh2 der Zeitverlauf der Kälteinduktion untersucht (Abbildung 7).

Dazu wurde mit der extrahierten Gesamt-RNA eines der in Abschnitt 3.3.2. beschriebenen Versuche eine Northern-Blot-Analyse mit einer Sonde gegen das *Atpmh2*-Transkript durchgeführt. Die Normierung erfolgte auch hier gegen Messwerte der 18S rRNA.

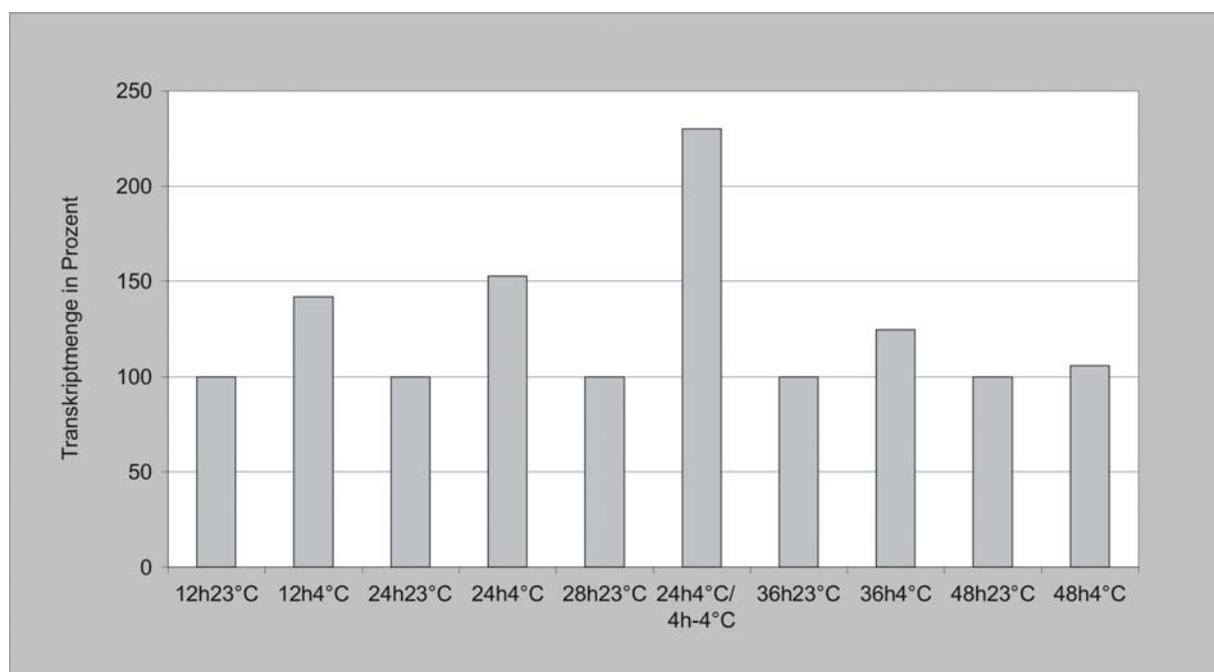


Abbildung 7: Zeitverlauf der Kälteinduktion von *Atpmh2*. Die gezeigten Werte wurden gegen 18S rRNA normiert. Die Darstellung erfolgt in Prozent. Die Kontrollwerte bei 23°C wurden willkürlich auf 100% gesetzt und die dazugehörigen Werte bei 4°C und –4°C wurden relativ dazu dargestellt.

Der Zeitverlauf der Kälteinduktion von *Atpmh2* ist, soweit das aufgrund der analysierten Messpunkte zu erkennen ist, ähnlich wie bei *Atpmh1*. Es erfolgt ein Anstieg der *Atpmh2* Transkriptmenge bis mindestens 24 Stunden nach dem Transfer auf 4°C. 36 Stunden nach Einsetzen der Kälteinduktion sinkt die Transkriptmenge trotz weiterer Inkubation bei 4°C wieder ab. Während sich bei *Atpmh1* 24 Stunden nach Beginn der Kälteinduktion ein Faktor von 6 zwischen der relativen Transkriptmenge bei Kälte und der bei 23°C zeigt, steigt die Transkriptmenge von *Atpmh2* im gleichen Zeitintervall in diesem Experiment nur um den Faktor 1.5. Inkubiert man Pflanzen, die bereits 24 Stunden bei 4°C kultiviert wurden, für weitere 4 Stunden bei –4°C, zeigt sich in der Northern-Blot-Analyse eine Steigerung der Transkriptmenge um den Faktor 1.5 im Vergleich zum Wert 24 Stunden bei 4°C. Da in diesem Versuch aber der Messpunkt 28 Stunden 4°C fehlt, ist unklar, ob der Anstieg der Transkriptmenge wirklich durch die Inkubation bei Temperaturen unter 0°C zustande kommt. Möglicherweise hätte die weitere Inkubation bei 4°C zum gleichen Anstieg geführt.

4.4 Charakterisierung der Promotoraktivität

Durch die Northern-Blot-Analysen wurde die Transkription der fünf untersuchten Helikasen gezeigt und erste Daten zur Verteilung der Transkriptmengen in verschiedenen Geweben der Pflanzen gewonnen. Um im Weiteren grundlegende Erkenntnisse über die Promotoraktivität der Helikasegene in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien zu erhalten, wurde ein Ansatz mit Promotor::Reportergen-Fusionskonstrukten gewählt. Möglicherweise stark örtlich oder entwicklungsstadienspezifisch eingegrenzte (distinkte) Promotoraktivitäten können mit dieser Methode fast bis auf die Zelle genau lokalisiert werden und damit Hinweise auf die Funktion der Helikasen im RNA-Metabolismus der Pflanzen geben. Als Reportergen wurde das Gen der bakteriellen β -Glucuronidase (GUS) verwendet. Transgene Pflanzenlinien, in welche die entsprechenden Promotor::GUS-Fusionskonstrukte der verschiedenen Helikasen stabil integriert wurden, wurden für histochemische β -Glucuronidase-Färbungen verwendet.

4.4.1 Klonierung der Promotor::GUS-Fusionsvektoren

In den Promotor::Reportergen-Fusionskonstrukten sollten alle wichtigen Elemente der Helikase-Promotoren enthalten sein. Da nicht bekannt ist, welche Elemente für die Regulation der Transkription der Helikasen wichtig sind, wurde, beginnend mit dem ATG, willkürlich der Bereich von 1,5-2 kb stromaufwärts des ATG-Codons ausgewählt. Dazu wurde für *Atmmh*, *Atpmh1*, *Atpmh2* und *Atpmh3* jeweils ein Primer-Paar gewählt. Der 5' gelegene Primer sollte etwa 1,5-2 kb stromaufwärts des ATG-Codons liegen und der 3' gelegene Primer sollte das ATG-Codon enthalten oder direkt davor aufhören. Zusätzlich wurden in die Primer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt. Über diese Schnittstellen sollte später die Integration der amplifizierten Promotorsequenzen in die Zielvektoren erfolgen. Die Primer, die genaue Lage der amplifizierten DNA-Fragmente in Bezug auf das Start-Codon des jeweiligen Gens, die eingebrachten Schnittstellen und die Bedingungen der PCRs sind in Tabelle 7 aufgelistet. Der etwa 1,5 kb große Promotorbereich von *Atmmh* wurde mit den genannten Primern (Tabelle 7) und mit Gesamt-DNA als Template in einer PCR amplifiziert. Dieses DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sall und BamHI geschnitten und in den ebenfalls mit Sall und BamHI geschnittenen pBluescript-Vektor eingebracht. Die Identität des PCR-Fragments wurde mit einer Sequenzierung überprüft. Die Amplifikation der Promotorbereiche von *Atpmh1*, *Atpmh2* und *Atpmh3* erwies sich als schwierig, geringe Produktmengen und eine hohe Anzahl an Nebenprodukten machten eine direkte Klonierung nach der ersten PCR unmöglich. Das Promotor-Fragment von *Atpmh1* wurde daher in einer ersten PCR mit Gesamt-DNA als Template amplifiziert. Das Produkt dieser PCR wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die erwartete Bande bei 2 kb ausgeschnitten und die DNA daraus

aufgereinigt. Dieses Fragment diente in einer zweiten PCR mit denselben Primern wie vorher als Template.

Gen	Amplifiziertes Fragment/Lage	Primer-Paar	Restriktionsenzyme	PCR-Bedingungen		Zwischenkloniert in
				1.PCR	2.PCR	
Atmmh	1587 bp/ -1559 bis -1	SG PMMH5'/ SG PMMH3'	Sall/BamHI	58°C/5x 63°C/35x	-	pBluescript
Atpmh1	2009 bp/ -1981 bis +14	SG pmh1prom5'/ SG pmh1prom3'	Sall/Sall	56°C/5x 50°C/35x	59°C/10x 55°C/30x	pGEMT
Atpmh2	2086 bp/ -2067 bis +3	Pmh2prom5'Xba2/ Pmh2prom3'Xba	XbaI/XbaI	56°C/40x	59°C/10x 55°C/30x	pGEMT
Atpmh3	2171 bp/ -2143 bis +4	Pmh3prom5'Bam2/ Pmh3prom3'Bam	BamHI/BamHI	56°C/40x	59°C/10x 55°C/30x	pGEMT

Tabelle 7: Amplifikation der Promotor-Bereiche der Helikasen Atmmh, Atpmh1, Atpmh2 und Atpmh3. Zu jedem Gen sind die in der 2. PCR verwendeten Primer und die mit den Primern eingebrachten Schnittstellen für Restriktionsenzyme genannt. Diese Restriktionsenzyme wurden verwendet, um die Promotorbereiche in die Multiple Klonierungsstelle des Vektors pBecks19/101 einzubringen. Die Größe und Lage des amplifizierten DNA-Fragments ist aufgelistet, wobei das Adenosin des ATG-Codons hier als +1 definiert ist. In der Spalte PCR-Bedingungen sind die Annealing-Temperaturen und die Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Klonierung der amplifizierten Fragmente in die Vektoren pBluescript oder pGEMT ist sinnvoll, da man durch die Restriktion der Promotor-Fragmente aus diesen Vektoren und deren anschließende Aufreinigung aus einem Agarosegel ausschließlich korrekt geschnittene DNA-Fragmente für die Klonierung in den Zielvektor, den binären Pflanzentransformations-Vektor pBecks19/101, erhält. Durch diesen Schritt wird die Effizienz der Klonierung in pBecks19/101 erhöht.

Um den Promotorbereich der Atpmh2 zu amplifizieren, wurde in der ersten PCR ein 2.29 kb großes DNA-Fragment mit den Primern pmh2gfp1.3 und pmh2prom5'Xba2 mit Gesamt-DNA als Template generiert. Das Produkt dieser PCR wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die erwartete Bande bei 2,29 kb ausgeschnitten und die DNA daraus aufgereinigt. Diese DNA diente in einer zweiten PCR mit den Primern pmh2prom5'Xba2 und pmh2prom3'Xba als Template. Für die Amplifikation des Atpmh3-Promotorbereiches wurde eine erste PCR mit den Primern pmh3prom5'Bam2 und pmh3gfp3'1 ebenfalls mit Gesamt-DNA als Template durchgeführt. Das erwartete Produkt von 2,37 kb wurde aus einem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und diente in einer zweiten PCR mit den Primern pmh3prom5'Bam2 und pmh3prom3'Bam als Template. Die in der zweiten PCR amplifizierten DNA-Fragmente der Atpmh1-, Atpmh2- und Atpmh3-Promotoren wurden direkt in den Vektor pGEMT kloniert. Dies ist möglich, da in der PCR durch die DNA-Polymerase Adenosin-Überhänge generiert werden. Diese Überhänge ermöglichen die Ligation in einen pGEMT-Vektor mit Thymidin-Überhängen. Die Identität der klonierten DNA-Fragmente wurde in einer Sequenzierung überprüft (nicht gezeigt). Alle subklonierten Promotorbereiche wurden mit den in Tabelle 7 angegebenen Restriktionsenzymen aus den Vektoren pBluescript und

pGEMT geschnitten und jeweils in den Pflanzentransformationsvektor pBecks19/101.3 (Abbildung 8) umkloniert.

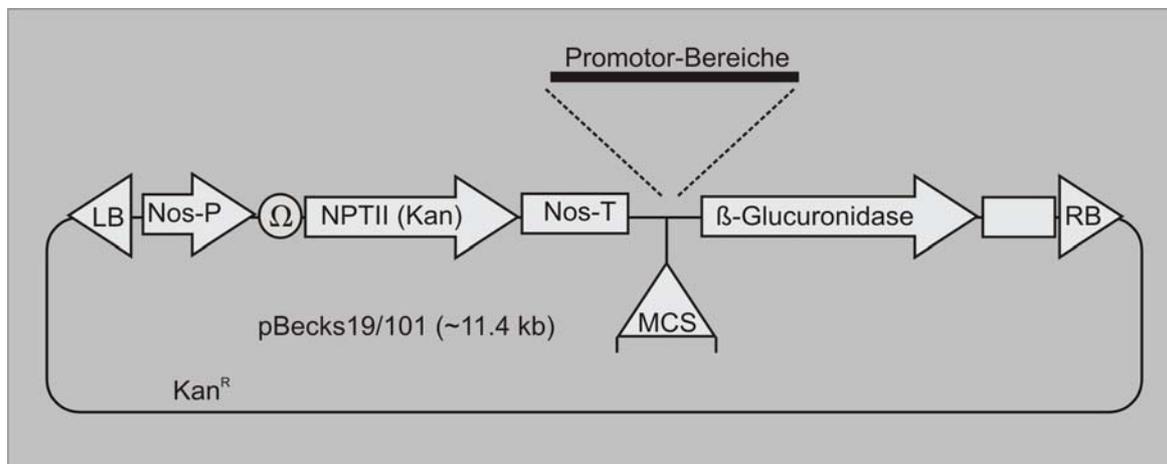


Abbildung 8: pBecks19/101 und Insertion der Promotor-Bereiche der RNA-Helikasegene. pBecks19/101 ist ein binärer Vektor der sowohl in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* propagiert werden kann. Zur Selektion in Bakterien enthält er eine Kanamycin-Resistenz unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Bei einer Transformation von *A. thaliana* mit Agrobakterien wird der Bereich zwischen der linken (LB) und der rechten Grenze (RB) der T-DNA in das Pflanzen-Genom integriert. Dieser Bereich enthält ein Kanamycin-Resistenz-Gen (NPTII [Kan], Neomycinphosphotransferase) unter der Kontrolle des Nopalinsynthese-Promotors (Nos-P). Die Transkriptionsrate dieses Gens wird zusätzlich durch ein Omega-Sequenzmotiv aus dem Tabakmosaikvirus (Ω) verstärkt. Stromaufwärts des β -Glucuronidase-Leserasters befindet sich eine multiple Klonierungsstelle (MCS) mit den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Sall, XbaI, BamHI und SmaI, in dieser Reihenfolge. Die Insertion der verschiedenen Promotorbereiche der Helikasen erfolgt innerhalb der multiplen Klonierungsstelle über die in Tabelle 6 genannten Schnittstellen.

Die korrekte Insertion in den pBecks-Vektor wurde mit Restriktionsverdau überprüft (nicht gezeigt). Nach der Bestätigung der korrekten Insertion der verschiedenen Promotorbereiche in den pBecks19/101-Vektor erfolgte zuerst die Transformation von Agrobakterien mit den resultierenden Plasmiden pBecksMmhprom, pmh1pBecks, pmh2pBecks und pmh3pBecks. Die erfolgreiche Transformation der Agrobakterien wurde durch PCR-Analysen überprüft (nicht gezeigt). Als nächstes wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit der „Floral-dip“-Methode stabil mit den Fusionskonstrukten transformiert. Transgene Pflanzen wurden selektioniert und für jedes Konstrukt mehrere Linien mit β -Glucuronidase Aktivität etabliert. Für das pmh3pBecks-Konstrukt stand bis zum Ende dieser Arbeit keine ausreichende Anzahl an Linien zur Verfügung. Die Linien mit den Promotor::GUS-Konstrukten für die RNA-Helikasen pBecksMmhprom, pmh1pBecks und pmh2pBecks wurden im Folgenden mit histochemischen β -Glucuronidase-Färbungen analysiert.

4.4.2 Analyse der Promotoraktivität mit histochemischen β -Glucuronidase-Färbungen

Für die histochemischen β -Glucuronidase-Färbungen wurden Samen der transgenen Pflanzen auf Erde oder auf MS-Agar-Platten ausgebracht und die Pflanzen unter Langtagbedingungen angezogen. Es wurden für jedes Gen jeweils fünf verschiedene Linien untersucht. In Tabelle 8 ist die Anzahl der untersuchten Linien aufgelistet und auch die Anzahl der Linien, welche in ihrer Färbung abweichend sind. Mindestens vier Linien zeigten jeweils ein konsistentes Färbemuster. Eine Ausnahme bilden Wurzeln von *Atpmh1*, bei denen nur drei Linien das gleiche Färbemuster zeigen. Einige Linien zeigen bei gleicher Behandlung eine wesentlich stärkere Färbung als andere Linien mit demselben Konstrukt. Dies ist wahrscheinlich auf die Anzahl der ins Genom integrierten Kopien eines Konstrukts zurückzuführen. Diese variiert zwischen den einzelnen transformierten Pflanzen. Bei Pflanzen mit mehreren integrierten Kopien kann es so zu einer stärkeren Reportergenexpression kommen.

Gen	Anzahl untersuchter Linien	Anzahl der Linien mit abweichender Färbung	Anzahl der Linien mit starker Färbung	Anzahl der Linien ohne Färbung
<i>Atmmh</i>	5	1 (Wurzel)	1	0
<i>Atpmh1</i>	5	1 (Wurzel)	0	1
<i>Atpmh2</i>	5	0	3	0

Tabelle 8: Anzahl der mit histochemischer β -Glucuronidase-Färbung untersuchten Linien.

Um die Promotoraktivität in Keimlingen zu untersuchen, wurden Keimlinge auf Erde angezogen, Färbungen in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt und analysiert. In Abbildung 9 sind Fotos von gefärbten Keimlingen im Alter von 6, 9 und 16 Tagen gezeigt. Für die Fotos wurden die Keimlinge auf MS-Agar-Platten angezogen, da die Präparation intakter Keimlinge so einfacher ist. Die Färbungsmuster von Keimlingen die auf Erde und Keimlingen die auf MS-Agar angezogen wurden sind fast identisch. Unterschiede zeigen sich nur bei den Wurzelspitzen von Pflanzen mit einem *Atpmh1*-Promotor::Reportergen-Konstrukt.

Atmmh zeigt eine starke Promotoraktivität in Kotyledonen von 6 Tage alten Keimlingen. Bei 9 Tage alten Keimlingen ist eine schwächere Färbung der Kotyledonen zu sehen, während junge Primärblätter eine starke Färbung zeigen. Auch in 16 Tage alten Keimlingen ist die Färbung in Kotyledonen und Blättern zu sehen. Die Färbung zeigt sich in allen Fällen stärker in den Blattaderungen als im umgebenden Gewebe. Ältere Blätter sind schwächer und

weniger gleichmäßig gefärbt als junge Blätter. Eine Färbung der Wurzeln ist im Keimlingsstadium nicht zu beobachten.

Pflanzen mit dem *Atpmh1*-Promotor::*GUS*-Konstrukt zeigen bei Wachstum auf Erde im Keimlingsstadium keinerlei β -Glucuronidase-Aktivität. Bei Anzucht auf MS-Medium zeigt sich allerdings eine schwache Färbung der Wurzelspitzen.

Der *Atpmh2*-Promotor ist in 6 Tage alten Keimlingen besonders in den Blattaderungen der Kotyledonen, im Sproßmeristem und in den Wurzelspitzen aktiv. Auch die Spitzen der Seitenwurzeln sind blau gefärbt. In den untersuchten Linien mit besonders starker Färbung (Linien 1,3, und 12) ist zusätzlich eine sehr schwache Anfärbung des Zentralzylinders der Wurzel zu erkennen. Dies wurde nicht als abweichendes Verhalten gewertet, sondern als Hinweis, dass auch hier eine schwache Promotoraktivität vorliegt, die in den Linien mit schwächerer Färbung unter der Nachweisgrenze liegt. 9 Tage alte Keimlinge zeigen Färbungen in allen Wurzelspitzen, in den Blatt-Primordien und im Sproßmeristem. Eine leichte Färbung der Blattaderungen ist in den Linien mit stärkerer Färbung vorhanden. Ein ähnliches Bild zeigt sich in 16 Tage alten Keimlingen. Die Färbung in Wurzelspitzen und im Sproßmeristem ist sehr stark, während die Färbung in den Blattadern nur in den stark angefärbten Linien zu sehen ist. Die Färbung in den Blattadern ist allgemein bei Keimlingen, die auf MS-Agar angezogen wurden, stärker als bei Keimlingen, die auf Erde angezogen wurden.

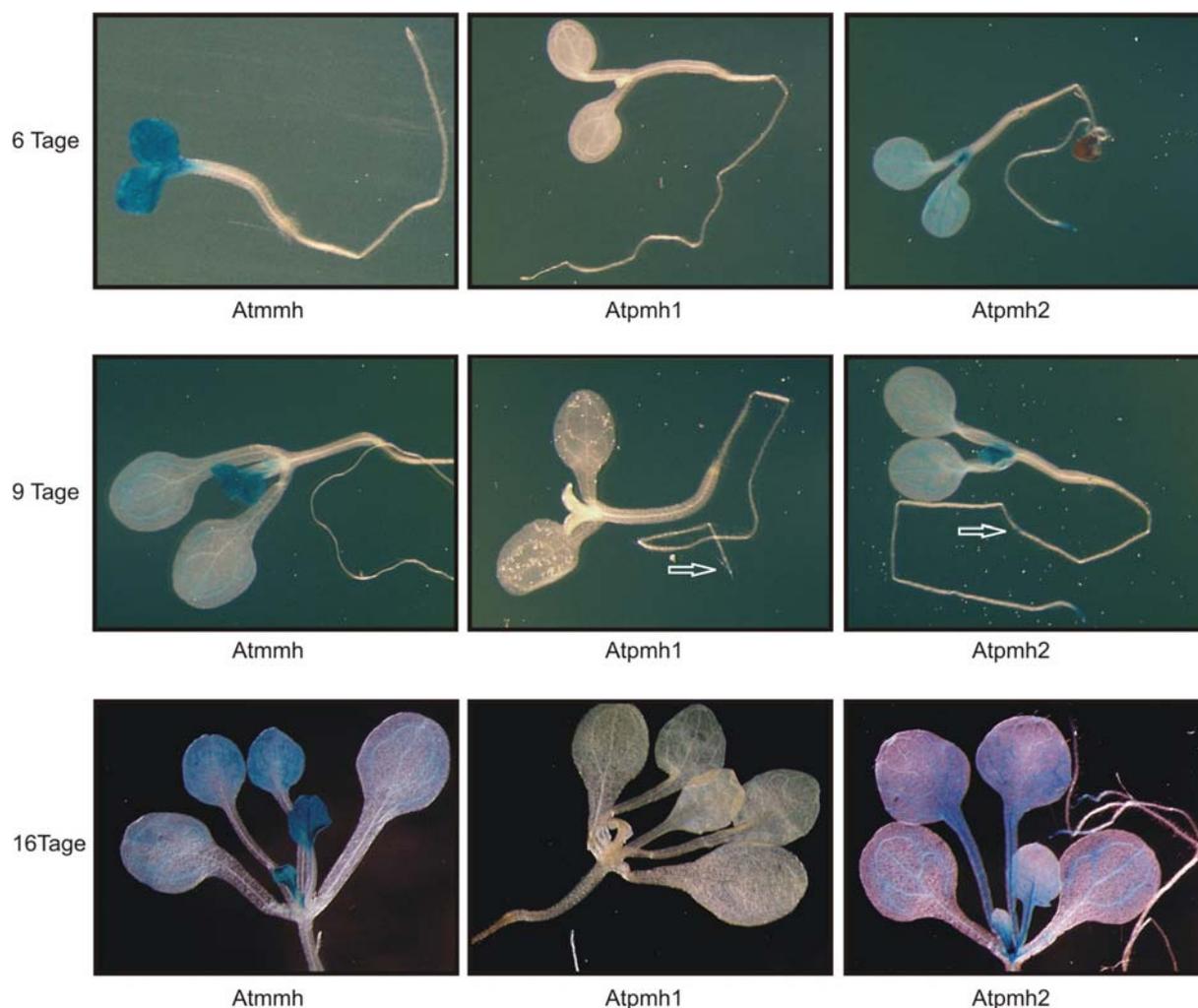


Abbildung 9: Histochemische β -Glucuronidase-Färbungen in Keimlingen. Samen wurden auf MS-Agar-Platten ausgebracht und unter Langtagbedingungen angezogen. Nach 6, 9, und 16 Tagen wurden Keimlinge zur Durchführung histochemischer β -Glucuronidase-Färbungen verwendet. Weiße Pfeile deuten auf schlecht zu erkennende Färbungen in den Wurzeln hin.

Des Weiteren wurden für alle Konstrukte die Färbungen in Blättern, Wurzeln, Blüten und Schoten analysiert (Abbildung 10). In adulten Blättern zeigt sich bei Linien mit dem Atmmh-Promotor::GUS-Konstrukt ausschließlich eine Färbung an der Schnittstelle. In Blüten zeigt sich eine Färbung der Pollen und wieder die Färbung an der Schnittstelle. In Schoten zeigt sich ausschließlich die Färbung der Schnittstellen. In den Wurzeln ist für den Atmmh-Promotor keine Aktivität nachweisbar.

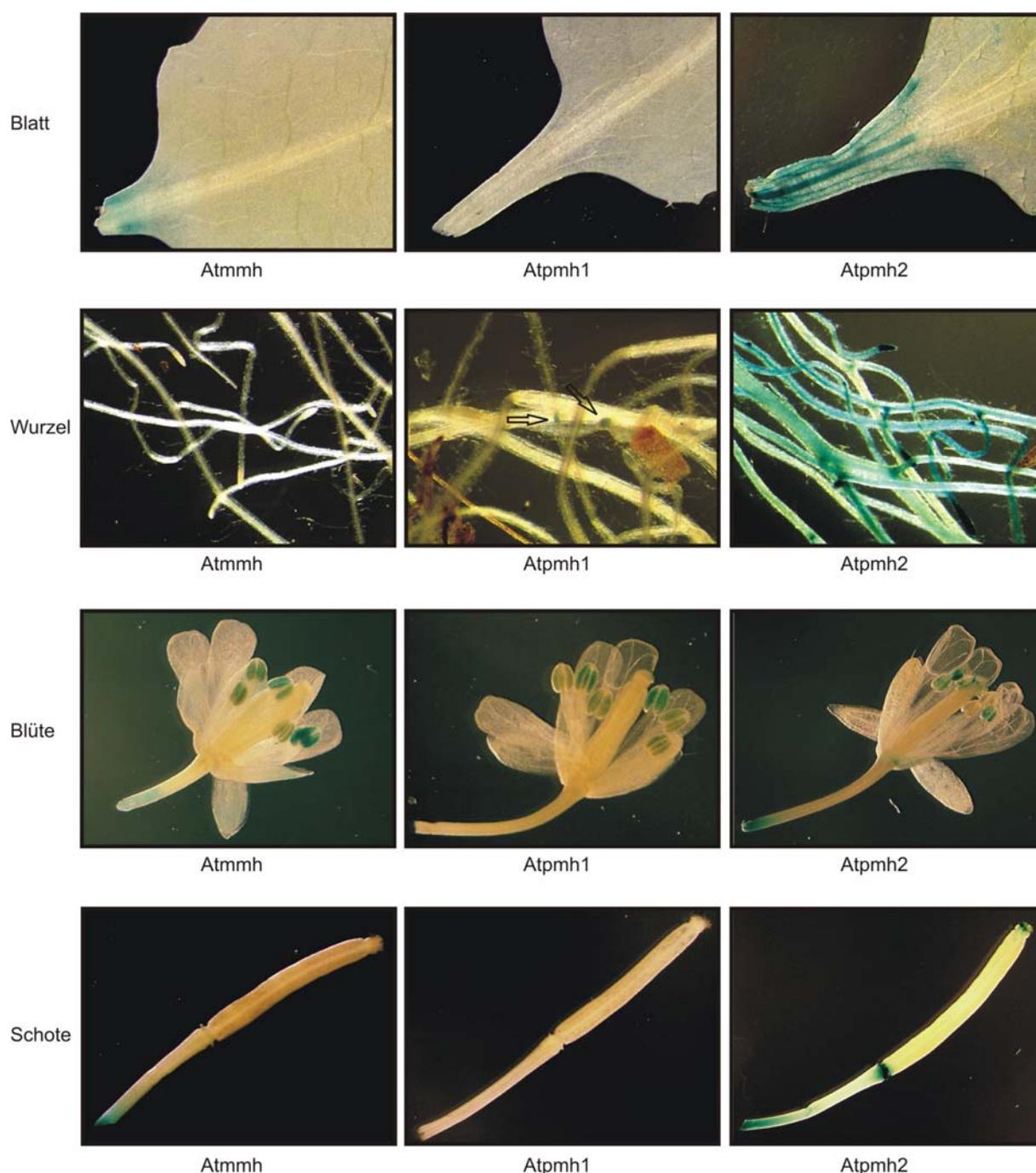


Abbildung 10: Histochemische β -Glucuronidase-Assay in Blättern, Wurzeln, Blüten und Schoten. Die Färbungen wurden mit Teilen von auf Erde angezogenen Pflanzen durchgeführt.

Atpmh1 zeigt in Blättern und Schoten keinerlei Färbung. In Blüten ist die Färbung der Pollen zu erkennen. Die Wurzeln zeigen kein einheitliches Bild. Drei der untersuchten Linien zeigen keine Färbung in Wurzeln von auf Erde angezogenen Pflanzen, während eine Linie Färbungen in den Wurzelspitzen aufweist (Abbildung 10). Histochemische Färbungen von Keimlingen auf MS-Medium zeigten, dass hier die Wurzelspitzen in allen Linien gefärbt sind (Ergebnis nicht gezeigt). Atpmh2 zeigt in Blättern an den Schnittstellen eine Färbung. Zusätzlich ist teilweise eine lokale Färbung der Adern zu erkennen (nicht gezeigt). Die Form der lokalen Färbungen könnte auf Promotoraktivität nach mechanischer Verletzung

des Gewebes hindeuten. In Blüten zeigt sich wie bei *Atmmh* die Färbung in Pollen und an den Schnittstellen. Die Schoten weisen Färbungen an den Schnittstellen und am Schotengrund auf. Die Wurzeln zeigen Färbungen in allen Wurzelspitzen, in den Achseln der Verzweigungen und in den besonders stark angefärbten Linien eine schwache Färbung im gesamten Zentralzylinder.

4.4.3 Analyse der Promotoraktivität von *Atmmh* und *Atpmh2* nach mechanischer Verwundung

Atmmh und *Atpmh2* zeigten in den in Abschnitt 3.4.2. dargestellten histochemischen Färbungen jeweils eine Färbung in den Schnittstellen, unabhängig davon, ob es sich dabei um Blätter, Blüten, oder Schoten handelte. Zusätzlich zeigten sich besonders bei *Atpmh2* lokal begrenzte Färbungen auf Blättern. *Atpmh1* zeigt im Gegensatz dazu keinerlei Färbung an den Schnittstellen. Durch das Abschneiden der Pflanzenorgane von den Pflanzen entstehen starke Verletzungen des Gewebes. Daher wurde vermutet, dass eine Aktivierung der Promotoren von *Atmmh* und *Atpmh2* durch Verwundung hervorgerufen wird. Um die Promotoraktivität nach Verwundung zu untersuchen, wurden Blätter von Pflanzen mit *AtMMH*-Promotor:: β -Glucuronidase- und *Atpmh2*-Promotor:: β -Glucuronidase-Konstrukten zusätzlich zu den Schnittstellen auf der Blattspreite verletzt. Dazu wurde das Gewebe der Blattspreite mit Pinzetten gequetscht. Ein anschließender histochemischer β -Glucuronidase-Assay ergab eine Färbung um die Verletzungsstelle sowohl bei den Linien mit dem *Atmmh*-Promotor::*GUS*-Konstrukt als auch in den Linien mit dem *Atpmh2*-Promotor::*GUS*-Konstrukt (Abbildung 11). Ein gleichzeitig durchgeführter β -Glucuronidase-Assay mit Pflanzen-Linien mit dem *Atpmh1*-Promotor::*GUS*-Konstrukt zeigte keine Färbung (Ergebnis nicht gezeigt). Die Färbung ist jeweils am stärksten in den Blattaderungen, obwohl auch das umgebende Gewebe eine schwache Färbung aufweist. Es ist möglich, dass sich die eigentliche Aktivität auf die Blattaderungen beschränkt, während die Färbung im umgebenden Gewebe auf Diffusion des β -Glucuronidase-Abbauproduktes beruht. Ein Unterschied im Färbungs-Muster von *Atmmh* und *Atpmh2* ist in diesem Versuch zu beobachten: während die Färbung bei den Linien mit dem *Atmmh*-Promotor::*GUS*-Konstrukt lokal um die Verletzungsstelle begrenzt ist, zeigt sich bei Linien mit dem *Atpmh2*-Promotor::*GUS*-Konstrukt eine weiter verteilte Färbung.

