

**Funktionelle Analyse mitochondrialer RNA-Helikase Komplexe
von *Arabidopsis thaliana***

DISSERTATION

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

vorgelegt von

DANIELA KÖHLER
aus Querfurt

2009

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften:

Prof. Dr. Peter Bäumler

Erstgutachter:

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

Zweitgutachter:

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

Tag der Promotion: 22.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	RNA Metabolismus in Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.2	Struktur und Funktionsweise der DEAD-Box-Proteine	5
1.3	Funktionen der DEAD-Box-Proteine	8
1.4	DEAD-Box-Proteine in den Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.5	Zielsetzung der Dissertation	11
2	Material	13
2.1	Pflanzenmaterial	13
2.2	Bakterienstämme	13
2.3	Kits	13
2.4	Oligonukleotide	14
2.5	Lösungen und Medien	15
2.5.1	Medien für die Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.5.2	Extraktionspuffer für die RNA-Präparation aus Samen	16
2.5.3	Lösungen für die BN-PAGE	16
2.5.4	Lösungen für die SDS-PAGE	17
2.5.5	Lösungen für die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation	18
2.5.6	Lösungen für die kolloidale Coomassie-Färbung	19
2.5.7	Lösungen für die Silberfärbung	19
3	Methoden	20
3.1	Anzuchtmethoden	20
3.1.1	Anzucht grüner Pflanzen	20
3.1.2	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen	20
3.1.3	Etablieren einer Zellsuspensionskultur aus Hypokotylen etiolierter Keimlinge	20
3.1.4	Kultivierung einer Zellsuspensionskultur	21
3.2	Herstellung transgener Pflanzen	21
3.2.1	Transformation von Agrobakterien	21
3.2.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels floral dip	22
3.3	Molekularbiologische Methoden	22
3.3.1	RNA Präparation aus Samen	22
3.3.2	Quantitative Real Time RT-PCR	24
3.4	Präparation von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellsuspensionskultur	26

3.5	Proteinbiochemische Methoden	27
3.5.1	Auftrennung von Mitochondrien in Matrix- und Membran-Fraktion	27
3.5.2	BN-PAGE (nach Schägger und Jagow, 1991)	27
3.5.3	SDS-PAGE.....	29
3.5.3.1	Tris-Tricin-SDS-PAGE (nach Schägger und Jagow, 1987)	30
3.5.3.2	Harnstoff-SDS-PAGE.....	31
3.5.4	Fraktionierung mitochondrialer Lysate über Saccharose-Gradienten-Zentrifugation.....	32
3.5.5	Färben von Proteingelen.....	33
3.5.5.1	Färbung mit kolloidalem Coomassie-Brillantblau (nach Neuhoff et al. 1988)	33
3.5.5.2	Silberfärbung (nach Blum et al., 1987).....	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Analyse hochmolekularer PMH1/2-Protein-Komplexe	35
4.1.1	Nachweis hochmolekularer PMH1/2-Protein-Komplexe	35
4.1.2	Detektion von PMH1/2-Protein-Komplexen in mitochondrialen Matrix- und Membran-Fractionen.....	37
4.2	Charakterisierung von <i>PMH1</i> - und <i>PMH2</i> -T-DNA-Insertionsmutanten.....	39
4.2.1	Etablierung homozygoter <i>PMH2</i> -T-DNA-Insertionslinien	40
4.2.2	Detektion von PMH1 und PMH2 in den T-DNA-Insertionsmutanten	44
4.2.3	Analyse der PMH1/2-Protein-Komplexe in den T-DNA-Insertionsmutanten...	46
4.2.4	Makroskopischer Phänotyp der <i>pmh1-1</i> - und <i>pmh2-1</i> -Mutanten	48
4.2.5	Molekulare Phänotypen in den T-DNA-Insertionsmutanten	49
4.2.5.1	Die Steady-State-Level einiger reifer mitochondrialer Transkripte sind in den <i>pmh2</i> -Mutanten reduziert	50
4.2.5.2	RNA-Editing des <i>nad2</i> -Transkripts ist in den <i>pmh1</i> - und <i>pmh2</i> -Mutanten nicht beeinflusst	54
4.2.6	Der Atmungskettenkomplex I ist in der <i>pmh2-1</i> -Mutante nicht reduziert	55
4.3	Analyse von <i>PMH2</i> -RNAi-Pflanzen im <i>pmh1-1</i> -Hintergrund.....	57
4.3.1	Klonierung eines RNA-Interferenz-Konstruktes für <i>PMH2</i>	57
4.3.2	Analyse des <i>PMH2</i> -Steady-State-Levels in transformierten Pflanzen	59
5	Diskussion	62
5.1	PMH2 liegt in deutlich größeren Mengen in den Mitochondrien vor als PMH1	62
5.2	PMH1 und PMH2 sind Komponenten hochmolekularer Protein-Komplexe.....	64
5.3	PMH1 und PMH2 werden in mitochondrialen Membran-Fractionen detektiert	66

5.4	Die Funktion der RNA-Helikase PMH2 im mitochondrialen RNA-Metabolismus von <i>A. thaliana</i>	68
5.4.1	PMH2 beeinflusst die Steady-State-Level reifer mitochondrialer mRNAs	68
5.4.2	Das Steady-State-Level des Atmungskettenkomplex I ist in der <i>pmh2-1</i> -Mutante unbeeinflusst.....	70
5.5	Die biologische Bedeutung der RNA Helikase PMH1 für die Pflanze.....	71
5.6	<i>PMH2</i> -RNAi-Pflanzen mit einem <i>pmh1-1</i> Hintergrund zeigen keinen veränderten Phänotyp.....	72
6	Zusammenfassung	74
7	Summary	76
8	Literaturverzeichnis.....	78
9	Anhang	84
9.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	84
9.2	Abkürzungsverzeichnis	85
9.3	Publikationsliste	87
9.4	Lebenslauf	88
9.5	Danksagung	89
9.6	Erklärung über die in Anspruch genommenen Hilfen.....	90

1 Einleitung

1.1 RNA Metabolismus in Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

Wie nahezu alle eukaryotischen Organismen besitzen auch höhere Pflanzen Mitochondrien. In den Membranen der Mitochondrien sind die Komponenten der Atmungskette lokalisiert und aufgrund ihrer Rolle im Stoffwechsel sind diese Zellorganellen essentiell für die Pflanze. Darüberhinaus erfüllen Mitochondrien weitere wichtige Funktionen, wie die Synthese von Nukleotiden, Vitaminen und Co-Faktoren, und sind am Aminosäuremetabolismus sowie der Photorespiration beteiligt (Bari et al., 2003). Nach der Endosymbiontentheorie stammen Mitochondrien von eubakterien-artigen Einzellern ab und wurden in eine Wirtszelle aufgenommen und integriert. Sie enthalten ein eigenes Genom, wobei im Zuge der Integration in die Wirtszelle ein Großteil des mitochondrialen Genoms in den Zellkern transferiert wurde bzw. verloren ging. Das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* umfasst noch 366.924 Nukleotide und codiert für 57 Gene. Neben drei rRNAs und 22 tRNAs sind einige ribosomale Proteine und ein Teil der Proteine der Atmungskettenkomplexe und der Cytochrome C Biogenese hier codiert (Unselde et al., 1997). Für die Funktion der Organellen ist die Expression dieser Gene wichtig. Diese beginnt mit der Transkription in mono- bzw. polycistronische Transkripte, die anschließend in einer Vielzahl von Prozessierungsprozessen zu reifen Transkripten werden (Hoffmann et al., 2001, Gagliardi und Binder, 2007). Dazu gehört die Generierung von reifen 3'- und 5'-Transkriptenden für alle Transkripte. Einige Transkripte enthalten zudem Gruppe II Introns, die durch *cis*- bzw. *trans*-Splicing entfernt werden müssen. Außerdem ist für mitochondriale Transkripte das RNA-Editing bekannt (Giege, 1999). Letztlich werden für die Stabilisierung der Transkripte bis zur Translation, die Translation und die anschließende Degradation weitere Proteine oder Protein-Komplexe benötigt. Die Regulation der Genexpression findet dabei offensichtlich über verschiedene Mechanismen statt - auf posttranskriptionaler Ebene über RNA-Stabilität bzw. -Degradation genauso wie auf posttranslationaler Ebene über Protein-Modifikationen und -Degradation (Gagliardi und Binder, 2007). Über die Proteine, die an diesen Mechanismen beteiligt sind, ist bis jetzt wenig bekannt.

Die überwiegende Mehrzahl der für die mitochondriale Genexpression benötigten Proteine und Cofaktoren sind im Kern kodiert und müssen aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien importiert werden. Dabei wird das gesamte mitochondriale Proteom auf ca. 2.000 bis 3.000 Proteine geschätzt, von denen in *A. thaliana* jedoch nur ein Bruchteil tatsächlich identifiziert

sind (Millar et al., 2001, 2005, 2006).

Zwei Protein-Familien, deren Mitglieder RNA-bindende Eigenschaften aufweisen und für deren Mitglieder zum Teil eine mitochondriale Lokalisation vorhergesagt ist, bilden die PPR- und die DEAD-Box-Proteine (Small und Peeters, 2000, Linder, 2006, Cordin et al., 2006).

1.2 Struktur und Funktionsweise der DEAD-Box-Proteine

Die DEAD-Box-Proteine gehören zur Superfamilie 2 der Helikase-Proteine. Helikasen kommen in vielen eukaryotischen und prokaryotischen Organismen vor und werden aufgrund verschiedener konservierter Motive in drei Superfamilien und zwei Familien eingeteilt. Die Superfamilie 1 bilden die DNA-Helikasen, die Superfamilie 2 dagegen die RNA-Helikasen. Die DEAD-Box-Proteine bilden zusammen mit den DEAH-, DExH- und DExD-Proteinen eine Familie. Sie wurden zuerst 1989 von Linder et al. aufgrund von acht konservierten Motiven identifiziert und erhielten ihren Namen nach der Aminosäureabfolge des zweiten Motivs D-E-A-D (Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat), das auch als Walker B Motiv bezeichnet wird. Insgesamt gibt es mehr als 500 Proteine mit diesen Motiven. Seither wurde ein weiteres Motiv (Q-Motiv) zusammen mit einem 17 Aminosäuren stromaufwärts davon liegenden aromatischen Rest identifiziert (Cordin et al., 2004, 2006). Dieses Motiv ist spezifisch für DEAD-Box-Proteine. Die Aminosäureabfolge dieser Motive bildet den 350 bis 400 Aminosäuren langen Kern dieser Proteine. Über Kristallisationsstudien wurde festgestellt, dass der Kern der Proteine zwei jeweils aus fünf β -Faltblättern und fünf α -Helices aufgebaute kugelförmige Domänen bildet, die durch eine Spalte getrennt sind. Diese Spalte kann von verschiedener Breite sein. Die Orientierung der beiden Domänen zueinander kann ebenfalls von Protein zu Protein unterschiedlich sein und durch konformale Änderungen während der Substrat-Bindung variiert werden. Die N-terminale Domäne (Domäne I) umfasst die Motive I (AxTGoGKT), Ia (PTRELA), Ib (TPGR), II (DEAD), III (SAT) und das Q-Motiv (GaccPohlQ), welches eine Cap-Struktur über der Domäne I bildet. Die Motive IV (LIV), V (ARGID) und VI (HRxGRxGR) bilden die C-terminale Domäne (Domäne II). Die C- und N-terminalen Verlängerungen sind zwischen den einzelnen DEAD-Box-Proteinen sehr variabel und es wird vermutet, dass sie für die Substratspezifität verantwortlich sind. Für das Protein DbpA aus *Escherichia coli* wurde zum Beispiel bereits gezeigt, dass eine zusätzliche RNA-Bindedomäne im C-terminalen Teil des Proteins die Substratspezifität ausmacht (Kossen et al., 2002). Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass für die Ausbildung der Substratspezifität Protein-Protein und Protein-RNA Wechselwirkungen mit anderen Co-Faktoren notwendig

sind (Cordin et al., 2006). Einige Helikasen arbeiten in großen Multiprotein-Komplexen, wie zum Beispiel eIF4A, eines der ersten umfangreich untersuchten DEAD-Box-Proteine (Schütz et al., 2008), oder p68 und p72 (Ogilvie et al., 2003). DEAD-Box RNA-Helikasen werden auch in kleineren Komplexen beobachtet, wie dem Degradosom in *E. coli*, das die RhlB-Helikase und die PNPase enthält (Liou et al., 2002). Konformale Änderungen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Substratbindung sind darüberhinaus oftmals essentiell für die Funktion von DEAD-Box-Proteinen, wie zum Beispiel für das eIF4A und das Dhh1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng et al., 2005).

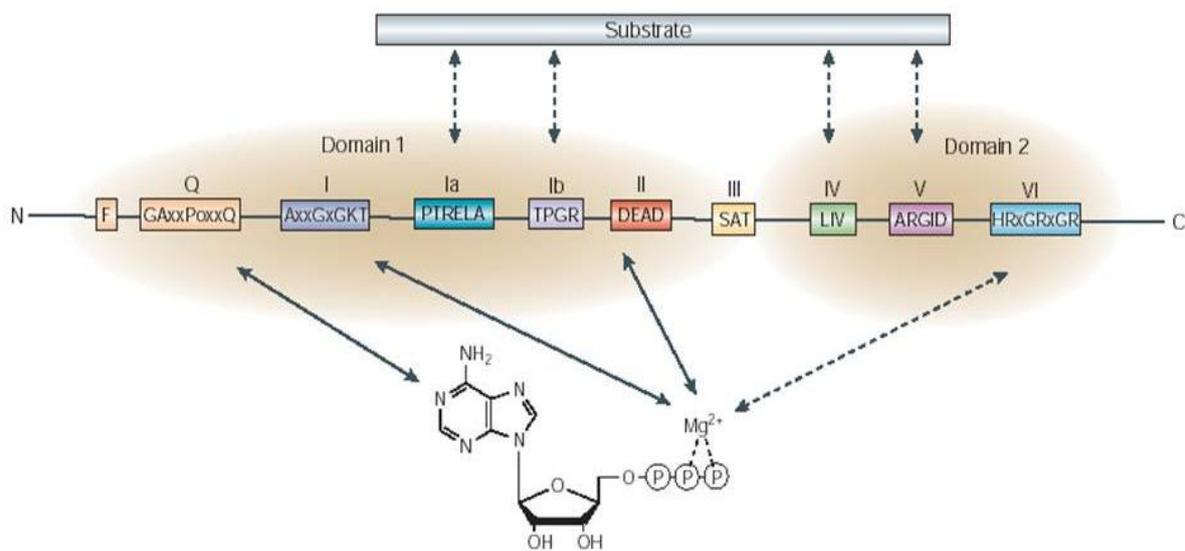


Abbildung 1.1: (aus Rocak und Linder, 2004) **Der allgemeine Aufbau von DEAD-Box-Proteinen.** Die neun konservierten Motive der DEAD-Box-Proteine bilden zwei Domänen (grau unterlegt). Die Pfeile zeigen, welche der 9 konservierten Motive des Proteins mit dem Substrat (RNA) interagieren und welche für die NTPase-Aktivität benötigt werden.

Aufgrund der beiden in allen Familien der DNA- und RNA-Helikasen konservierten Walker A- und Walker B-Motive wurden die DEAD-Box-Proteine als Helikasen eingestuft. Für eine ganze Reihe von DEAD-Box-Proteinen wurde in vitro auch bereits eine RNA-abhängige ATPase-Aktivität und eine ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität nachgewiesen. Dabei sind die Motive I (Walker A), II (Walker B), VI und das Q-Motiv für die Bindung und Hydrolyse von ATP verantwortlich, wobei das Q-Motiv auch zur RNA-Bindung beiträgt. Die Motive Ia, Ib, III, IV und V sind vermutlich für die RNA-Bindung und strukturellen Veränderungen des Proteins während der Bindung von ATP und RNA verantwortlich. Dabei wird für Motiv III vermutet, dass es die ATPase- und die Helikase-Aktivität miteinander verknüpft. Auch für Motiv V kann eine Beteiligung an der ATPase-Aktivität oder der Verknüpfung der beiden Aktivitäten nicht ausgeschlossen werden. Um

beide Funktionen zu erfüllen, werden vermutlich eine Vielzahl von Interaktionen zwischen den einzelnen Motiven ausgebildet (Cordin et al., 2006). So wurde für das DEAD-Box-Protein Dhh1p aus *S. cerevisiae* eine Interaktion der Motive I, V und dem Q-Motiv nachgewiesen. Durch Mutationen verursachte Unterbindung der Wechselwirkungen führte zum Funktionsverlust des Proteins (Cheng et al., 2005).

Die Helikase-Aktivität beinhaltet neben dem Auflösen von Sekundärstrukturen und Tertiärstrukturen von RNA als RNA-Chaperon, wie für das CYT-19 DEAD-Box-Protein aus *Neurospora crassa* gezeigt wurde (Tijerina et al., 2006, Mohr et al., 2006), auch das Auflösen von DNA/RNA-Bindungen und von Protein/RNA-Strukturen als RNPsasen (Linder et al., 2001, Schwer, 2001, Jankowsky und Bowers, 2006, Linder, 2006). Darüber wie die DEAD-Box-Proteine diese Helikase-Aktivität ausführen, ist bis jetzt recht wenig bekannt. Die Mehrzahl der DEAD-Box-Helikasen benötigten in *in vitro* Versuchen als Substrat einen Nukleinsäure-Doppelstrang, von dem wenigstens ein Strang RNA ist. Außerdem benötigen sie überhängende Enden, um an ein RNA-Substrat zu binden. Yang et al. (2007) haben dabei für Ded1p und Mss116p aus *S. cerevisiae* gezeigt, dass die Überhänge lediglich zum Laden des Proteins auf das RNA-Substrat, nicht aber für das Auflösen des RNA-Duplex selbst benötigt werden. Die meisten DEAD-Box-Proteine zeigen dabei abweichend von anderen Helikasen eine Bidirektionalität für die Entwindungsaktivität, dafür aber kaum eine Prozessivität. Sie entwinden nur Bereiche von 10 bis 25 bp Länge und lösen einen RNA-Duplex damit nur lokal auf. Für den Mechanismus werden verschiedene Modelle diskutiert, wie zum Beispiel der „An- und Aus“-Mechanismus (Cordin et al., 2006). Dabei wird davon ausgegangen, dass der zu entwindende Duplex am Ende thermisch denaturiert wird und das Protein so an einen einzelsträngigen Teil binden kann. Dadurch wird der Duplex destabilisiert und entweder entwunden oder das Protein dissoziiert wieder von seinem Substrat, wobei für das Lösen des Substrates die Lyse von ATP benötigt wird. In einem zweiten Model bewegt sich die Helikase, nachdem sie einmal an das Substrat gebunden hat, über Translokation unter ATP-Hydrolyse immer dann vorwärts, sobald durch thermisches Aufschmelzen einzelne Basen des Duplexes gelöst werden. Auf diese Weise wird der Duplex thermisch dissoziiert indem die Helikase ein erneutes Zusammenlagern der beiden Stränge verhindert. Die so auftretende Prozessivität wird von der Substratspezifität der jeweiligen Helikase bestimmt (Cordin et al., 2006).

In einem dritten Model entwindet die Helikase Doppelstränge aktiv unter ATP-Verbrauch und aktiver Translokation entlang des Doppelstranges (Rocak und Linder, 2004). Dabei könnte das Protein die durch die ATP-Bindung und anschließende Hydrolyse hervorgerufenen

konformationalen Veränderungen, die zu einem „Öffnen“ bzw. „Schließen“ der Spalte zwischen den beiden Domänen des Proteins führen, nutzen, um sich entlang des RNA-Stranges zu bewegen. Eine andere denkbare Variante ist, dass das Protein als Dimer mit jeweils einem Molekül in einer der beiden Konformationen vorliegt, die verschiedene ATP- und RNA-Bindeeigenschaften aufweisen. Während der ATP-Bindung und Hydrolyse, sowie der dsRNA-Bindung und ssRNA-Freisetzung tauschen beide Moleküle die Konformation und bewegen sich so entlang des RNA-Stranges. Liu et al. haben kürzlich für das Ded1p-Protein aus *S. cerevisiae* gezeigt, dass die ATP-Hydrolyse nicht für das Auflösen eines RNA-Duplexes benötigt wird, aber für das Lösen des Enzymes vom RNA-Substrat, da ein Protein-ATP-Komplex deutlich höhere Affinität zum RNA-Substrat zeigt, als ein ADP-Protein-Komplex (Liu et al., 2008).

1.3 Funktionen der DEAD-Box-Proteine

DEAD-Box-Proteine sind in fast allen Organismen aus allen drei Reichen des Lebens zu finden. Dabei wurden ihnen Funktionen in nahezu allen Bereichen des RNA-Metabolismus von der Transkription, dem Transport, der Prozessierung der 5'- bzw. 3'-Enden, dem RNA-Editing und dem Splicing über die Ribosomen-Biogenese und Translationsinitiation bis hin zur Degradation der RNA nachgewiesen (Cordin et al., 2006, Linder, 2006).

So wurde für die Helikase DP103 eine Funktion in der Repression der Transkription gezeigt. Auch die beiden sehr ähnlichen Helikasen p68 und p72 fungieren als Corepressoren oder Coaktivatoren der Transkription, indem sie mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren (Fuller-Pace, 2006).

Nach der Transkription sind DEAD-Box-Proteine am Spleißen der pre-mRNA beteiligt, wobei ihre genaue Funktion bis jetzt noch unbekannt ist. Obwohl die beiden Transesterifikationsreaktionen während des Spleißens keine Energie benötigen, wird trotzdem ATP für das Spleißen verbraucht. Vermutlich wird diese für die Neu- und Umordnung von RNA-Protein-Komplexen während der Assemblierung des Spliceosoms und der Substrat-Umsetzung benötigt (Rocak und Linder, 2004, Linder, 2006, Cordin et al., 2006). Für die beiden Helikasen CYT19 aus *Neurospora crassa* und Mss116p aus *S. cerevisiae* wurde *in vitro* gezeigt, dass sie das Spleißen bestimmter Introns auch als Einzelprotein unter ATP-Verbrauch unterstützen, dafür aber nicht unbedingt ihre Helikase-Aktivität benötigen, somit also als RNA-Chaperone fungieren. Vermutlich werden eher funktionelle Konformationen des Substrates stabilisiert, als aktiv gebildet (Mohr et al., 2006, Solem et al., 2006, del Campo

et al., 2007). Die p72-Helikase spielt zudem eine Rolle im alternativen Spleißen (Hönig et al., 2002).

Ein Einfluss von DEAD-Box-Proteinen auf das RNA-Editing wurde bis jetzt recht selten nachgewiesen. Ein Beispiel ist das mHEL61 aus *Trypanosoma brucei*, dessen Knockout in einer starken Reduktion editierter mitochondrialer mRNAs resultiert (Missel et al., 1997).

Nach der Prozessierung der mRNA sind DEAD-Box-Proteine auch am Export aus dem Zellkern in das Cytoplasma beteiligt. Das Dbp5-Protein aus Mensch und Säugetieren zum Beispiel bindet mRNA im Kern und leitet sie durch den „Nuclear pore complex“ (NPC). Auf der cytoplasmatischen Seite wird die RNA durch Bindung von Dpb5 an das NUP214-Protein vom Dpb5 dissoziiert (Moeller et al., 2009, Gross et al., 2007).

An der Ribosomen-Biogenese ist die vermutlich größte Anzahl an DEAD-Box-Proteinen beteiligt. So sind 14 der 24 bekannten DEAD-Box-Proteine aus *S. cerevisiae* an der Assemblierung der Ribosomen-Untereinheiten beteiligt (Cordin et al., 2006), wie zum Beispiel Has1p, das zusätzlich an der Reifung der 18S rRNA und 27S pre-rRNA beteiligt ist (Emery et al., 2004, Rocak et al., 2005). Drei der fünf DEAD-Box-Proteine in *E. coli* (CsdA, SrmB und DbpA) sind ebenfalls an der Assemblierung der großen Ribosomen-Untereinheit beteiligt (Iost und Dreyfus, 2006, Charollais et al., 2004).