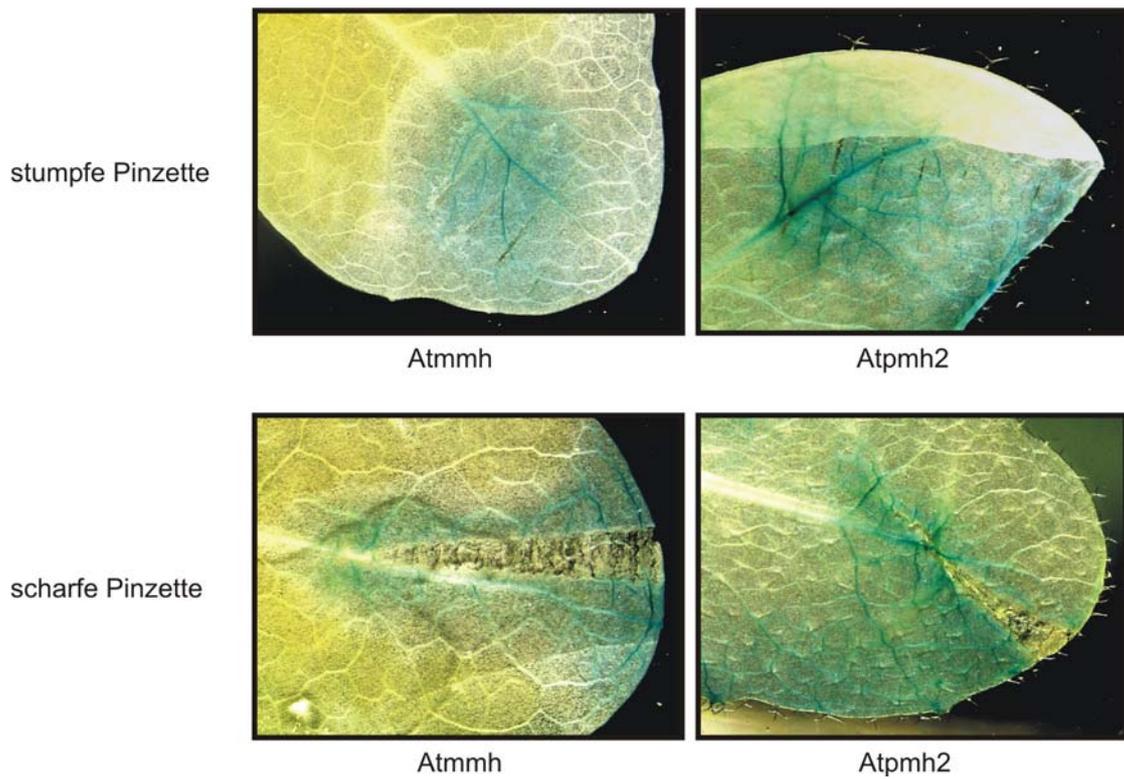


Abbildung 11: Histochemischer β -Glucuronidase-Assay nach Verwundung. Die Blattspreite wurde durch Quetschen mit einer stumpfen, oder einer scharfen Pinzette verletzt. Die verletzten Blätter wurden sofort in die Färbelösung transferiert.

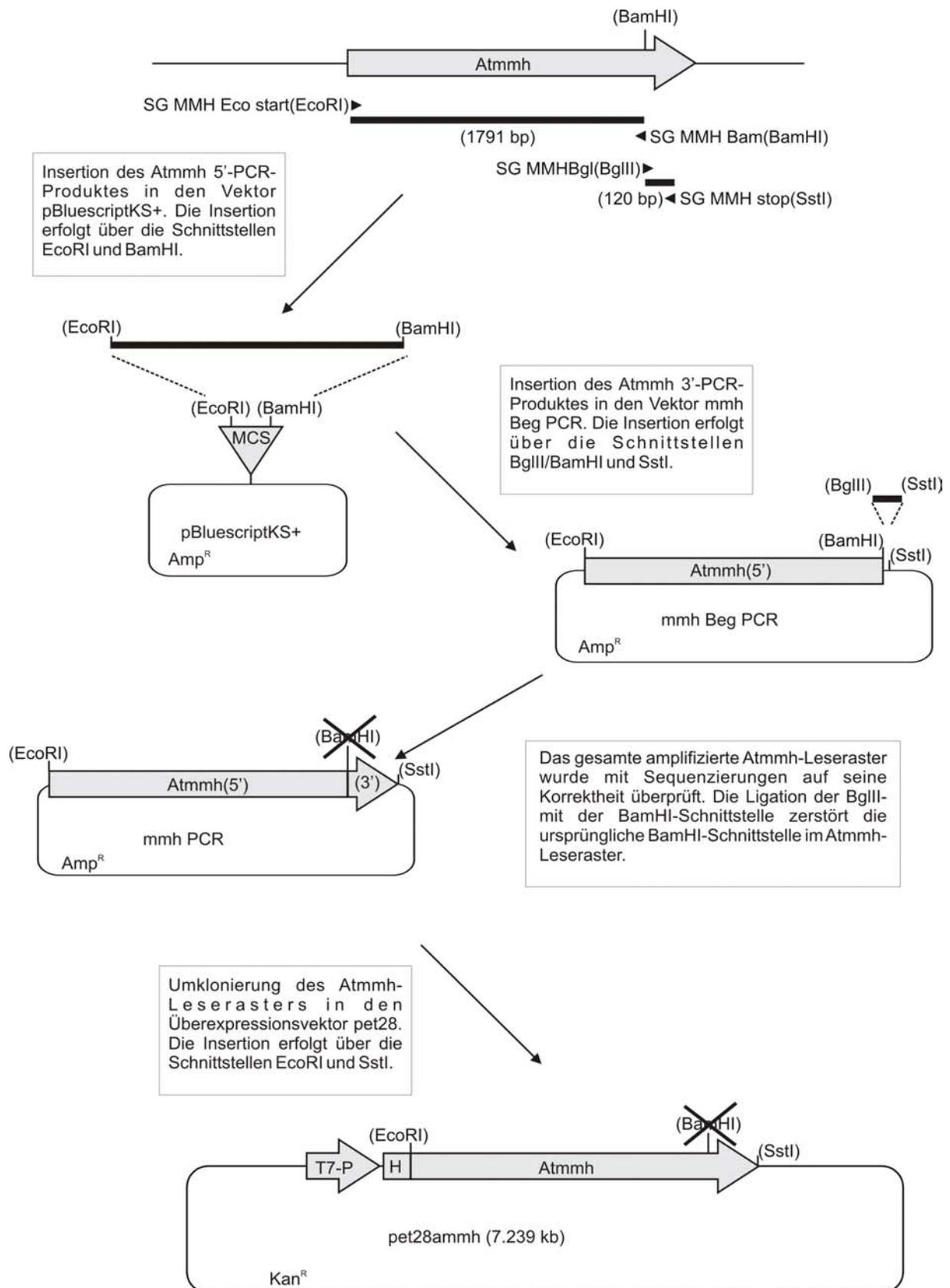
4.5 Detektion der Helikasen in mitochondrialen Protein-Extrakten

Der Grund für die Herstellung von Antikörpern gegen die Helikase-Proteine und deren Detektion in mitochondrialen Proteinextrakten ist eine mögliche Identifikation von Interaktionspartnern. Nützlich wären die Antikörper aber auch zur Bestätigung einer Kälteinduktion oder der mitochondrialen Lokalisation auf Proteinebene. Zur Herstellung eines AtMMH-Antikörpers wurde ein Ansatz gewählt bei dem rekombinantes Protein in *E. coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt wurde. Das aufgereinigte Protein wurde zur Immunisierung von Mäusen verwendet, aus welchen Serum mit einem polyklonalen AtMMH-Antikörper gewonnen wurde. Ein AtPMH1/2-Antikörper sollte durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid-Antigen erfolgen. Der polyklonale Peptid-Antikörper liegt in einer Fraktion mit aufgereinigtem IgG vor. Eine Western-Blot-Analyse sollte bestätigen, dass die hergestellten Antikörper die rekombinanten Proteine erkennen. Nach dieser Bestätigung wurden auf verschiedene Art gewonnene mitochondriale Proteinextrakte auf Anwesenheit von AtMMH und AtPMH1/2 untersucht.

4.5.1 Herstellung der Antikörper für AtMMH und AtPMH1/2

Für die Überexpression des AtMMH-Proteins sollte der Atmmh-Leserahmen in den bakteriellen Überexpressionsvektor pet28 kloniert werden. In diesem Vektor ist das Gen unter der Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors. Durch die Klonierung in den pet28-Vektor wird der Atmmh-Leserahmen mit einem N-terminalen Histidin-Tag, der aus sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Codonen besteht, fusioniert. Der Histidin-Tag ermöglicht eine Detektion des aufgereinigten Fusionsproteins mit einem Antikörper gegen diesen Histidin-Tag. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Abbildung 12 skizziert.

Abbildung 12 (folgende Seite): Klonierung des Atmmh-Leserasters in den Vektor pet28. Die einzelnen Klonierungsschritte sind dargestellt und in der Abbildung beschrieben. Die Subklonierung in den Vektor pBluescript KS+ wurde durchgeführt, da die Zusammensetzung des 5'-Bereichs und des 3'-Bereichs und die Sequenzierung in diesem Vektor aufgrund seiner Größe einfacher war. Falls später ein Konstrukt mit einem C-terminalen Tag benötigt wird, kann der kurze 3'-Bereich leicht in einer PCR mit einem Primer ohne Stop-Codon generiert werden.



Für die Klonierung des Atmmh-Leserahmens wurde zuerst in einer PCR mit einem Atmmh cDNA-Klon als Template der 5'-Bereich des Gens amplifiziert. Für die PCR wurden die Primer SG MMH Eco start und SG MMH Bam verwendet, welche Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI enthalten. Die Annealing-Temperatur betrug für fünf Zyklen 56°C und für weitere 35 Zyklen 59°C. Das entstandene PCR-Produkt von 1791 bp wurde über die Schnittstellen EcoRI und BamHI in den Vektor pBluescript KS+ eingebracht (Abbildung 12). Im resultierenden Plasmid MMH Beg PCR wurde die Atmmh-Sequenz mit Sequenzierungen auf ihre Korrektheit überprüft. In einer zweiten PCR wurde das 3'-Ende des Atmmh-Gens mit den Primern SG MMHBgl und SG MMH stop amplifiziert. Das PCR-Produkt von 120 bp wurde über die in den Primern enthaltenen BglII und SstI-Schnittstellen in das Plasmid MMH Beg PCR eingebracht. Auch die Korrektheit der 3'-Sequenz wurde mit Sequenzierungen überprüft. Das gesamte Leseraster der Atmmh wurde nun über die EcoRI und SstI-Schnittstellen in den bakteriellen Überexpressionsvektor pet28 umkloniert. Die Überexpression erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 p(Lys)S. Da bei der Überexpression in *E. coli* ein Großteil des rekombinanten AtMMH-Proteins in "inclusion bodies" abgelagert wurde, erfolgte die Aufreinigung aus diesen "inclusion bodies". Eine Western-Blot-Analyse der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung mit einem Anti-Histidin-Antikörper zeigte, dass sich der größte Teil des rekombinanten AtMMH-Proteins in der Fraktion befand, die auch in Harnstoff nicht löslich war (nicht gezeigt). Zudem zeigte sich, dass in dieser Fraktion die Reinheit des rekombinanten AtMMH-Proteins ausreichend war für die Herstellung von Antikörpern. Diese Fraktion wurde in den 10 Spuren eines 10% SDS Polyacrylamid-Gels aufgetrennt. Die Proteine wurden in einem Western-Transfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Ponceau-Rot angefärbt. Die angefärbten Banden des AtMMH-Proteins wurden ausgeschnitten, in DMSO gelöst und dem Tierforschungszentrum der Universität Ulm zur Immunisierung von Mäusen und zur anschließenden Serum-Gewinnung übergeben. Das erhaltene Serum wurde in einer Western-Blot-Analyse darauf getestet, ob es rekombinantes AtMMH-Protein erkennt (Abbildung 11). Dazu wurde eine Bakterienkultur mit BL21pLysS-Zellen, die das Atmmh-Konstrukt im pet32-Vektor enthalten, angezogen. Die Insertion des Atmmh-Leserahmens in den pet32-Vektor erfolgte analog zu der in Abbildung 12 dargestellten Klonierung in den pet28-Vektor. Der Unterschied besteht darin, dass das auf dem pet32mmh-Plasmid kodierte Fusionsprotein aufgrund weiterer Tags, z.B. dem S-Tag, größer ist. Vor der Induktion der Expression des Fusionsproteins und nach erfolgter Überexpression wurden Aliquots von je 1 ml entnommen. Durch Zentrifugation wurde ein Bakterienpellet gewonnen und dieses in SDS-PAGE-Ladepuffer gelöst. Diese Proben wurden auf einem SDS-PA-Gel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit dem gewonnenen AntiMMH-Antiserum unterzogen. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse ist in Abbildung 13 gezeigt. In der Fraktion "Atmmhpet32

induziert“ ist nach Coomassie-Färbung (Abbildung 13 A) eine starke Bande zwischen 75 und 105 kDa zu erkennen. Diese Bande ist in der Spur "nicht induziert“ nicht vorhanden und sollte das überexprimierte AtMMHpet32-Fusions-Protein darstellen, dessen berechnete Größe bei 92 kDa liegt. Abbildung 13 B zeigt die Western-Blot-Analyse der beiden Proteinextrakte. Der Antimmh-Antikörper erkennt keine Proteine in der Fraktion des nicht-induzierten Proteinextraktes. Nach der Überexpression sind mehrere Signale zu erkennen. Das stärkste Signal entspricht einer Größe von 85-95 kDa. Dieses Signal entspricht dem überexprimierten AtMMH-Protein. Da die anderen Signale in der nicht induzierten Fraktion nicht auftauchen, kann es sich nicht um Kreuzreaktionen mit *E.coli*-Proteinen handeln. Möglicherweise wird durch den Aufschluß mit Ultraschall das rekombinante Protein teilweise degradiert und die Signale von geringerer Größe sind auf Degradationsprodukte zurückzuführen. Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass der AntiMMH-Antikörper in der Lage ist, rekombinantes AtMMH-Protein zu detektieren.

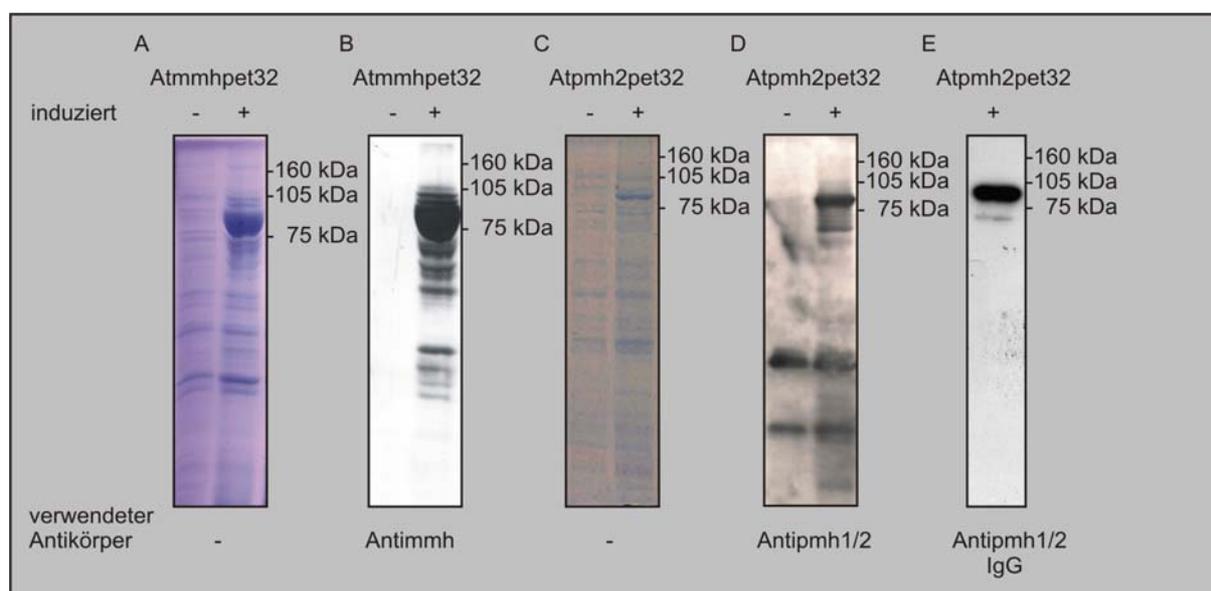


Abbildung 13: Western-Blot-Analysen der verwendeten AntiMMH und AntiPMH1/2 Antikörper. Oben in der Abbildung ist benannt, welches rekombinante Protein in den verwendeten *E.coli*-Kulturen überexprimiert wurde. Über den gezeigten mit Coomassie gefärbten Gelen und den Western-Hybridisierungen ist gekennzeichnet, ob der Proteinextrakt vor der Induktion oder nach erfolgter Überexpression gewonnen wurde. Ganz unten in der Abbildung wird der in der Western-Blot-Analyse verwendete 1. Antikörper genannt.

Die Herstellung der Antikörper gegen AtPMH1/2 erfolgte durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien). Es wurden zwei Peptide mit einer Länge von 15 und 16 Aminosäuren ausgewählt, deren Sequenz sowohl in AtPMH1 als auch in AtPMH2 enthalten ist. Die Sequenz des ersten Peptid ist ELPSIAVERGSASMFE, die Sequenz des zweiten Peptids ist AQRERTLAGFRDGNF. Außerdem wurde sichergestellt, dass diese Aminosäuresequenzen nicht in anderen Proteinen von *Arabidopsis thaliana* vorkommen. Ein gegen diese Peptide gerichteter polyklonaler Antikörper sollte sowohl AtPMH1-Protein als auch AtPMH2-Protein

erkennen. Die Herstellung der Antikörper erfolgte in Kaninchen. Der gewonnene Peptid-Antikörper wird als Anti-PMH1/2 bezeichnet. Zusätzlich erhält man eine Fraktion die aus dem Anti-PMH1/2-Serum aufgereinigte IgG-Antikörper enthält. In einer Western-Blot-Analyse wurde das erhaltene Serum daraufhin untersucht, ob rekombinantes AtPMH2-Protein erkannt wird (Abbildung 13). Abbildung 13 C zeigt ein mit Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel mit Proteinextrakten aus BL21pLysS-Zellen, die ein Konstrukt von Atpmh2 im pet32-Vektor enthalten. Die Probennahme und Behandlung erfolgte wie für Atmmhpet32 beschrieben. In der ersten Spur ist Proteinextrakt aufgetragen aus Zellen vor einer Induktion, in der zweiten Spur nach erfolgter Überexpression. In der Spur "induziert" ist eine zusätzliche Bande in der Größe von etwa 85 kDa vorhanden. Die theoretische Größe des AtPMH2-pet32-Fusionsproteins beträgt 90 kDa. In Abbildung 13 D ist eine Western-Blot-Analyse gezeigt, bei der Antiserum gegen AtPMH1/2 als Antikörper verwendet wurde. Kleinere Signale bei unter 50 kDa sind in beiden Fraktionen enthalten, was auf Kreuzreaktionen mit *E.coli*-Proteinen hindeutet. Das stärkste Signal bei 80-90 kDa ist nur in der Fraktion nach Überexpression zu erkennen. Dieses Signal entspricht dem rekombinanten AtPMH2-pet32-Fusionsprotein. In Abbildung 13 E ist eine Western-Blot-Analyse gezeigt, bei der eine aufgereinigte IgG-Fraktion des Atpmh1/2-Antiserums als Antikörper benutzt wurde. Hier fehlen die Signale, die durch Kreuzreaktionen hervorgerufen wurden. Aus dem Serum aufgereinigte IgG-Antikörper detektieren somit rekombinantes AtPMH2 und zeigen keine detektierbaren Kreuzreaktionen mit *E.coli*-Proteinen.

4.5.2 Analyse von mitochondrialen Proteinextrakten mit AntiMMH und AntiPMH1/2

Sowohl für den Antikörper gegen AtMMH-Protein, als auch für den Antikörper gegen AtPMH1/2-Protein wurde in 3.5.1 gezeigt, dass die Detektion von überexprimiertem rekombinantem Protein in Gesamt-Proteinextrakt von *E.coli* funktioniert. Die Detektion der Proteine in Proteinextrakten von Pflanzen ist aber ungleich schwieriger. Während das analysierte Protein nach der Überexpression in großen Mengen vorliegt, ist es möglicherweise in Pflanzen nur sehr schwach exprimiert. Außerdem sind Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus den Pflanzen möglich, die schwache Signale des untersuchten Proteins überlagern können. Um zu analysieren, ob die Antikörper ihre Zielproteine auch in pflanzlichen Proteinextrakten detektieren können, wurden Proteinextrakte aus Mitochondrien gewonnen. Dazu wurden Mitochondrien, die zuvor aus einer Zellkultur von *A. thaliana* präpariert wurden, auf drei verschiedene Arten lysiert:

1. Durch den Aufschluss mit Natriumdodecylsulfat werden alle Proteine aus den Mitochondrien in Lösung gebracht.

2. Bei der Herstellung von S-100-Lysat werden die Proteine zwar nicht denaturiert, auch gelangen keine Membranproteine in Lösung, aber Komplexe mit geringen statische Wechselwirkungen werden aufgelöst.
3. Der Aufschluss durch wechselndes Einfrieren und Auftauen bringt nur lösliche Matrix-Proteine in Lösung.

Mit den Proteinextrakten, die auf diese Arten gewonnen wurden, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Proteinextrakte in einem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennt, wobei als Größenstandard ein vorgefärbter Marker (Rainbow-Marker, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mit aufgetrennt wurde. Die aufgetrennten Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper wurden jeweils AntiMMH oder AntiPMH1/2-IgG verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Western Blotting System. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 gezeigt. Bei der Analyse mit dem AntiMMH-Antikörpers werden in jeder Spur mehrere Banden detektiert. Die stärkste Bande befindet sich zwischen 60 und 63 kDa. Aber schwächere Banden sind zusätzlich bei etwa 90 kDa, 35 kDa und unter 35 kDa zu erkennen. Die theoretische Größe des AtMMH-Proteins beträgt 68 kDa. Davon wäre noch die Masse der Signalsequenz abzurechnen, aber eine klare Vorhersage der Länge der Signalsequenz von AtMMH ist mit den gängigen Vorhersage-Programmen nicht möglich. Die stärkste Bande bei 60-63 kDa zeigt vermutlich das detektierte AtMMH-Protein. Diese Bande findet sich in der Fraktion mit den in SDS gelösten Mitochondrien (Abbildung 14 B, SDS). Schwach ist diese Bande auch in der S-100-Fraktion (Abbildung 14 B, S-100) zu erkennen, während sie in der Freeze-Thaw-Fraktion (Abbildung 14 B, FT, löslich) vollständig fehlt. Die verschiedenen Lyse-Methoden unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Membran-Proteine zu solubilisieren. Eine Schlussfolgerung aus den erhaltenen Ergebnissen könnte daher lauten, dass das AtMMH-Protein mit Membran-Proteinen stark assoziiert, oder selbst in der Membran verankert, oder integriert ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit der löslichen Fraktion und der Membranfraktion der Freeze-Thaw-Lyse durchgeführt (Abbildung 14 E). Die vermutliche AtMMH-Bande wird ausschließlich in der Membranfraktion detektiert. In der löslichen Fraktion wird nichts detektiert. Eine Assoziation von AtMMH an die Membran kann damit angenommen werden. Die Art und Stärke der Assoziation muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

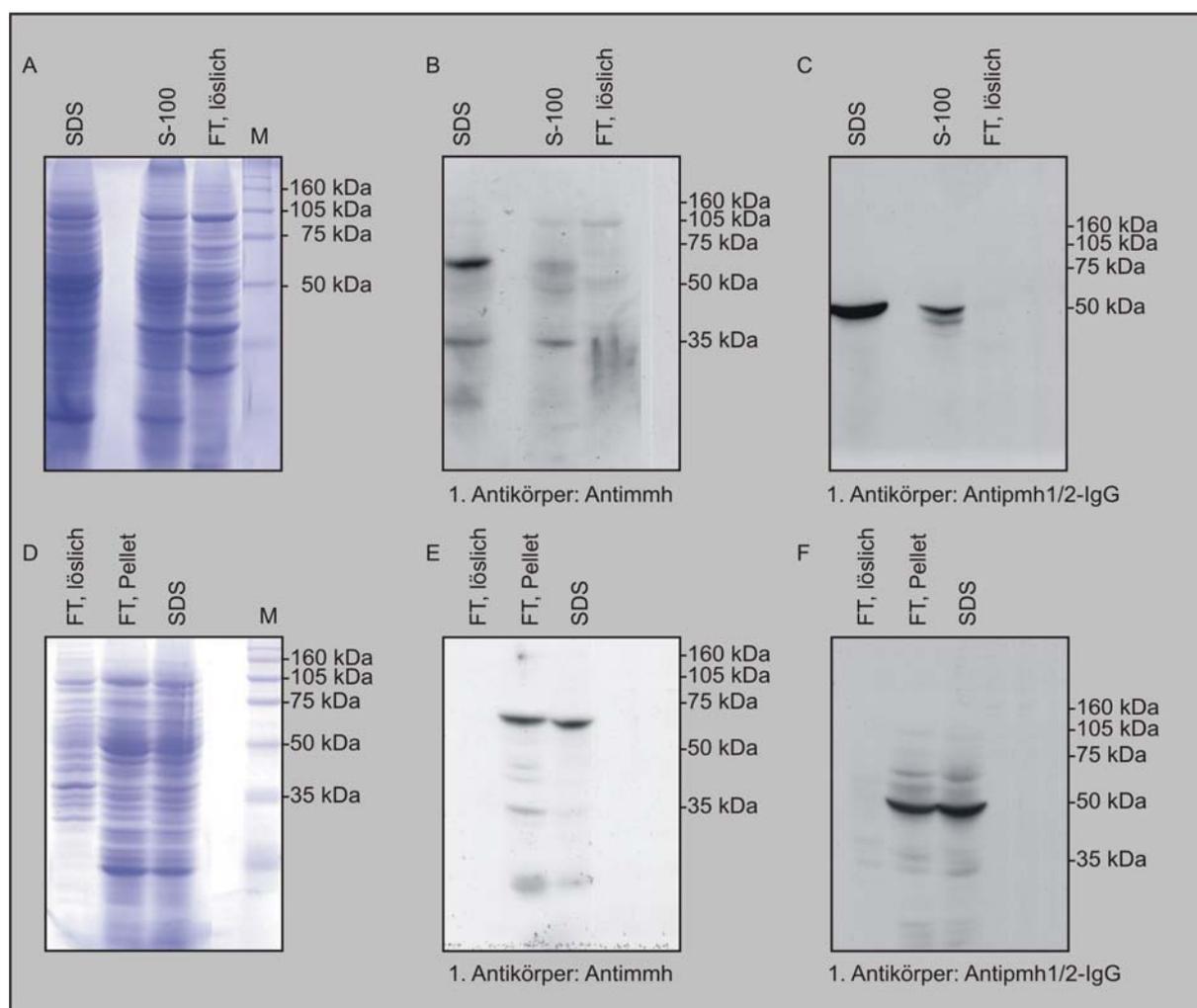


Abbildung 14: Detektion von AtMMH und AtPMH1/2 in löslichen und unlöslichen mitochondrialen Proteinextrakten. A: Mit Coomassie gefärbtes Gel mit verschiedenen Fraktionen von mitochondrialen Proteinen. B + C: Western-Blot-Analyse eines mit A identischen Gels. D: Mit Coomassie gefärbtes Gel mit löslichen Fraktionen und Membran-Fraktionen von mitochondrialen Proteinen. E + F: Western-Blot-Analyse eines mit D identischen Gels. Der verwendete Antikörper ist jeweils unten angegeben. SDS: Protein Fraktion, die durch Lyse der Mitochondrien mit SDS gewonnen wurde. S-100: S-100-Proteinfraktion aus Mitochondrien. FT, löslich: Proteinextrakt, der durch Lyse der Mitochondrien mit der Freeze-Thaw-Methode gewonnen wurden. FT, Pellet: Membranfraktion, die nach der Lyse der Mitochondrien mit der Freeze-Thaw-Methode gewonnen wurden.

Bei der Analyse der Membran mit den SDS-, S-100- und Freeze-Thaw-Fraktionen mit dem Antipmh1/2-Antikörper wird nur ein Signal detektiert. Die Größe des detektierten Proteins liegt bei etwa 50 kDa. Die Länge der Präsequenzen von AtPMH1 und AtPMH2 wird von den verschiedenen Vorhersage-Programmen nicht einheitlich angegeben. Die berechneten Molekularen Massen liegen daher, je nachdem, ob Berechnung mit oder ohne die verschiedenen vorhergesagten Präsequenzen durchgeführt wird, für AtPMH1 zwischen 56 und 64 kDa und für AtPMH2 zwischen 61 und 65 kDa. Für die vorhergesagten Größen der AtPMH1- und AtPMH2-Proteine ist das Signal somit zu klein. Es ist unklar, ob es sich bei dem detektierten Signal um AtPMH1 oder AtPMH2 handelt. Das Signal ist in der SDS-Fraktion (Abbildung 14 C, SDS) und schwächer in der S-100-Fraktion (Abbildung 14 C, S-

100) vorhanden. Auch für dieses detektierte Protein sollte eine Assoziation an die Membran untersucht werden. Bei der Western-Blot-Hybridisierung der Membran mit der löslichen- und der Membran-Fraktion der Freeze-Thaw-Lyse (Abbildung 14 E) wird wieder das stärkste Signal bei etwa 50 kDa detektiert. Zusätzlich sind noch weitere schwächere Banden zu erkennen. Die zwei Signale, die in ihrer Stärke der 50 kDa-Bande am nächsten kommen, liegen etwa zwischen 52-65 kDa. Der vorhergesagten Größe von AtPMH1 oder AtPMH2 würden diese Proteine näher kommen. Mit dem Antipmh1/2-IgG-Antikörper werden in mitochondrialen Extrakten also Proteine detektiert, die aufgrund der erhaltenen Ergebnisse in Assoziation mit der Membran vorliegen könnten. Eine endgültige Klärung der Identität der detektierten Proteine steht noch aus.

4.6 Untersuchung von transgenen Pflanzen

Die Untersuchung von transgenen Pflanzen soll zur Aufklärung der Funktion der Helikasen im RNA-Metabolismus beitragen. Wird z.B. durch eine T-DNA-Insertion innerhalb eines Gens dessen Produkt nicht mehr gebildet, kann dies Auswirkungen auf den Habitus der Pflanze und auf den physiologischen Phänotyp haben. Die Art dieser Auswirkungen kann Hinweise darüber geben, an welchem Prozess im RNA-Metabolismus der Pflanze die RNA-Helikase beteiligt ist. Bevor der Phänotyp einer T-DNA-Insertionsmutante eingehend untersucht werden kann, muss bestätigt werden, dass die Insertion an der angegebenen Stelle liegt. Eine für die Insertion im Ziel-Gen homozygote Linie muss etabliert werden und die Auswirkung der Insertion auf die Transkription des Ziel-Gens analysiert werden. Das ist nötig, da Insertionen, die im 5'-, oder 3'-untranslatierten Bereich liegen, nicht unbedingt zu einem Knock-out des Ziel-Gens führen. Dasselbe gilt für Insertionen in Introns und manchmal für Insertionen, die weit im 3'-Bereich des Leserasters liegen. Bei essentiellen Genen ist ein totaler Knock-out letal. In RNAi-Linien ist die Expression des Ziel-Gens häufig nicht komplett unterbunden, sondern nur unterdrückt. Daher können RNAi-Linien, in denen die geringe Expressionsrate die Ausbildung eines Phänotyps bewirkt, aber ausreicht, um die Pflanze am Leben zu erhalten, zur Aufklärung der Funktion essentieller Gene beitragen. Eine dritte Möglichkeit bieten Überexpressionslinien. Ist in der Zelle durch Überexpression zuviel von einem bestimmten Protein vorhanden, kann dies zur Ausprägung eines veränderten Phänotyps führen und einen Hinweis auf die Funktion dieses Proteins geben.