An der Translationsinitiation sind zum Beispiel eIF4A im Komplex mit eIF4B, einem RNA-bindenden Protein, durch Entwindung von Sekundärstrukturen am 5'-Ende der mRNA beteiligt. Auch Ded1p aus *S. cerevisiae* ist essentiell für die Translationsinitiation, wobei die genaue Rolle des Proteins noch unbekannt ist (Iost et al., 1999).

Letztlich können DEAD-Box-Proteine auch am Abbau von RNA beteiligt sein. Hier sind allerdings kaum Beispiele bekannt. In Eukaryoten sind nur Proteine verwandter Familien wie den DEAH-Box-Proteinen oder Ski2-artigen Proteinen in Komplexen mit dem Exosom gefunden worden (Cordin et al., 2006). In *E. coli* wurde dagegen RhlB als Bestandteil des Degradosomes identifiziert. Für dieses Protein wurde bereits im Minimal-Komplex mit der PNPase eine Funktion in der Degradation doppelsträngiger RNA ohne Degradosom gezeigt (Liou et al., 2002). Für Dhh1 aus *S. cerevisiae* wurde gefunden, dass es am Decapping von mRNAs beteiligt ist und damit diese für die 3' nach 5'-Degradation zugänglich macht (Cheng et al., 2005).

Über die Funktion und Bedeutung von DEAD-Box-Proteinen in Pflanzen ist noch recht wenig bekannt. Sie scheinen mit all den Funktionen, mit denen DEAD-Box-Proteine den RNA-Metabolismus und damit die Genexpression regulieren, eine bedeutende Rolle im Wachstum und der Entwicklung von Pflanzen zu spielen (Western et al., 2002, Arciga-Reyes et al., 2006,

Yoine et al., 2006, Kobayashi et al., 2007, Matthes et al., 2007, u.a.). So verursacht der Knockout des UPF1, das am Abbau nicht korrekter mRNAs (Nonsense-mediated Decay) beteiligt ist, die Ausbildung abnormaler, gezackter Blätter, verspätete Blütenbildung und Keimlingslethalität (Arciga-Reyes, et al., 2006). Das VDL-Protein aus Tabak ist vermutlich an der Differenzierung von Chloroplasten beteiligt und dessen Knockout verursacht ebenfalls verkrüppelte Blätter und abnormale Wurzeln und Blüten (Wang et al., 2000).

Darüberhinaus sind DEAD-Box-Proteine an Stress-Antworten und deren Regulation in Pflanzen beteiligt. Zum Beispiel bewirkt die Überexpression des OsBIRH1-Gens in *Arabidopsis* eine Hochregulation der Gene für die Abwehr von Schädlingen wie *Pseudomonas syringae* und für Toleranz gegenüber oxidativem Stress (Li et al., 2008). Das LOS4-Protein aus *A. thaliana* reguliert die Expression von Transkriptionsaktivatoren der CBF-Familie indem es den mRNA-Export der CBF-Transkripte erhöht oder verringert und somit das Protein-Level reguliert. Diese Transkriptionsaktivatoren werden für die Expression von Genen der Kälteantwort benötigt (Gong et al., 2005). Die *STRS1* und *STRS2* Gene dagegen hemmen die Expression von Transkriptionsaktivatoren der Stressantwort auf Salz-, Hitze- und osmotischen Stress (Kant et al., 2007).

1.4 DEAD-Box-Proteine in den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis thaliana* wurden aufgrund der 9 konservierten Motive 53 Gene für DEAD-Box-Proteine anhand ihrer Sequenz identifiziert (Boudet et al., 2001). Durch verschiedene Computer-Algorithmen zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation wurden für die vier DEAD-Box-Proteine PMH1 (Putative Mitochondriale RNA-Helikase 1, At3g22310), PMH2 (At3g22330), PMH3 (At1g12770) und PMH4 (At4g09730) eine mitochondriale Lokalisation in Betracht gezogen. Die mitochondriale Lokalisation wurde für PMH1-4 über die Expression von entsprechenden GFP-Fusions-Proteinen in Tabak-Protoplasten nachgewiesen (Matthes et al., 2007, Forner, Wildum, Diplomarbeiten, 2002, Schmidt-Gattung, Dissertation, 2006). Desweiteren wurde PMH2 in Proteom-Analysen in mitochondrialen Lysaten gefunden (Millar et al., 2001; Matthes et al., 2007).

Die beiden Proteine PMH1 und PMH2 weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit von 76 % auf Aminosäureebene auf. Dagegen zeigen die anderen beiden Helikasen abgesehen von den konservierten Kerndomänen der DEAD-Box-Proteine kaum eine Sequenzähnlichkeit zueinander und zu der Sequenz von PMH1/2 (Schmidt-Gattung, Dissertation, 2006). Mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen wurden die Transkripte aller vier Gene in allen

untersuchten Geweben nachgewiesen. Die Promotoraktivitäten von *PMH2*, *PMH3* und *PMH4* wurde in allen Geweben über Promotor::GUS-Fusions-Pflanzen bestätigt. Der *PMH1*-Promotor ist nur in Pollen und Wurzelspitzen aktiv. Die Expressionsmuster der vier Gene unterschieden sich jedoch deutlich. *PMH2* ist deutlich stärker exprimiert als *PMH1*. *PMH1* ist dafür in starkem Maß durch Kälte induzierbar, was für *PMH2* nur in geringerem Maße zutrifft. *PMH3* und *PMH4* werden kaum bzw. gar nicht durch Kälte angeschaltet. Zusätzlich sind *PMH2*, *PMH3* und *PMH4* durch Verwundung und *PMH1* durch Salz-Stress induzierbar (Schmidt-Gattung, Dissertation 2006, Kim et al., 2008). Analysen von T-DNA-Insertions-Pflanzen wurden bis zum Beginn dieser Arbeit nur für das *PMH1*- und das *PMH4*-Gen durchgeführt. Während an *PMH1* Knockout-Pflanzen in bisherigen Analysen kein sichtbarer Phänotyp zu erkennen war, erwies sich *PMH4* als so essentiell, dass keine homozygoten Ko-Mutanten erhalten werden konnte. Heterozygote Pflanzen zeigten bei der Samenbildung eine 25 %ige Embryoletalität in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung (Schmidt-Gattung, Dissertation 2006).

Für die *PMH1/2*-Proteine wurde über zweidimensionale Blue-native/SDS-PAGE und anschließende Immunodetektion mit einem Antikörper für beide Proteine eine Assoziation an RNA-abhängige, hochmolekulare Protein-Komplexe nachgewiesen. Die Behandlung der Zellsuspensionskultur mit Kälte vor der Isolierung der untersuchten Mitochondrien und eine Solubilisierung der Mitochondrien unter Anwesenheit von $MgCl_2$ verstärkten die Bildung solcher Komplexe (Matthes et al., 2007). Weiterhin deuteten proteinbiochemische Analysen auf eine Assoziation der beiden Proteine an Membranen hin.

Die unterschiedlichen Expressionsmuster und die verschiedenen Auswirkungen eines Knockout der einzelnen Proteine auf die Pflanze deuten auf unterschiedliche Funktionen dieser vier Proteine im RNA-Metabolismus in den Mitochondrien hin. Die Funktionen selbst waren aber noch für alle vier Proteine unbekannt.

1.5 Zielsetzung der Dissertation

Als Ausgangspunkt für die Untersuchung des RNA-Metabolismus in Mitochondrien wurde bereits die Lokalisation für vier DEAD-Box-Proteine (*PMH1-4*) in diesem Kompartiment nachgewiesen. Für zwei von ihnen, *PMH1* und *PMH2*, konnte außerdem mittels BN-PAGE eine Assoziation an hochmolekulare RNA-abhängige Proteinkomplexe beobachtet werden (Matthes, Diplomarbeit).

Ziel dieser Arbeit ist es, diese hochmolekularen Komplexe und ihre Verteilung auf Matrix

und Membranen der Mitochondrien mittels Saccharose-Gradienten Auftrennung und BN-PAGE näher zu charakterisieren, um Hinweise auf die Art der Komplexe und damit ihre Funktion im RNA-Metabolismus zu bekommen.

In einem zweiten Ansatz sollen T-DNA-Insertionslinien für das *PMH2*-Gen homozygot etabliert werden. Für das *PMH1*-Gen war bereits eine solche Linie etabliert (Schmidt-Gattung, Dissertation 2006). Im Anschluss sollen diese Linien charakterisiert werden, um über eventuelle molekulare oder morphologische Phänotypen der Mutanten Hinweise zu bekommen, an welchen Prozessen des RNA-Metabolismus beide Proteine *in vivo* beteiligt sein könnten.

Zusätzlich soll durch RNA-Interferenz in den Mutanten auch die Expression des intakten PMH-Proteins unterbunden werden. Die phänotypische Analyse solcher Pflanzen soll Hinweise auf mögliche redundante Funktionen der beiden Proteine liefern.

2 Material

2.1 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia

T-DNA-Insertionsmutanten:

Salk 035421 (The Salk Institute for Biological studies, San Diego, USA)

Salk 056387 (The Salk Institute for Biological studies, San Diego, USA)

Sail 628 C06 (Syngenta, Basel, Schweiz)

2.2 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Stratagene GmbH Heidelberg, Deutschland)

Escherichia coli SURE (Stratagene GmbH Heidelberg, Deutschland)

Agrobacterium tumefaciens GV2260 (Deblaere et al., 1985)

2.3 Kits

DNeasy [®] Plant Mini Kit (50)	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Gateway [®] LR Clonase [™] Enzyme Mix	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
GFX [™] Micro Plasmid KIT	(GE Healthcare)
GFX [™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit	(GE Healthcare)
LightCycler 480 [®] SYBR Green I Master	(Roche, Mannheim, Deutschland)
M-MLV-Reverse Transkriptase RNaseH(-) Point Mutant	(Promega, Mannheim, Deutschland)
pGEM [®] -T Vector System I	(Promega, Mannheim, Deutschland)
PureLink [™] HiPure Plasmid Maxiprep Kit	(Invitrogen)
Rediprime [™] II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences)
RNeasy [®] Plant Mini Kit (50)	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Roti [®] -Nanoquant	(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit	(Roche, Mannheim, Deutschland)

2.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Experiment
LBXL	CCGATTTTCGGAACCACCATCAAACAGG	PMH2 T-DNA-Linien
RBXL	ATTAAACTCCAGAAACCCGCGGCTGA	PMH2 T-DNA-Linien
SynLB	TAGCCTTGCTTCCTATTATATCTTCC	PMH2 T-DNA-Linien
PMH2FLR5	GCTTTCTCCTTTTACCTCGAACC	PMH2 T-DNA-Linien
At PMH2 GFP 1.5	CACCTGGATCCGAAAATGATCAC	PMH2 T-DNA-Linien
At PMH2 GFP 2.3	GCGGATCCCAAGCCCATCACCACCAAC	PMH2 T-DNA-Linien
SALK 021934	TAGACGAGGGAGGAATCC	PMH2 T-DNA-Linien
Pmh2hy3'	ATGGATCCGTAAGATCTTTTCCCAT	PMH2 T-DNA-Linien
nad2 ab splicing a	CCAGTAATGTGGGTTGG	nad2 steady state Transkripte
nad2 ab splicing b	AAGAGCATACCGCGAGTAGG	nad2 steady state Transkripte
nad2 ab intron 1	TAGCCGGGAGGAAAGAAAGG	nad2 steady state Transkripte
nad2 cde splicing 1	ACAAAGGAGAGGGGTATAGC	nad2 steady state Transkripte
nad2 cde splicing 2	TCTCATACGCAGGAATACCC	nad2 steady state Transkripte
nad2 cde intron 2R	CTCGCATTTCTCATCGAACA	nad2 steady state Transkripte
nad2d NS.R	GGGCACCAGATATCTATGAGGG	nad2 steady state Transkripte
nad2d NS.H	GTCACTACTCCCCTGGGGC	nad2 steady state Transkripte
Atnad4-fl.3'A	GACCCGTTTTTCTTTTCTTTGCTG	nad4 steady state Transkripte
Atnad4-fl.5'B	AGGCGTATACACGGGAAGG	nad4 steady state Transkripte
nad7 ab splicing 1	ATGACGACTAGGAAAAGGCA	nad7 steady state Transkripte
Atnad7-10	TTGTGAATGGGCAGAGCCGG	nad7 steady state Transkripte
nad9 NS.H	ATGGATAACCAATTCATTTTC	nad9 steady state Transkripte
nad9 NS.R	TTATCCGTCGCTACGCTG	nad9 steady state Transkripte
Atatp8-NS.H	CTGGATAAATTCACTTATTTTTCAC	atp8 steady state Transkripte
Atatp8-NS.R	TTCGATATATTATATAATATGTTTCTTTCCC	atp8 steady state Transkripte
P18SrRNA	AAGCATATGACTACTGGCAGG	Northern Kontrolle
GW1	GTGCCACCTTATTCAACCATCAGG	RNAi
GW1_AS	CCTGATGGTTGAATAAGGTGGCAC	RNAi
pmh2 RT3'	GAGAGATCTGATCCAACCTCGG	RT-PCR
pmh2 RT5'	ATGATCACTACAGTGCTACG	RT-PCR
pmh2qPCR_2H	CCGATTCCTGAGCTCCCTA	Q-RT-PCR
pmh2qPCR_2R	AAGCTTGAACCACGATCCCT	Q-RT-PCR
PP2A At1g13320_1	TAACGTGGCCAAAATGATGC	Q-RT-PCR
PP2A At1g13320_2	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	Q-RT-PCR
AT4G27960_1 UBC9	TCACAATTTCCAAGGTGCTGC	Q-RT-PCR
AT4G27960_2 UBC9	TCATCTGGGTTTGGATCCGT	Q-RT-PCR
DTXSC	GACTCGAGTCGACATCGA(T) ₁₇	cDNA Synthese (Q-RT-PCR)

2.5 Lösungen und Medien

2.5.1 Medien für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

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

MS-Medium für die Flüssigkultur:

4,3 g/l	Murashige Skoog Salts (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	
90 mM	Saccharose	30 g/l
pH 5,7 einstellen mit 1 M KOH		
Nach dem Autoklavieren für 15 min werden zugegeben:		
4,5 nM	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1 mg/ml)	50 µl/ml
4 µM	Nikotinsäure (5 mg/ml)	1 µl/ml
2,4 µM	Pyridoxin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	1 µl/ml
0,3 µM	Thiamin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	1 µl/ml
0,55 mM	MyoInositol	0,1 mg/ml
0,075 mg/ml	Ampicillin (1 mg/ml)	75 µl

Material

MS1-Medium:

4,4 g/l	Murashige Skoog Salts with Gamborg B5 Vitamins (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	
5 mM	MES	1 g/l
0,5 % (w/v)	Saccharose	5 g/l
0,8 % (w/v)	Microagar	8 g/l

pH 5,7 mit KOH einstellen und für 15 min autoklavieren

MS2-Medium:

4,3 g/l	Murashige Skoog Salts (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	
30 g/l	Saccharose	
0,8 % (w/v)	Microagar	

pH-Wert 5,7 mit KOH einstellen und für 15 Minuten autoklavieren

4,5 nM	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1 mg/ml)	50 µl/ml
4 µM	Nikotinsäure (5 mg/ml)	1 µl/ml
2,4 µM	Pyridoxin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	1 µl/ml
0,3 µM	Thiamin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	1 µl/ml
0,55 mM	MyoInositol	0,1 mg/ml
1,33 mM	BAP (1 mg/ml)	0,3 µl/ml

2.5.2 Extraktionspuffer für die RNA-Präparation aus Samen

0,2 M	Natriumtetraborat-decahydrat	76,3 g/l
30 mM	EGTA	11,4 g/l
1 % (w/v)	SDS	10 g/l
1 % (w/v)	Natriumdeoxycholat	10 g/l

pH 9,0 mit 1 M NaOH einstellen
frisch zugegeben werden immer

0,2 % (w/v)	DTT (20%-Stocklsg)	10 µl/ml
6 % (w/v)	PVP40	60 mg/ml
0,5 mg/700 µl	ProteinaseK	

2.5.3 Lösungen für die BN-PAGE

6 x BN-Gelpuffer	3 M	ε-AMinocaprinsäure	393,6 g/l
	0,3 M	Bis-Tris/HCl (500 mM, pH 7,0)	600 ml/l

Material

10 x BN-Kathodenpuffer			
Farblos	500 mM	Tricin	89,6 g/l
	150 mM	Bis-Tris pH 7,0	31,38 g/l
	pH 7,0 mit HCl einstellen		
blau	10 x	Kathodenpuffer farblos	
	0,2 % (w/v)	Coomassie G 250	1 g/l
10 x BN-Anodenpuffer	500 mM	Bis-Tris pH 7,0	104,6 g/l
	pH 7,0 mit HCl einstellen		
ACA 750-Probenpuffer:	750 mM	ϵ -Aminocapronsäure	99,3 g/l
	50 mM	Bis-Tris (500 mM, pH 7,0)	10 ml/l
	0,5 mM	EDTA-Na ₂	
BN-Ladepuffer	750 mM	ϵ -Aminocapronsäure	98,4 g/l
	5% (w/v)	Coomassie G 250	50 g/l
Äquibrierungslösung	2 % (w/v)	SDS	20 g/l
	66 mM	Na ₂ CO ₃	7,1 g/l
	2 % (w/v)	2-Mercaptoethanol	20 ml

2.5.4 Lösungen für die SDS-PAGE

Harnstoff-SDS-PAGE:

10 x SDS Kathoden-/Anodenpuffer			
	250 mM	Tris	30,3 g/l
	1,92 M	Glycin	144,13 g/l
	1 % (w/v)	SDS	10 g/l
8 x SDS-Trenngelpuffer	3 M	Tris	363,48 g/l
	pH 8,8 mit HCl einstellen		
2 x SDS-Sammelgelpuffer	0,25 M	Tris	30,28 g/l
	pH 6,8 mit HCl einstellen		
Überschichtungslösung	1x SDS-Kathoden-/Anodenpuffer		100 ml/l
	0,5 % (w/v)	Agarose	5 g/l
2x SDS-Probenpuffer	0,125 M	Tris pH 6,8	15,14 g/l
	20 % (v/v)	Glycerin (99%)	200 ml
	4 % (w/v)	SDS	40 g/l
	100 mM	DTT (1M)	100 ml
	1 Spatelspitze	Bromphenolblau	

Tricin-SDS-PAGE:

3x Gelpuffer	3 M	Tris	363,5 g/l
	0,3 % (w/v)	SDS	3 g/l
	pH 8,45 mit HCl einstellen		
10x Anodenpuffer	2 M	Tris	242,2 g/l
	pH 8,9 mit HCl einstellen		
10x Kathodenpuffer	1 M	Tris	121,1 g/l
	1 M	Tricin	179,2 g/l
	1 % (w/v)	SDS	10 g/l
	pH 8,25 stellt sich von selbst ein		
Überschichtungslösung	1 x	Kathodenpuffer	100 ml/l
	0,5 % (w/v)	Agarose	5 g/l
	Spatelspitze	Bromphenolblau	

2.5.5 Lösungen für die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Solubilisierungspuffer

0,2 M	Tris-HCl (2 M, pH 8,0)	100 ml/l
35 mM	MgCl ₂ (2 M)	17,5 ml/l
25 mM	EGTA (0,1 M)	250 ml/l
0,2 M	Saccharose (2 M)	100 ml/l
40 mM	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	80 ml
500 µg/ml	Heparin	0,5 g/l
500 µg/ml	Chloramphenicol	0,5 g/l
10 mM	β-Mercaptoethanol	700 µl/l
2 % (w/v)	DDM	20 g/l
(Optional:	0,3 M KCl (3 M)	100 ml/l)

Gradientenpuffer:

40 mM	Tris-HCl (2 M, pH 8,0)	20 ml
10 mM	MgCl ₂ (2 M)	5 ml
1 mM	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 ml
0,5 mg/ml	Heparin	0,5 g/l
100 µg/ml	Chloramphenicol	100 mg/l
10 mM	2-Mercaptoethanol	700 µl/l
20 mM	KCl (3 M)	6,66 ml

2.5.6 Lösungen für die kolloidale Coomassie-Färbung

Stammlösungen:

A	2 %	Ortho-Phosphorsäure	20 g/l
	10 %	Ammoniumsulfat	100 g/l
B	5 %	Coomassie-G250	1 g/20 ml

Gebrauchslösungen:

Fixierer:	40 %	Methanol (100 %)	400 ml/l
	10 %	Essigsäure (100 %)	100 ml/l
Färbelösung:	98 %	Lösung A	98 ml
	2 %	Lösung B	2 ml

Kurz vor Gebrauch werden vier Teile (100 ml) der Färbelösung mit einem Teil (25 ml) Methanol versetzt.

2.5.7 Lösungen für die Silberfärbung

Fixierer:	50 %	Methanol (100 %)	500 ml/l
	12 %	Essigsäure (100 %)	120 ml/l
Waschlösung:	50 %	Ethanol (100 %)	500 ml/l
Imprägnierer:	0,8 mM	Natriumthiosulfat	0,2 g/l
Silbernitrat-Lösung:	11,7 mM	Silbernitrat	2 g/l
	0,027 %	Formaldehyd (36,5 %-Lsg.)	750 µl/l
Entwickler:	566 mM	Natriumcarbonat	60 g/l
	0,02 mM	Natriumthiosulfat	5 mg/l
	0,009 %	Formaldehyd (36,5 %-Lsg)	250 µl
Stopp-Lösung:	10 %	Essigsäure (100 %)	100 ml/l
Lagerlösung:	1 %	Essigsäure (100 %)	10 ml/l

3 Methoden

3.1 Anzuchtmethoden

3.1.1 Anzucht grüner Pflanzen

Alle *Arabidopsis thaliana* Pflanzen werden entweder in einzelnen Töpfchen auf Kultivierungserde oder in sterilen Petrischalen mit Standard-MS-Medium und 1,5 % Microagar angezogen. Die Anzucht erfolgt entweder in einer Klimazelle VB 8018 (Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen, Deutschland) oder einem Percival Klimaschrank (CLF Laborgeräte GmbH, Emersacker, Deutschland) unter den Wachstumsbedingungen 16 h Licht (80-140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) und 8 h Dunkelheit (Langtagbedingungen), sowie 21-23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-80 %. Zur Kältebehandlung werden die Pflanzen unter den genannten Langtagbedingungen bei 4°C während der 8 h Dunkelperiode gehalten.

3.1.2 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana* Samen

Für das Wachstum auf sterilem MS-Medium muss die Oberfläche der *A. thaliana* Samen vor dem Ausbringen sterilisiert werden, um ein Überwachsen der MS-Platten mit Bakterien und Schimmelpilzen zu vermeiden. Dazu werden ca. 100 μl Samen (entspricht ~ 1000 Stück) in ein 15 ml Falcon abgefüllt und für 5 min in 15 ml 70 % (v/v) Ethanol geschüttelt. Im Anschluss werden die Samen für 2 min bei 2.000 x g abzentrifugiert und danach für 5 min mit 15 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült. Dann werden die Samen für 2 x 10 min mit 15 ml Sterilisationslösung (0,6 % (v/v) Natriumhypochlorid, 1 % (v/v) TritonX-100) behandelt. Zum Abschluss werden die Samen dreimal mit 15 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült, in 0,1 % (w/v) Agarlösung aufgenommen und auf den MS-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgebracht.