4.6.1 Charakterisierung der Atmmh T-DNA-Insertionsmutante

Atmmh-1

Über eine *in silico*-Recherche wurde eine Atmmh-T-DNA-Insertionslinie gefunden. Die Linie Garlic_571_E09 der Firma Syngenta enthält die Insertion im Exon 9 des Atmmh-Gens (Abbildung 15 A). Eine Southern-Blot-Analyse sollte die vorhergesagte Insertion im Exon 9 bestätigen. Dazu wurden die von Syngenta erhaltenen Samen einzeln auf Erde ausgebracht und unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach 3-4 Wochen wurden Rosettenblätter der einzelnen Pflanzen genommen, um daraus DNA zu extrahieren. Die DNA der verschiedenen Pflanzen wurde mit der Restriktionsendonuklease XbaI geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mit einer gen-spezifischen bzw. einer T-DNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Lage und Größe der verwendeten Sonden sind in der Abbildung 15 dargestellt, die auch die Ergebnisse der Southern-Hybridisierungen zeigt. Bei der vorhergesagten Insertion der T-DNA in das Atmmh-Gen sollte die T-DNA-Sonde ein Fragment von 1840 bp binden. Ein Signal in dieser Größe zeigt sich bei den Linien 1, 2, 3, 6 und 7 (Abbildung 15 C rechts). Die Linien 4 und 5 enthalten das Atmmh-Allel mit der Insertion nicht. Von den Linien mit der T-DNA-Insertion im Atmmh-Gen zeigen die

Linien 2 und 6 in diesem Southern-Blot außerdem noch Signale bei etwa 2.3 kb, 5.5 kb und bei weit über 10 kb. Diese Linien enthalten somit außer der im *Atmmh*-Gen noch drei weitere T-DNA-Insertionen. Die Linien 1, 3 und 7 zeigen alle außer dem Signal bei 1.8 kb noch ein Signal bei 2.3 kb. Diese beiden Signale kommen immer zusammen vor und deuten auf eine Doppelinsertion der T-DNA hin.

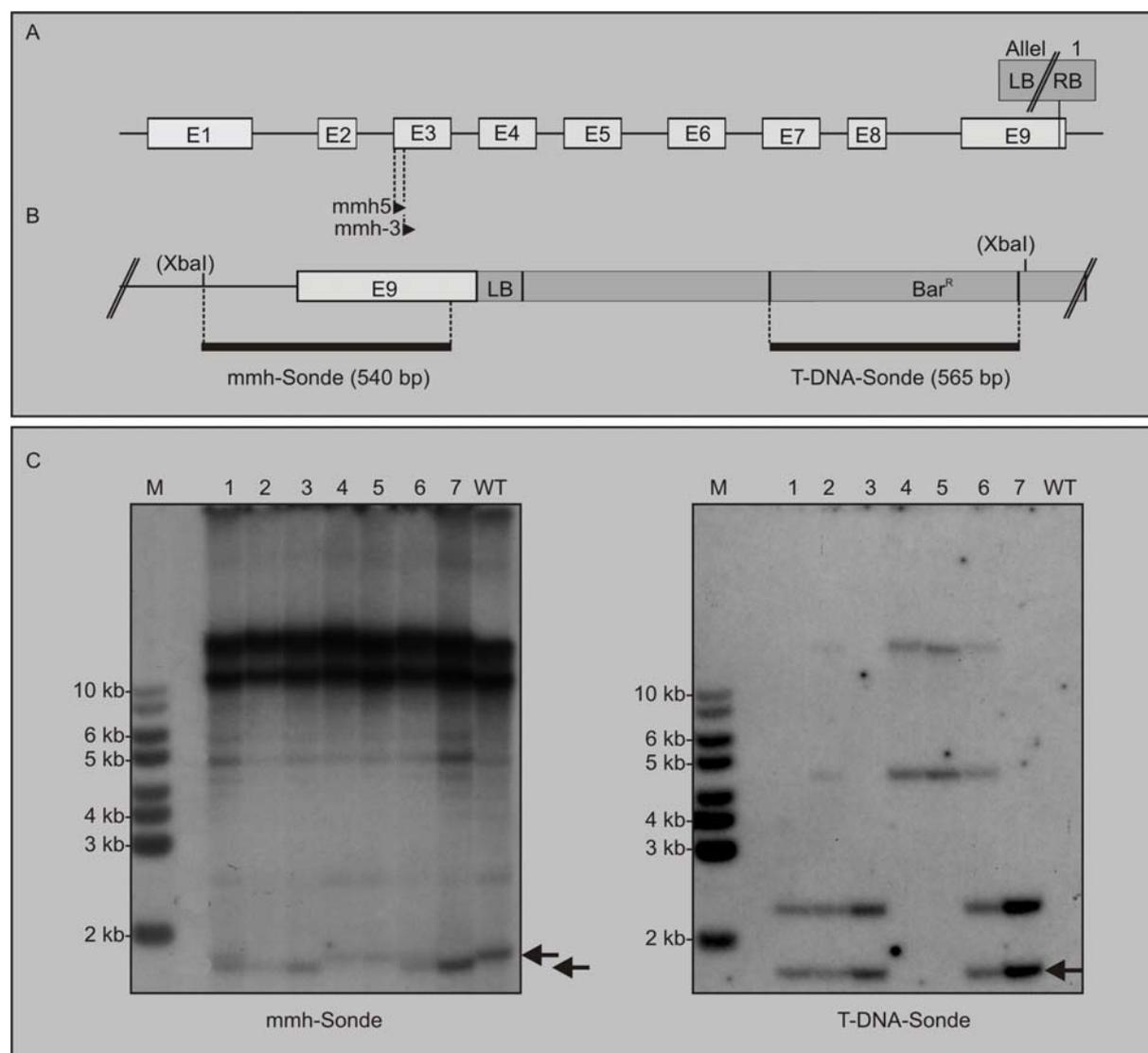


Abbildung 15: Analyse einer *Atmmh*-T-DNA-Insertionsmutante mit der Insertion in Exon 9. A: Exon-Intron-Struktur des *Atmmh*-Gens. Die Insertionsstelle der T-DNA in Exon 9 ist markiert. B: Ausschnitt aus dem *Atmmh*-Gen mit T-DNA-Insertion. Gezeigt ist das 1766 bp Fragment, das durch Restriktion mit XbaI entsteht. T-DNA-Elemente sind in dunkelgrau dargestellt. Die Lage und Länge der gen-spezifischen und der T-DNA-spezifischen Sonde sind angegeben. C: Southern-Blot-Analyse der Gesamt-DNA von Wildtyppflanzen und T-DNA-Insertionslinien. Die Restriktion der DNA erfolgte mit XbaI. Links ist die Hybridisierung mit der gen-spezifischen Sonde, rechts die Hybridisierung mit der T-DNA-spezifischen Sonde gezeigt. Die schwarzen Pfeile markieren das Fragment mit einem Teil der integrierten T-DNA (1766 bp, links und rechts) und das gleiche Restriktions-Fragment ohne T-DNA im Wildtyp-Allel (1870 bp). E1-9: Exon 1 bis Exon 9. LB: Left Border. RB: Right Border. Bar^R: Basta-Resistenzgen. (XbaI): Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XbaI. WT: Wildtyp. M: Marker

Die Southern-Hybridisierung mit der Genspezifischen Sonde soll Aufschluss geben über die Zygotie der untersuchten Linien (Abbildung 15 C links). Die Linien 4 und 5 zeigen nur das

Wildtyp-Allel mit 1870 bp. Dies bestätigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der T-DNA-Sonde, dass Linien 4 und 5 keine T-DNA-Integration im *Atmmh*-Gen tragen. Die Linien 1 und 6 zeigen positive Signale für das Wildtyp-Allel und für die T-DNA Insertion, diese beiden Linien sind heterozygot für die T-DNA-Integration im *Atmmh*-Gen. Die Linien 2, 3 und 7 zeigen nur ein Signal bei 1.84 kb. Diese Linien sind homozygot für die Integration der T-DNA in das *Atmmh*-Gen. Da die Linien 3 und 7 die geringste Anzahl an zusätzlichen T-DNA-Integrationen aufweisen, wurden diese beiden Linien zur weiteren Untersuchung verwendet. Da sich die T-DNA-Integration nur 30 Nukleotide stromaufwärts des Stop-Codons befindet, sollte überprüft werden, ob trotz der Integration ein *Atmmh*-Transkript gebildet wird. Dazu wurde eine Reverse-Transkription mit dem poly (dT)-Adapter-Primer auf Gesamt-RNA der Linien 3 und 7 durchgeführt. Anschließend wurde die in der Reversen Transkription gebildete cDNA als Template in eine PCR mit den Primern *mmh5* und *AUAP* eingesetzt. Der Primer *AUAP* bindet dabei an die Sequenz des Adapter-Primers. Die PCR bestand aus 6 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60°C und weiteren 32 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 56°C. Die gebildeten Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, aus diesem ausgeschnitten und aufgereinigt. Die aufgereinigten Produkte dienten in einer zweiten PCR mit den Primern *AUAP* und *mmh3* als Template. Die Bedingungen dieser PCR waren 6 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C und 32 weiteren Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 54°C. Von der PCR wurde ein Aliquot von 5 µl in einem Agarosegel aufgetrennt. Das Ergebnis des Agarosegels ist in Abbildung 14 A gezeigt. Die Linien 3 und 7 zeigten beide ein starkes Signal bei 1.2-1.3 kb. Diese Größe ist plausibel, da die Länge eines Fragments von Primer *mmh3* bis zur Insertionsstelle der T-DNA etwa 1.2 kb beträgt. Ein Transkript, das trotz der Insertion der T-DNA gebildet wird, muss mindestens diese Größe zeigen. Die Stärke des Signals und dessen Größe weisen eindeutig daraufhin, dass trotz der homozygoten T-DNA-Integration in den Linien 3 und 7 ein *Atmmh*-Transkript gebildet wird. Um das gebildete Transkript näher zu charakterisieren, wurde das PCR-Produkt der Linie 3 aus dem Gel aufgereinigt und in den Vektor *pGEMT* kloniert. Die in den *pGEMT*-Vektor integrierte Sequenz kann mit den Primern *Universal* und *Revers* sequenziert werden. Auf diese Weise kann die Sequenz des 3'-Endes des *Atmmh*-T-DNA-Transkriptes bestimmt werden. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem gebildeten Transkript um ein Hybrid aus *Atmmh*- und T-DNA-Sequenz handelt. Die *Atmmh*-Sequenz endet an der Insertionsstelle der T-DNA. Die Sequenz des Transkripts geht weiter mit 142 Nukleotiden der *Left-Border*-Sequenz der T-DNA. Eine Translation in die Aminosäuresequenz zeigt, dass ein von diesem Transkript translatiertes Protein sich von dem Wildtyp-*AtMMH*-Protein nur in den letzten 10 Aminosäuren unterscheiden würde. Die veränderte Aminosäuresequenz ist in Abbildung 16 B gezeigt.

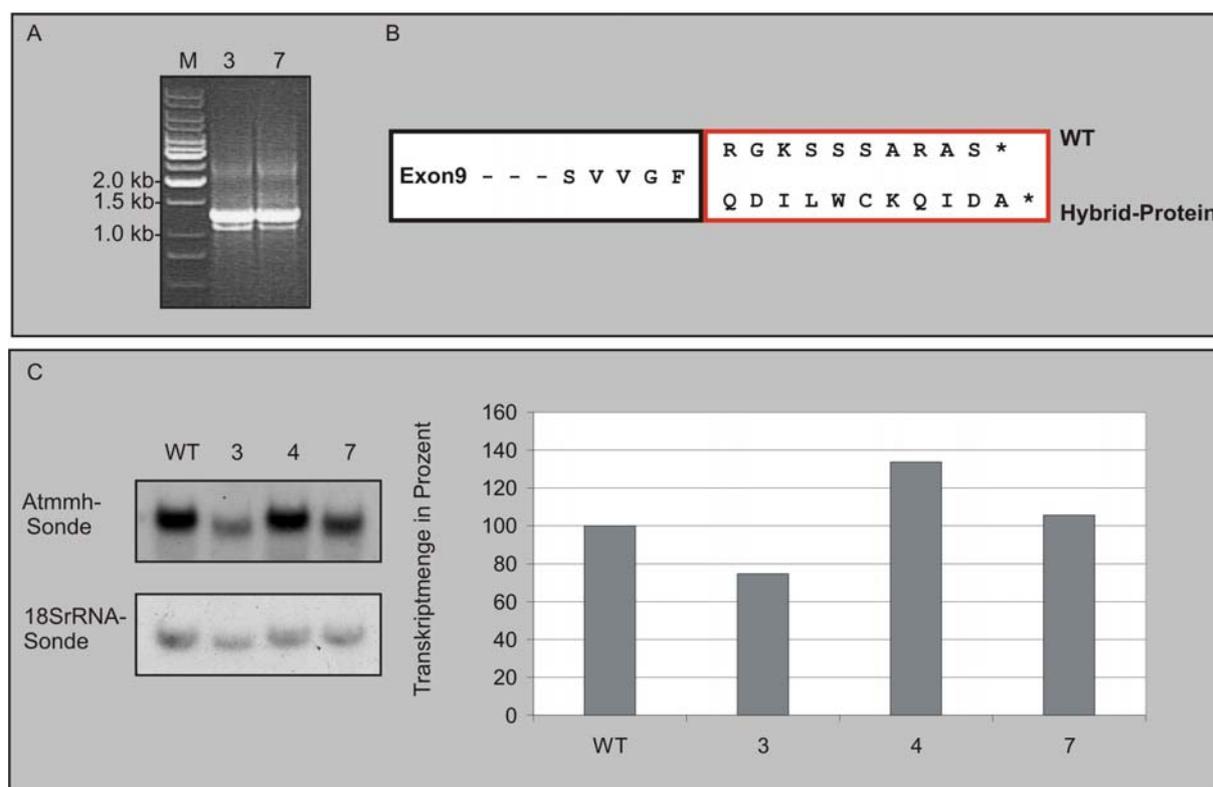


Abbildung 16: Analyse der Atmmh-T-DNA-Insertionlinien atmmh-1 auf transkriptioneller Ebene. A. 2-PCR auf die in der Reversen Transkription gebildete cDNA zur Untersuchung, ob in Pflanzen, die für die T-DNA Integration im Atmmh-Gen homozygot sind, Atmmh-Transkript gebildet wird. B. Aminosäuresequenzen des C-terminalen Endes der AtMMH im Wildtyp und im hypothetischen Hybrid-Protein mit der T-DNA-Insertion. C. Northern-Blot-Analyse der Atmmh-Transkripte mit je 10 µg Gesamt-RNA aus Wildtyp-Pflanzen und aus transgenen Pflanzen, die für die T-DNA-Insertion im Atmmh-Gen homozygot sind. Links ist die Northern-Hybridisierung mit einer Atmmh-Sonde und mit einer 18SrRNA-Sonde gezeigt. Im Diagramm ist die relative Atmmh-Transkriptmenge, die für die verschiedenen Linien berechnet wurde, dargestellt.

Eine Northern-Blot-Analyse sollte untersuchen, ob die homozygote T-DNA Integration Auswirkungen auf die Größe und die Menge an gebildetem Atmmh-Transkript haben. Gesamt-RNA der homozygoten T-DNA-Insertionslinien 3 und 7 wurde dabei mit Gesamt-RNA der Linie 4 und mit Wildtyp verglichen (Abbildung 16 C). Die Signale der Transkripte der Linien 3 und 7 erscheinen etwas tiefer als die von WT und Linie 4. Die Hybrid-Transkripte sind somit etwas kleiner als die WT-Transkripte. Eine Berechnung der Steady-State-Transkriptmengen zeigt keine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung in den Linien 3 und 7. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der homozygoten Insertion der T-DNA in das Atmmh-Gen in diesen Linien ein Transkript in ähnlicher Größe und Menge wie in WT-Pflanzen gebildet wird. Da die Pflanzen der Linien 3 und 7 unter Langtagbedingungen keinen sichtbar veränderten Phänotyp zeigen, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass das Hybrid-Transkript in ein funktionales Protein translatiert wird.

4.6.2 Charakterisierung einer Atmmh T-DNA-Insertionsmutante Atmmh-2

Da die Atmmh-T-DNA-Insertionslinie Atmmh-1 aufgrund des noch vorhandenen Atmmh-Transkriptes für die Untersuchung eines Phänotyps vermutlich nicht geeignet ist, wurde eine weitere T-DNA-Insertionslinie ausgewählt. Die Atmmh-T-DNA Insertionslinie SALK090774 enthält die T-DNA Integration im Intron zwischen Exon 7 und 8 (Abbildung 17 A).

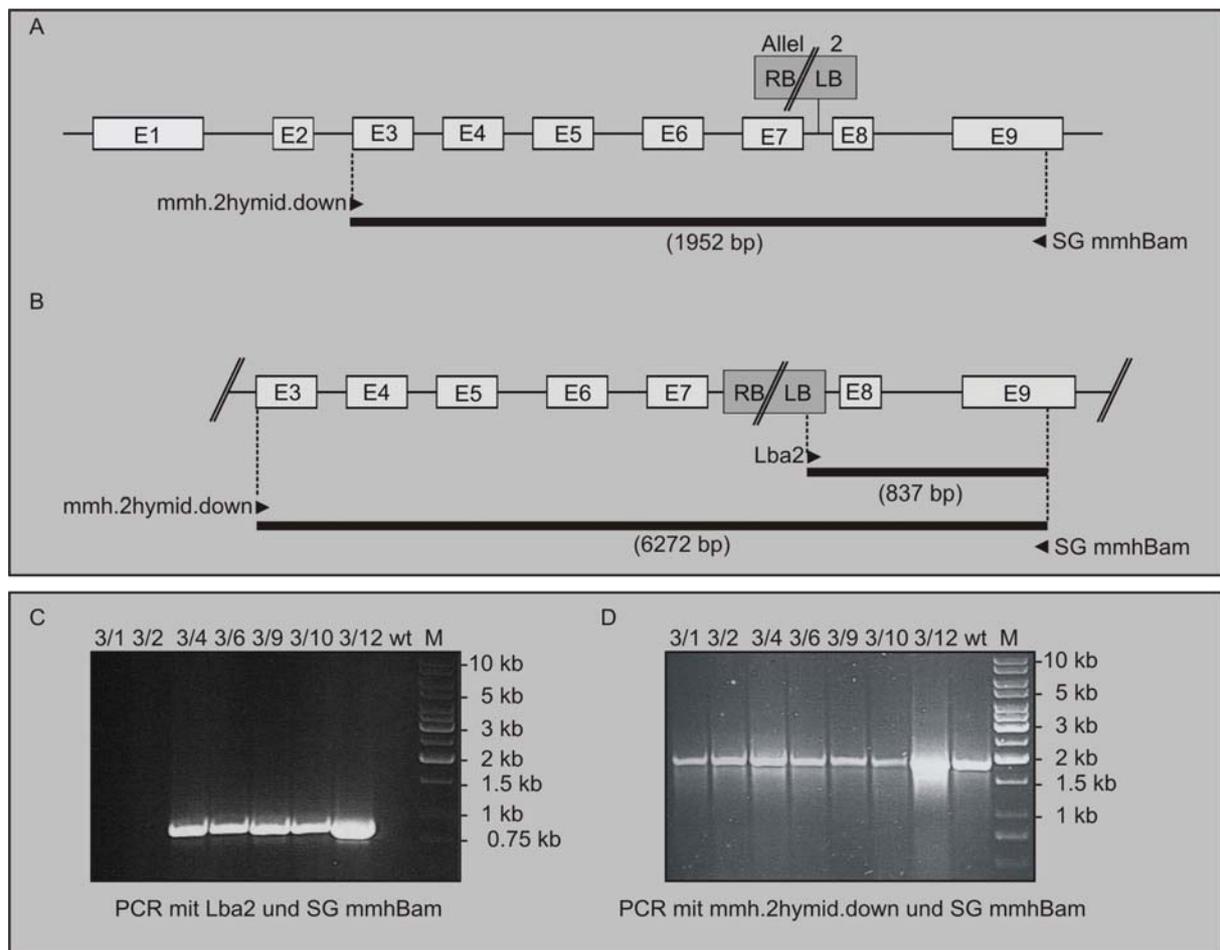


Abbildung 17: Analyse einer Atmmh-T-DNA-Insertionsmutante mit der Insertion in Intron 7. A: Genstruktur von Atmmh ohne die T-DNA-Insertion. Der Ort der T-DNA-Insertion ist angegeben. B: Ausschnitt der Genstruktur von Atmmh mit der T-DNA-Insertion in Intron 7. Schwarze Pfeilspitzen stellen die in der PCR-Analyse verwendeten Primer dar. Die Namen der verwendeten Primer sind davor oder dahinter angegeben. Schwarze Balken zeigen die Produkte der verschiedenen PCR, die Längen der Produkte sind unter den Balken in Klammern angegeben. C und D: PCR-Analyse der DNA verschiedener Nachkommen der heterozygoten Linie 3.

Zur Unterscheidung gegenüber der Syngenta-Linie wird die SALK-Linie in dieser Arbeit als Atmmh-T-DNA-Insertionslinie atmmh-2 bezeichnet. Die erhaltenen Samen der Generation F4 wurden einzeln auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. Nach 3-4 Wochen wurden Rosettenblätter der einzelnen Pflanzen genommen, um daraus Gesamt-DNA zu extrahieren. Diese wurde für PCR-Analysen verwendet. Mit diesen PCR-Analysen sollte festgestellt werden, ob die einzelnen Pflanzen, von denen die DNA stammt, die T-DNA an

der vorhergesagten Stelle im Genom enthalten. Weiterhin sollte mit PCR untersucht werden, ob die Pflanzen für das Allel mit der T-DNA-Insertion heterozygot oder homozygot sind. Eine Analyse der Gesamt-DNA von 10 untersuchten Pflanzen zeigte nur heterozygote Pflanzen, oder Pflanzen, die in Bezug auf die Integration in das *Atmmh*-Gen Wildtypen waren (Ergebnis nicht gezeigt). Sieben Nachkommen von der als heterozygot bestimmten Pflanze 3 wurden wie vorher angezogen und daraus Gesamt-DNA für eine neue PCR-Analyse extrahiert (Abbildung 17 C und D). Eine PCR mit den Primern SG mmh Bam und Lba2 ergibt bei einer T-DNA-Integration an der vorhergesagten Stelle im Intron zwischen Exon 7 und 8 ein Produkt von 837 bp. In Abbildung 17 C ist zu sehen, dass ein Fragment dieser Größe bei den Linien 3/4, 3/6, 3/9, 3/10 und 3/12 amplifiziert wurde. Die PCR mit den Primern SG mmh Bam und mmh2hy.middown ergibt nur mit dem Wildtyp-Allel als Template ein Produkt von 1952 bp. Bei einer Integration der T-DNA ist das DNA-Fragment, das mit den verwendeten Primern amplifiziert werden müsste, über 6 kb groß. Ein Fragment dieser Größe kann mit der verwendeten DNA-Polymerase (Promega) nicht amplifiziert werden. Homozygote Pflanzen würden in dieser PCR somit kein Produkt bilden. In Abbildung 17 D ist zu sehen, dass das 1.952 kb-Produkt natürlich bei der DNA aus einer Wildtyp-Pflanze gebildet wurde, aber auch bei der DNA von allen untersuchten Nachkommen der heterozygoten Pflanze 3. Die PCR-Analyse ergab somit, dass die Linien 3/1 und 3/2 ausschließlich das *Atmmh* Wildtyp-Allel enthalten, während die Linien 3/4, 3/6, 3/9, 3/10 und 3/12 für die Integration in das *Atmmh*-Gen heterozygot sind. Statistisch müssten von den Nachkommen einer heterozygoten Pflanze 25% homozygot sein. Da weder in den untersuchten Pflanzen der F4 Generation, noch in den sieben untersuchten Pflanzen der F5-Generation eine homozygote Pflanze gefunden wurde, wurde die Embryoletalität eines Knock-out von *Atmmh* in Betracht gezogen. Bei einer näheren Untersuchung der heterozygoten Pflanzen fiel eine hohe Anzahl an leeren Samen auf (Abbildung 18 A). Etwa 600 Samen der Linien 3/4, 3/6, 3/9, 3/10 und 3/12 wurden gezählt. Die Aufteilung in gesunde Samen mit normal entwickeltem Embryo und in leere Samen ist in Abbildung 18 B gezeigt. In den untersuchten Linien fanden sich jeweils etwa 25% leere Samen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde gefolgert, dass ein Knock-out des *Atmmh*-Gens Embryoletalität bewirkt.

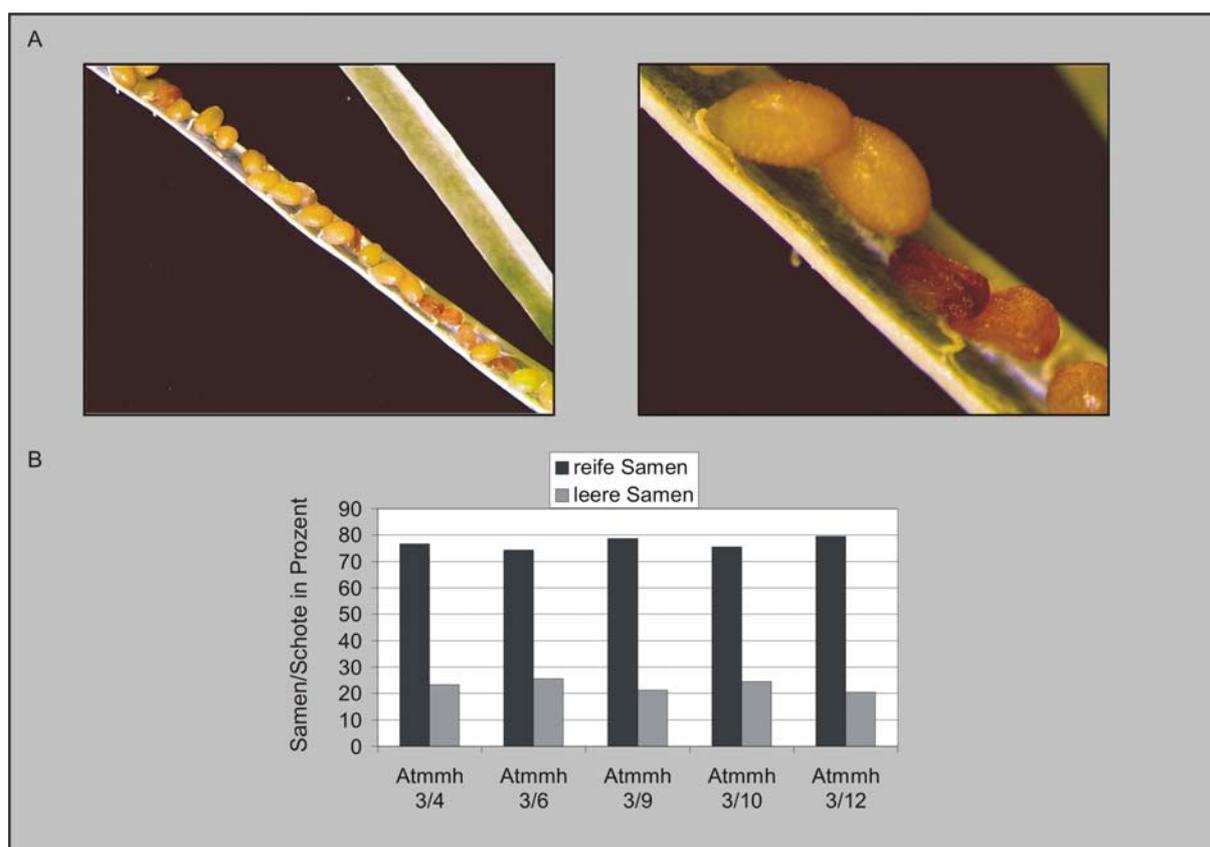


Abbildung 18: Analyse der Samen in heterozygoten Pflanzen der T-DNA Insertions-Linie *atmmh-2*. A: Links ist eine Schote einer heterozygoten Pflanze der Linie *Atmmh* T-DNA-Insertion Allel 2 zu sehen. Rechts ist ein Ausschnitt derselben Schote zu sehen, mit Samen die als "reif" gezählt wurden (links oben) und Samen, die als "leer" gezählt wurden (rechts unten). B: Prozent an "reifen" und "leeren" Samen in Schoten von heterozygoten Pflanzen der Linie 3.

4.6.3 Charakterisierung einer *Atmmh*-RNAi-Linie

Da sich ein Knock-out des *Atmmh*-Transkriptes durch T-DNA-Integration als embryoletal erwiesen hatte, wurde zur Untersuchung von Pflanzen mit einem Funktionsverlust von *Atmmh* ein anderer Ansatz gewählt. Mit Hilfe eines RNAi-Konstruktes sollten Pflanzenlinien erstellt werden, in denen die Transkriptmenge von *Atmmh* so erheblich gesenkt ist, dass ein teilweiser Funktionsausfall zu einem abnormen Phänotyp führt. Die restliche Transkriptmenge sollte jedoch so hoch sein, dass ein Überleben der Pflanzen gewährleistet ist. Für die Klonierung eines *Atmmh*RNAi-Konstruktes wurden die ersten 300 Nukleotide des *Atmmh*-Leserahmens mit dem Gateway-System in den RNAi-Vektor pK7GWIWG2 transferiert. Dazu wurden zuerst aus dem Plasmid *mmh*gfp3.2 mit der Restriktionsendonuklease BamHI die ersten 300 Nukleotide der *Atmmh* ausgeschnitten und in den ebenfalls mit BamHI geschnittenen Vektor pENTR kloniert. Der Vektor pENTR dient im Gateway-System als Einstiegs-Vektor. Aus diesem Einstiegsvektor kann die insertierte Sequenz mit dem Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix in andere Vektoren des Systems transferiert werden. Für diese Arbeit wurde die Klonierung in den Vektor pK7GWIWG2

gewählt. In diesen Vektor erfolgt die Insertion der Atmmh-Sequenz als Inverted-Repeat, der von einer Intron-Sequenz unterbrochen wird (Abbildung 19 A).