3.1.3 Etablieren einer Zellsuspensionskultur aus Hypokotylen etiolierter Keimlinge

Für die Isolierung größerer Mengen Mitochondrien eignet sich eine Suspensionskultur undifferenzierter Zellen besser gegenüber ganzen Pflanzen aufgrund der höheren Zellmaterial-Ausbeute bei kürzerer Kultivierungszeit. Desweiteren lässt sich durch Kultivierung im Dunkeln die Bildung von Chloroplasten unterdrücken und so eine Chloroplasten-freie, wenn auch nicht gänzlich Plastiden-freie (Proplastiden) Mitochondrien-Fraktion erhalten. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Zellkulturen aus dem Hypokotyl

etiolierter Keimlinge gewonnen.

Zur Etablierung einer Zellsuspensionskultur werden zunächst die Samen der gewünschten *Arabidopsis* Pflanze sterilisiert und auf MS-Agar 1 ausgebracht. Die Platten werden dann zum Ausschluss von Licht für sechs Tage in Alufolie verpackt und bei 21 °C inkubiert. Danach werden von den so etiolierten Keimlingen die Kotyledonen und die Wurzeln sorgfältig abgeschnitten und die Hypokotyle auf MS-Agar 2 ausgelegt. Diese Platten werden dann unter denselben Bedingungen weiter inkubiert. Nach etwa vier bis fünf Wochen sind die Hypokotyle vollständig mit Kallus bedeckt und es werden je 2 - 3 g Kallus in 50 ml flüssiges MS-Medium übertragen. Die Kultivierung erfolgt dann weiter als Zellsuspensionskultur.

3.1.4 Kultivierung einer Zellsuspensionskultur

Um einmal angelegte Zellsuspensionskulturen für nachfolgende Experimente über längere Zeiträume zur Verfügung zu haben, werden die Zellsuspensionskulturen durch regelmäßiges Übertragen eines Teils der Zellen in frisches Flüssig-Medium in Kultur gehalten. Dazu werden die Zellen in 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit flüssigem MS-Medium bei 110 rpm und 23 °C im Dunkeln gehalten. Alle sieben Tage werden ca 1 - 2 g Zellmaterial pro Kolben unter einer Sterilbank in frisches Medium übertragen und unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert.

3.2 Herstellung transgener Pflanzen

3.2.1 Transformation von Agrobakterien

Für die Übertragung von Transgenen in die *A. thaliana* Pflanzen wurden Agrobakterien des Stammes GV2260 verwendet (Deblaere et al., 1985). Dazu werden die kompetenten Agrobakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µg des Plasmids vermischt. Dann werden die Zellen für 5 min auf Eis gehalten, 5 min in flüssigem Stickstoff gefroren und daraufhin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 2 - 4 h bei 28 °C und 220 rpm geschüttelt. Zum Schluss werden 200 µl der Zellen auf einer ersten und die restlichen Zellen auf einer zweiten LB-Platte mit Carbenicillin (100 µg/ml) zur Selektion auf das Helferplasmid und dem für das Konstrukt zu verwendenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten werden dann bei 28 °C für ca. zwei Tage inkubiert. Nach dieser Zeit sollten die Zellkolonien zu sehen sein.

3.2.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels floral dip

Die Übertragung von T-DNA Konstrukten auf die entsprechenden *A. thaliana* Pflanzen erfolgte durch Transformation nach der „floral dip“-Methode nach Clough und Bent (1998). Dazu werden zehn Töpfe mit je drei bis fünf Pflanzen bis zur Bildung der Primärfloreszenzen angezogen. Die Primärfloreszenzen werden nach Erreichen einer Höhe von 2-10 cm knapp über den Rosetten abgeschnitten. Dann werden die Pflanzen bis zur Bildung der Sekundärfloreszenzen weiter gezogen (vier bis sechs Tage). Drei bis vier Tage vor der Transformation wird eine 10 ml Vorkultur der Agrobakterien mit der zu übertragenden T-DNA in Standard-LB Medium mit dem Antibiotikum zur Selektion auf das Konstrukt (Kanamycin: 30 mg/l; Spectinomycin: 50 mg/l) und dem Antibiotikum zur Selektion auf das Helferplasmid des Stammes (GV2260: Carbenicillin: 100 mg/l) angesetzt und bei 28°C und 220 rpm geschüttelt. Ein bis zwei Tage vor der Transformation wird dann eine 200 ml Hauptkultur unter den gleichen Bedingungen angezogen. Zur Transformation der Pflanzen werden die Zellen für 20 min bei 3.000 x g abzentrifugiert und in Infiltrationsmedium (5 % Saccharose, 0.05 % Silwet L-77, pH 6-8) auf eine $OD \geq 0,8$ aufgenommen. Die Pflanzen werden kopfüber für 3-5 sec in die Zellsuspension getaucht und anschließend horizontal in einer Plastikschaale abgelegt. Die Pflanzen werden über Nacht bei gedämpfter Beleuchtung gehalten, dann aufgerichtet und unter Langtagbedingungen weitergezogen. Nach drei bis vier Tagen wird eine zweite Transformation durchgeführt und die Pflanzen dann bis zur Samenreife kultiviert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Methoden, die an dieser Stelle nicht näher beschrieben sind, wurden nach Sambrook and Russel (2001) oder mit einem Kit nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

3.3.1 RNA Präparation aus Samen

Die Präparation von Gesamt-RNA aus gequollenen Samen erfolgte entsprechend dem Protokoll von Birtić und Kranner (2006) ohne Änderungen.

Pflanzensamen enthalten oft große Mengen an Polysacchariden, Polyphenolen, Lipiden und Proteinen als Reservestoffe. Diese können während der Präparation mit RNA interferieren oder sie gar degradieren. Zum Beispiel werden Phenole zu Quinonen oxidiert und können

dann kovalent an Nukleinsäuren binden. Polysaccharide weisen ähnliche physikochemische Eigenschaften wie RNA auf und können dadurch mit RNA co-präzipitieren und so die gewonnene RNA-Lösung kontaminieren. Diese Kontaminationen führen dann zu fehlerhafter Bestimmung der erhaltenen RNA-Menge und können die Reverse Transkription und PCR Anwendungen beeinflussen. Deshalb wurde zur Isolierung von RNA aus *A. thaliana* Samen das von Birtić und Kranner (2006) etablierte Protokoll, in dessen Verlauf diese sekundären Pflanzenstoffe entfernt werden, verwendet. Phenole werden durch die Zugabe einer optimalen Konzentration des Phenol Blockers PVP entfernt, Proteine durch die Zugabe von DTT denaturiert und durch ProteinaseK abgebaut. Lipide werden durch die Zugabe von KCl kondensiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Zum Abschluss wird die RNA durch Fällern von restlichen Polysacchariden und restlichen Proteinen getrennt.

Alle Zentrifugationsschritte in diesem Protokoll werden mit 18.000 x g und bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge durchgeführt. Vor der RNA-Isolierung wurden die Samen für 3 h im Licht (80-140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) bei 21 °C und dann für 3 h im Licht bei 4 °C mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ auf Filterpapier eingeweicht. Nach Protokoll werden ca. 100-120 mg Samen in flüssigem Stickstoff zusammen mit einer Spatelspitze autoklaviertem Seesand gemörsert und in 700 μl 80 °C-heißem Extraktionspuffer mit ProteinaseK aufgenommen. Diese Suspension wird dann für 1,5 h bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Daraufhin werden 56 μl 2 M KCl zugefügt und die Probe für 45 min auf Eis gehalten. Dann wird der Seesand für 4 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Der Überstand wird dann für 20 min zentrifugiert. Dabei bilden die Lipide eine feste Phase über der Nukleinsäure-Lösung. 600 μl der wässrigen unteren Phase werden in ein neues Eppi überführt und um die Nukleinsäuren zu fällen mit 200 μl 8 M LiCl versetzt und für 1 h auf Eis gehalten. Diese werden dann für 20 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 750 μl 2 M LiCl gewaschen. Das Pellet wird dann in 100 μl RNase-freiem ddH_2O aufgenommen und nicht lösliche Bestandteile des Pellets noch einmal für 10 min abzentrifugiert. Die Nukleinsäurekonzentration wird bestimmt und ein DNase-Verdau nach den Angaben des Herstellers der DNase I angesetzt. Um den DNase-Verdau zu stoppen werden auf 10 % des Gesamtvolumens 2 M KAc zugegeben, wodurch der pH Wert gesenkt und die DNase denaturiert wird. Die Probe wird für 15 min auf Eis gehalten und die denaturierte DNase abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 100 %igem Ethanol auf eine Endkonzentration von 75 % Ethanol gebracht und die Probe zur Fällung der RNA für 2 h bei -80°C inkubiert. Die RNA wird im Anschluss für 30 min abzentrifugiert, das Pellet mit 400 μl 70% igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pellet wird in

40 µl RNase freiem Wasser aufgenommen, die RNA-Konzentration bestimmt und die Qualität der RNA über ein Agarosegel überprüft. Auf diese Weise können 20-30 µg Samen-RNA gewonnen werden. Die RNA kann dann bei -20°C gelagert oder direkt in die nachfolgende Anwendung eingesetzt werden.

3.3.2 Quantitative Real Time RT-PCR

Zur Bestimmung relativer Transkriptmengen bestimmter Gene in *A. thaliana* wurden quantitative RT-PCR Analysen durchgeführt.

Die Real-time PCR liefert dabei die am besten reproduzierbaren quantitativen Ergebnisse. Sie beruht auf der Amplifikation des Zieltranskriptes mittels PCR und der kontinuierlichen Detektion der erhaltenen PCR-Produktmenge mittels Fluoreszenz-Farbstoffen. Zur Fluoreszenz-Markierung der PCR-Produkte gibt es verschiedene Systeme, wie zum Beispiel die Markierung mit Zielsequenz spezifischen TaqMan[®]-Sonden oder unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalierende Farbstoffe, wie SYBR-Green[®] I. In dieser Arbeit wurde die Markierung der PCR-Produkte mit dem SYBR Green[®]-Farbstoff verwendet. Dieses Molekül hat eine geringe Grundfluoreszenz, die um das 1.000-fache steigt, sobald das Molekül an doppelsträngige DNA bindet. Da dieser Farbstoff unspezifisch an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet, kann damit nur ein PCR-Produkt pro Reaktion analysiert werden. Dazu ist es unerlässlich die durchgeführte PCR so zu optimieren, dass nur das gewünschte Produkt entsteht. Desweiteren müssen die eingesetzten Primer so optimiert sein, dass sie während der Reaktion keine Dimere bilden, da diese ebenfalls als doppelsträngige Moleküle SYBR Green[®] I binden und so die Fluoreszenz unspezifisch erhöhen. Wieviele PCR-Produkte während einer Amplifikationsreaktion entstehen, kann mit Hilfe einer Schmelzkurve überprüft werden. Dabei wird die Temperatur des Reaktionsansatzes am Ende eines Laufes kontinuierlich gesteigert und die Fluoreszenz kontinuierlich detektiert. Beim Schmelzen der DNA-Moleküle wird das SYBR Green[®] wieder freigesetzt und die Fluoreszenz sinkt. Da die Temperatur bei der das Schmelzen erfolgt von der Länge und der Basenzusammensetzung des jeweiligen Moleküls abhängt, erfolgt es für jedes PCR-Produkt und für die Primer-Dimere bei unterschiedlichen Temperaturen und so wird die Fluoreszenzabnahme bei verschiedenen Temperaturen detektiert. Die Bedingungen einer PCR müssen daher so optimiert werden, dass nur ein Produkt entsteht.

Die Quantifizierung des in die Reaktion eingesetzten Templates erfolgt entweder absolut anhand einer Standardkurve oder relativ zu einer Vergleichsprobe (Calibrator), die im

gleichen Lauf mitamplifiziert wird. In dieser Arbeit dienten WT-Pflanzen als Calibrator-Proben. Um beide Proben vergleichen zu können, muss sicher gestellt sein, dass beide Reaktionen gleich ablaufen, das heißt, eine gleiche Effizienz aufweisen. Das ist dann optimal gegeben, wenn in beiden Reaktionen in jedem Zyklus genau eine Verdopplung des PCR-Produktes erreicht wird (Effizienzwert von 2,0). Um die Effizienz mit der eine Reaktion abläuft zu bestimmen, werden Reaktionen mit einer Verdünnungsreihe der zu verwendenden cDNA durchgeführt. Dabei wird für alle Verdünnungen der Zyklus bestimmt, in dem der Fluoreszenzwert der Probe einen Schwellenwert (Threshold) übersteigt. Der Kreuzungspunkt zwischen Threshold und der Fluoreszenzkurve wird als c_t - oder c_p -Wert bezeichnet. Bei einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 1:2 sollten die c_t -Werte sich genau um 1 unterscheiden, dann liegt eine Effizienz von 2,0 vor. Bei einer Verdünnung der Proben von 1:10 sollte die Verschiebung des c_t -Wertes bei 3,3 liegen. Gegen Ende des PCR-Laufes nimmt die Effizienz einer Reaktion generell ab, da sich zum Beispiel Abbau-Produkte anhäufen, Komponenten des PCR-Ansatzes verbraucht werden oder die Taq-Polymerase an Aktivität verliert. Deshalb sollte anhand der Standardkurve auch überprüft werden, wieviel Template pro Reaktion eingesetzt werden sollte, um möglichst c_t -Werte unter 30 Zyklen zu erhalten. Um trotzdem auftretende Schwankungen in der PCR-Effizienz zu kompensieren, werden alle Reaktionen in Triplikaten durchgeführt.

Um eine Probe relativ zu einem Calibrator quantifizieren zu können, muss desweiteren sicher gestellt werden, dass in jede Reaktion eine gleiche Menge an Probe eingesetzt wurde. Dazu wird für jede Probe eine PCR auf mindestens ein, besser auf zwei Referenzgene durchgeführt. Diese Referenzgene sollten unter allen zu untersuchenden Bedingungen in allen zu untersuchenden Proben gleich exprimiert werden und auf einem ähnlichen Expressionslevel liegen, wie das Zielgen. Für *A. thaliana* wurden solche Gene von Czechowski et al. (2005) evaluiert. Die c_t -Werte aus der PCR auf das Zielgen werden auf die c_t -Werte aus der PCR auf die Referenzgene normalisiert und so Abweichungen in der eingesetzten Ausgangsmenge pro Reaktion ausgeglichen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde das LightCycler[®]480-System (Roche, Deutschland) verwendet. Es wurde Gesamt-RNA aus Blüten, Blättern oder 14 Tage alten Keimlingen isoliert und jeweils 5 µg davon mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche, Deutschland) oder der M-MLV-Reverse Transkriptase RNaseH(-) Point Mutant (Promega, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit dem GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) aufgereinigt und mit 100 µl H₂O_{bidest} eluiert.

Für die Real-Time PCR wurden die Reaktionen in 10 µl Ansätzen mit dem LightCycler 480[®] SYBR Green I Master (Roche, Deutschland) Mastermix angesetzt (Tabelle 3.1). Als Referenzgene dienten At4g27960 (UBC9) und At1g13320 (PP2A) (Czechowski et al., 2005). Die Primer für die Referenzgene wurden Czechowski et al. (2005) entnommen, die Zielgen-spezifischen Primer wurden mit Hilfe des Primer-Blast tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) entworfen.

Komponente	Ausgangskonzentration	Eingesetztes Volumen [µl]	Endkonzentration
Mastermix	2x	5	1x
Primer	1 µM	2	200 nM
cDNA	-	0,5 - 1	-
H ₂ O		2 – 2,5	

Tabelle 3.1: Pipettierschema für die Reaktionsansätze in der Real-Time PCR

Die PCR-Bedingungen wurden für alle Versuche mit 20 sec Denaturierung bei 95 °C, 20 sec Annealing bei 60 °C und 20 sec Elongation bei 72 °C gewählt. Die Fluoreszenz wurde immer am Ende der Elongation gemessen. Als Kontrolle wurden am Ende des Laufes Schmelzkurven mit einer Heizrate von 0,11 °C/sec von 65 °C auf 95 °C kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler 480[®]-Software LCS480 1.5.0.39 für die Standardkurven als absolute Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und für die Transkript-Analysen als Advanced relative Quantification nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

3.4 Präparation von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionskultur

Für die Präparation von Mitochondrien werden 10 – 20 Erlenmeyerkolben (1 L) mit je 100 ml flüssigem MS-Medium (siehe 2.5.1) mit je ca. 2 g der gewünschten Zellsuspensionskultur (aus Dauerkultur) angeimpft und für vier Tage bei 120 rpm und 23 °C im Dunkeln geschüttelt. Für eine Kältebehandlung wird die Zellkultur in den letzten 18 bis 24 h bei 4 °C unter sonst gleichen Bedingungen gehalten. Die Ernte der Zellen und die Präparation der Mitochondrien erfolgte nach dem Protokoll nach Klein et al. (1998) und Werhahn et al. (2000).

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Auftrennung von Mitochondrien in Matrix- und Membran-Fraktion

Zur submitochondrialen Lokalisierung der hier untersuchten Proteine wurden Mitochondrien in Matrix- und Membran-Fractionen aufgetrennt und analysiert. Die Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an Linke und Weiss (1986).

Alle Schritte werden auf Eis und alle Zentrifugationen bei 4 °C ausgeführt. Die Mitochondrien werden in 500 µl ACA 750 Puffer pro 100 mg Mitochondrien aufgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Der Aufschluss der Mitochondrien erfolgt auf Eis mit viermal 10 sec Ultraschall der Stufe 5 mit jeweils 30 sec Pause zwischen den Behandlungen. Dann werden je 500 µl der Suspension in 1,5 ml Eppis überführt und unlysierte Mitochondrien bei 5.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in neue abgewogene Eppis überführt und für 90 min bei 150.000 x g im TLA 100.4 Rotor (Beckman, Deutschland) in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Deutschland) die Membranen pelletiert. Der Überstand der Zentrifugation stellt die Matrix-Fraktion dar, das Pellet die Membran-Fraktion. Die Matrix-Fraktion wird in ein neues Eppi überführt und das Membran-Pellet wird erneut in 500 µl ACA 750 Puffer aufgenommen. Da beide Fraktionen noch mit Proteinen der jeweils anderen Fraktion verunreinigt sind, wird für die Membran-Fraktion die Ultraschall-Behandlung wiederholt und dann für beide Fraktionen die Ultrazentrifugation erneut durchgeführt. Der Überstand im Eppi der Matrix-Fraktion stellt nun die reine Matrix-Fraktion dar und das Pellet in dem Eppi der Membran-Fraktion die reine Membran-Fraktion. Die Membranen werden abgewogen und in 50 µl ACA 750 Puffer pro 5 mg Membran durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Unlösliche Bestandteile werden durch eine Zentrifugation bei 18.000 x g für 5 min entfernt. Die Fraktionen können dann bei -80 °C eingefroren oder direkt in die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.

3.5.2 BN-PAGE (nach Schägger und Jagow, 1991)

Die Blue Native Polyacrylamid Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von nativen Membranprotein-Komplexen. Durch die Behandlung von Protein-Proben mit nichtionischen Detergenzien, wie zum Beispiel Digitonin, Dodecylmaltosid oder TritonX-100, werden Membranproteine solubilisiert, ohne physiologische Protein-Protein-Interaktionen aufzubrechen. Zusätzlich wird die Löslichkeit der Proteine im wässrigen Puffersystem durch Zusatz amphophiler Aminocaprinsäure verbessert. Um eine einheitliche

Laufrichtung aller Proteine im elektrischen Feld während der Elektrophorese zu erreichen, wird Coomassie G250 den Protein-Proben und dem Laufpuffer zugesetzt. Coomassie G250 lagert sich an die hydrophoben Seitenketten von Aminosäuren an und verleiht den Protein-Komplexen eine negative Gesamtladung. Auf diese Weise können native und enzymatisch aktive Protein-Komplexe bei neutralem pH Wert nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In einer zweiten Dimension werden dann die Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Komplexe durch das anionische Detergenz SDS aufgebrochen und die einzelnen Untereinheiten auf einem zweiten Gel aufgetrennt. Proteine eines Komplexes erscheinen dann als vertikale Reihe von Spots auf dem Gel der zweiten Dimension.

Um die Auftrennung eines möglichst breiten Größenspektrums an Komplexen zu erreichen, werden in der Regel Gradientengele verwendet. Je nach Probe werden dabei Acrylamid-Konzentrationen von 3 – 16 % verwendet.

Zur Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen von *A. thaliana* wurden Gele mit einer Dicke von 0,75 mm und mit einem Gradienten von 3 % bzw. 4,5 % bis 16 % Acrylamid verwendet. Die Gradientengele werden mit Hilfe eines Gradientenmischers (Biorad) geschichtet. Das Pipettierschema der einzelnen Lösungen ist in Tabelle 3.2 gegeben. Das Gel wird immer mindestens einen Tag vor dem Versuch gegossen und über Nacht in feuchten Tüchern gelagert, um ein vollständiges Auspolymerisieren des 16 %-Teils über Nacht zu gewährleisten.

	16%	4,5%	3%	4%
Acrylamid (37,5:1)	4,2 ml	1,18 ml	0,79 ml	1,01 ml
6 x Gelpuffer	1,75 ml	1,75 ml	1,75 ml	1,67 ml
Glycerin	2,1 g	-	-	-
H ₂ O _{bidest}	3 ml	7,57 ml	7,96 ml	7,32 ml
∑	10,5 ml	10,5 ml	10,5 ml	10,0 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl
APS	20 µl	20 µl	20 µl	100 µl

Tabelle 3.2: Pipettierschema für ein Gradientengel mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration

Die Mitochondrien wurden für jeden Versuch immer frisch isoliert, da das Einfrieren der Mitochondrien native hochmolekulare Komplexe zerstören kann. Für den Aufschluss der

Organellen werden 10 mg Mitochondrien (entspricht ca. 1 mg Protein) in 80 µl ACA-Probenpuffer aufgenommen, mit 15 µl 10 % Dodecylmaltosid versetzt und für 10-20 min auf Eis gehalten. Nicht solubilisierte Mitochondrien werden dann für 30 Min bei 18.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 15 µl BN-Ladepuffer versetzt und vorsichtig gemischt. Die Proben werden auf das Gradientengel geladen und der Lauf bei 11 mA und einer Kühlung auf 4 °C gestartet. Es sollten pro Spur nicht mehr als 1 mg Protein geladen werden, da sonst die Geltaschen verstopfen und die Proben nicht einlaufen. Für die erste Hälfte des Laufes wird der blauer Kathodenpuffer mit Coomassie G250 verwendet. Coomassie G250 bindet nicht kovalent an die Proteine und muss deshalb während des Laufes ständig nachgeliefert werden, aus diesem Grund wird es dem Kathodenpuffer zugegeben. Nachdem die Coomassie Blau-Bande die Hälfte des Trenngels erreicht hat, wird der Lauf unterbrochen und der blaue gegen den farblosen Kathodenpuffer ausgetauscht, sodass überschüssiges Coomassie aus dem Gel läuft und die Protein-Banden im Gel sichtbar werden. Der Lauf wird bei 11 mA fortgesetzt. Sobald die Coomassie-Bande aus dem Gel gelaufen ist, wird die Elektrophorese gestoppt und das Gel aus der Elektrophoreseeinheit gebaut. Die einzelnen Spuren des Gels werden ausgeschnitten und bei -20 °C eingefroren. Für die zweite Dimension werden die Gelstreifen in 25 ml BN-Äquilibriumspuffer pro Streifen für 20 min bei RT geschwenkt und dann in die SDS-PAGE eingesetzt.

Es werden 10 % PAA-Gele mit einer Dicke von 1 mm und einem Sammelgel von 4 % nach Tabelle 3.4 Spalte 3 und 5 (siehe 3.5.3.2) im Protean II System gegossen. Die äquilibrierten Gelstreifen aus der ersten Dimension der BN-PAGE werden auf das Sammelgel aufgelegt und mit Übersichtungslösung fixiert.