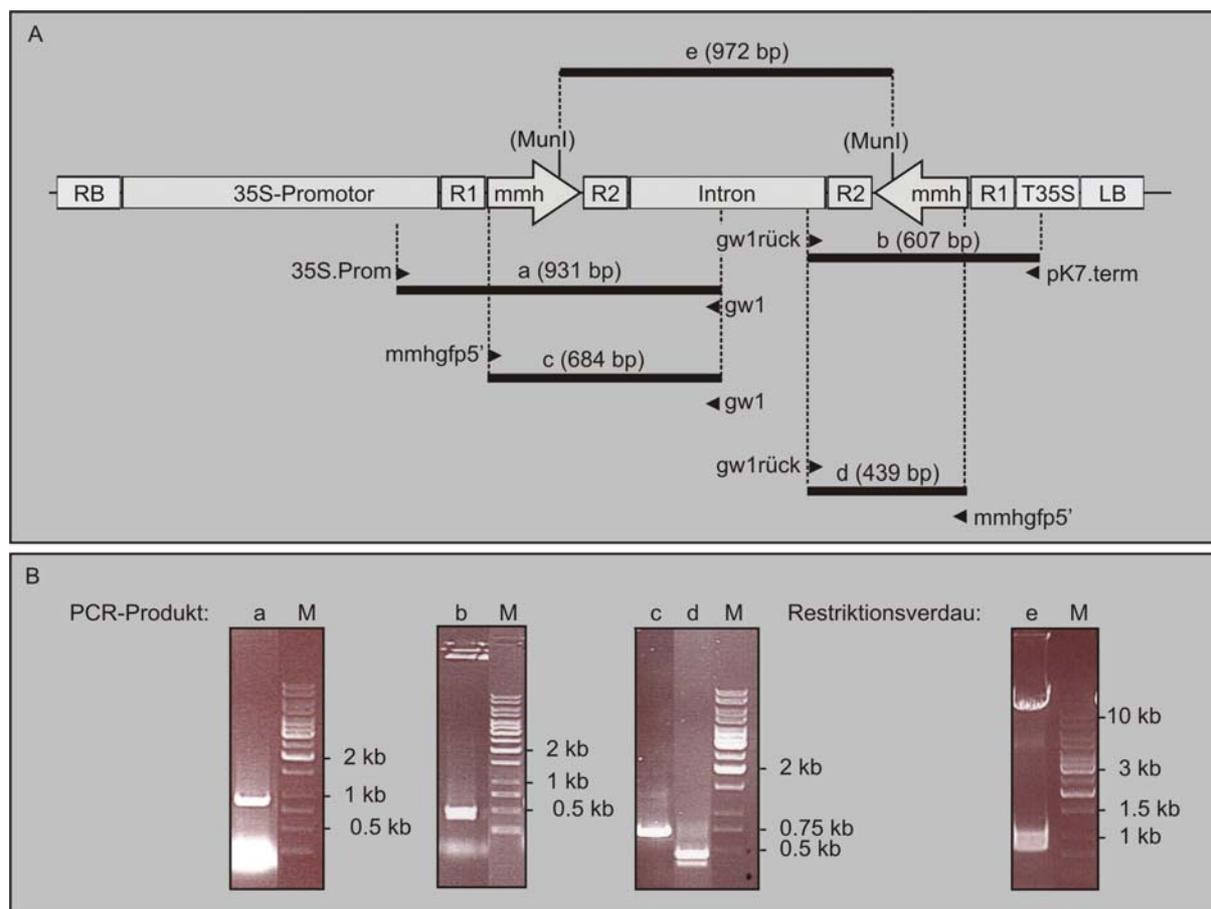


Abbildung 19: Analyse des Atmmh-RNAi-Konstruktes im Vektor pK7GWIWG2. A: Struktur der T-DNA, die vom pK7GWIWG2-Atmmh-Vektor in Pflanzen übertragen wird. Vom Leserahmen der Atmmh sind die ersten 300 Basenpaare ab dem ATG integriert. Die für die PCR-Analyse verwendeten Primer sind durch schwarze Pfeilspitzen dargestellt, die Namen stehen daneben. Die Größe und Lage der resultierenden PCR-Produkte und des MuniI-Restriktionsfragmentes sind durch schwarze Balken gezeigt. Die Größe der Produkte steht in Klammern über den Balken. Die einzelnen Produkte sind mit a bis e gekennzeichnet. B: Ergebnis der PCR-Analysen und des Restriktionsverdauens. Über die Bezeichnungen a bis e lassen sich die Reaktionsprodukte den theoretisch erwarteten Produkten aus A zuordnen. RB: Right Border; LB: Left Border; R1/R2: "Attachement sites" für die LR-Rekombinationsreaktion mit dem Zielvektor pK7GWIWG2; M: Marker

Das resultierende RNAi-Konstrukt steht unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Tabakmosaikvirus-Promotors. Vor der Transformation des fertigen Konstruktes in Pflanzen wurde die Korrektheit des Konstruktes mit PCR-Analysen und einem Restriktionsverdau überprüft (Abbildung 19 B). Die Transformation in *A. thaliana* erfolgte mit der Floral-Dip-Transformation mit Agrobakterien. Um Pflanzen mit einer Insertion des Konstruktes zu erhalten, wurden Samen der T1-Generation auf MS-Agar mit Kanamycin ausgebracht. Von selektierten Pflanzen, die fähig waren auf Kanamycin zu wachsen, wurden Gesamt-DNA-Extraktionen durchgeführt. Die DNA wurde mit einer PCR auf die Anwesenheit des Konstruktes untersucht. Dazu wurde eine PCR mit den Primern gw1 und mmhgf5'

durchgeführt, die nur bei Integration des RNAi-Konstruktes ins Genom ein Produkt von 684 bp ergibt (Abbildung 20 A).

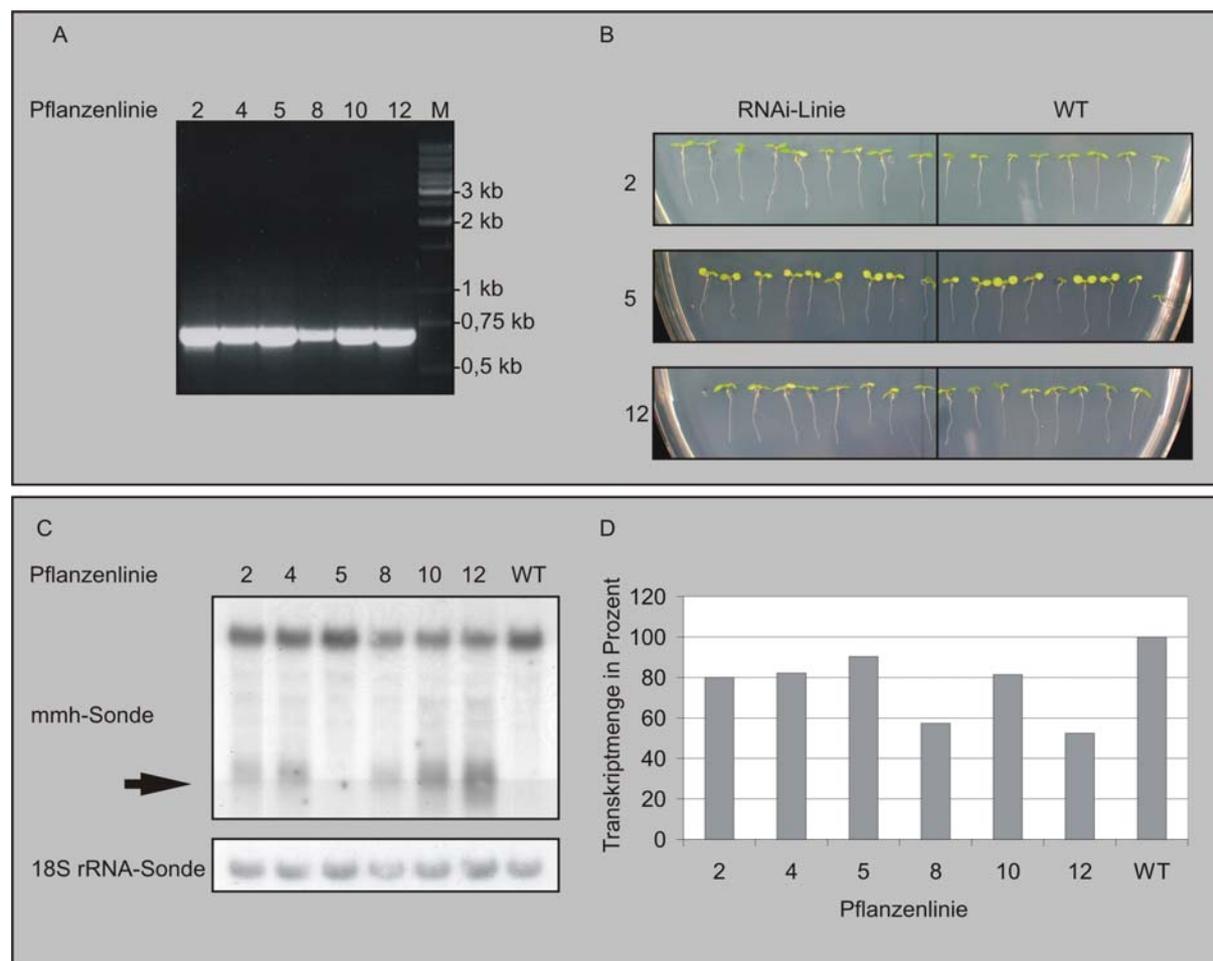


Abbildung 20: Molekulare und phänotypische Analysen der möglichen AtmmhRNAi-Linien. A: PCR-Analyse der DNA aus den Linien 2, 4, 5, 8, 10, 12 und Wildtyp mit den Primern gw1 und mmhgp5'. B: Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp wurden auf MS-Agar neben Keimlingen der Linien 2, 5, und 12 angezogen. Die Platten wurden unter Langtagbedingungen in vertikaler Stellung kultiviert. C: Northern-Blot-Analyse der möglichen RNAi-Linien. Der schwarze Pfeil zeigt auf die zusätzlich in den transformierten Pflanzen vorhandenen Signale. D: Darstellung der Atmmh-Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp. Die Transkriptmenge in Wildtyp RNA wurde auf 100 % gesetzt, die anderen Transkriptmengen sind relativ dazu dargestellt.

Bei den untersuchten Pflanzenlinien 2, 4, 5, 8, 10 und 12 war die PCR positiv. Alle selektierten Pflanzen enthalten somit das Konstrukt, trotzdem ist unklar, ob oder in welchem Maße es durch die Integration des Konstruktes zu einem RNA-Interferenz-Effekt in Bezug auf das Atmmh-Transkript kommt. Um die Transkriptmenge und damit einen möglichen RNAi-Effekt zu untersuchen, wurde bei Nachkommen der Linien 2, 4, 5, 8, 10 und 12 eine RNA-Extraktion aus Rosettenblättern durchgeführt. Mit der RNA wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 20 C). Bei allen untersuchten Pflanzen konnte das Atmmh-Transkript in der Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Zusätzlich zum Signal des Wildtyp-Transkriptes wurde jedoch in den Linien 2, 4, 8, 10, und

12 ein weiteres Signal detektiert. Dieses Signal ist erheblich kleiner als das eigentliche Transkript und unschärfer. Es könnte sich um spezifische Degradationsprodukte handeln, was auf einen RNAi-Effekt hinweisen würde. Da die verwendete Sonde den gesamten Leserahmen des *Atmmh*-Gens überspannt, wäre es aber auch möglich, dass es sich bei dem zweiten, kleineren Signal um eine Detektion des transkribierten RNAi-Konstruktes handelt. Eine densitometrische Vermessung der Hauptsignale zeigt bei den Linien mit dem RNAi-Konstrukt eine geringere Transkriptmenge als im Wildtyp (Abbildung 20 D). Die Linie 5, welche das zusätzliche Signal nicht enthält, zeigt eine *Atmmh* Transkriptmenge von 90% im Vergleich zum Wildtyp. Linie 12, welche das stärkste Zusatzsignal aufweist, zeigt nur 52% der Transkriptmenge des Wildtyps. Bei Anzucht auf MS-Medium zeigen die Keimlinge keinen Unterschied zu Wildtyp Keimlingen (Abbildung 20 B). Auch bei Anzucht auf Erde unter Langtagbedingungen zeigen die Pflanzen mit dem Konstrukt während des gesamten Wachstumszyklus keinen offensichtlichen Unterschied im Phänotyp (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein RNAi-Konstrukt für *Atmmh* erstellt wurde und erfolgreich Pflanzen mit diesem RNAi-Konstrukt transformiert wurden. Die Anwesenheit eines zusätzlichen Signals in der Northern-Blot-Analyse und die leicht reduzierte Transkriptmenge in den untersuchten RNAi-Linien deuten auf einen geringen RNAi-Effekt hin. Da bei den untersuchten RNAi-Linien bisher kein Phänotyp festgestellt werden konnte, reicht die Reduktion der Transkriptmenge für die Ausbildung eines Phänotyps möglicherweise nicht aus.

4.6.4 Charakterisierung einer *Atmmh*-Überexpressions-Linie

Es sollten in dieser Arbeit transgene Pflanzen hergestellt werden, die ein Allel mit einer Fusion des *Atmmh*-Gens mit einem Flag-Tag tragen. Der Flag-Tag besteht aus 24 Basenpaaren und kodiert für ein 8 Aminosäuren langes Peptid, welches zur Detektion und Aufreinigung des Fusionsproteins dient. Bei der Aufreinigung des Fusionsproteins aus der Pflanze sollen später Proteine, die mit AtMMH Komplexe bilden, mit aufgereinigt werden. Die Identifizierung der anderen Komplex-Komponenten soll bei der Aufklärung der Funktion der Helikasen im RNA-Metabolismus helfen. Zusätzlich kann es aber in den transgenen Pflanzen durch die zusätzlichen Kopien des *Atmmh*-Gens zu einer Überexpression des AtMMH-Proteins kommen. Falls die Überexpression in einem mutierten Phänotyp resultiert, soll dieser Phänotyp untersucht werden, da auch der veränderte Phänotyp Hinweise auf die Funktion der AtMMH im RNA-Metabolismus geben könnte. Die Herstellung des *Atmmh*-Flag-Konstruktes ist in Abbildung 21 dargestellt.

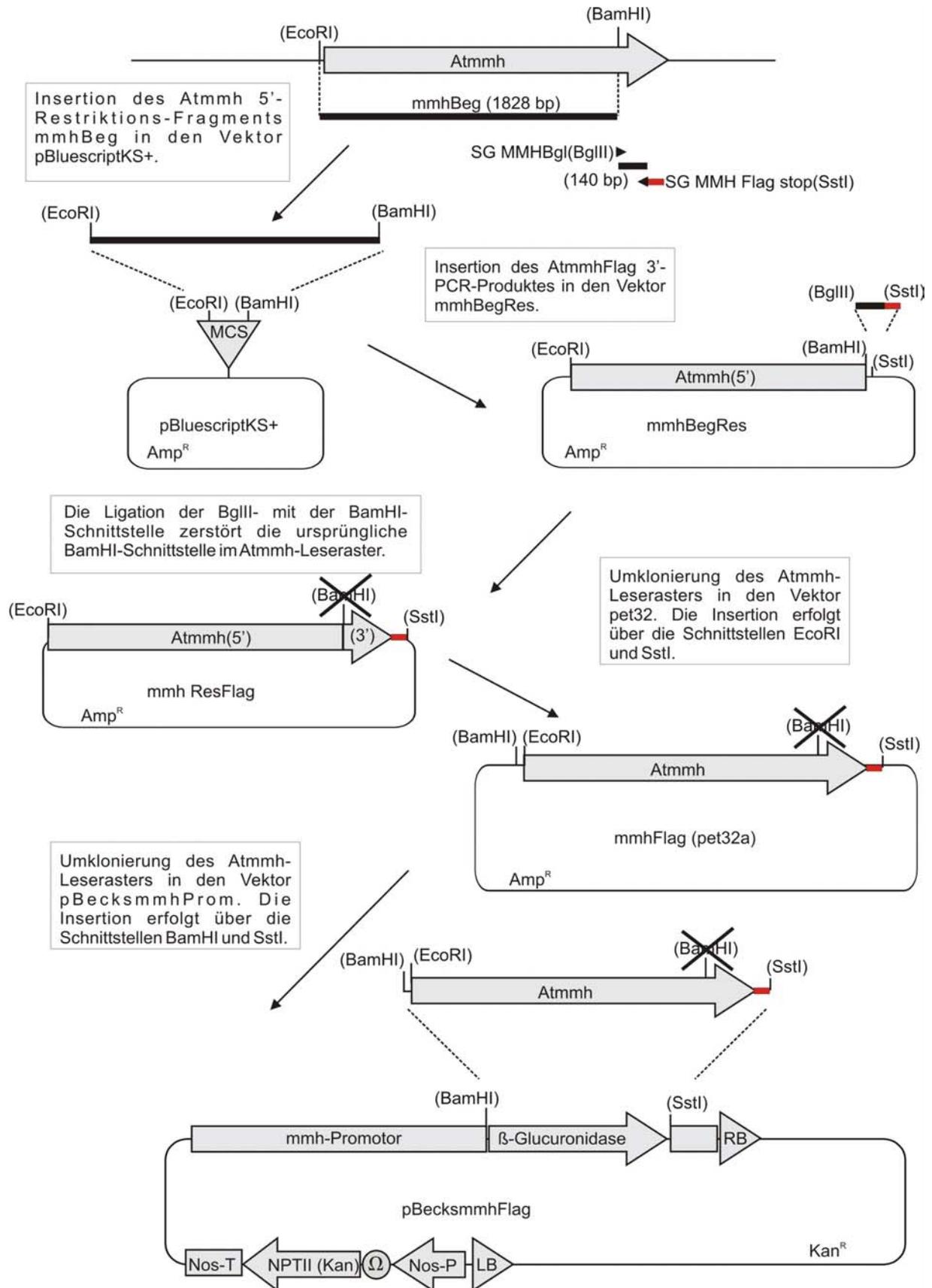


Abbildung 21: Klonierungsstrategie des pBecksmmhFlag-Konstruktes. PCR-Produkte und Restriktionsfragmente sind als schwarze Balken dargestellt. Die Flag-Sequenz ist in Rot dargestellt.

Zuerst wurde aus einem Atmmh-cDNA-Klon der 5'-Bereich der Atmmh mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI ausgeschnitten. Das 1828 bp lange Restriktionsfragment wurde in den Vektor pBluescriptKS+ eingebracht. Der 3' Bereich der Atmmh wurde mit den Primern SG MMHBgl und SGMMHFlag Stop in einer PCR mit dem mmh-cDNA-Klon als Template amplifiziert. Die Bedingungen der PCR waren zuerst 5 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 55°C dann weitere 35 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 59°C. Das erhaltene PCR-Produkt hat eine Länge von 140 bp. Über die durch die Primer eingebrachten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen BglII und SstI wurde das PCR-Produkt in den Vektor mmhBegRes eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde als mmhResFlag bezeichnet. Durch die Ligation in die BamHI- und SstI-Schnittstellen des Vektors wurde die BamHI-Schnittstelle im Atmmh-Leseraster zerstört. Die Sequenz des 3' Bereiches und die Übergänge wurden mit Sequenzierungen auf ihre Korrektheit überprüft. Nun erfolgte die Umklonierung des gesamten Atmmh-Leserasters in den Vektor pet32a über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen EcoRI und SstI. Dieser Schritt war nötig, da die endgültige Klonierung des Atmmh-Leserasters in den Vektor pBecksmmhProm über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen BamHI und SstI erfolgen sollte. Die nötige BamHI-Schnittstelle ist im Vektor pet32a enthalten. Durch diese Klonierung wurde der Vektor pBecksmmhFlag konstruiert, der das Atmmh-Leseraster mit der fusionierten Sequenz des Flag-Tag unter der Kontrolle des Atmmh-Promotors enthält (Abbildung 22 A). Das β -Glucuronidase-Gen wird durch die Klonierung aus dem Vektor entfernt. Dieser Vektor wurde durch Transformation in Arabidopsis-Pflanzen eingebracht. Die Samen der T1-Generation wurden auf MS-Kan-Platten angezogen, um Pflanzen mit einer Integration des Konstruktes ins Genom zu selektionieren. Von Pflanzen, die eine Kanamycin-Resistenz aufwiesen, wurde Gesamt-DNA aus Blättern extrahiert. Diese DNA wurde in einer PCR mit den Primern mmh5 und mmhRT3' auf Anwesenheit des Flag-Konstruktes untersucht (Abbildung 22 B). Die DNA der Linien 3/1, 6/1, 7/3, 8/3, 5/1, 12/1, 15/1 und 16/1 zeigt in der PCR zusätzlich zu dem 690 bp-Produkt, das mit dem Wildtyp-Allel als Template entsteht, ein 440 bp-Produkt. Dieses entsteht dadurch, dass das Atmmh-Flag-Konstrukt keine Introne enthält. Die Pflanzen 3/1, 6/1, 7/3, 8/3, 5/1, 12/1, 15/1 und 16/1 enthalten also das Atmmh-Flag-Konstrukt in ihrem Genom. Diese Pflanzen zeigten Auffälligkeiten im Erscheinungsbild der Schoten.

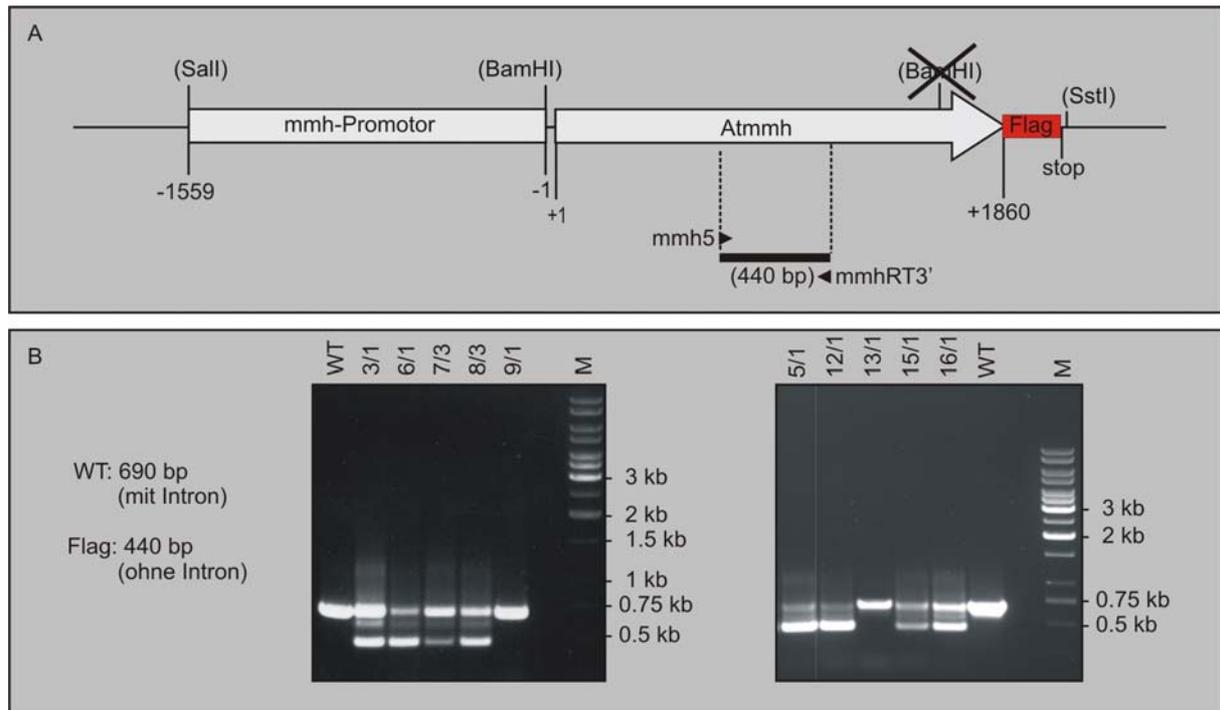
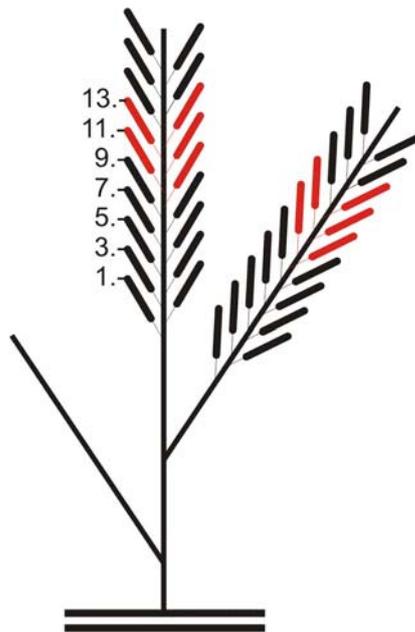


Abbildung 22: Skizze des Atmmh-Flag-Konstruktes und PCR-Analyse transformierter Pflanzen.
 A: Skizze des Atmmh-Flag-Konstruktes. Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen im Vergleich zum ATG-Startcodon der Atmmh an, wobei +1 das A des ATG-Codons ist. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, auch die zerstörte BamHI-Erkennungssequenz im Atmmh-Leseraster, sind in Klammern angegeben. Die Lage der in der PCR-Analyse verwendeten Primer ist mit schwarzen Pfeilspitzen gezeigt und die Größe und Lage des resultierenden PCR-Produktes dargestellt. B: Ergebnis der PCR-Analyse der Gesamt-DNA von Atmmh-Flag-Linien und von WT. Die verwendeten Primer sind mmh5 und mmhRT3'. Die Größen einiger Markerbanden sind angegeben.

Um den Phänotyp der Atmmh-Flag-Pflanzen zu charakterisieren, wurde zuerst die Anzahl an Samen pro Schote bestimmt. Dazu wurden Samen der Atmmh-Flag-Pflanzen und *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen auf Erde unter Langtagbedingungen bis zur Reifung der Schoten angezogen. Von jeder Pflanze wurden dann zehn Schoten genommen und die Samen darin gezählt. Die Anzahl der Samen in jeder Schote hängt auch vom Ernährungs- und Entwicklungsstand der Pflanze ab (Meinke, 1994). Schoten an Infloreszenzen, die in sehr späten Entwicklungsstadien der Pflanze wachsen, zeigen auch im Wildtyp häufig eine sehr geringe Anzahl an Samen pro Schote. Um Schoten aus ähnlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen zu zählen, wurden jeweils fünf aufeinander folgende Schoten der Primärinfloreszenz und fünf aufeinander folgende Schoten der ersten Verzweigung verwendet. Die folgende Skizze stellt einen Ausschnitt einer Arabidopsis-Pflanze dar, die die Schoten der Primärinfloreszenz und der ersten Verzweigung sind eingezeichnet. Die zur Auszählung verwendeten Schoten sind in Rot dargestellt. Es wurden jeweils die Schoten 10-14 einer Infloreszenz gezählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schoten die Samenentwicklung abgeschlossen hatten.



Das Ergebnis der Auszählung der Samen pro Schote ist in Abbildung 23 gezeigt. Während Wildtyp-Pflanzen 50-60 Samen pro Schote bilden, enthalten die Atmmh-Flag-Linien 3/1, 6/1, 12/1, 15/1 und 16/1 im Durchschnitt nur etwa die Hälfte, also 25-30 Samen pro Schote. Die Linien 7/3 und 5/1 sogar noch weniger. Dabei zeigen sich Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps von Pflanze zu Pflanze innerhalb einer Linie. In Abbildung 23 A und B ist z.B. eine Schote der Linie 6/1 gezeigt, die nur 4 Samen enthielt.

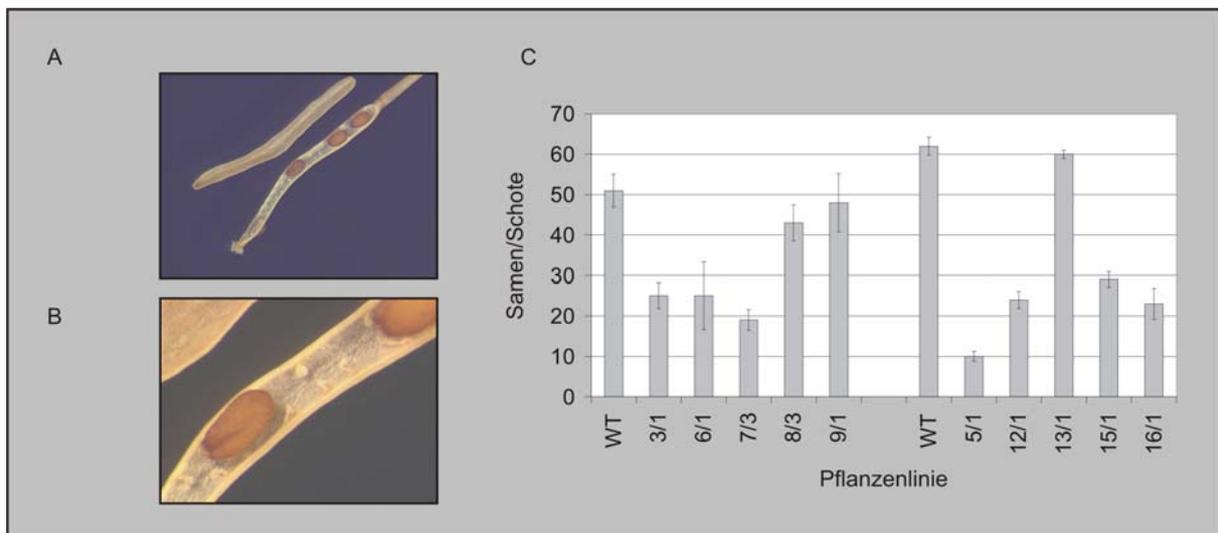


Abbildung 23: Auszählung der Anzahl an Samen pro Schote in transgenen Atmmh-Flag-Pflanzen. A: Extremes Erscheinungsbild des veränderten Phänotyps in Atmmh-Flag-Pflanzen. B: Vergrößerung von A – man sieht, dass die Samenanlagen vorhanden sind, aber keine Samen gebildet wurden. C: Diagramm mit den Ergebnissen der Auszählung der Samen pro Schote. Von den Linien 5/1, 12/1, 13/1, 15/1 und 16/1 wurde je eine Pflanze gezählt. Von den Pflanzen 3/1, 6/1, 7/3, 8/3, 9/1 und WT wurden je 3-4 Pflanzen gezählt. Die Balken im Diagramm zeigen die Standardabweichung.

Die Linien 9/1 und 13/1, die sich in der PCR-Analyse in Bezug auf das *Atmmh*-Gen als Wildtyp erwiesen, verhalten sich mit durchschnittlich 48 und 60 Samen pro Schote auch in dieser Untersuchung wie der Wildtyp. Den einzigen Ausreißer stellt die Linie 8/3 dar. Obwohl sie das *Atmmh*-Flag-Konstrukt enthält, liegt sie mit durchschnittlich 43 Samen pro Schote im Bereich des Wildtyp-Phänotyps. Trotzdem zeigt diese Untersuchung deutlich, dass Pflanzen, die das *Atmmh*-Flag-Konstrukt enthalten, eine geringere Samenanzahl pro Schote als der Wildtyp aufweisen. Um die durchschnittliche Länge der Schoten zu analysieren, wurden diese vermessen (Abbildung 24). In Abbildung 24 C ist zu sehen, dass die Schoten der Linien 3/1, 6/1 und 7/3 um 4 mm – 5,5 mm kürzer sind als die Schoten des Wildtyps. Obwohl alle Pflanzen die gleichen Wachstumsbedingungen hatten, zeigt auch die Linie 9/1 Schoten, die um durchschnittlich 2,6 mm kürzer sind als die Wildtypschoten. Das Gleiche gilt für die Linie 8/3. Auch hier zeigt sich die Tendenz, dass die Linien 3/1, 6/1 und 7/3 den am stärksten abweichenden Phänotyp aufweisen.

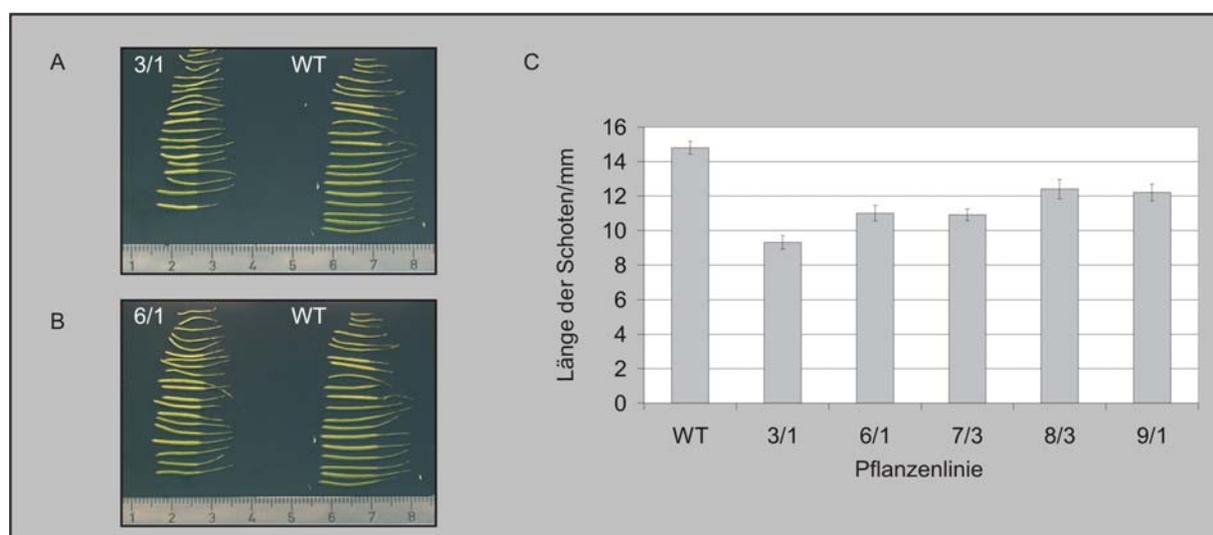


Abbildung 24: Vermessung der Schotenlängen von *Atmmh*-Flag-Linien und Wildtyp-Pflanzen. A und B: Die 20 obersten Schoten der Primärfloreszenz wurden in Reihenfolge übereinander gelegt um die Verkürzung der Schoten zu untersuchen. Gezeigt sind die Schoten der Linien 3/1 und 6/1. Vermessen wurden jeweils die 10 Schoten, die von der noch blühenden Infloreszenz am weitesten entfernt waren. C: Diagramm mit den Ergebnissen der Vermessung. Gezeigt ist die durchschnittliche Länge der Schoten in Zentimetern. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Pflanzenlinien, die das *Atmmh*-Flag-Konstrukt enthalten, zeigen also verkürzte Schoten und eine geringere Anzahl an Samen pro Schote. Unklar ist jedoch, was den veränderten Phänotyp bewirkt. Eine Northern-Blot-Analyse soll klären, ob die *Atmmh*-Transkriptmenge in den Pflanzen mit dem *Atmmh*-Flag-Konstrukt verändert ist. Dazu wurden Samen der Linien 3/1, 6/1, 7/3, 8/3, 9/1 und WT auf Erde ausgebracht und unter Langtagbedingungen 10 Tage kultiviert. Von den 10 Tage alten Keimlingen wurde eine Gesamt-RNA-Extraktion mit dem RNeasy-mini-plant-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die so extrahierte Gesamt-RNA wurde für die Northern-Blot-Analyse verwendet. Die Membran wurde mit der radioaktiv

markierten mmh-Sonde und, zur Standardisierung der RNA-Mengen, mit der atp9 Sonde hybridisiert (Abbildung 25). Die ermittelten Atmmh-Transkriptmengen sind im Diagramm in Abbildung 25 B dargestellt. Die Atmmh-Transkriptmenge im Wildtyp wurde als 100% definiert. Im Vergleich dazu zeigen die Linien 3/1, 6/1, 7/3 und 8/3 erhöhte Transkriptmengen von 160 %, 211 %, 202 % und 142 %. Die Linie 9/1 zeigt eine im Gegensatz zum Wildtyp leicht verringerte Transkriptmenge von 85%. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Linien 3/1, 6/1 und 7/3 in allen drei Experimenten die stärkste Ausprägung des veränderten Phänotyps aufweisen. Die Linie 9/1, die das Atmmh-Flag-Konstrukt nicht enthält, zeigt kaum Abweichungen vom Wildtyp-Phänotyp. Allerdings zeigt auch die Linie 8/3, welche das Atmmh-Flag-Konstrukt enthält, kaum Abweichungen vom Wildtyp-Phänotyp.