Das Protean II Elektrophorese-System wird zusammengebaut und der Lauf bei 20 mA pro Gel gestartet. Nach Einlaufen der Proteine in das Sammelgel wird die Stromstärke auf 8 mA pro Gel begrenzt und der Lauf über Nacht fortgesetzt. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Coomassie-Lauffront aus dem Gel gelaufen ist.

3.5.3 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat denaturiert und mit einer negativen Gesamtladung versehen.

Für die denaturierende Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE gibt es verschiedene Systeme. Zum einen das Puffersystem nach Laemmli (1970) mit Glycin als Träger-Ion, das eine Auftrennung von 20-200 kDa erreicht, und das Puffersystem mit Tricin, das auch

Proteine von unter 10 kDa (1-100 kDa) ohne Steigerung der Acrylamidkonzentration gut auftrennt (Schägger und Jagow, 1987). Durch Zugabe von Harnstoff zur Gellösung kann eine bessere Auftrennung bereits im Glycin-Gelsystem bis 10 kDa erreicht werden (Swank und Munkres, 1971). Tricin wandert im Sammelgel deutlich schneller als Glycin, obwohl es eine höhere molekulare Masse aufweist, weil ein deutlich größerer Anteil des Tricins in der im elektrischen Feld wandernden anionischen Form vorliegt. Auf diese Weise wird im Tricin-System das Sammeln der Proteine im Sammelgel zu niedrigeren molekularen Massen, bei gleicher Acrylamidkonzentration verschoben. Um kleinere Proteine in scharfen Banden auftrennen und auflösen zu können, müssen diese von der Lauffront des SDS im Gel getrennt werden. Das ist schwierig, da kleinere Peptide Komplexe mit dem SDS bilden, die die gleiche Größe und Ladung haben wie SDS Micellen. Um kleinere Proteine von der SDS Lauffront zu trennen, gibt es verschiedene Möglichkeiten: (1) Erhöhen des pH-Wertes des Sammelgels, wodurch die Mobilität des Glycins erhöht wird (damit werden aber auch größere Proteine nicht mehr in der gleichen Bande wie kleinere Proteine im Sammelgel gesammelt). Glycin wandert sehr langsam im sauren Sammelgel. Auf diese Weise werden auch sehr große Proteine noch in einer scharfen Bande mit gesammelt, aber Proteine unter 20 kDa werden nicht von SDS getrennt. (2) Eine andere Möglichkeit ist die Erhöhung der Acrylamidkonzentration, wodurch die Mobilität der Proteine herabgesetzt wird. Mit Tricin kann ein Sammeln kleinerer Proteine und eine Trennung von der SDS-Lauffront bei gleichem pH-Wert wie im Trenngel und geringen Acrylamidkonzentrationen erreicht werden.

Da Acrylamid-Gele im Tricin-System aufgrund der größeren Mobilität des Tricins für die gleiche Trennstrecke bei gleicher Stromstärke deutlich längere Laufzeiten aufweisen, muss abgewogen werden, ob die Auftrennung der kleinen Proteine unter 10 kDa benötigt wird oder nicht.

3.5.3.1 Tris-Tricin-SDS-PAGE (nach Schägger und Jagow, 1987)

Als eine Möglichkeit zur Auftrennung von Protein-Komplexen in ihre Untereinheiten über einen Größenbereich von unter 10 kDa bis über 200 kDa wurde die SDS-PAGE mit dem Tricin-Puffersystem durchgeführt. Um Proteine von so unterschiedlichem Molekulargewicht auf einem Gel aufzutrennen, werden Gele mit zwei Trennstufen und mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Der untere Teil des Gels besteht aus einem 16 %igen und der obere Teil aus einem 10 %igen PAA-Gel. Die beiden Trenngel-Lösungen werden übereinander geschichtet, zuerst der 16 %-Teil und dann der 10 %-Teil und gleichzeitig polymerisiert. Durch die

Zugabe von Glycerin zum unteren Trennteil des Gels vermischen sich beide Gellösungen beim Überschichten nicht. Nach dem Auspolymerisieren wird das Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet.

Gelkonzentration	4%	10%	16%
Acrylamid (37,5:1)	1,0 ml	7,5 ml	12,0 ml
3 x Gelpuffer	3,35 ml	10,0 ml	10,0 ml
H ₂ O _{bidest}	5,65 ml	12,8 ml	5,0 ml
Glycerin (99%)	-	-	3,3 ml
TEMED	10 µl	30 µl	30 µl
10% APS	100 µl	300 µl	300 µl
Σ	10 ml	30 ml	30 ml

Tabelle 3.3: Pipettierschema für Tricin-SDS-Gele

Die Proteine in den Gel-Streifen aus der ersten Dimension der BN-PAGE werden in Äquilibriumlösung mit SDS für 20 min bei RT solubilisiert, die Streifen zwischen die Glasplatten auf das SDS-Gel der zweiten Dimension aufgelegt und mit Überschichtungslösung fixiert. Die Elektrophoreseeinheit wird zusammengebaut und der Lauf bei 40 mA pro Gel gestartet. Nachdem die Proteine in das Sammelgel eingelaufen sind, wird die Stromstärke auf 15 mA pro Gel begrenzt und der Lauf über Nacht fortgesetzt. Die Elektrophorese wird beendet, nachdem die Coomassie-Lauffront aus dem Gel gelaufen ist.

3.5.3.2 Harnstoff-SDS-PAGE

Zur eindimensionalen Auftrennung von Protein-Lysaten wurden 10 %-SDS-Harnstoff-PAA-Gele mit einer Dicke von 0,75 mm, einem 4 % Sammelgel und 10 Proben-Taschen verwendet.

Die Gele werden mit dem Protean II Gelelektrophoresesystem (Biorad) gegossen und laufen gelassen. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wird der Kamm gezogen und die Gele direkt verwendet oder in feuchte Tücher gewickelt bei 4 °C gelagert.

Die aufzutrennenden Proteinlösungen werden mit 1 Vol 2 x SDS-Ladepuffer versetzt und auf die Gele aufgetragen. Der Lauf erfolgt über Nacht bei 10 mA pro Gel und die Elektrophorese wird beendet, sobald die Bromphenolbande aus dem Gel gelaufen ist.

Gelkonzentration	10 % Trenngel 0,75 mm	10 % Trenngel 1,0 mm	End- konzentration	4 % Sammelgel
Acrylamid (37,5:1)	6,0 ml	9,0 ml	10 %	0,72 ml
8 x Trenngelpuffer/ 2 x Sammelgelpuffer	3,0 ml	3,75 ml	1 x	3,0 ml
H ₂ O _{bidest}	11,2 ml	12,5 ml	-	2,28 ml
Harnstoff	5,76 g	7,2 g	4 M	-
TEMED	12 µl	15 µl	0,05 %	5 µl
10 % APS	40 µl	50 µl	0,016 %	50 µl
Σ	24 ml	30 ml	-	5 ml

Tabelle 3.4: Pipettierschema für Harnstoff-SDS-Gele

3.5.4 Fraktionierung mitochondrialer Lysate über Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Alternativ zur BN-PAGE können hochmolekulare Protein/DNA/RNA-Komplexe durch Zentrifugation über einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt werden. Bei dieser Methode werden die Proteine und Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je höher das Molekulargewicht eines Komplexes ist, desto größer ist die während der Zentrifugation entstehende Zentrifugalkraft und in umso höhere Konzentrationsbereiche wandert der Komplex. Die Zentrifugation wird dafür in einem Swingout-Rotor durchgeführt. Zur Analyse mitochondrialer Proteinlysate auf einem Saccharose-Gradienten werden 100 mg Mitochondrien (entspricht ca. 10 mg Protein) in 1 ml Solubilisierungspuffer (Raczynska et al., 2006) oder in 1 ml ACA 750 Puffer mit 2 % DDM aufgenommen und für 10 min auf Eis gehalten. Im Anschluss werden nicht lysierte Mitochondrien für 1 h bei 18.000 x g und 4 °C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand enthält dann das mitochondriale Proteinlysate und wird auf einen diskontinuierlichen 9 ml Saccharose-Gradienten in 13 ml Polyallomer Zentrifugenröhrchen (14 x 95 mm, Beckman) geladen. Die Saccharosekonzentration wird in Gradientenpuffer von 15 % Saccharose in der obersten Stufe in 5 %-Schritten auf 55 % in der neunten und letzten Stufe des Gradienten eingestellt. Der Gradient wird dann für 4 h bei 217.000 x g im SW40Ti-Rotor (Beckman) und bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation werden von oben nach unten 1 ml Fraktionen abgenommen. Dabei entspricht die geladene Probe der Fraktion 1 (0 % Saccharose), die erste

Stufe des Gradienten (15 % Saccharose) der Fraktion 2,...und die letzte und zehnte Fraktion der Stufe neun des Gradienten (55 % Saccharose).

Protein-Analysen können mittels Harnstoff-SDS-PAGE durchgeführt werden, in dem direkt 50 µl der Fraktionen 1 bis 9 mit 50 µl 2 x SDS-Ladepuffer versetzt werden und auf 10 % PAA-Gelen aufgetrennt werden. Die Gele werden einem Western Blot unterzogen und im Anschluss die Proteine mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

Für RNA-Analysen werden 800 µl jeder Fraktion mit 1 Volumen 8 M Guanidinhydrochlorid versetzt und mit 2 Volumen 100 %igem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die RNA wird bei 18.000 x g und 4 °C für 45 min abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und nach Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat pH 5,3 und 400 µl 100 % (v/v) Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die RNA wird dann bei 18.000 x g und 4 °C für 1 h abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Die Verteilung von ribosomalen RNAs auf die Fraktionen wird durch Auftragen von 15 µl der RNA auf ein Agarosegel und Ethidiumbromid-Färbung der RNA untersucht.

3.5.5 Färben von Proteingelen

3.5.5.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie-Brillantblau (nach Neuhoff et al. 1988)

Die Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Brillantblau ist eine Methode zur Detektion von Proteinen in Acrylamid-Gelen. Eine hohe Sensitivität zusammen mit einer geringen Hintergrundfärbung erhält man, wenn der verwendete Coomassie-Farbstoff in kolloidaler Form in der Färbelösung vorliegt. Das kann man durch Zugabe des Salzes Ammoniumsulfat in Konzentrationen von 6 – 10 % (w/v) zur Färbelösung erreichen. Durch Zugabe von 20 % (v/v) Methanol wird die Diffusion des Farbstoffes in die Gele erleichtert und eine Färbung der Proteine durch das komplette Gel ermöglicht. Dabei zeigt Coomassie G250 eine zweimal so hohe Sensitivität wie Coomassie R250 und erreicht eine Nachweisgrenze von 0,5 ng pro Spot (Neuhoff et al., 1985, 1988). Entsprechend wurde die Färbung von Acrylamidgelen mit Coomassie-Brillantblau G250 angelehnt an Neuhoff et al. (1988) durchgeführt.

Dabei werden die Gele für mindestens 1 h oder über Nacht in 150 ml Fixierlösung geschwenkt. Dann werden vier Teile Färbelösung mit einem Teil Methanol versetzt und die Gele darin für mindestens einen Tag inkubiert. Zum Abschluss werden die Gele in H₂O_{bidest} gespült, bis kein Hintergrund mehr zu erkennen ist. Die Gele werden sofort nach der Färbung eingescannt und dann in H₂O_{bidest} aufbewahrt.