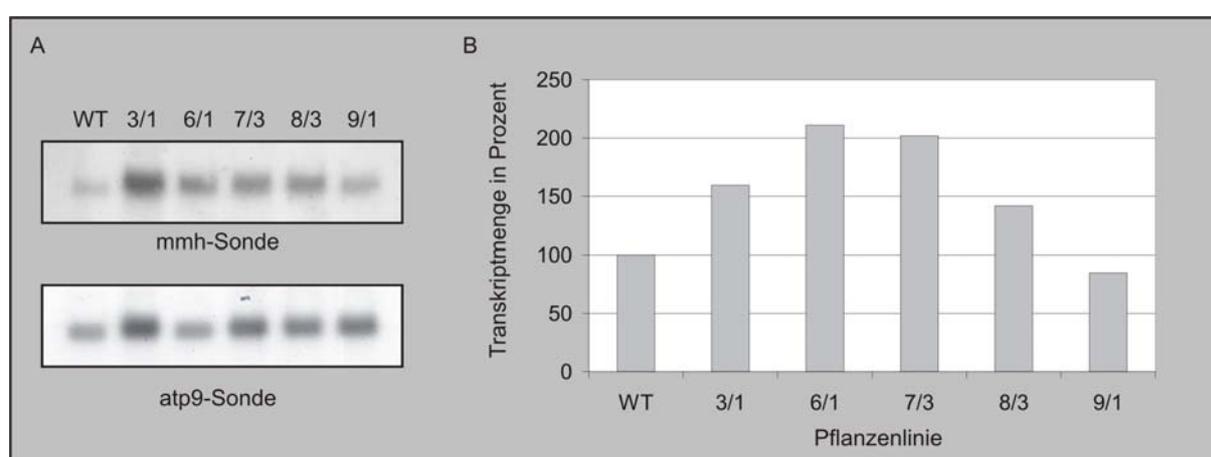


Abbildung 25: Northern-Blot-Analyse der Atmmh-Transkriptmenge in Atmmh-Flag-Linien. A: Northern-Blot-Hybridisierung mit der mmh-Sonde, oben, und die Hybridisierung der selben Membran mit einer atp9-Sonde als Standard, unten. B: Diagramm mit der Darstellung der Ergebnisse der Northern-Blot-Hybridisierungen.

Es wurde gefunden, dass sowohl die verringerte Anzahl der Samen, als auch die Verkürzung der Schoten mit der erhöhten Atmmh-Transkriptmenge korreliert sind.

4.6.5 Charakterisierung von Atpmh1 T-DNA-Insertionspflanzen

Für die Analyse von Atpmh1 Knock-out-Pflanzen wurde durch eine *in silico*-Recherche die T-DNA-Insertions-Linie SALK pda 08753 ausgewählt. In dieser Linie war eine T-DNA-Integration im Exon 6 vorhergesagt (Abbildung 26 A). Die Orientierung dieser Insertion ist derart, dass die Left-Border in Leserichtung der Atpmh1 zuerst abgelesen wird. Die erhaltenen Samen der T4-Generation wurden auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen und nach 3-4 Wochen wurde aus den einzelnen Pflanze Gesamt-DNA extrahiert. In ersten PCR-Analysen mit der Gesamt-DNA der einzelnen Pflanzen wurde gefunden, dass einige der untersuchten Pflanzen die Left-Border an der angegebenen Stelle im Exon 6 enthielten. Allerdings konnten nur heterozygote Pflanzen identifiziert werden und eine PCR

mit einem Right-Border-Primer und einem genspezifischen Primer ergab nie ein Produkt (Ergebnisse nicht gezeigt). Um homozygote Pflanzen zu erhalten, wurden Samen der T5-Generation der zwei heterozygoten Pflanzen 4 und 6 wie vorher angezogen und DNA extrahiert. Eine PCR mit einem Left-Border-Primer und einem genspezifischen Primer zeigte für alle untersuchten Nachkommen die korrekte Integration der T-DNA. Die PCR mit zwei genspezifischen Primern ergab jedoch, dass alle untersuchten Pflanzen auch das Wildtyp-Allel ohne T-DNA-Integration enthielten. Statistisch ist es unwahrscheinlich, dass eine Untersuchung der Nachkommen einer heterozygoten Pflanze ebenfalls nur heterozygote Pflanzen aufweist. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von *Atpmh1* und *Atpmh2* wurde die Vermutung aufgestellt, dass das Produkt in der PCR mit zwei genspezifischen Primern von *Atpmh2* stammt und die untersuchten Pflanzen in Bezug auf eine T-DNA-Integration homozygot sind. Um die Zygotie der Pflanzen zu klären, wurde ein anderer Ansatz gewählt. Mit DNA der zwei Pflanzen 4 und 6, die beide in der PCR eine T-DNA-Integration zeigten (Abbildung 26 D), wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 26 E). Die DNA der Pflanzen 4 und 6 und Wildtyp-DNA wurden dazu mit der Restriktionsendonuklease *SacI* geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Southern-Blot erfolgte die Hybridisierung mit der *pmh1*-Sonde. Bei einer T-DNA Integration sollte ein Signal bei 3,29 kb detektiert werden, während das Signal des Wildtyp-Allels bei 5 kb liegen sollte. Die Southern-Blot-Analyse zeigt für Pflanze 4 und 6 jeweils das Signal in der erwarteten Größe für eine T-DNA-Integration, aber kein Signal in der Größe des Wildtyp-Allels. Beide Pflanzen sind also für die Integration der T-DNA in das *Atpmh1*-Gen homozygot. Unklar war noch, weshalb eine PCR auf die Right-Border der T-DNA nicht möglich war. Bei der Integration von T-DNA in das Pflanzengenom kann es zu Doppelintegrationen kommen, die häufig als „inverted repeat“ vorliegen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde mit DNA der Pflanze 4 eine PCR mit den Primern *Lba2* und *pmh1.2hy3'* durchgeführt (Abbildung 26 C und F). Diese PCR ergab für Wildtyp-DNA kein Produkt und für die Pflanze 4 ein Produkt von etwa 570 bp. Eine Sequenzierung ergab eine Lokalisation einer T-DNA Left-Border 150 bp stromabwärts der ersten Integration. Es handelt sich somit um mindestens zwei Kopien der T-DNA, die als Inverted-Repeat vorliegen könnten. Nachdem gezeigt wurde, dass die Pflanze 4 homozygot für die T-DNA-Integration in *Atpmh1* ist, sollte eine Northern-Blot-Analyse klären, ob durch die Integration in Exon 6 die *Atpmh1*-Transkription unterbunden ist. Dazu wurden Pflanzen auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen, bis sich Blüten bildeten. Die blühenden Pflanzen wurden für 24 Stunden entweder bei 4°C oder bei 23°C kultiviert, dann wurde aus den Blüten Gesamt-RNA extrahiert. Das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse ist in Abbildung 26 G gezeigt: Die Hybridisierung mit der 18SrRNA-Sonde bestätigt, dass in allen Spuren RNA vorhanden ist. Die Hybridisierung mit der *pmh1*-Sonde zeigt bei Wildtyp-DNA ein Signal, ein schwächeres bei 23°C und ein stärkeres nach der

Induktion durch Kälte. Bei RNA der Pflanze 4 zeigt sich nur ein Signal, das so schwach ist, dass trotzdem von einem Knock-Out der Atpmh1 RNA-Helikase ausgegangen wurde. Bei der Pflanzenlinie 4 handelt es sich also um eine homozygote T-DNA-Insertionsmutante mit einem Knock-out des Atpmh1-Gens.

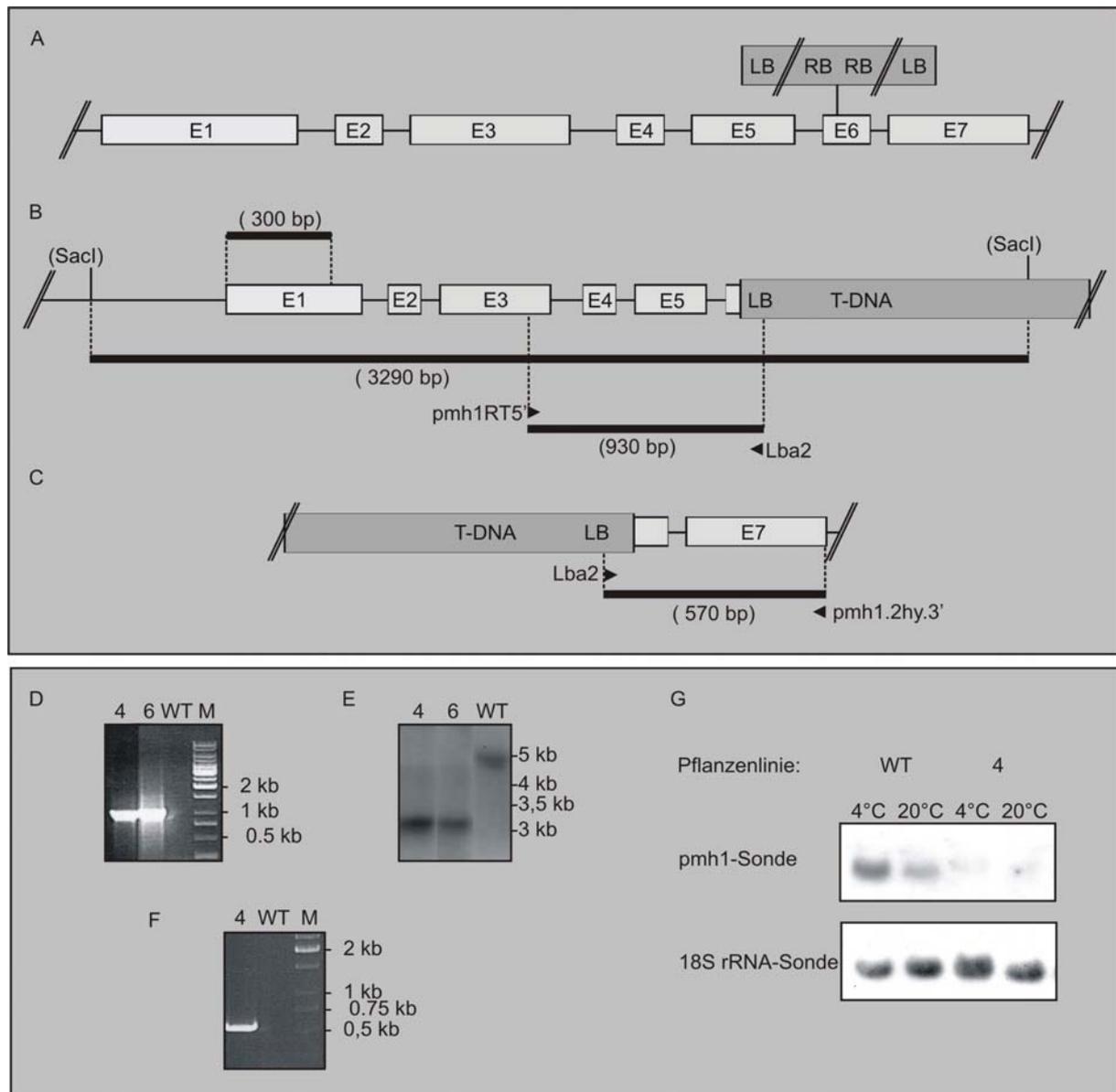


Abbildung 26: Molekulare Analyse der T-DNA-Integration in das Atpmh1-Gen. A: Struktur des Atpmh1-Gens. Der Ort der T-DNA-Integration in Exon 6 ist eingezeichnet. B: Struktur des 5'-Teils des Atpmh1-Gens mit der ersten T-DNA-Integration. C: Struktur des 3'-Teils des Atpmh1-Gens mit der zweiten T-DNA-Integration. Primer sind als Pfeilspitzen dargestellt. Die Lage und Größe von PCR-Produkten, Restriktionsfragmenten und Sonden sind durch schwarze Balken angegeben. D: PCR mit Primern pmh1RT5' und Lba2. E: Southern-Blot-Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde (300 bp). F: PCR mit den Primern pmh1.2hy3' und Lba2. G: Northern-Blot-Analyse.

Die Pflanzenlinie sollte nun auf einen veränderten Phänotyp hin untersucht werden. Dazu wurden zuerst Samen der Linie 4 und Wildtyp-Samen im Vergleich unter verschiedenen Bedingungen angezogen. Es war jedoch bis zum Abschluss dieser Arbeit noch keine

Veränderung im Phänotyp der *Atpmh1*-Knock-out-Pflanzen identifiziert worden. Untersucht wurde das Wachstum auf vertikal stehenden MS-Agar-Platten (Abbildung 27 A), eine Methode, bei der Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit und Orientierung von Keimlingen besonders gut beobachtet werden können. Auch bei der Anzucht unter Langtag- und Kurztagbedingungen (Abbildung 27 B und C) zeigten sich keine Unterschiede.

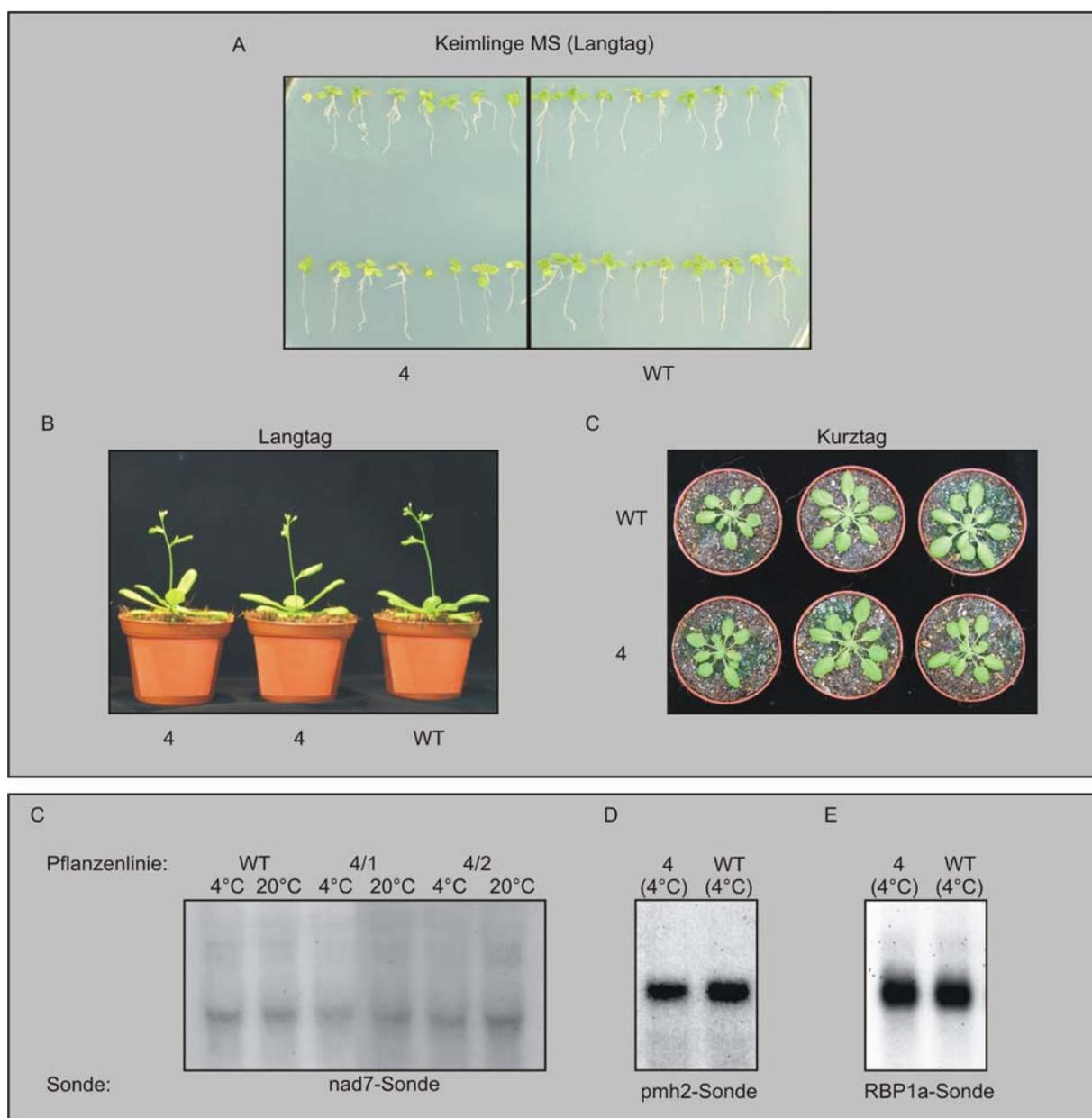


Abbildung 27: Phänotypische und molekulare Analyse einer *Atpmh1*-Knock-out-Linie. A, B und C: Phänotypische Analyse von *Atpmh1* T-DNA-Insertionsmutanten der Linie 4 im Vergleich zum Wildtyp. A: Samen beider Genotypen wurden auf MS-Agar-Platten ausgebracht und diese Platten vertikal unter Langtagbedingungen kultiviert. B: Samen beider Genotypen wurden einzeln auf Erde ausgebracht und unter Langtagbedingungen angezogen. C: Samen beider Genotypen wurden einzeln auf Erde ausgebracht und unter Kurztagbedingungen angezogen. D, E und F: Northern-Blot Hybridisierungen von Wildtyp-, und *Atpmh1* 4-Gesamt-RNA mit verschiedenen Sonden zur Identifikation eines molekularen Phänotyps.

Da die Northern-Blot-Analyse ergeben hatte, dass die Transkriptmenge von *Atpmh1* eine Induktion durch Kälte zeigt, wurden verschiedene Versuche unternommen, bei denen die Pflanzen Temperaturen von 4°C ausgesetzt waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Wildtyp und *Atpmh1*-Knock-out-Pflanzen wurden einzeln auf Erde ausgesät und unter Langtagbedingungen mit reduzierter Lichtmenge (70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$) angezogen, bis die Primärfloreszenz nach 3-4 Wochen die ersten offenen Blüten zeigte. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Pflanzen bei 4°C, aber unter gleichen Lichtbedingungen, weiter kultiviert. Beim Wachstum bei 4°C wiesen die Pflanzen beider Genotypen eine Lila-Färbung der Blätter durch Anthocyane auf. Nach einer Woche bei 4°C wurden die Pflanzen wieder auf 23°C transferiert. Bereits 24 Stunden nach dem Transfer hatten sich die Pflanzen beider Genotypen wieder regeneriert. Lässt man die Pflanzen weiter bei 4°C wachsen, wachsen sie extrem langsam und auch gebildete Schoten zeigen die Lila-Färbung durch Anthocyan. Auch hier zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen den Wildtyp-Pflanzen und den *Atpmh1*-Knock-out-Pflanzen. In einem weiteren Versuch wurden Wildtyp und Mutanten 6 Tage vertikal auf MS-Agar-Platten unter Langtagbedingungen angezogen, für 48 Stunden auf 4°C transferiert und dann unter Langtagbedingungen weiter kultiviert. Auch hier zeigte sich im weiteren Wachstum kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (Ergebnis nicht gezeigt). Da *Atpmh1* und *Atpmh2* in ihrer Sequenz eine so starke Ähnlichkeit haben (76% ähnliche Aminosäuren) und zudem in den Northern-Blot-Analysen ein ähnliches Entwicklungs- und Gewebespezifisches Expressionsmuster zeigen, wäre es möglich, dass sie in ihrer Aktivität redundant sind, *Atpmh2* also die Funktion der fehlenden *Atpmh1* übernimmt. Dazu sollte untersucht werden, ob in den *Atpmh1*-Knock-out-Pflanzen eine höhere Menge an *Atpmh2* Transkript vorliegt. Dazu wurde ein Northern-Blot mit Gesamt-RNA von Wildtyp- und *Atpmh1*-Knock-out-Pflanzen (Blüten bei 4°C) mit einer *Atpmh2*-Sonde hybridisiert (Abbildung 27 E). Es zeigten sich keine Unterschiede in der Transkriptmenge. Um zu untersuchen, ob der Abbau oder die Bildung von mitochondrialer RNA durch das Fehlen der *Atpmh1* beeinträchtigt ist, wurde der Northern-Blot mit einer Sonde für das mitochondrial lokalisierte Gen aus der Atmungskette *nad7* hybridisiert (Abbildung 27 D). Auch hier ist kein Unterschied im Transkript von Wildtyp und Mutante zu erkennen. Zuletzt wurde der Northern-Blot mit einer Sonde für das kern-kodierte Gen *RBP1a* hybridisiert (Abbildung 27 F). Das *RBP1a*-Protein ist in Mitochondrien lokalisiert und zeigt RNA-Bindeaktivität. Außerdem weist das *RBP1a*-Transkript eine Kälteinduktion auf (Guerman, B 2004). Das *RBP1a*-Transkript zeigt keine Veränderung in *Atpmh1*-Knock-out-Pflanzen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T-DNA-Integration in Exon 6 bestätigt wurde. Eine homozygote T-DNA-Insertions-Linie für *Atpmh1* wurde etabliert und der Knock-out des *Atpmh1*-Transkriptes gezeigt. Die *Atpmh1*-Mutanten zeigten in den vorgenommenen Untersuchungen, abgesehen von der fehlenden *Atpmh1*-Transkription, keinerlei Abweichung

vom Wildtyp-Phänotyp. Allerdings kann eine weitere, noch nicht identifizierte, Veränderung des Phänotyps nicht ausgeschlossen werden.

4.7 Etablierung eines RNA-Entwindungs-Assays zur Analyse der RNA Helikase-Aktivität

Die konservierten Aminosäure-Motive weisen alle fünf untersuchten Proteine als Helikasen der Superfamilie II aus. Um aber zu untersuchen, ob es sich wirklich um RNA-Helikasen handelt die RNA-RNA-Doppelstränge entwinden können, sollte in dieser Arbeit ein *in vitro*-Entwindungs-Assay etabliert werden. Dazu sollten durch *in vitro*-Transkription zwei RNA-Stränge hergestellt werden, die in der Mitte einen komplementären Sequenzbereich aufweisen. Nach einem Annealing der beiden RNA-Stränge soll das so entstandene teilweise doppelsträngige Substrat in einem *in vitro*-Versuch eingesetzt werden. Die aufgereinigten Helikasen sollen dann auf ihre Fähigkeit untersucht werden, das RNA-RNA-Substrat zu entwinden. Das Prinzip dieses Assays ist in Abbildung 29 C dargestellt. Ist dieser Test etabliert, kann man mit unterschiedlichen Substraten die Helikase-Aktivität näher charakterisieren: Wie lang ist der doppelsträngige Bereich, den die Helikasen noch entwinden können? Brauchen die RNA-Helikasen einzelsträngige 3'- oder 5'-Überhänge, um das Substrat zu binden? Lassen sich Substratspezifitäten oder Vorlieben für bestimmte dNTPs nachweisen?

4.7.1 Klonierung und Herstellung des Substrates für den Entwindungs-Assay

Bei der Etablierung des Assays dienten die Veröffentlichungen von Okanami *et al.*, 1998 und Schneider and Schwer 2001 als Leitfaden. Von Okanami *et al.* wurden zwei Plasmide zur Verfügung gestellt, die nach Restriktion als Template für eine *in vitro*-Transkription dienen. Mit den RNA-Polymerasen SP6 und T7 können davon zwei RNA Stränge transkribiert werden, die 32 und 41 Nukleotide lang sind, und als T7 und SP6 bezeichnet werden. Um die RNA-Stränge später detektieren zu können, wird in der *in vitro*-Transkription radioaktives [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP verwendet. Das Annealing der zwei markierten Einzelstränge führt zu einem Substrat mit einem doppelsträngigen Bereich von 10 bp. Erste Versuche mit diesem Substrat zeigten aber, dass es schon bei geringen Temperaturen in hohem Maße zur spontanen Trennung der Doppelstränge neigte. Um dieses spontane Aufschmelzen zu verhindern, sollte daher für diese Arbeit ein Substrat mit einem längeren komplementären Bereich erstellt werden. Außerdem helfen Analysen mit Substraten die unterschiedlich lange komplementäre Bereiche aufweisen, bei der Charakterisierung der Prozessivität der untersuchten RNA-Helikasen. Eine Skizze, welche die Konstruktion des neuen Substrates verdeutlicht, ist in Abbildung 28 dargestellt.

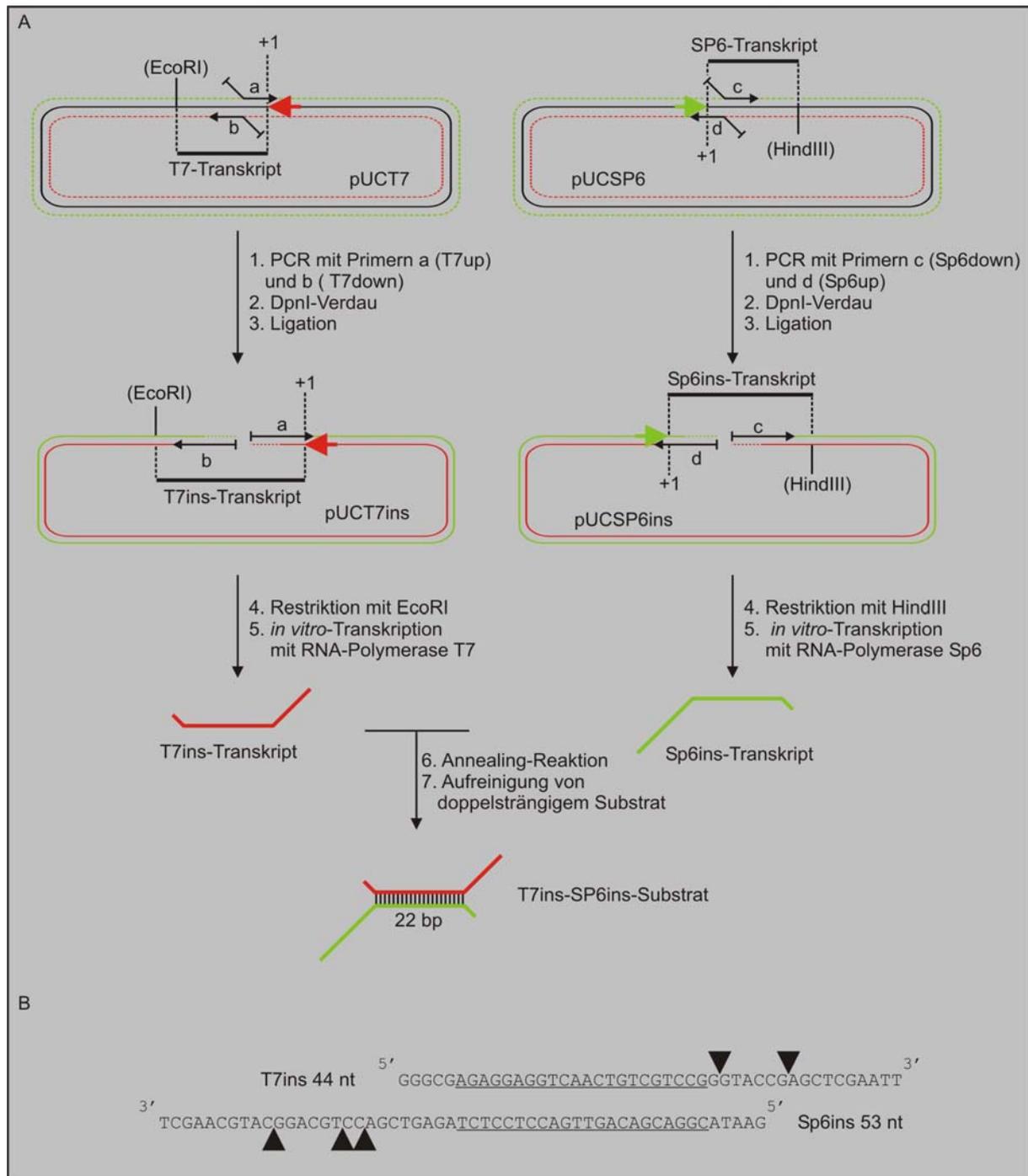


Abbildung 28: Konstruktion des T7ins-SP6ins-Substrates. A: Klonierung und Herstellung des T7ins-SP6ins-Substrates aus den Plasmiden pUCT7 und pUCSP6. Rote und grüne gestrichelte Linien zeigen die durch die Primer amplifizierten Sequenzen. Die Primer sind als schwarze Pfeile dargestellt. Rote und grüne Pfeile stellen den T7-Promotor und den SP6-Promotor dar. Der Transkriptionsstart ist mit +1 gekennzeichnet. Sowohl die ursprünglichen T7- und SP6-Transkripte, als auch die neuen, verlängerten T7ins und SP6ins-Transkripte sind als schwarze Balken eingezeichnet. B: Sequenz der verlängerten T7ins und SP6ins-Transkripte. Der komplementäre Bereich ist unterstrichen. Die schwarzen Pfeilspitzen zeigen an, wo durch Restriktion der Plasmide mit anderen Restriktionsenzymen das Substrat verkürzt werden könnte.

Die beiden vorhandenen Plasmide pUCT7 und pUCSP6 wurden als Template für eine PCR verwendet. In dieser PCR wurde mit den Primer-Paaren T7up/T7down und SP6up/SP6down die gesamte Sequenz der Plasmide amplifiziert (Abbildung 28 A 1.). Die Primer-Paare

enthielten an ihren 5'-Enden zusätzliche Sequenzen, die zur Verlängerung des doppelsträngigen Bereichs im Substrat um 12 bp (6 bp/ Primer) führen. Nach der Amplifikation der Plasmid-Sequenzen wurden die Plasmide pUCT7 und pUCSP6 mit einem DpnI-Verdau zerstört. Durch eine anschließende Ligation der PCR-Produkte entstanden neue Plasmide, welche die zusätzlichen Sequenzen enthalten, und die als pUCSP6ins und pUCT7ins bezeichnet werden. Nach der Vermehrung dieser Plasmide in *E. coli* wurden die neuen Sequenzen mit Sequenzierungen überprüft. Um das neue Substrat zu generieren wurden die Plasmide pUCSP6ins und pUCT7ins mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRI linearisiert. Nach der Restriktion können in einer *in vitro*-Transkription mit den RNA-Polymerasen SP6 und T7 zwei RNA-Stränge von 53 nt und 44 nt Länge hergestellt werden. Nach einer Annealing-Reaktion der beiden Einzelstränge hat das aufgereinigte neue Substrat einen doppelsträngigen Bereich von 22 bp (Abbildung 28 B). Zur Bestimmung der minimalen Länge, die der einzelsträngige Überhang zum Binden der Helikasen benötigt, kann das Substrat später durch Restriktionen an den in Abbildung 28 B mit Pfeilspitzen markierten Stellen verkürzt werden.

4.7.2 Entwindungs-Assay um die Helikase-Aktivität zu untersuchen

Zur Etablierung des Entwindungs-Assays war eine Positiv-Kontrolle nötig. Für die RNA-Helikase Prp22 aus Hefe wurde bereits eine *in vitro*-Entwindungsaktivität gezeigt (Schneider and Schwer 2001). Das in dieser Veröffentlichung beschriebene Überexpressionskonstrukt der Prp22 wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt und die Überexpression und Aufreinigung der Prp22 erfolgte wie dort beschrieben. Zusätzlich sollte eine der mitochondrialen RNA-Helikasen aus Arabidopsis für eine erste Analyse der Entwindungsaktivität aufgereinigt werden. Für das AtSUV3-Protein wurde bereits eine ATPase-Aktivität gezeigt (Gagliardi *et al.*, 1999). Ein entsprechendes Konstrukt des Atsuv3-Leserasters im pet32a-Vektor wurde zur Aufreinigung des AtSUV3-Proteins verwendet. Das Atsuv3pet32a Konstrukt wurde im *E. coli*-Stamm BL21pLysS überexprimiert wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben. Da der pet32-Vektor eine Ampicillin-Resistenz enthält, wurde zur Kultivierung jedoch LB-Medium mit Ampicillin verwendet. Die Aufreinigung des überexprimierten AtSUV3-Proteins erfolgte, da für diesen Versuch aktives Protein nötig ist, aus dem löslichen Überstand, der durch die Zentrifugation des Bakterienlysats nach dem Aufschluss der *E.coli*-Zellen mit Ultraschall entstand (Abschnitt 2.5.1). Das Fusionsprotein, das auf dem Atsuv3pet32-Plasmid kodiert ist, enthält unter anderem einen N-terminalen S-Tag, anhand dessen die Aufreinigung mit dem S-Tag-Purification-Kit erfolgte. Dabei wird der Überstand mit löslichem Protein mit der S-Protein-Agarose inkubiert, die den S-Tag des Fusionsproteins bindet. Durch mehrere Waschschrte wird ungebundenes Protein entfernt.

Danach wird die Protease Enterokinase zugegeben, die das Fusionsprotein zwischen dem S-Tag und der Aminosäuresequenz der AtSUV3 schneidet. Die Enterokinase mit dem gebundenen S-Tag wird durch eine Capture-Agarose aus der Lösung entfernt und es verbleibt das lösliche AtSUV3-Protein ohne den Tag. In Abbildung 27A ist ein Coomassiegefärbtes Gel mit einigen Fraktionen dieser Aufreinigung zu sehen. Das AtSUV3-Protein sollte mit dem S-Tag etwa eine Größe von 85 kDa haben, ohne diesen eine Größe von etwa 60 kDa. Die starke Bande in der Fraktion "induziert" (Abbildung 29 A2) hat eine Größe von 75-85 kDa und wird auch in der S-Tag-Detektion erkannt (Abbildung 29 B2). Auch in der Fraktion "Protein an S-Agarose gebunden" (Abbildung 29 B3) wird ein Protein in der erwarteten Größe erkannt. Nach der Abspaltung des S-Tags kann das rekombinante Protein nicht mehr in der Detektion erkannt werden, aber ein Protein in der erwarteten Größe ist in der Fraktion "Aufgereinigtes Protein" im Coomassie-Gel vorhanden (Abbildung 29 A5). Allerdings sind noch weitere Proteine in dieser Fraktion vorhanden. Für den *in vitro*-Entwindungs-Assay wurden drei Entwindungs-Reaktionen durchgeführt. Eine Negativ-Kontrolle ohne Enzym, eine Positiv-Kontrolle mit 150 ng Prp22-Protein und der Versuchs-Ansatz mit 200 ng Protein aus der AtSUV3-Aufreinigung. Nach der Inkubation des radioaktiv markierten Substrates mit den Proteinen wurden die Ansätze auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 29 D gezeigt. Links von dem entwickelten Film ist durch Skizzen die Lauflänge des Substrates und der Einzelstränge angegeben. In der Fraktion ohne Protein ist das Substrat noch fast komplett doppelsträngig vorhanden. Auch in der Positiv-Kontrolle mit Prp22 ist noch ein Teil des Substrates doppelsträngig, aber der Großteil liegt durch die Entwindungsaktivität der Prp22 in Einzelsträngen vor. In der Fraktion mit AtSUV3-Protein ist ein geringer Teil des Substrates entwunden. Der AtSUV3-Proteinextrakt, der für diesen Versuch verwendet wurde, ist aber zu unrein, um mit Sicherheit die Entwindungs-Aktivität der AtSUV3 zuschreiben zu können. Außerdem fehlt ein Beweis mit einem AtSUV3-Antikörper, dass es sich bei dem Protein in der erwarteten Größe wirklich um AtSUV3 handelt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *in vitro*-Entwindungs-Assay erfolgreich mit dem neu erstellten Substrat etabliert wurde, aber aufgrund der vorliegenden Daten noch keine klare Aussage über eine RNA-RNA-Entwindungs-Aktivität des AtSUV3-Proteins möglich ist.

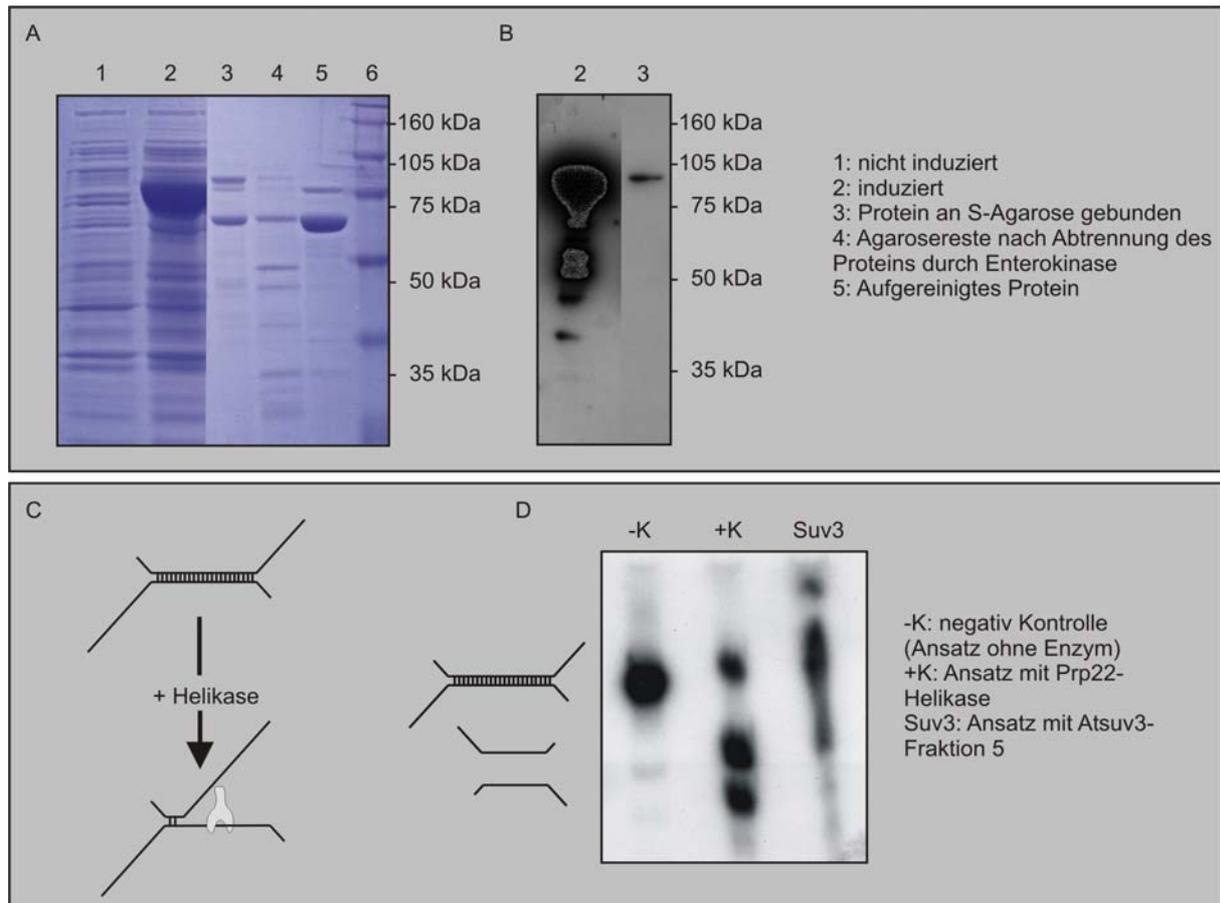


Abbildung 29: Aufreinigung rekombinanten AtSUV3-Proteins und Entwindungs-Assay. A: Polyacrylamidgel mit Fraktionen der Aufreinigung der rekombinanten Atsuv3-Helikase. Das Gel ist mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. B: S-Tag-Detektion in Fraktionen der S-Tag-Aufreinigung der rekombinanten AtSUV3. C: Skizze der Entwindungsaktivität von Helikasen, die im Entwindungs-Assay nachgewiesen wird. D: *in vitro*-Entwindungs-Assay. Die Symbole links vom Ergebnis des Assays zeigen die Laufhöhe des doppelsträngigen Substrates (oben) und der Einzelstränge nach Entwindung (Mitte und unten). Die Negativ-Kontrolle wurde, bis auf das fehlende Enzym, genau wie die beiden anderen Ansätze behandelt.

5. Diskussion

5.1 Mitochondriale RNA-Helikasen in *Arabidopsis thaliana*

In dieser Arbeit wurde eine mitochondriale Lokalisation eines AtPMH3::GFP-Fusionsproteins experimentell gezeigt (Abbildung 3). Damit sind in Mitochondrien von *A. thaliana* mindestens fünf RNA-Helikasen vorhanden. Von den 39 RNA-Helikasen in *Saccharomyces cerevisiae* wurde für drei (Margossian *et al.*, 1996; Seraphin *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 2002), in *Homo sapiens* bisher nur für eine RNA-Helikase (Minczuk *et al.*, 2002) eine mitochondriale Lokalisation beobachtet. Da nicht klar ist, wie viele RNA-Helikasen in den verschiedenen Organismen in den Mitochondrien vorhanden sind, ist unklar ob in *A. thaliana* mit mindestens fünf RNA-Helikasen vergleichsweise viele oder wenige in Mitochondrien lokalisiert sind. Führt man Sequenzvergleiche gegen alle bekannten Proteine aus anderen Organismen durch, so findet sich erwartungsgemäß für alle fünf in dieser Arbeit analysierten RNA-Helikasen ein Homolog im komplett sequenzierten Genom von *Oryza sativa* (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Danach gibt es große Unterschiede zwischen den verschiedenen RNA-Helikasen. So finden sich für AtSuv3 homologe Proteine in Mensch und in Maus und in vielen Fischen und Pilzen. Dies deutet auf eine hochkonservierte Funktion in allen Eukaryoten hin und nicht auf eine Funktion die spezifisch für Pflanzen ist. Alle Proteine die eine hohe Sequenzidentität mit Atmmh und Atpmh3 zeigen, stammen aus Bakterien. Speziell bei Atmmh stammen die Proteine mit den höchsten Sequenzidentitäten aus Purpurbakterien, die als die engsten Verwandten der Mitochondrien gelten (Gray, 1998; Andersson *et al.*, 1998). Daraus könnte man schließen, dass z.B. das Gen für Atmmh-Homologe ursprünglich im mitochondrialen Genom kodiert war und im Laufe der Evolution in das Kern-Genom transferiert wurde.

5.2 Die mitochondrial lokalisierte DEAD-Box RNA-Helikase Atmmh

5.2.1 Atmmh ist wundinduziert und zeigt eine geringe Expression in Wurzeln

In Northern-Blot-Analysen wurde das Atmmh-Transkript in allen untersuchten Geweben in ähnlichen Mengen gefunden (Abbildung 5). Eine Ausnahme bildeten die Wurzeln, in denen nur eine sehr geringe Transkriptmenge detektiert wurde. In diesem Versuch wurde auch eine leichte Kälteinduktion der Atmmh von etwa 50% beobachtet. Bei der Auswertung der Northern-Blot-Analysen zu den Transkriptmengen der Atmmh (und ebenso zu den Transkriptmengen der anderen untersuchten Helikasen) in verschiedenen Geweben war zu

beachten, dass die Ergebnisse aufgrund von zwei Punkten eine leichte Ungenauigkeit aufweisen:

- Es wurde für jedes Gewebe und für den Test auf Kälte-Induktion nur RNA aus einer Präparation untersucht. Die Transkriptmenge eines Gens könnte innerhalb eines Gewebes aber natürlichen Schwankungen unterliegen. Schwankungen bezüglich Lichtstärke, Feuchtigkeit, oder Temperatur, die auch in den verwendeten Klimaschränken vorkommen, könnten einen geringen Einfluss auf die Transkriptmenge haben.
- Die Vermessung der Filmschwärzung mit dem Densitometer weist, bedingt z.B. durch Schwärzungs-Artefakte und Überlappungen der Signale, einen geringen Fehler auf.

Unterschiede zwischen den detektierten Transkriptmengen der verschiedenen Gewebe von bis zu 20% wurden daher nicht als signifikant gewertet. Das heißt z.B. die beobachtete Transkriptmenge von *Atpmh1* lag zwar in Keimlingen um 12% höher als in Wurzeln, (Abbildung 5) aber daraus wurde nicht der Schluss gezogen, dass das *Atpmh1*-Transkript in Keimlingen wirklich häufiger vorkommt als in Wurzeln. Eine Möglichkeit auch geringe Unterschiede in den Transkriptmengen als signifikant zu bestätigen, sind Wiederholungen der Northern-Blot-Analysen mit RNA aus mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten, wodurch die erwähnten geringen Ungenauigkeiten statistisch herausgemittelt würden.

Ein weiterer Ansatz um die Expression der fünf RNA-Helikasen in dieser Arbeit zu untersuchen, war die histochemische β -Glucuronidase-Färbung. Hier wird jedoch nicht die Transkriptmenge, sondern die Promotoraktivität untersucht. Widersprüchliche Ergebnisse der beiden Ansätze weisen somit nicht zwangsweise auf Fehler hin, denn eine geringere Promotoraktivität muss nicht unbedingt auch zu einer niedrigeren Steady-State-Transkriptmenge führen. Eine größere Transkript-Stabilität könnte geringere Promotoraktivitäten ausgleichen. Stimmen die Aussagen der beiden Versuchs-Ansätze jedoch überein, wird das erhaltene Ergebnis dadurch bestätigt. So wird die geringe detektierte Transkriptmenge der *Atmmh* in Wurzeln (Abbildung 10) z.B. durch die fehlende *Atmmh*-Promotoraktivität in der histochemischen β -Glucuronidase-Färbung ergänzt (Abbildung 10). In beiden Analysen wird somit eine geringe bis fehlende Expression der *Atmmh* in Wurzeln beobachtet. Dies ist auffällig, da besonders in den Wurzelmeristemen eine große Anzahl an aktiven Mitochondrien für die Energieversorgung nötig ist. Daher würde man gerade in diesem Gewebe eine stärkere Expression eines mitochondrial lokalisierten Proteins erwarten. Auch in den anderen Geweben, die in beiden Versuchs-Ansätzen analysiert wurden, nämlich Blüten, Blättern und Keimlingen, unterstützen sich die Ergebnisse von Northern-Blot-Analyse und histochemischer β -Glucuronidase-Färbung. Außerdem kann mit der nicht quantitativen histochemischen β -Glucuronidase-Färbung die

Promotoraktivität bis auf wenige Zellen eingegrenzt werden. Die Northern-Blot-Analyse zeigt die Transkriptmenge in gesamten Keimlingen, durch die histochemische β -Glucuronidase-Färbung wird klar, dass die Promotoraktivität auf die Kotyledonen beschränkt ist und weder im Stängel, noch in den Wurzeln der Keimlinge nachzuweisen ist. Die hohe Transkriptmenge in Blüten (Abbildung 5) ist vermutlich vor allem auf die hohe Transkriptionsrate in Pollen und im verwundeten Gewebe an den Schnittstellen zurückzuführen (Abbildung 10). Die Atmmh DEAD-Box RNA-Helikase könnte also wichtig sein für die Entwicklung reifer Pollen. Außerdem zeigt der Atmmh-Promotor Aktivität nach mechanischer Verwundung der Blattspreiten (Abbildung 11). Dies lässt vermuten, dass auch die Promotoraktivität an den Schnittstellen der Stängel von Blättern, Blüten und Schoten auf Wundinduktion beruht (Abbildung 10). Eine *in silico*-Analyse der Atmmh-Promotor-Region zeigte eine W-Box etwa 500 Nukleotide stromaufwärts vom ATG. Eine W-Box ist ein *cis*-Element mit der konservierten Sequenz TTGACC. An diese W-Box binden pflanzen-spezifische Transkriptionsaktivatoren der WRKY-Genfamilie. Für diese Zink-Finger-artigen Proteine wird eine Beteiligung an der Regulation der Verwundungs-Antwort angenommen (Eulgem *et al.*, 2000, Robatzek und Somssich, 2002). Ob die Atmmh zu den WRKY-Regulierten Genen gehört, ist aber unsicher, da solche Gene häufig mehrere W-Boxen in ihrem Promotorbereich enthalten (Eulgem *et al.*, 1999; Maleck *et al.*, 2000). Die genauen Bereiche des Atmmh-Promotors, die für die Induktion durch Verwundung verantwortlich sind, könnten durch histochemische β -Glucuronidase-Assays mit verkürzten Promotorbereichen eingegrenzt werden. So könnte auch analysiert werden, ob die gefundene W-Box an der Induktion der Atmmh-Transkription nach Verwundung beteiligt ist. Die Frage nach der Funktion von Atmmh bei der Verwundungsantwort ist schwer zu beantworten. Für keine bisher bekannte RNA-Helikase wurde eine Beteiligung an der Verwundungsantwort gezeigt. Proteine, die von wundinduzierten Genen kodiert werden, haben eine der folgenden Funktionen (León *et al.*, 2001):

- Reparatur des verletzten Pflanzen-Gewebes.
- Produktion von Substanzen, die das Wachstum von angreifenden Insekten inhibieren.
- Teilnahme an Signalkaskaden, die eine Verteidigung gegen Verwundung aktivieren.
- Anpassen des pflanzlichen Metabolismus an die veränderten Nährstoffansprüche.

Da RNA-Helikasen RNA-RNA-Bindungen entwinden oder RNA-Protein-Bindungen lösen, ist eine direkte Beteiligung an den genannten Vorgängen aber unwahrscheinlich. Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich noch keine bestimmte Funktion der Atmmh im RNA-Metabolismus der Pflanze ableiten.

5.2.2 AtMMH ist möglicherweise mit Membranen assoziiert

Atmmh wurde in dieser Arbeit nicht nur auf der Transkriptebene untersucht, sondern mit dem hergestellten Atmmh-spezifischen Antikörper wurde auch eine Analyse des AtMMH-Proteins begonnen. Mit diesem Antikörper konnte in mitochondrialen Proteinextrakten aus *A. thaliana* mit hoher Wahrscheinlichkeit das Atmmh-Protein detektiert werden (Abbildung 14). Die Fähigkeit des Antikörpers rekombinantes AtMMH-Protein zu erkennen (Abbildung 13) und die Größe des Signals, das in mitochondrialem Proteinextrakt gefunden wurde (Abbildung 14), sind gute Hinweise, dass es sich bei dem detektierten Protein wirklich um AtMMH handelt. Endgültige Sicherheit würde eine Ansequenzierung bringen. Wenn man davon ausgeht, dass es sich um das AtMMH-Protein handelt, weist dessen Detektion in der Membranfraktion nach einem Aufschluss mit Freeze-Thaw darauf hin, dass das AtMMH-Protein in irgendeiner Weise mit der Membran assoziiert ist. Eine Assoziation mit der Membran könnte auch den hohen Grad an Präzipitation des rekombinanten Proteins in wässrigen Lösungen erklären. Die Art dieser Assoziation ist unklar. In *in silico*-Analysen wurden keine transmembranen Helices oder besonders hydrophobe Bereiche identifiziert. Trotzdem könnte AtMMH direkt an die Membran gebunden sein. Da RNA-Helikasen aber häufig mit anderen Proteinen interagieren, ist es wahrscheinlicher, dass das AtMMH-Protein aufgrund seiner Interaktion mit anderen Proteinen mit der Membran assoziiert ist. Dafür spricht auch die geringe Detektion in der S-100-Fraktion (Abbildung 14). Bei der Herstellung von S-100-Proteinextrakt werden keine integralen Membran-Proteine gelöst, aber elektrostatische Wechselwirkungen in Proteinkomplexen werden aufgehoben. AtMMH ist somit vermutlich Teil eines Proteinkomplexes, der an die mitochondriale Membran gebunden ist.

5.2.3 Beobachtungen an transgenen Pflanzen

Für die Analyse der Genfunktion von Atmmh wurden zuerst T-DNA-Mutanten herangezogen. An dieser Stelle sollen daher ein paar Worte zu der Analyse von T-DNA-Mutanten gesagt werden. Die in dieser Arbeit analysierten Mutanten stammen aus großen Kollektionen von T-DNA-Insertions-Mutanten, der Salk-Kollektion (Alonso *et al.*, 2003) und der SAIL-Kollektion der Firma Syngenta (Sessions *et al.*, 2002). Die exakten Vorgänge, die zur Integration von T-DNA-Sequenzen in das Genom von *Arabidopsis thaliana* führen, sind noch nicht aufgeklärt. Allerdings ist klar, dass es bei der Herstellung von T-DNA-Insertions-Kollektionen im Mittel zu 1,5 T-DNA-Integrationen pro Pflanze kommt (Alonso *et al.*, 2003; Sessions *et al.*, 2002). Nicht alle Integrationen führen dabei zu einem Knock-Out des Ziel-Gens, bei Integrationen in Introne, oder die 5'- und 3'-Bereiche kann die Expression der Ziel-Gene trotz T-DNA-Integration weiterhin erfolgen. Zudem kann es bei der Integration zu diversen Sequenzumlagerungen kommen. Verkürzte, Tandem-, Inverted-Repeat- und sogar multiple

Integrationen der T-DNA sind häufig (Castle *et al.*, 1993). Um zu bestätigen, dass ein beobachteter Phänotyp wirklich durch die Insertion in das Ziel-Gen hervorgerufen wird, können folgende Maßnahmen ergriffen werden:

- Die Analyse von anderen Insertions-Mutanten, die eine T-DNA-Insertion im Ziel-Gen aufweisen und die denselben Phänotyp zeigen.
- Die Komplementation des Phänotyps durch Integration eines intakten Allels in eine homozygote T-DNA-Insertions-Mutante.
- Bestätigung einer unterbundenen Expression des Ziel-Gens durch Northern-Blot-Analysen.

5.2.3.1 Die Atmmh T-DNA-Insertionslinie 1 (atmmh-1) bildet ein Atmmh-T-DNA-Hybridtranskript und zeigt keinen veränderten Phänotyp

Die Southern-Blot-Analyse der Atmmh-T-DNA-Insertionslinie atmmh-1 zeigt, dass die Pflanzen 2, 3 und 7 homozygot für die Insertion der T-DNA sind (Abbildung 15). Sowohl in der Hybridisierung mit der T-DNA-spezifischen Sonde als auch in der Hybridisierung mit der gen-spezifischen Sonde zeigen sich zusätzliche Signale. Das zusätzliche Signal bei der Hybridisierung mit der T-DNA-Sonde ist auf eine weitere Insertion der T-DNA in ein anderes Gen oder auf eine Doppelintegration zurückzuführen. Die zusätzlichen Signale in der Hybridisierung mit der gen-spezifischen Sonde könnten durch inkomplette Restriktion der Gesamt-DNA oder durch Kreuzreaktionen der gen-spezifischen Sonde mit anderen Sequenzen entstehen. Die RT-PCR-Analyse der Pflanzen 3 und 7 zeigt, dass trotz der in der Southern-Blot-Analyse gezeigten Homozygotie für die T-DNA Integration in Atmmh ein Atmmh-Transkript gebildet wird (Abbildung 16). Die Analyse dieses Transkriptes zeigte, dass es sich um ein Hybrid-Transkript aus Atmmh-Sequenz und T-DNA-Sequenz handelt. Die Northern-Blot Analyse, die zeigt, dass die Atmmh-Transkriptmenge und -Transkriptlänge in den homozygoten T-DNA-Insertionslinien nicht gravierend vom WT abweichen (Abbildung 16), sind ein guter Hinweis, dass es durch diese T-DNA Integration nicht zu einem Knock-Out der Atmmh kommt. Obwohl die Pflanzen 3 und 7 bei Wachstum unter Langtagbedingungen augenscheinlich keinen veränderten Phänotyp aufweisen, ist es nicht ausgeschlossen, dass es trotzdem zu einem leicht veränderten Phänotyp in diesen Pflanzen kommt. Aufgrund der Ergebnisse aus dem Northern-Blot und der RT-PCR wurde jedoch auf ein aufwendiges Screening nach einer Abweichung vom Wildtyp-Phänotyp verzichtet und angenommen, dass in der Linie atmmh-1 ein zumindest ausreichend funktionales AtMMH-Protein gebildet wird. Daraus könnte man schließen, dass die C-terminalen 10 Aminosäuren der AtMMH, die in atmmh-1 fehlen, für die Aktivität des Proteins unwichtig sind.

5.2.3.2 Die Atmmh T-DNA-Insertionslinie 2 (atmmh-2) zeigt Embryo-Letalität

Die Analyse des Genotyps der Atmmh T-DNA-Insertionslinie atmmh-2 wurde mit PCR-Analysen durchgeführt. Eine PCR mit einem gen-spezifischen Primer und einem Right-Border-spezifischen Primer ergab dabei kein Produkt. Bei der Integration der T-DNA kommt es häufig dazu, dass anstelle der Right-Border eine weitere Left-Border Sequenz gefunden wird, was auf eine Doppel-Integration der T-DNA als Inverted-Repeat hindeutet (Castle *et al.*, 1993). Auch für atmmh-2 wird ein ähnlicher Fall vermutet. Die Integration in das Intron zwischen Exon 7 und Exon 8, vielleicht sogar als Doppelintegration, macht einen totalen Knock-Out des Atmmh-Gens viel wahrscheinlicher als die Lokalisation der Integration in den atmmh-1-Pflanzen. Das Ergebnis, dass alle untersuchten Pflanzen heterozygot, oder in Bezug auf die T-DNA Integration in das Atmmh-Gen Wildtypen sind, stützt sich auf die Aussagen der PCR-Analyse mit zwei gen-spezifischen Primern und einem gen-spezifischen und einem Left-Border-spezifischen Primer (Abbildung 17). Die aus diesem Ergebnis gefolgerte Annahme, dass ein homozygoter Knock-Out des Atmmh-Gens embryoletal ist, wird durch das klare Ergebnis der Samenzählung unterstützt. Bei allen untersuchten Pflanzen zeigte sich eine Verteilung von 25% leeren Samen und 75% intakten Samen (Abbildung 18). Atmmh ist also ein essentielles Gen. Eine nähere Betrachtung der leeren Samen hilft bei der Eingrenzung, in welchem Stadium der Samenentwicklung es zum Abort kommt. In Meinke (1994), ist beschrieben, dass unbefruchtete Samenanlagen bis zur Reife der Schoten weiß bleiben. Im Gegensatz dazu zeigen Samen, bei denen es zu einem Stop in der Entwicklung des frühen Embryos kommt, bei der Reifung der Schote eine braune Färbung. Die ausgezählten leeren Samen von atmmh-2 zeigen alle ein verschrumpeltes Aussehen und sind deutlich braun gefärbt. Es handelt sich somit tatsächlich um Embryoletalität. Es ist aufgrund der Beobachtung der leeren Samen sogar möglich, das embryonale Stadium, in welchem der Abort passiert, genauer einzugrenzen. Normale Samen bleiben während ihrer Entwicklung weiß gefärbt bis zum späten globulären Stadium, danach färben sich sowohl die Samenhülle als auch der Embryo leicht grün. Nach dem Torpedo-Stadium ist der Embryo komplett grün (Meinke, 1994). Eine Beobachtung der Samen heterozygoter atmmh-2 Pflanzen zeigt, dass die leeren Samen weiß bleiben bis sie anfangen zu schrumpeln und sich braun zu färben. Vermutlich passiert der Stop der Embryo-Entwicklung bei homozygoten Samen somit bereits vor dem Herz-Stadium.

5.2.3.3 Bei den Atmmh RNAi-Linien ist der RNAi-Effekt nicht ausreichend, um einen veränderten Phänotyp zu bewirken

Das System der RNA-Interferenz wurde bisher vor allem in Nematoden zur gezielten posttranskriptionellen Gen-Stilllegung verwendet. Die Veröffentlichung von Wesley *et al.* (2001) analysiert, welche Art von Konstrukt in *Arabidopsis* am effizientesten zu einem RNAi-Effekt

führt. Die besten Resultate wurden mit Konstrukten erzielt, die aus einem Inverted-Repeat bestanden, das durch ein Intron getrennt ist. Nach der Transkription bildet sich daraus eine Haarnadelstruktur, die Teile der Sequenz des Ziel-Gens enthält. In der erwähnten Veröffentlichung wurden effizient RNAi-Effekte erzielt mit Sequenzen aus dem Ziel-Gen von 120 bp Länge. Außerdem wurden mit Sequenz-Fragmenten von 50-1000 bp erfolgreich Gene stillgelegt (Helliwell und Waterhouse, 2003). Das in dieser Arbeit verwendete mmh-Konstrukt enthielt 300 bp des Ziel-Gens und besteht aus der erwähnten Inverted-Repeat-Struktur mit einem Intron dazwischen. Dieses RNAi-Konstrukt bietet somit gute Voraussetzungen für eine Unterdrückung der Expression des Ziel-Gens *Atmmh*. Bei der Herstellung eines RNAi-Konstruktes kann es aufgrund der Inverted Repeat-Struktur zu Umlagerungen innerhalb des Moleküls kommen. Eine genaue Überprüfung des fertigen Konstruktes auf Korrektheit ist daher nötig. Die Überprüfung des fertigen RNAi-Konstruktes für das *Atmmh*-Gen wurde mit PCR-Analysen und einem Restriktionsverdau durchgeführt (Abbildung 19). Eine Sequenzierung des gesamten Bereiches zwischen Left-Border und Right-Border hätte zu einer 100% Sicherheit geführt, aber die Sequenzierung des Konstruktes erwies sich, vermutlich aufgrund der Inverted Repeat-Struktur oder aufgrund der Sequenz-Wiederholungen in den "attachment sites", als nicht möglich. Trotzdem kann aufgrund der durchgeführten PCR-Analysen und des Restriktionsverdaus eine Umlagerung im Molekül ausgeschlossen werden. Zusammen mit der PCR-Analyse der transformierten Pflanzen konnte eine Integration des korrekten RNAi-Konstruktes in die untersuchten Arabidopsis-Pflanzen bestätigt werden. Es kommt aber aufgrund dieser Integration in den untersuchten Pflanzen nicht zu einer effektiven post-transkriptionellen Gen-Stilllegung der *Atmmh*. Die Zusatzbanden (Abbildung 20), die in keiner anderen Northern-Blot-Analyse mit einer *Atmmh*-Sonde gefunden wurden, sind vermutlich auf eine Detektion des transkribierten RNAi-Konstruktes zurückzuführen. Das RNAi-Konstrukt wird also vermutlich transkribiert und ein Hinweis auf einen vorhandenen RNAi-Effekt ist, dass alle untersuchten Linien in der Northern-Blot-Analyse eine geringere *Atmmh*-Transkriptmenge als der Wildtyp aufweisen (Abbildung 20). Aber das bisher erreichte Maß an Unterdrückung der *Atmmh*-Expression ist nicht ausreichend, um zu einer offensichtlichen Abweichung vom Wildtyp-Phänotyp zu führen. Nachkommen der untersuchten Pflanzen sollten daraufhin untersucht werden, ob es bei ihnen zu einem stärkeren RNAi-Effekt kommt. Dies sollte auch mit der Detektion von kleinen (21 nt) RNAs bestätigt werden, die bei der posttranskriptionellen Genstilllegung entstehen. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse mit Pflanzen der Linie *atmmh-2* ist es wahrscheinlich, dass die Abwesenheit von *Atmmh* zu Fehlern bei der Embryonal-Entwicklung führt. Bei einem stärkeren RNAi-Effekt ist somit zu erwarten, dass die Pflanzen eine offensichtliche Abweichung vom Wildtyp-Phänotyp zeigen. Bisher konnten mit den

RNAi-Linien keine Ergebnisse erzielt werden, die bei der Aufklärung der Atmmh-Funktion helfen.

5.2.3.4 Atmmh-Flag-Linien zeigen einen veränderten Phänotyp durch Überexpression von Atmmh

Die Pflanzen mit dem Atmmh-Flag-Konstrukt wurden ursprünglich erstellt, um eine Aufreinigung von Protein-Komplexen mit dem AtMMH-Protein aus Pflanzen zu ermöglichen und die weiteren Komponenten dieser Komplexe zu identifizieren. Als bei vielen der Atmmh-Flag-Linien der auffällig veränderte Phänotyp mit den kurzen Schoten und der geringen Anzahl an Samen beobachtet wurde, wurde dieser Phänotyp näher charakterisiert. Der Zusammenhang zwischen verringerter Samenanzahl und dem Vorhandensein des Atmmh-Flag-Konstruktes ist klar belegt, denn außer der Linie 8/3, die das Konstrukt enthält, aber eine kaum verringerte Samenanzahl pro Schote aufweist, zeigen die anderen 7 Linien mit dem Konstrukt eine deutlich verringerte Samenanzahl (Abbildung 23). Damit ist ausgeschlossen, dass der Phänotyp durch die Integration des Konstruktes in ein anderes Gen hervorgerufen wird. Unklar ist jedoch, weshalb das Konstrukt den veränderten Phänotyp hervorruft. Drei Möglichkeiten sind denkbar:

1. Durch den Flag-Tag am C-Terminus des AtMMH-Flag-Proteins könnte die Helikase-Aktivität des AtMMH-Proteins oder seine Interaktion mit anderen Proteinen gestört sein.
2. Durch die Expression des Atmmh-Flag-Konstruktes kommt es in der Zelle zu einer erhöhten Menge an AtMMH-Protein.
3. Die Transkription des Atmmh-Flag-Konstruktes führt durch Co-Suppression zu einer verringerten Menge an AtMMH-Protein in der Zelle.

Gegen die Möglichkeit, dass der Flag-Tag selbst für den veränderten Phänotyp verantwortlich ist, sprechen seine geringe Größe, die vielen erfolgreichen Anwendungen mit anderen Proteinen und die Tatsache, dass die Aminosäure-Motive, die für die Helikase-Aktivität verantwortlich sind, im mittleren Bereich des Proteins liegen. Ein weiterer Hinweis gegen einen störenden Einfluss des Flag-Tag sind die Erfahrungen mit der Linie atmmh-1. Bei dieser Linie weichen, wie bei der Atmmh Flag-Tag-Linie, die C-Terminalen 10 Aminosäuren vom Wildtyp-Protein ab, ohne dass die Pflanzen eine offensichtliche Abweichung vom Wildtyp-Phänotyps zeigten. Die durchgeführte Northern-Blot-Analyse zeigt, dass in den Atmmh-Flag-Pflanzen eine erhöhte Menge an Atmmh-Transkript vorliegt (Abbildung 25). Dadurch wird eine Co-Suppression als Auslöser des veränderten Phänotyps ausgeschlossen. Der veränderte Phänotyp entsteht mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Überexpression des AtMMH-Proteins. Das die Linie 8/3 beinahe den Wildtyp-Phänotyp zeigt, wurde vernachlässigt, da sie die geringste Erhöhung an Atmmh-Transkriptmenge aufweist (Abbildung 25). Der veränderte Phänotyp in den Atmmh-Flag-Linien zeichnet sich durch eine

geringere Samenanzahl pro Schote und eine geringere Schotenlänge aus (Abbildung 23, 24). Die geringere Samenanzahl kommt nicht durch einen frühen Stop in der Embryonalentwicklung zustande, sondern durch fehlende Befruchtung. Dies zeigt die Betrachtung der *Atmmh*-Flag-Schoten, denn unbefruchtete Ovulen bleiben weiß, anstatt sich gegen Ende der Schoten-Reifung braun zu färben (Meinke 1994). Die fehlende Elongation der Schoten ist eine direkte Folge der fehlenden Befruchtung. Schoten beginnen sich innerhalb von 24 Stunden nach der Befruchtung zu verlängern und erreichen nach abgeschlossener Reifung eine maximale Länge von 1,6 cm. Schoten mit einer geringeren Anzahl an befruchteten Samen bleiben erheblich kürzer und Schoten mit ausschließlich unbefruchteten Samenanlagen erreichen nur eine Länge von maximal 3,5 mm (Meinke und Sussex, 1979). Unklar ist aber, in welcher Weise die Überexpression von *Atmmh* zu Fehlern bei der Befruchtung führt.

5.2.4 Überlegungen zu der Funktion von *Atmmh* im RNA-Metabolismus von Mitochondrien

Zum Schluss bleibt die Frage, ob man aus den gesammelten Ergebnissen zur *Atmmh* bereits auf ihre Funktion im RNA-Metabolismus der Pflanzenzelle rückschließen kann. Diese Frage ist gerade bei RNA-Helikasen besonders schwer zu beantworten, da sie aufgrund ihres weiten Wirkungsspektrums am Abbau, Aufbau oder an der Prozessierung von RNA beteiligt sein können. Sie können RNA-RNA-Doppelstränge oder RNA-Protein-Interaktionen trennen. Die Frage nach der Funktion der *Atmmh* kann daher aufgrund der bisher gesammelten Ergebnisse noch nicht beantwortet werden. Allerdings können bereits einige grundlegende Vermutungen angestellt werden:

- *AtMMH* ist am RNA-Metabolismus in Mitochondrien beteiligt, da sie mitochondrial lokalisiert ist.
- Eine Assoziation an die Membran, vielleicht durch Interaktion mit anderen Proteinen, ist sehr wahrscheinlich aufgrund der Detektion von *AtMMH*-Protein in der mitochondrialen Membranfraktion. Aufgrund ihrer fehlenden intrinsischen Substrat-Spezifität wird vermutet, dass RNA-Helikasen meist in Komplexen mit anderen Proteinen vorliegen. Auch die Ablagerung in "inclusion bodies", die das rekombinante Protein in *E.coli* zeigt, könnte darauf hinweisen, dass dem *AtMMH*-Protein in *E.coli* die Bindung an die Membran und die interagierenden Proteine fehlen.
- Das *Atmmh*-Transkript ist in allen untersuchten Geweben nachgewiesen worden. Dieser Nachweis und die Promotoraktivität in Pollen, jungen Keimlingen und nach mechanischer Verwundung könnte auf eine generelle Induktion in Geweben hinweisen, in denen eine hohe Anzahl an Mitochondrien und mitochondrialer

Aktivität nötig ist. Die fehlende Promotoraktivität und geringe Transkriptmenge in Wurzeln, auch nach mechanischer Verwundung, spricht aber gegen eine solche generelle Induktion, denn gerade in Wurzelmeristemen sind besonders viele Mitochondrien vorhanden. Eine mögliche Erklärung ist die Beteiligung der Atmmh an der RNA-Degradation. Dies würde eine große Menge dieser RNA-Helikase möglicherweise gerade dann erfordern, wenn eine hohe mitochondriale Aktivität nicht mehr nötig ist, z.B. in Keimlingen die ihre Energie vermehrt aus der Photosynthese gewinnen. Abgesehen davon ist zwar die mitochondriale Lokalisation des AtMMH-Proteins belegt, aber eine zusätzliche Lokalisation in anderen Zell-Kompartimenten ist nicht ausgeschlossen. Würde z.B. eine große Menge an AtMMH-Protein in die Chloroplasten importiert, so würde dies die starke Expression in Keimlingen und jungen Blättern und die geringe Transkriptmenge in Wurzeln erklären. Lokalisationsversuche mit einem Fusionsprotein aus der gesamten AtMMH-Sequenz mit dem GFP könnten Aufschluss über einen möglichen zusätzlichen Import in Chloroplasten geben.

- Sowohl ein Mangel an Atmmh wie in der T-DNA-Insertionslinie *atmmh-2*, als auch ein Überangebot an Atmmh wie in den Atmmh-Flag-Pflanzen hat verheerende Wirkung auf die Fortpflanzung von *A. thaliana*. Die hohe Promotoraktivität in Pollen könnte darauf hinweisen, dass Atmmh eine Aufgabe bei der Entwicklung des männlichen Gametophyten spielt. Allerdings könnte damit nicht die Embryoletalität eines Atmmh-Knock-Out erklärt werden. Außerdem zeigen Mutanten, bei denen die Entwicklung des männlichen Gametophyten gestört ist, meist eine Transmissionsrate die von der Mendel-Verteilung abweicht. Durch das massive Überangebot von Pollen gegenüber Samenanlagen, sind genug gesunde Pollen für die Befruchtung vorhanden. Die exakten 25% leere Samen, die in den Schoten von heterozygoten *atmmh-2*-Pflanzen gefunden wurden (Abbildung 18), und die Embryoletalität an sich, sprechen somit gegen eine Störung in der Entwicklung des männlichen Gametophyten. Ein Defekt in der Entwicklung des weiblichen Gametophyten könnte dagegen die veränderten Phänotypen der *atmmh-2*-Pflanzen und der Atmmh-Flag-Linien erklären. Die Embryoletalität ließe sich durch ungenügende Energieversorgung des Embryos erklären und die fehlende Befruchtung z.B. durch einen Fehler bei der Leitung der Pollenschläuche. Die Pollenschläuche wachsen durch den Transmissionstrakt ohne Beteiligung des weiblichen Gametophyten, aber für das Wachstum entlang des Funiculus und in die Mikropyle sind Signale aus den Synergiden-Zellen nötig (Higashiyama *et al.*, 2003). Histochemische β -Glucuronidase Assays zeigen allerdings keine Promotoraktivität während der Entwicklung des weiblichen

Gametophyten. Wie könne diese Vorgänge aber durch eine zu hohe, bzw. zu geringe Menge einer mitochondrialen RNA-Helikase ausgelöst werden? Dies ist nicht leicht zu beantworten, da über die genetischen und molekularen Vorgänge, die die Entwicklung des weiblichen Gametophyten steuern sehr wenig bekannt ist. Ebenso unklar ist, ob die Entwicklung und die Physiologie primär vom haploiden oder vom diploiden Genom gesteuert werden (Christensen *et al.*, 2002). Theoretisch könnte es bei einer Beteiligung von Atmmh an der RNA-Degradation durch den Atmmh-Knock-Out zur Anhäufung bestimmter Transkripte oder toxischer Introne kommen, die schließlich zu einer reduzierten metabolischen Aktivität der Mitochondrien und zu einer Unterversorgung des Embryos führt. Die fehlende Befruchtung in Atmmh-Flag-Pflanzen lässt sich dadurch allerdings nicht erklären. Der Einfluss auf den weiblichen Gametophyten wurde in *A. thaliana* für das mitochondriale Protein GFA2 untersucht (Christensen *et al.*, 2002). Bei GFA2 handelt es sich um ein Chaperon-Protein, dessen Knock-Out den programmierten Zelltod einer der Synergiden-Zellen verhindert. Samenanlagen in diesen Pflanzen zeigen keine Anzeichen von Befruchtung. Die Autoren vermuten, dass die Abwesenheit des Chaperons GFA2 zu Fehlfaltungen von Proteinen kommt, die für den programmierten Zelltod der Synergide wichtig sind. Könnte ein Atmmh-Knock-Out oder die Atmmh-Überexpression theoretisch ähnliche Auswirkungen haben? Für Mitochondrien in Pflanzen wird eine Beteiligung am programmierten Zelltod stark angenommen (Christensen *et al.*, 2002; Balk und Leaver, 2001; Yao *et al.*, 2004). Ähnlich wie in Säugerzellen ist dabei vermutlich die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien nötig (Balk und Leaver, 2001; Sun *et al.*, 1999). Theoretisch könnte eine RNA-Helikase durch den Einfluss auf die Gen-Expression in Mitochondrien, z.B. auf die Gene der Cytochrom C-Biogenese, auch Auswirkungen auf den Zelltod haben. Auch erhöhte Mengen an reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) können den Zelltod auslösen. Da ROS in hohem Maße in Mitochondrien anfallen, könnten auch dabei mitochondriale Proteine einen Einfluss haben.

5.3 Die mitochondrial lokalisierten DEAD-Box RNA-Helikasen Atpmh1 und Atpmh2

5.3.1 Atpmh1 und Atpmh2 zeigen zum Teil ähnliche Expressionsmuster und beide sind kälteinduziert

Atpmh1 und Atpmh2 zeigen in den Northern-Blot-Analysen ähnliche Ergebnisse (Abbildung 5): Beide weisen eine Induktion der Transkriptmenge nach Inkubation bei 4°C auf und beide

zeigen bei 23°C die höchste Transkriptmenge in Blüten-Gewebe. Allerdings ist die Kälteinduktion von *Atpmh1* wesentlich stärker (6x) als bei *Atpmh2* (2,5x). Es könnte aber sein, dass sich die absolute Transkriptmenge nach Kälteinduktion bei beiden nicht stark unterscheidet. Dies könnte der Fall sein, wenn das *Atpmh2*-Transkript bei 23°C bereits in größerer Menge vorliegt als das *Atpmh1*-Transkript. Im Gegensatz zu den Ähnlichkeiten in den Northern-Blot-Analysen zeigen sich in den histochemischen GUS-Färbungen große Unterschiede zwischen *Atpmh1* und *Atpmh2*. Zwar zeigen beide eine hohe Promotoraktivität in Pollen (Abbildung 10), aber ansonsten zeigt *Atpmh1* nur noch eine Promotoraktivität in Wurzelspitzen von Keimlingen, die auf MS-Agar angezogen wurden (Abbildung 9). Wurzeln von Keimlingen die auf Erde angezogen wurden zeigen keinerlei Promotoraktivität. Diese unterschiedlichen Promotoraktivitäten könnten durch die unterschiedliche mechanische Behandlung der Keimlinge vor der Färbung zustande kommen. So müssen die Keimlinge die auf Erde angezogen wurden vor der Färbung von der Erde befreit werden, während die Keimlinge von MS-Agar direkt in die Färbelösung transferiert werden können. Möglicherweise ist die Aktivität des *Atpmh1*-Promotors auf MS-Agar aber auch ein Hinweis auf eine Regulation der *Atpmh1*-Transkription durch äußere Faktoren sein, z.B. durch die in MS-Agar enthaltene Kohlenstoffquelle Saccharose. So wurde z.B. für die cyanobakterielle DEAD-Box RNA-Helikase *CrhR* eine Transkriptakkumulation als Reaktion auf Glucose im Medium gezeigt (Kujat und Owtrim, 2000). In Blättern und Schoten zeigt *Atpmh1* keine Aktivität (Abbildung 10). *Atpmh2* hingegen zeigt starke Promotoraktivität in Keimlingen (Abbildung 9), Wurzeln (Abbildung 10) und in Blättern als Folge von mechanischer Verwundung (Abbildung 11). Wie sind die unterschiedlichen Beobachtungen zu *Atpmh1* in den beiden Versuchsansätzen erklärbar? Eine Möglichkeit ist, dass die Transkriptstabilität von *Atpmh1* sehr hoch ist, und so die Transkripte trotz kaum vorhandener Promotoraktivität nachweisbar sind. Als Schlussfolgerung ist zum einen zu erwähnen, dass das *Atpmh2*-Transkript in allen Geweben vorhanden ist, in denen *Atpmh1* vorliegt. Umgekehrt ist aber das *Atpmh1*-Transkript, schon aufgrund der fehlenden Wundinduktion, nicht in allen untersuchten Geweben vorhanden in denen *Atpmh2* vorliegt. Des Weiteren könnten die Ergebnisse ein Hinweis sein, dass *Atpmh1* in der Zelle in wesentlich geringerer Menge vorliegt als *Atpmh2*. Die Detektion von AtPMH2-Protein, nicht aber von AtPMH1-Protein, in mitochondrialem Proteinextrakt (Millar *et al.*, 2001, siehe auch Abschnitt 4.2.3) unterstützt diese Vermutung.

In dieser Arbeit konnte sowohl für *Atpmh1* als auch für *Atpmh2* eine Kälte-Induktion der Transkriptmenge nachgewiesen werden. Diese Induktion ließ sich bei Keimlingen, die auf MS-Agar-Platten (Abbildung 5) und bei Keimlingen, die auf Erde (Abbildungen 6 und 7) wuchsen, nachweisen. Eine Kälteinduktion von *Atpmh1* und/oder *Atpmh2* wurde auch in zwei Veröffentlichungen mit Microarray-Analysen beobachtet (Fowler und Thomashow,

2002; Vogel *et al.*, 2005). Eine Unterscheidung von *Atpmh1* und *Atpmh2* ist allerdings bei beiden verwendeten Affymetrix GeneChips nicht möglich, da die kurzen Sequenzabschnitte die als Sonden verwendet wurden in Bereichen hoher Sequenzidentität von *Atpmh1* und *Atpmh2* liegen. In der Veröffentlichung von Fowler und Thomashow (2002) wurde mit einem Affymetrix GeneChip eine mögliche Kälteinduktion von 8.000 Genen von *A. thaliana* untersucht. Die RNA-Proben wurden 0,5, 1, 4, 8, 24 und 168 Stunden nach dem Transfer auf 4°C entnommen und für *Atpmh1/2* wurde ausschließlich nach 24 Stunden eine Kälteinduktion um den Faktor 5 gefunden. In der Veröffentlichung von Vogel *et al.* (2005) wurde eine Microarray-Analyse der Transkriptmengen von 24.000 Genen von *A. thaliana* beschrieben. Gesamt-RNA von 10 Tage alten Keimlingen die auf Erde, oder auf MS-Agar-Platten wuchsen, wurde mit dem Affymetrix GeneChip auf Induktion durch Kälte analysiert. Die Inkubationszeiten bei 4°C waren 1 Stunde, 24 Stunden oder 7 Tage. Bei diesem Experiment zeigte sich für *Atpmh1/2* nach 24 Stunden Inkubation bei 4°C eine Zunahme der Transkriptmenge um den Faktor 3,5 für Keimlinge auf Platte und um den Faktor 2 für Keimlinge auf Erde. Bei einer Stunde Inkubation bei 4°C konnte in diesem Versuch noch keine Induktion festgestellt werden und nach 7 Tagen bei 4 °C zeigte sich noch eine Transkriptmenge die etwa um den Faktor 1,5 höher war als vor der Kälteinduktion. Alle Versuche stimmen darin überein, dass die Kälteinduktion von *Atpmh1* und *Atpmh2* nach 24 Stunden Inkubation bei 4°C am stärksten ist. Die in dieser Arbeit detailliert untersuchte Kälteinduktion von *Atpmh1* und *Atpmh2* wurde somit auch in anderen Experimenten beobachtet (Fowler und Thomashow, 2002; Vogel *et al.*, 2005). Wie kommt es nun zu dieser Induktion durch Kälte? Eine Möglichkeit ist die Induktion auf transkriptioneller Ebene. Analysen der Promotorsequenzen von *Atpmh1* und *Atpmh2* zeigen unterschiedliche konservierte Sequenzen, die eine Rolle bei deren Kälte-Induktion spielen könnten. So enthält *Atpmh1* die putative ICE-("Inducer of CBF Expression")-Sequenz ACATntg gleich zweimal. Der Promotor-Bereich von *Atpmh2* enthält hingegen eine andere konservierte Sequenz, die als C-Repeat (CRT) bekannt ist und in vielen kälte-induzierten Genen vorkommt. Eine Regulation der Kälte-Induktion auf transkriptioneller Ebene ist somit für *Atpmh1* und *Atpmh2* sehr wahrscheinlich, wobei es sich um verschiedene Transkriptionsaktivatoren handeln würde. Eine genauere Beschreibung der erwähnten Promotorelemente findet sich weiter unten. Allerdings kann auch eine Regulation der Induktion auf post-transkriptioneller Ebene, z.B. über die Transkript-Stabilität, nicht ausgeschlossen werden. Unabhängig davon, wie es zu der höheren Transkriptmenge nach Inkubation bei 4°C kommt, stellt sich aber auch die Frage, welche Rolle zwei mitochondrial lokalisierte Helikasen in der Anpassung der Pflanzen an Kälte spielen könnten. Dazu muss hier eine kurze Beschreibung des derzeitigen Wissens über die Anpassung der Pflanzen an Kälte eingefügt werden. Eine genauere Übersicht über den derzeitigen Wissensstand gibt die Veröffentlichung von Thomashow (1999). Transferiert

man Pflanzen von 23°C direkt auf Temperaturen unter 0°C, so sterben die Meisten bereits nach kurzer Zeit. Werden die Pflanzen aber dazwischen für einige Zeit bei Temperaturen, die etwas über dem Gefrierpunkt liegen (z.B. 4°C) inkubiert, so können sie danach Temperaturen unter 0°C für längere Zeit unbeschadet überstehen. Dieser Vorgang der Anpassung wird als Kälte-Akklimatisierung bezeichnet. Dieser Vorgang wird mit großer Anstrengung erforscht, denn besonders für die Landwirtschaft wären Möglichkeiten Nutzpflanzen bei geringeren Temperaturen erfolgreich zu kultivieren von hohem Nutzen. Von den Möglichkeiten der Pflanze sich an Kälte anzupassen sind einige bekannt:

- Änderungen in der Lipid-Zusammensetzung der Membran.
- Akkumulation von Zuckern als Gefrierschutz.
- Da es Hinweise gibt, dass reaktive Sauerstoff Verbindungen (ROS) zur Membranschädigung beitragen, könnten antioxidative Mechanismen dagegen helfen (McKersie und Bowley, 1997).
- Die Induktion von COR ("cold-regulated")-Genen verstärkt die Toleranz der Pflanzen gegenüber Temperaturen unter dem Gefrierpunkt. COR-Gene codieren kleine Proteine, die sehr hydrophil sind. Noch gibt es nur Theorien ob und auf welche Weise sie die Membranen stabilisieren (Steponkus *et al.*, 1998).
- Chaperone sollen die Denaturierung von Proteinen verhindern (Guy und Li, 1998).

In Gilmour *et al.*, 1998 ist eine Theorie gezeigt, auf welche Weise die Signaltransduktion bei Kälte abläuft. Die COR-Gene und viele andere kälteinduzierte Gene enthalten in ihrem Promotor eine Bindestelle für einen ebenfalls kälteinduzierten Transkriptionsaktivator. Diese konservierte Sequenz wird als CRT bezeichnet und ist verantwortlich für die Kälteinduktion (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994). CBF1 ("CRT-binding-Factor") ist ein Gen dessen Transkriptlevel bereits 15 Minuten nach einem Transfer der Pflanzen auf 4°C stark ansteigt (Gilmour *et al.*, 1998). Für das CBF1-Protein wurde gezeigt, dass es an die CRT-Sequenz bindet (Stockinger *et al.*, 1997). Die Transkription von CBF wiederum wird durch das bHLH-Protein ICE1 aktiviert (Chinnusamy *et al.*, 2003). Obwohl also bei *Atpmh1* und *Atpmh2* unterschiedliche Promotorelemente für die Kälteinduktion verantwortlich wären, würden beide innerhalb einer Signalkaskade aktiviert werden. Die möglichen Funktionen von *Atpmh1* und *Atpmh2* in der Kälteakklimatisierung hängen alle mit dem RNA-Metabolismus zusammen. Sie könnten, ähnlich wie die DEAD-Box RNA-Helikase CsdA aus *E. coli*, am Abbau von mRNA beteiligt sein. Für diese wurde gezeigt, dass sie bei Kälte anstelle von RhlB mit dem Degradosom assoziiert ist (Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). CsdA ist beteiligt an der Degradation der mRNA von Kälteschock-Genen, die nach dem Transfer auf 4°C induziert werden und nach Abschluss der Kälteakklimatisierung wieder abgebaut werden (Yamanaka und Inouye, 2001). Auch eine Beteiligung an der mRNA-Reifung wäre möglich: Für das mitochondriale *cox2*-Transkript in Weizen wurde beobachtet, dass es bei Kälte zu

einer Anhäufung von unreifem Transkript kommt, das nicht gespleißt und nicht editiert ist. Trotzdem ändert sich die Menge an reifer mRNA nicht (Kurihara-Yonemoto und Handa, 2001), was z.B. durch den Einfluss von RNA-Helikasen erklärbar ist. Am wahrscheinlichsten erscheint aber eine Funktion als RNA-Chaperon. So könnten Atpmh1 und Atpmh2 kältestabilisierte Sekundärstrukturen am 5'-Ende von mRNAs lösen und so die Translation bei Kälte unterstützen. Dies wird z.B. für die cyanobakteriellen DEAD-Box-Proteine CrhC und CrhB vermutet (Chamot *et al.*, 1999; Yu und Owtrim, 2000). Zudem zeigen sowohl Atpmh1 als auch Atpmh2 einen Glycin-reichen C-Terminus. Solche Glycin-reichen Sequenzabschnitte kommen bei cyanobakteriellen RNA-Binde-Proteinen und in Glycin-reichen Proteinen von Pflanzen und Säugetieren vor (Maruyama *et al.*, 1999). Viele dieser Proteine sind Kälte-induziert und eine Funktion als RNA-Chaperone die bei Kälte die Bildung von nachteiligen Sekundärstrukturen verhindern wird vermutet (Sato, 1995; Carpenter *et al.*, 1994). Aus den erhaltenen Daten kann nicht geschlossen werden, auf welche Weise Atpmh1 und Atpmh2 an der Kälte-Akklimatisierung beteiligt sind. Die Atpmh1-Mutante atpmh1-1 zeigt keine erhöhte Kältesensitivität (Abschnitt 3.7.1). Die Untersuchung der Kälte-Toleranz einer Atpmh2-Mutante, oder einer Atpmh1/Atpmh2-Doppelmutante könnte Hinweise liefern, ob das Fehlen von Atpmh1 und Atpmh2 einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *A. thaliana* bei Temperaturen unter 0°C hat, und in welcher Art die beiden Proteine an der Kälteakklimatisierung beteiligt sind.

5.3.2 Atpmh2 ist wundinduziert

Für Atpmh2 konnte in histochemischen β -Glucuronidase-Färbungen eine Induktion der Promotoraktivität nach mechanischer Verwundung beobachtet werden. Im Gegensatz zu der beobachteten Färbung in Atmmh-Promotor::GUS-Pflanzen war die Färbung in Atpmh2-Promotor::GUS-Pflanzen nicht so strikt um den Verwundungsbereich begrenzt (Abbildung 11). In *A. thaliana* existieren zwei unabhängige Signaltransduktions-Kaskaden nach Verwundung. Eine ist abhängig von Jasmonat die andere ist abhängig von Oligosacchariden (León *et al.*, 2001). Beide Kaskaden sind aber miteinander vernetzt. Allgemein ist noch sehr wenig bekannt über die Rezeptoren, die das Verwundungsereignis detektieren, und auch über die Regulation der Genexpression nach Verwundung. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Antworten auf Verwundung zwischen verschiedenen Pflanzen-Spezies stark unterscheiden. Eine Analyse des Promotorbereichs von Atpmh2 zeigt weder Jasmonat-induzierbare Elemente, noch W-Boxen wie der Promotor von Atmmh. Eine Aussage auf welche Weise Atpmh2 an der Verwundungsreaktion beteiligt ist, ist daher nicht möglich. Interessant wäre aber eine Analyse, wie stark sich die Induktion systemisch ausbreitet. Dies wäre durch histochemische GUS-Färbungen von gesamten Pflanzen möglich. Dazu müsste man die Pflanzen zwischen Verwundung und Färbung z.B. noch 24 Stunden weiter

kultivieren und dann analysieren, ob die Färbung, und damit die Promotoraktivität, auf das verwundete Blatt begrenzt ist, oder sich auf die ganze Pflanze ausgebreitet hat.

5.3.3 In mitochondrialen Membranfraktionen wird AtPMH2-Protein detektiert

Bei der Analyse von mitochondrialen Proteinextrakten mit dem Anti-pmh1/2 Peptidantikörper wurden ein starkes Signal bei 50 kDa und zwei schwächere Signale bei etwa 55 und 60 kDa detektiert (Abbildung 14). Alle drei Signale wurden hauptsächlich in der SDS-Fraktion oder, nach Freeze-Thaw-Lyse, in der Membran-Fraktion beobachtet und nur das Signal bei 50 kDa wurde in geringerem Maße auch in der S-100-Fraktion gefunden (Abbildung 14 C). Es handelt sich bei den detektierten Proteinen somit wie bei AtMMH vermutlich um Membran-Assoziierte Proteine. Ohne Sequenzierung ist aber nicht völlig klar, bei welchem Signal es sich um welches Protein handelt. Millar *et al.* (2001) analysierten das mitochondriale Proteom von *A. thaliana* mittels 2-D-Gelelektrophorese. Dazu wurden zuerst Mitochondrien aus Zellkulturen von *A. thaliana* isoliert. Aus diesen Mitochondrien wurden verschiedene subzelluläre Fraktionen extrahiert. Diese enthielten lösliche Proteine, integrale Membran-Proteine, oder periphere Membran-Proteine. Als Vergleich wurde auch mitochondriales Gesamt-Protein verwendet. Proteine, die sich als Spots reproduzierbar in den Gelen der 2. Dimension fanden, wurden durch Massenspektrometrie und anschließende Sequenzvergleiche identifiziert. Bei dieser Analyse konnte auch AtPMH2 identifiziert werden, aber keine der anderen in dieser Arbeit untersuchten mitochondrialen RNA-Helikasen. Das AtPMH2-Protein lief bei einer Größe von 61 kDa. Da der Antikörper fähig ist, rekombinantes AtPMH2-Protein zu detektieren und AtPMH2 in Mitochondrien häufig genug vorkommt, um in einem 2-D-Gel identifiziert zu werden, wird vermutet, dass es sich zumindest bei einem der in dieser Arbeit gefundenen Signale um AtPMH2 handelt. Verschiedenen Protein-Marker, die zudem in verschiedenen Puffersystemen angewendet werden, können durchaus Unterschiede von 10 kDa aufweisen. Obwohl das stärkste Signal mit dem verwendeten Rainbow-Marker bei 50 kDa eingeordnet wurde und Millar *et al.* (2001) das AtPMH2-Protein bei 61 kDa detektiert haben, ist es daher wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Signal um AtPMH2 handelt. Die gefundenen Ergebnisse unterstützen dann, aufgrund der Detektion in der SDS- und der Membranfraktion und der geringeren Menge in S-100-Proteinextrakt, wie bei AtMMH die Vermutung, dass AtPMH2 in Komplexen mit anderen Proteinen vorliegt und diese Komplexe mit der Membran assoziiert sind.

5.3.4 Die Atpmh1- Knock-Out-Linie atpmh1-1 zeigt keinen veränderten Phänotyp

Durch die durchgeführten Southern-Blot-Analysen und besonders durch die Northern-Blot-Analysen mit der Atpmh1 T-DNA-Insertionslinie ist sicher, dass es sich um einen homozygoten Knock-Out des Atpmh1-Gens handelt. Zwar sind in der Northern-Blot-Analyse mit der Atpmh1-Sonde schwache Signale zu erkennen, die im Gel etwas langsamer laufen, als das Wildtyp-Atpmh1-Transkript (Abbildung 26), diese können aber durch eine mögliche Kreuzreaktion mit dem Atpmh2-Transkript, oder, da die T-DNA-Insertion im Exon 6 liegt, durch eine geringe Transkription des Allels mit der Insertion erklärt werden. Das Vorhandensein von funktionalem AtPMH1-Protein in diesen Pflanzen wird ausgeschlossen. Trotzdem konnte in diesen Pflanzen bisher keinerlei Veränderung im Phänotyp festgestellt werden. Natürlich wurde noch keine komplette Analyse des Phänotyps auf molekularer Ebene durchgeführt, da die genaue Funktion der Atpmh1 im RNA-Metabolismus der Mitochondrien noch nicht bekannt ist. Die Tatsache, dass die Mutanten auf Kälteeinwirkung nicht sensibler reagieren, als der Wildtyp, war aber unerwartet und zeigt, dass Atpmh1 kein essentielles Gen ist.

5.3.5 Haben AtPMH1 und AtPMH2 redundante Funktionen im RNA-Metabolismus?

Die fehlende Veränderung im Phänotyp der Atpmh1 Mutanten könnte durch ein anderes Protein mit redundanter Aktivität begründet sein. Atpmh2 bietet sich als möglicher Kandidat an. Die stärkere β -Glucuronidase-Aktivität aller Atpmh2-Promotor::GUS-Pflanzen im Gegensatz zu Atpmh1-Promotor::GUS-Pflanzen und die Detektion von AtPMH2-Protein, nicht aber AtPMH1-Protein in mitochondrialen Proteinextrakten (Millar *et al.*, 2001) deuten darauf hin, dass Atpmh2 eine höhere Expressionsrate als Atpmh1 aufweist. Obwohl die Transkriptmenge von Atpmh2 in Atpmh1-Mutanten nicht erhöht ist (Abbildung 27), könnte somit die Aktivität von Atpmh2 ausreichen, um das Fehlen von Atpmh1 auszugleichen. Die hohe Ähnlichkeit der beiden Proteine auf Aminosäureebene lässt darauf schließen, dass sie redundante Funktionen haben könnten. Diese Ähnlichkeit zeigt sich nicht nur in den mittleren Bereichen der Proteine, wo die Motive für die Helikase-Aktivität sitzen, sondern auch in den N-terminalen Bereichen, und in den Glycin-reichen C-terminalen Bereichen (Abbildung 4). Von den N-, und C-terminalen Bereichen wird vermutet, dass sie in RNA-Helikasen für die Interaktion mit anderen Proteinen und damit für die Spezifität der Helikase-Aktivitäten verantwortlich sind. Außerdem weisen die Expressionsmuster von Atpmh1 und Atpmh2 in den Northern-Blot-Analysen hohe Ähnlichkeiten auf. Bei den Analysen der Promotoraktivität zeigen sich zwar Unterschiede - die Promotoraktivität der Atpmh2 in Keimlingen und nach mechanischer Verwundung findet sich bei Atpmh1 nicht - aber der Atpmh2-Promotor ist in

allen Geweben aktiv, in denen der Atpmh1-Promotor aktiv ist. Diese beiden kommen also in der Zelle zum großen Teil in den selben Geweben und unter den gleichen Bedingungen vor und können möglicherweise mit den selben Proteinen interagieren. Alle Voraussetzungen für eine redundante Funktion sind somit gegeben. Unklar bleibt aber die genaue Funktion von Atpmh1 und Atpmh2 im RNA-Metabolismus. Analysen von transgenen Pflanzen mit Doppel-Knock-Outs von Atpmh1 und Atpmh2 könnten helfen diese Möglichkeit näher zu untersuchen, oder, falls ein Knock-Out von Atpmh2 sich als letal erweist, könnte versucht werden, dies durch Überexpression von Atpmh1 zu kompensieren.

5.4 Die mitochondrial lokalisierten RNA-Helikasen Atpmh3 und Atsuv3

5.4.1 Atpmh3 ist mitochondrial lokalisiert

Eine mitochondriale Lokalisation von AtPMH3 konnte in dieser Arbeit anhand der *in vivo*-Lokalisation eines PMH3-Signalsequenz::GFP-Fusionsproteins gezeigt werden. Das GFP ist ohne Signal-Sequenz nicht in Mitochondrien sondern im Cytoplasma lokalisiert. Die gefundene mitochondriale Lokalisation des Fusionsproteins beruht somit auf der N-terminalen Signalsequenz des PMH3-Proteins. Eine zusätzliche Lokalisation in andere Zell-Kompartimente ist damit aber nicht ausgeschlossen. Signal-Sequenzen die weiter C-terminal im PMH3-Protein liegen könnten für eine zusätzliche Lokalisation z.B. in Plastiden sorgen. So wurde z.B. für die Glutathion-Reduktase (GR) aus Erbse gezeigt, dass sie sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten lokalisiert ist. Trotzdem zeigt die GR als Fusionsprotein mit GFP nach transienter Expression ausschließlich eine Lokalisation in Chloroplasten (Chew *et al.*, 2003). Western-Blot-Analysen von subzellulären Fraktionen könnten das erhaltene Ergebnis bestätigen oder eine duale Lokalisation zeigen. Da für die weitere Analyse der Atpmh3 in dieser Arbeit aber nur die mitochondriale Lokalisation eine Rolle spielt, ist das erhaltene Ergebnis ausreichend.

5.4.2 Atpmh3 und Atsuv3 sind schwach exprimiert

Die Ergebnisse aus den Northern-Blot Analysen für Atsuv3 und Atpmh3 weisen einige Ähnlichkeiten auf (Abbildung 5). Beide Transkripte konnten in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Da die Expositionszeiten zum Nachweis der Transkripte sehr lang waren, ist auch der Hintergrund stärker und das Verhältnis von Signal-zu-Hintergrund kleiner als bei den anderen Transkripten, dadurch kann der Fehler bei der Berechnung der relativen Transkriptmenge etwas größer ausfallen. Die sehr langen Expositionszeiten für die Detektion der Atsuv3- und Atpmh3-Transkripte sind Hinweise darauf, dass beide Transkripte in der Zelle in geringer Menge vorliegen. Zwar hat die Effizienz der Sonden-Bindung einen starken

Einfluss, aber die Länge der Sonden und die Methode der Markierung stimmt mit den Sonden für *Atpmh1* und *Atpmh2* überein. Diese Übereinstimmung spricht gegen so eklatante Unterschiede in der Effizienz der Sonden. Für eine schwache Expression von *Atsuv3* spricht auch, dass in Gagliardi *et al.* (1999) das Transkript nur in Poly(A)⁺RNA nachgewiesen werden konnte.

5.4.3 Überlegungen zu den zusätzlichen Signalen in der Northern-Blot-Analyse von *Atsuv3*

Im Northern-Blot der *Atsuv3* zeigten sich zwei weitere Banden, die kleiner sind als die Hauptbande (Abbildung 5). Bei diesen kleineren Banden könnte es sich um Abbauprodukte des *Atsuv3*-Transkriptes handeln, um Kreuzreaktionen der Sonde mit anderen Transkripten, oder um ein alternativ gespleißtes *Atsuv3*-Transkript. Kreuzreaktionen sind unwahrscheinlich, da die Sequenz der verwendeten *Atsuv3*-Sonde im Genom von *A. thaliana* nur im *Atsuv3*-Gen vorkommt. Die Sonde bindet auch an 65 bp der Sequenz des Intron 1 des *Atsuv3*-Gens, eine Detektion des herausgespleißten Introns oder von Abbauprodukten des Transkriptes wäre somit möglich, falls diese langsam genug abgebaut würden. Aber auch die Möglichkeit, dass das *Atsuv3*-Gen alternative Spleiß-Muster aufweist, bei denen es durch Stop-Codone zu kürzeren Transkripten kommt, ist nicht auszuschließen. Alternatives Spleißen scheint für die Variabilität eukaryotischer Proteome wichtiger zu sein als bisher angenommen. So gibt es Schätzungen, dass 40% der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden (Modrek und Lee 2002). Die Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis* machte auch für diesen Organismus Schätzungen möglich. Computer-Vergleiche von Gen-Sequenzen mit cDNA-Sequenzen zeigen, dass vermutlich mindestens 5% der Gene von *A. thaliana* alternative Spleiß-Muster aufweisen (Kazan, 2003). Dabei sind in dieser Schätzung Gene mit sehr geringen Transkriptionsraten nicht erfasst, da für diese keine cDNA-Daten vorliegen.

5.4.4 Mögliche Entwindungsaktivität des *AtSUV3*-Proteins

Ein Ziel dieses Versuches, ein Assay-System zu etablieren, mit dem im Weiteren für alle in dieser Arbeit erwähnten Helikasen die Entwindungsaktivität näher charakterisiert werden kann, wurde erreicht. Für das in dieser Arbeit erstellte Substrat mit dem doppelsträngigen Bereich von 22 nt wurde gezeigt, dass es sich für den Entwindungs-Assay eignet. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Substraten ist eine Unterscheidung von prozessiven Helikasen und nicht-prozessiven Helikasen möglich. Die Möglichkeiten zur Verkürzung der einzelsträngigen Bereiche im neuen Substrat bieten weitere Ansätze die Helikase-Aktivitäten näher zu charakterisieren, indem die benötigte Länge dieser Einzelstränge eingegrenzt werden kann. Das Ergebnis, das mit einer Fraktion eines *E.coli*-Proteinextraktes mit

rekombinanter AtSUV3 gewonnen wurde (Abbildung 29), ist aber nur ein sehr schwacher Hinweis auf eine *in vitro*-Entwindungsaktivität des AtSUV3-Proteins. Da sich in der verwendeten Fraktion mehrere Proteine befinden und aufgrund der fehlenden endgültigen Identifikation des AtSUV3-Proteins in dieser Fraktion ist es nicht möglich, die beobachtete Aktivität der AtSUV3 zuzuordnen. Obwohl für ein verkürztes rekombinantes AtSUV3-Protein bereits eine ATPase-Aktivität nachgewiesen wurde (Gagliardi *et al.*, 1999), ist unklar, ob AtSUV3 auch RNA-RNA-Entwindungsaktivität aufweist. Das SUV3-Homolog aus Hefe zeigt mit hoher Wahrscheinlichkeit RNA-RNA-Entwindungsaktivität (Dziembowski *et al.*, 2003), während das humane SUV3-Homolog *in vitro* sowohl dsRNA, dsDNA als auch DNA/RNA-Heteroduplexe entwinden kann. In Fairman *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass die ATPase-Aktivität von DexH/D-Box-Proteinen auch zur Entwindung von RNA-Protein-Bindungen verwendet werden kann. Diese Aktivität ist dabei unabhängig von einer RNA-RNA-Aktivität. Die Autoren vermuten, dass die beiden unterschiedlichen Aktivitäten auf dem gleichen Prinzip beruhen, und die beiden analysierten Proteine zeigten in Kontrollversuchen ebenfalls *in vitro* RNA-RNA-Entwindungsaktivität. Trotzdem ist damit nicht ausgeschlossen, dass einige DEXH/D-Box-Proteine die ATPase-Aktivität ausschließlich zur Trennung von RNA-RNA-Doppelsträngen, oder von RNA-Protein-Bindungen nutzen. Diese Möglichkeit erweitert die potentiellen Funktionen der DEAxH/D-Box Proteine im RNA-Metabolismus. Aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten der Helikase-Aktivitäten ist es nötig, sowohl die Aktivität der AtSUV3 als auch die der anderen mitochondrialen Helikasen näher zu analysieren, um deren Funktion im RNA-Metabolismus der Pflanzen zu charakterisieren.

6. Zusammenfassungen

6.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden fünf DEAD/DExH-Box RNA-Helikasen aus *A. thaliana* analysiert. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass die Proteine AtSUV3, AtMMH, AtPMH1 und AtPMH2 eine mitochondriale Lokalisation aufweisen. Da in dieser Arbeit die mitochondriale Lokalisation eines AtPMH3::GFP-Fusionsproteins in Tabakprotoplasten gezeigt wurde, kann dies auch für das AtPMH3-Protein angenommen werden. Mit Northern-Blot-Analysen wurden die relativen Transkriptmengen der fünf Gene in Wurzeln, Blüten, Blättern und Keimlingen untersucht und anhand von histochemischen Färbungen von entsprechenden transgenen Promotor::GUS-Pflanzen wurden die Promotoraktivitäten in den unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien der Pflanzen analysiert. Abgesehen davon, dass die Transkripte von Atmmh, Atsuv3, Atpmh1, Atpmh2 und Atpmh3 in allen untersuchten Geweben nachgewiesen wurden und für die analysierten Promotoren eine Transkriptionsaktivität in Pollen beobachtet wurde, zeigten die verschiedenen RNA-Helikasen z.T. sehr unterschiedliche und sehr differenzierte Expressionsmuster. So wurde in Northern-Blot-Analysen eine durch Kälte induzierte Transkript-Akkumulation von Atpmh1 und Atpmh2 festgestellt und deren Zeitverlauf über 48 Stunden hinweg verfolgt. Der Anstieg der Transkriptmenge über einen Zeitraum von 28 Stunden und der Rückgang nach 36 Stunden trotz weiterer Inkubation bei 4°C ist bei beiden Transkripten zu beobachten, bei Atpmh1 allerdings wesentlich ausgeprägter als bei Atpmh2. Auch für das Atmmh-Transkript wurde in der Northern-Blot-Analyse eine leichte Erhöhung des Steady-State-Levels durch Kälte beobachtet. Dies deutet auf eine Beteiligung dieser RNA-Helikasen an der Kälteakklimatisierung von *A. thaliana* hin. In den histochemischen Färbungen wurde eine Promotoraktivität des Atmmh- und des Atpmh2-Promotors nach mechanischer Verwundung von Blattspreiten und Stängeln gefunden. Dies ist unseres Wissens der erste bisher belegte Fall einer Induktion von RNA-Helikase-Transkription durch Verwundung und könnte auf bisher unbekannt Funktionen dieser Proteingruppe hindeuten. Bei den durchgeführten Analysen von T-DNA-Insertionsmutanten wurde für Atpmh1-Knock-Out-Pflanzen keine Abweichung vom Wildtyp-Phänotyp und keine erhöhte Kältesensitivität gefunden, Atpmh1 ist somit kein essentielles Gen. Heterozygote Atmmh-Knock-Out-Mutanten hingegen zeigten bei der Samenbildung eine 25-%ige Embryoletalität in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung. Daraus wurde geschlossen, dass Atmmh ein essentielles Gen ist. Überexpressions-Pflanzen mit erhöhten Atmmh-Transkriptmengen zeigten eine wesentlich geringere Anzahl an Samen pro Schote als Wildtyp-Pflanzen. Die Embryoletalität in heterozygoten Atmmh-Knock-Out-Pflanzen und deren Transmissionsrate von 25% deuten

auf einen Effekt im weiblichen Gametophyten hin, obwohl eine Promotoraktivität in Blüten nur im Pollen nachgewiesen wurde. In Western-Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinfractionen wurde in dieser Arbeit das AtMMH-Protein und das AtPMH2-Protein vor allem in Membranfraktionen detektiert, was für beide Proteine ein Hinweis auf eine Assoziation mit der mitochondrialen Membran oder mit einem membranassoziierten Komplex ist. Schließlich wurde mit der Etablierung eines *in vitro*-Entwindungsassays mit einem neuen Substrat die Grundlage geschaffen, die RNA-RNA-Entwindungsaktivität der Helikasen zu charakterisieren.

6.2 Summary

In this thesis five DEAD/DExH-box RNA helicases from *A. thaliana* were analysed. At the beginning of this work the mitochondrial localization of AtSUV3, AtMMH, AtPMH1 and AtPMH2 was known. The transient expression of an AtPMH3::GFP-fusionprotein in tobacco protoplasts experimentally confirmed the predicted mitochondrial localization of AtPMH3. To examine the transcript levels of these RNA helicases in different tissues Northern blot analyses were performed. Additionally, histochemical staining of respective transgenic promotor::GUS plants were done to investigate promotor activities in different tissues and developmental stages. The transcripts of Atmmh, Atsuv3, Atpmh1, Atpmh2, and Atpmh3 were detected in the investigated tissues: root, flower, leaf, and in seedlings and analysed promotors were activ in pollen. Beside these common features the different RNA helicases displayed very different and distinct expression patterns. Northern blot analyses showed a significant cold induction of Atpmh1 and Atpmh2 transcript levels, although the extend of induction was more pronounced in Atpmh1. The cold induction was followed over a period of 48 hours. After the shift to 4°C the transcript levels of both, Atpmh1 and Atpmh2, increased for about 28 hours and decreased again after 36 hours despite the prolonged incubation at 4°C. A small increase in the transcript level in response to cold was also detected for Atmmh. This suggests a role of these helicases in the cold acclimation of *A. thaliana*. Histochemical staining after mechanical wounding of leaves and stems showed promotor activity of Atpmh2 and Atmmh. This is, to our knowledge, the first report of wound induction of RNA helicases and could indicate yet unknown functions of these proteins. Analyses of T-DNA insertion lines detected no difference in the phenotype of Atpmh1 knockout plants compared to wildtype plants and no increased cold sensitivity, thus showing that Atpmh1 is not an essential gene. Heterozygotes for an Atmmh (atmmh-2) insertion displayed emryoethality in 25% of their progeny indicating that Atmmh is an essential gene and that a homozygous knockout of Atmmh is embryolethal. Overexpression lines with increased amounts of Atmmh transcripts showed a reduced amount of seeds per silique. Embryoethality in homozygotes of atmmh-2 and the transmission rate of this mutant phenotype of 25% suggests a defect in

the female gametophyte although *Atmmh* promoter activity in flowers could only be detected in pollen. In western blot analyses of mitochondrial protein extracts the *AtMMH* protein and the *AtPMH2* protein were mostly detected in the membrane fraction suggesting an association with the membrane or with membrane associated proteins. An *in vitro* unwinding assay with a new RNA substrate was established to allow for a characterization of the helicase activity of the five investigated proteins.

7. Literaturverzeichnis

- Alonso, J.M. *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, S. 653-657
- Andersson, S.G.E., Zomrodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Aslmark, A.C.M., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.-S., Winkler, H.H., Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, **396**, S. 133-140
- Janneke Balk, J. und Leaver, C.J. (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *The Plant Cell*, **13**, S. 1803–1818
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E. (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-Binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.*, **104**, S. 1015-1025
- Caruthers, J. M., Johnson, E. R., McKay, D.B. (2000) Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, S. 3080-3085
- Castle, L. A. *et al.* (1993) Genetic and molecular characterization of embryogenic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, S. 504-514
- Chamot, D., Magee, W.C., Yu, E., Owttrim, G.W. (1999) A Cold Shock-Induced Cyanobacterial RNA Helicase. *J. Bacteriol.*, **181** (6), S. 1728–1732
- Chamot, D. und Owttrim, G.W. (2000) Regulation of cold shockinduced RNA helicase gene expression in the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **182**, S. 1251–1256
- Chew, O., Rudhe, C., Glaser, E., Whelan, J. (2003) Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant Mol. Biol.*, **53** (3), S. 341-356
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M., Zhu, J.K. (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **7**, S. 1043–1054
- Christensen, C.A., Gorsich, S.W., Brown, R.H., Jones, L.G., Brown, J., Shaw, J.M., Drews, G.N. (2002) Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **14**, S. 2215–2232
- Clough, S.J. und Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16** (6), S. 735-743
- Conrad-Webb, H., Perlman, P. S., Zhu, H., and Butow, R. A. (1990) The nuclear SUV3-1 mutation affects a variety of post-transcriptional processes in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1369–1376
- Dziembowski, A., Malewicz, M., Minczuk, M., Golik, P., Dmochowska, A., Stepień, P.P. (1998) The yeast nuclear gene DSS1, which encodes for a putative RNase II, is necessary for the function of the mitochondrial degradosome in processing and turnover of RNA. *Mol. Gen. Genet.*, **260**, S. 108–114
- Dziembowski, A., Piwowarski, J., Hoser, R., Minczuk, M., Dmochowska, A., Siep, M., van der Spek, H., Grivell, L., Stepień, P.P. (2003) The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism. *J. Biol. Chem.*, **278**(3), S. 1603-1611
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1999) Early nuclear events in plant defense signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.*, **18**, S. 4689-4699

- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, **5**, S. 199-206
- Fairman, M.E., Maroney, P.A., Wang, W., Bowers, H.A., Gollnick, P., Nilsen, T.W., Jankowsky, E. (2004) Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding. *Science*, **304**, S. 730-734
- Forner, J. (2003) Diplomarbeit Universität Ulm
- Fowler, S. und Thomashow, M.F. (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, **14** (8), S. 1675-90
- Gagliardi, D., Kuhn, J., Spadinger, U., Brennicke, A., Leaver, C. (1999) An RNA helicase (Atsuv3) is present in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *FEBS Lett.*, **458**, S. 337-342
- Giegé, P. und Brennicke, A. (1999) RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in open reading frames. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, S. 15324-15329
- Giegé, P., Hoffmann, M., Binder, S., Brennicke, A. (2000) RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep.*, **1**, S. 164-170
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F. (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.*, **16**(4), S. 433-42.
- Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B., Zhu, J.K. (2002) RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, S. 11507-11512
- Gray, M.W. (1998) *Rickettsia*, typhus and the mitochondrial connection. *Nature*, **396**, S. 109-110
- Guy, C.L. und Li, Q.B. (1998) The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, **10**, S. 539-556
- Helliwell, C. und Waterhouse, P. (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*, **30**, S. 289-295
- Henn, A., Shi, S.P., Zarivach, R., Ben-Zeev, E., Sagi, I. (2002) The RNA helicase DbpA exhibits a markedly different conformation in the ADP-bound state when compared with the ATP- or RNA-bound states. *J. Biol. Chem.*, **277** (48), S. 46559-46565
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. (2003) Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, S. 36-41
- Huang, H.R., Rowe, C.E., Mohr, S., Jiang, Y., Lambowitz, A.M., Perlman, P.S. (2004) The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** (1), S. 163-168
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, **436** (7052), S. 793-800
- Jäger, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R., Klug, G. (2001) An RNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res.*, **29**, S. 4581-4588
- Jankowsky, E., Gross, C.H., Shumann, S., Pyle, A.M. (2001) Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science*, **291**, S. 121-125
- Kazan, K. (2003) Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *TRENDS in Plant Science*, **8** (10), S. 468-471

- Kuhn, J., Tengler, U., Binder, S. (2001) Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, S. 731–742
- Kujat, S.L. und Owttrim, G.W. (2000) Redox-regulated RNA helicase expression. *Plant Physiology*, **124**, S. 703-713
- Kurihara-Yonemoto, S. und Handa, H. (2001) Low temperature affects the processing pattern and RNA editing status of the mitochondrial *cox2* transcripts in wheat. *Curr. Genet.*, **40** (3), S. 203-208
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jaquier, A., Tollervey, D. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, **121**, S. 713-724
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, **52** (354), S. 1-9
- Lim, J., Thomas, T., Cavicchioli, R. (2000) Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J. Mol. Biol.*, **297**, S. 553–567
- Lin, C. und Kim, J.L. (1999) Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J. Virol.*, **73**, S. 8798-8807
- Liou, G.-G., Chang, H.-Y., Lin, C.-S., Lin-Chao, S. (2002) DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with Exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *J. Biol. Chem.*, **277** (43), S. 41157-41162
- Margossian, S.P., Li, H., Zassenhaus, H.P., and Butow, R.A. (1996) The DExH box protein Suv3p is a component of a yeast mitochondrial 3'-to-5' exoribonuclease that suppresses group I intron toxicity. *Cell*, **84**, S. 199–209
- Martin, A., Schneider, S., Schwer, B. (2002) Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.*, **277** (20), S. 17743-17750
- Maruyama, K., Sato, N., Ohta, N. (1999) Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.*, **27** (9), S. 2029-2036
- Meinke, D. W. (1994) Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. In: *Arabidopsis*. Editors: Meyerowitz, E. M. und Somerville, C. R., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Meinke, D.W. und Sussex, I.M. (1979) Embryo lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: a model system of plant embryo development. *Dev. Biol.*, **75**, S. 50-61
- McKersie, B.D. und Bowley, S.R. (1997) Active oxygen and freezing tolerance in transgenic plants. *Plant Cold Hardiness. Molecular Biology, Biochemistry and Physiology*, New York, S. 203-214
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giegé, P., Leaver, C.J. (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiology*, **127**, S. 1711-1727
- Minczuk, M., Piwowarski, J., Papworth, M.A., Awiszus, K., Schalinski, S., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Bartnik, E., Tokatlidis, K., Stepień, P.P., Borowski, P. (2002) Localisation of the human hSuv3p helicase in the mitochondrial matrix and its preferential unwinding of dsDNA. *Nucleic Acids Res.*, **30** (23), S. 5074-86
- Missel, A., Souza, A. E., Nörskau, G., Göhringer, H. U. (1997) Disruption of a gene encoding a novel mitochondrial DEAD-box protein in *Trypanosoma brucei* affects edited mRNAs. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, S. 4895–4903
- Modrek, B. und Lee, C. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.*, **30**, S. 13-19

- Moore, M.J., Query, C.C., Sharp, P.A. (1993) Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (eds), Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosome. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, S. 303–357
- Nilsen, T.W. (1994) RNA–RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell*, **78**, S. 1–4
- Nishiuchi, T., Kodama, H., Yanagisawa, S., Iba, K. (1999) Wound induced expression of the FAD7 gene is mediated by different regulatory domains of its promoter in leaves/stems and roots. *Plant Physiol.*, **121**, S. 1239–1246
- Okanami, M., Meshi, T., Iwabuchi, M. (1998) Characterization of a DEAD box ATPase/RNA helicase protein of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, **26** (11), S. 2638–2643
- Prud'homme-Genereux, A., Beran, R.K., Iost, I., Ramey, C.S., Mackie, G.A., Simons, R.W. (2004) Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol. Microbiol.*, **54** (5):S. 1409–1421
- Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M., Carpousis, A. J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*, **381**, S. 169–172
- Rajendran, R. R. *et al.* (2003) Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97). *J. Biol. Chem.*, **278**, S. 4628–4638
- Robatzek, S. und Somssich, I.E. (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.*, **16**, S. 1139–1149
- Rocak, S. und Linder, P. (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature*, **5**, S. 232–241
- Rossow, K. L. und Janknecht, R. (2003) Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene*, **22**, S. 151–156
- Sambrook, J. und Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sato, N. (1995) A family of cold-regulated RNA-binding protein genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. *Nucleic Acids Res.*, **23** (12), S. 2161–2167
- Schmidt, U., Lehmann, K., Stahl, U. (2002) A novel mitochondrial DEAD box protein (Mrh4) required for maintenance of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEM Yeast Res.*, **2**, S. 267–276
- Schneider, S. und Schwer, B. (2001) Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J. Biol. Chem.*, **276** (24), S. 21184–21191
- Schwer, B. und Meszaros, T. (2000) RNA helicase dynamics in pre-RNA splicing. *EMBO J.*, **19**, S. 6582–6591
- S raphin, B., Simon, M., Boulet, A., Faye, G. (1989) Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. *Nature*, **337**, S. 84–87
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S.A. (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell*, **14**, S. 2985–2994
- Shu, Z., Vijayakumar, S., Chen, C.-F., Chen, P.-L., Lee, W.-H. (2004) Purified human SUV3p exhibits multiple-substrate unwinding activity upon conformational change. *Biochemistry*, **43**, S. 4781–4790
- Snay-Hodge, C. A., Colot, H. V., Goldstein, A. L., Cole, C. N. (1998) Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *EMBO J.*, **17**, S. 2663–2676.

- Stepien, P.P., Margossian, S.P., Landsman, D., Butow, R.A. (1992) The yeast nuclear gene *suv3* affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA-helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, S. 6813–6817
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Joseph, R.A., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1998) Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, S. 14570-14575
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, S. 1035-1040
- Story, R.M., Li, H., Abelson, J.N. (2001) Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, S. 1465-1470
- Sun, Y.L., Zhao, Y., Hong, X., Zhai, Z.H. (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett.*, **462**, S. 317–321
- Takenaka, M. und Brennicke, A. (2003) In vitro RNA editing in pea mitochondria requires NTP or dNTP, suggesting involvement of an RNA helicase. *J Biol Chem.*, **278** (48), S. 47526-47533
- Takyar, S., Hickerson, R.P., Noller H.F. (2005) mRNA Helicase Activity of the Ribosome. *Cell*, **120** January 14, S. 49-58
- Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., Linder, P. (2003) The Q motif. A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell*, **11**, S. 127-138
- Tanner, N.K. und Linder, P. (2001) DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell*, **8**, S. 251–262.
- Tax, F.E. und Vernon, D.M. (2001) T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiology*, **126**, S. 1527-1538
- Thomashow, M.F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, S. 571-599
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., Thomashow, M.F. (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **41** (2), S. 195-211
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, S. 945-951
- Weigel, D. und Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., Braun, H.P. (2001) Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis*. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiology*, **125**, S. 943–954
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Waterhouse, P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, **27** (6), S. 581-590
- Wildum, S. (2003) Diplomarbeit Universität Ulm
- Will, C.L. und Lührmann, R. (1997) Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, S. 320–328

- Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (1994) A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt stress. *Plant Cell*, **6**, S. 251-261
- Yamanaka, K. und Inouye, M. (2001) Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **183** (9), S. 2808-2816
- Yan, X., Mouillet, J. F., Ou, Q., Sadovsky, Y. (2003) A novel domain within the DEAD-box protein DP103 is essential for transcriptional repression and helicase activity. *Mol. Cell Biol.*, **23**, S. 414–423
- Yao, N., Eisfelder, B.J., Marvin, J., Greenberg, J.T. (2004) The mitochondrion--an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **40** (4), S. 596-610
- Yao, N., *et al.*, (1997) Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nature Struct. Biol.*, **4**, S. 463–467
- Yu, E. und Owtrim, G.W. (2000) Characterization of the cold stress-induced cyanobacterial DEAD-box protein CrhC as an RNA-helicase. *Nucleic Acids Res.*, **28**, S. 3926-3934
- Zhu, H., Conrad-Webb, H., Liao, X.S., Perlman, P.S., Butow, R.A. (1989) Functional expression of a yeast mitochondrial intron-encoded protein requires RNA processing at a conserved dodecamer sequence at the 3' end of the gene. *Mol. Cell Biol.*, **9** (4), S. 1507-1512

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

3':	Hydroxyterminus der Nucleinsäuren
5':	Phosphatterminus der Nucleinsäuren
<i>A. thaliana</i> :	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP:	Adenosinriphosphat
bidest.:	Bidestilliertes Wasser
bp:	Basenpaare
cpm:	counts per minute
CTAB:	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-terminus:	Carboxylterminus von Proteinen
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
DTT:	Dithiothreitol
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP:	Green Fluorescent Protein
GUS:	β -Glucuronidase
IgG:	Immunglobulin G
IPTG:	Isopropylthiogalactosid
kb:	Kilobasenpaare
kDa:	Kilodalton
N-terminus:	Stickstoffterminus von Proteinen
nt:	Nucleotide
NTP:	Nucleosidtriphosphat
OD:	Optische Dichte
PAGE:	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR:	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PMSF:	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
RNA:	Ribonucleinsäure
rRNA:	ribosomale RNA
rpm:	rounds per minute
SDS:	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
snRNA:	small nuclear RNA (kleine nucleäre RNA)
WT:	Wildtyp

8.2 Publikationsliste

Vorträge

Schmidt-Gattung, S. (2002) RNA-Helikasen in Pflanzenmitochondrien. VIII. Jahrestagung der Deutschen Sektion der Internationalen Gesellschaft für Endocytobiologie, Blaubeuren

Schmidt-Gattung, S., Kuhn, J., Binder, S. (2004) Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten und Untersuchungen zur Regulation der Transkription der mitochondrial lokalisierten RNA-Helikasen Atmmh und Atsuv3. 17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

Poster und Tagungsbeiträge

Schmidt-Gattung, S., Kuhn, J., Binder, S. (2002) Identification and functional analysis of *Arabidopsis* mitochondrial RNA helicases. Botanikertagung 2002, Freiburg i.Br.

Schmidt-Gattung, S., Kuhn, J., Binder, S. (2003) RNA-Helikasen in Pflanzenmitochondrien. 16. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

Schmidt-Gattung, S., Forner, J., Wildum, S., Binder, S. (2004) RNA-helicases in plant mitochondria. MitEURO plenary meeting, Aussois

Frühere Veröffentlichungen

Langfelder, K., Gattung, S., Brakhage, A.A. (2002) A novel method used to delete a new *Aspergillus fumigatus* ABC transporter-encoding gene. Current genetics

Liebmann, B., Gattung, S., Jahn, B., Brakhage, A.A. (2003) cAMP signalling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene *pksP* and in defense against killing macrophages. Mol.Gen.Genomics, **269**, S. 420-235

8.3 Lebenslauf

Name: Schmidt-Gattung
Vorname: Stephanie
Geburtsdatum: 29.09.1975
Geburtsort: Langen / Deutschland

1982 – 1986: Gerhard-Hauptmann-Grundschule in Dreieich
1986 – 1988: Förderstufe auf der Goethe-Schule in Dreieich
1988 – 1995: Ricarda-Huch-Gymnasium, Dreieich Allgemeine Hochschulreife

WS 1995-SS2001: Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt.
Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie

Titel der Arbeit: Molekularbiologische Analyse von potentiell virulenz-
determinierenden Genen des opportunistisch human-pathogenen
Pilzes *Aspergillus fumigatus*.

Diplom (10.08.2001)

Seit WS 2001: Promotion in der Abteilung Molekulare Botanik der Universität Ulm bei
PD Dr. Stefan Binder

8.4 Erklärung über die in Anspruch genommenen Hilfen

Ich erkläre, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt, und wörtlich oder inhaltlich übernommene Texte als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den

8.5 Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. S. Binder dafür, dass ich die Welt der RNA-Helikasen in seinem Labor erforschen durfte. Vielen Dank für das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für seine hervorragende Betreuung.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. A. Brennicke für seine Unterstützung während der letzten Jahre, sowie allen Mitarbeitern in der Abteilung Molekulare Botanik für das kollegiale Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön an alle Kolleginnen und Kollegen im SB-Labor, Joachim Schuster, Edyta Bocian, Joachim Forner, Conny Guha, Bärbel Weber und Tanja Knill für die gegenseitige Unterstützung und die schöne Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank vor allem auch an Annemarie Matthes für viele gute Diskussionen, Tee-Pausen und das "Weiterforschen" an den RNA-Helikasen.

Ein herzliches Dankeschön auch an Michaela Hoffmann für die großartige Hilfe am Anfang.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der Prüfungskommission, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.