3.5.5.2 Silberfärbung (nach Blum et al., 1987)

Die Silberfärbung ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen in Acrylamid-Gelen mit höherer Sensitivität als die Coomassie-Brilliantblau Färbung. Es ist möglich Proteine bis 0,1 ng pro Spot nachzuweisen. Die Färbung beruht auf der Anlagerung von Silber-Ionen an die Proteine und deren Reduktion zu atomarem Silber durch funktionelle Gruppen und die Peptidbindungen der Proteine. Diese Silberkeime führen dann zur Anlagerung weiterer Silber-Atome bei Einsatz eines Reduktionsmittels, wodurch die Färbung der Proteine eintritt. Ein großes Problem ist oft, dass eine Reduktion von Silber-Ionen in geringem Maß im gesamten Gel erfolgt und so ein recht starker Hintergrund entstehen kann. Dies verringert die Sensitivität und verschlechtert die Detektion deutlich. Die Reduktion der Silberionen erfordert außerdem eine pH-Änderung hin zum alkalischen in der Entwickler-Lösung, wodurch aber auch eine Präzipitation von unlöslichen Silbersalzen auf der Oberfläche der Gele bewirkt wird, die den Kontrast im Gel deutlich verringert. Nach Blum et al. (1987) können diese Probleme durch den Einsatz des Reduktionsmittels Thiosulfat umgangen werden. Durch den Einsatz von Thiosulfat bei der Vorbehandlung der Gele erreicht man eine geringere Hintergrundfärbung und damit eine höhere Sensitivität. Zudem bewirkt ein Einsatz in der Entwicklerlösung durch die Komplexierung der unlöslichen Silbersalze eine Steigerung des Kontrastes. Deshalb wurden Silbergele in Anlehnung an dieses Protokoll nach Blum et al. (1987) gefärbt.

Dazu werden die Gele für zweimal 30 min oder über Nacht in Fixierlösung geschwenkt und für dreimal 20 min in 50 % (v/v) Ethanol gespült. Im Anschluss werden die Gele für 1 min in Imprägnierlösung inkubiert und zweimal für 1 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült. Dann erfolgt die Beladung der Gele mit Silber-Ionen in einer Silbernitrat-Lösung für 20 min und erneut dreimaliges Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Daraufhin werden die Gele solange in Entwickler-Lösung gehalten, bis die Färbung kurz vor der gewünschten Intensität ist (dauert nur einige Sekunden). Die Entwickler-Lösung wird gegen die Stopp-Lösung ausgetauscht, sobald die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist und weitere 10 min inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Gele noch kurze Zeit nachfärben. Die Gele werden sofort nach der Färbung eingescannt und dann in der Lagerlösung aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse hochmolekularer PMH1/2-Protein-Komplexe

4.1.1 Nachweis hochmolekularer PMH1/2-Protein-Komplexe

Im Vorfeld dieser Dissertation wurde für die beiden Proteine PMH1 und PMH2 bereits ein Antikörper hergestellt. Dieser Antikörper richtet sich gegen zwei 15 Aminosäuren lange Peptide, die in den beiden PMH-Proteinen nahezu identisch sind. Mittels massenspektrometrischer Analyse nach 2D-Gelelektrophorese und vergleichender Western-Blot-Analyse mit Immunodetektion mit diesem Antikörper wurde nachgewiesen, dass dieser Antikörper spezifisch die beiden PMH-Proteine erkennt. Da die beiden für die Immunisierung verwendeten Peptide in beiden Proteinen nahezu identisch sind, konnte in den durchgeführten Immunodetektionsanalysen nicht zwischen beiden PMH-Proteinen unterschieden werden.

In mitochondrialem Proteinextrakt aus *A. thaliana* Zellsuspensionskultur wurden mit Hilfe dieses Antikörpers PMH1 und PMH2 in hochmolekularen Protein-Komplexen nachgewiesen (Matthes et al. 2007). Dazu wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. In der ersten Dimension wurden Protein-Komplexe nativ durch eine Blue-Native-PAGE aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden diese Komplexe dann mittels Harnstoff-SDS-PAGE in ihre Untereinheiten aufgelöst. Die Gele der zweiten Dimension wurden entweder Coomassie gefärbt oder die Proteine durch Western-Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Die PMH-Proteine wurden durch Immunodetektion mit dem beschriebenen Antikörper und Entwicklung über das ECL-System (Enhanced Chemiluminescene) nachgewiesen. Im folgenden wird dieser experimentelle Ansatz einfach als BN-PAGE bezeichnet.

Um das Auftreten dieser Komplexe mit einer zweiten unabhängigen Methode zu analysieren, wurde mitochondriales Protein-Lysat über einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die Verteilung der PMH1/2-Proteine innerhalb des Gradienten wurde über Harnstoff-SDS-PAGE und anschließende Immunodetektionsanalyse der einzelnen Dichtestufen analysiert. Darüberhinaus wurde die Verteilung der beiden Proteine mit der Verteilung von Ribosomen bzw. Polysomen über den Gradienten verglichen. Dies sollte Rückschlüsse über eine potentielle Interaktion der PMH-Proteine mit Ribosomen oder Polysomen erlauben. Dazu wurden Mitochondrien aus einer vier Tage alten Zellsuspensionskultur isoliert. Direkt im Anschluss wurden 100 mg dieser Mitochondrien in Solubilisierungspuffer mit 2 % des Detergenz DDM lysiert. Dieser Puffer ist für die Isolierung intakter Ribosomen und

Polysomen optimiert. Anschließend wurde das solubilisierete mitochondriale Protein über einen Saccharose-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.5.4). Die Dichtestufen wurden einzeln von oben nach unten abgenommen. Jeweils 50 µl einer jeden Dichte-Stufe wurden über ein 10 %-Harnstoff-SDS-Gel aufgetrennt und über Immunodetektion analysiert. Signale wurden in den Fraktionen 1 bis 7, das heißt in Saccharose-Konzentrationen von 0 bis 40 % detektiert (Abbildung 4.1-A, unteres Bild, untere Signale). Die Signale entsprechen Proteinen der Größe um 60 kDa, wie PMH1 und PMH2. Zusätzlich wurde ein Signal korrespondierend zu einem Protein von ca. 65 kDa in den Fraktionen 1 und 2 detektiert. Um die Verteilung der Ribosomen und Polysomen auf dem Gradienten zu überprüfen, wurde aus 800 µl jeder Gradienten-Fraktion RNA isoliert und über Agarosegelelektrophorese untersucht. Die ribosomalen RNAs wurden hauptsächlich in den Fraktionen 3 bis 5 beobachtet. Im Vergleich zu den ribosomalen RNAs, die in Fraktion 2 nur in geringen Mengen zu finden waren (Abbildung 4.1-A, oberes Bild), waren in dieser Fraktion die PMH-Proteine in größerer Menge zu beobachten.

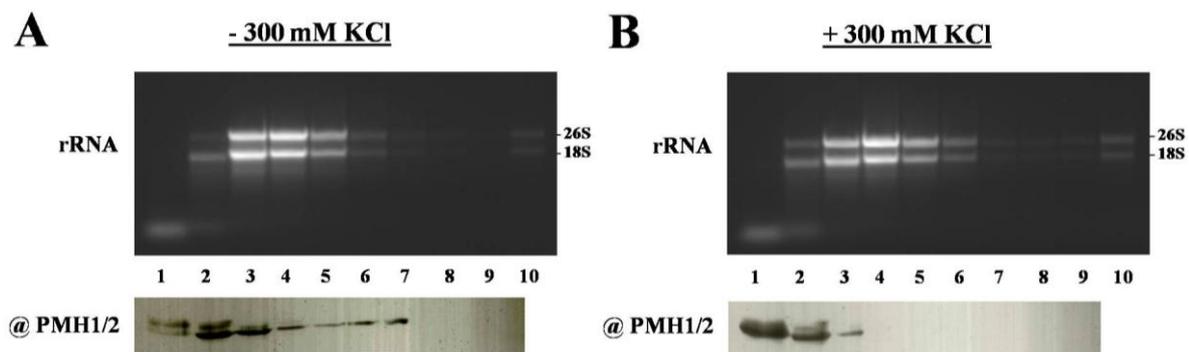


Abbildung. 4.1: Fraktionierung von Ribosomen, Polysomen und mitochondrialen Protein-Komplexen auf diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten. Mitochondriales Protein wurde in Solubilisierungspuffer (A) ohne und (B) mit 300 mM KCl solubilisiert und auf diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten von 15-55 % in 5 % Stufen aufgetrennt. Die abgenommenen Fraktionen entsprachen der Reihe nach: Fraktion 1- geladene Probe, Fraktion 2- 15 % Saccharose, 3- 20 %, 4- 25 %, 5- 30 %, 6- 35 %, 7- 40 %, 8- 45 %, 9- 50 % und Fraktion 10- 55 % Saccharose. Die Verteilung der beiden PMH-Proteine über die Fraktionen 1 bis 9 wurde über Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper (@PMH1/2) analysiert (unteren Bilder). Die Verteilung der Ribosomalen RNAs über die Fraktionen 1 bis 10 wurde über Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung dargestellt (oberen Bilder). Die Banden der 26S rRNA und der 18S rRNA sind angegeben.

Wurde der Solubilisierungspuffer mit 300 mM KCl versetzt, wurden die ribosomalen RNAs erneut hauptsächlich in den Fraktionen 3 bis 5 detektiert, während die PMH1 und PMH2 Proteine hauptsächlich nur noch in den Fraktionen 1 und 2 zu finden waren (Abbildung 4.1-B). In diesem Puffersystem bleiben also die Polysomen auf dem Gradienten stabil, während

PMH1 und/oder PMH2 von ihren Komplexen dissoziieren. Die ungleiche Verteilung von Polysomen und den PMH-Proteinen auf dem Gradienten und das unterschiedliche Dissoziationsverhalten dieser Komplexe machen eine Integration oder stabile Assoziation der beiden Proteine in bzw. mit Ribosomen oder Polysomen unwahrscheinlich. Schwache oder kurzzeitige Wechselwirkungen der beiden Proteine mit Ribosomen oder Polysomen können allerdings nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2 Detektion von PMH1/2-Protein-Komplexen in mitochondrialen Matrix- und Membran-Fractionen

Um die submitochondriale Lokalisation der beiden PMH-Proteine näher zu untersuchen, wurden die Mitochondrien einer vier Tage alten Wildtyp-Zellsuspensionskultur isoliert und in Matrix- und Membran-Fractionen getrennt. Die Proteine der einzelnen Fractionen wurden zunächst über eindimensionale Harnstoff-SDS-PAGE aufgetrennt und PMH1 und PMH2 in den verschiedenen Fractionen durch Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper nachgewiesen.

Dabei wurden hauptsächlich Signale für ein Protein der richtigen Größe im mitochondrialen Gesamtprotein-Lysat und in der Membran-Fraction detektiert (Abbildung 4.2-A). In der Matrix-Fraction ist nur ein deutlich schwächeres Signal zu sehen. Um die Vollständigkeit der Trennung der Matrix- und Membran-Proteine zu überprüfen, wurde eine zweite Immunodetektion mit einem Antikörper gegen Porin, einem Protein der äußeren mitochondrialen Membran durchgeführt. Dabei wurden nur Signale in mitochondrialem Gesamtprotein und in Membran-Fractionen beobachtet (Abbildung 4.2-B), so dass von einer annähernd vollständigen Trennung der beiden Fractionen ausgegangen werden konnte.

Um zu überprüfen, ob die hochmolekularen Proteinkomplexe nur in der Membran-Fraction mit dem Hauptteil der beiden Proteine bestehen oder auch in der Matrix-Fraction vorkommen, wurden die entsprechenden Fractionen zum einen über BN-PAGE und zum anderen über Saccharose-Dichtegradienten analysiert. Dazu wurden 550 µg Protein der beiden Fractionen über ein 4,5 – 16 % BN-Gel unter nativen Bedingungen aufgetrennt und die bestehenden Komplexe in einer zweiten Dimension über ein 10 % Harnstoff-SDS-Gel aufgelöst. Die Proteine wurden nach der zweiten Dimension über Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper untersucht. In der Matrix-Fraction wurde dabei hauptsächlich Einzelprotein und nur geringe Mengen an Komplexen detektiert (Abbildung 4.2-F). Die Analyse der Membran-Fraction zeigte dagegen deutliche Signale im hochmolekularen Bereich bis über 1000 kDa

(Abbildung 4.2-E). Zur Größenabschätzung der Komplexe wurde jeweils ein zweites parallel gelaufenes SDS-Gel mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die darauf sichtbaren Komplexe der mitochondrialen Atmungskette wurden dabei zum Größenvergleich herangezogen (Gele nicht gezeigt).

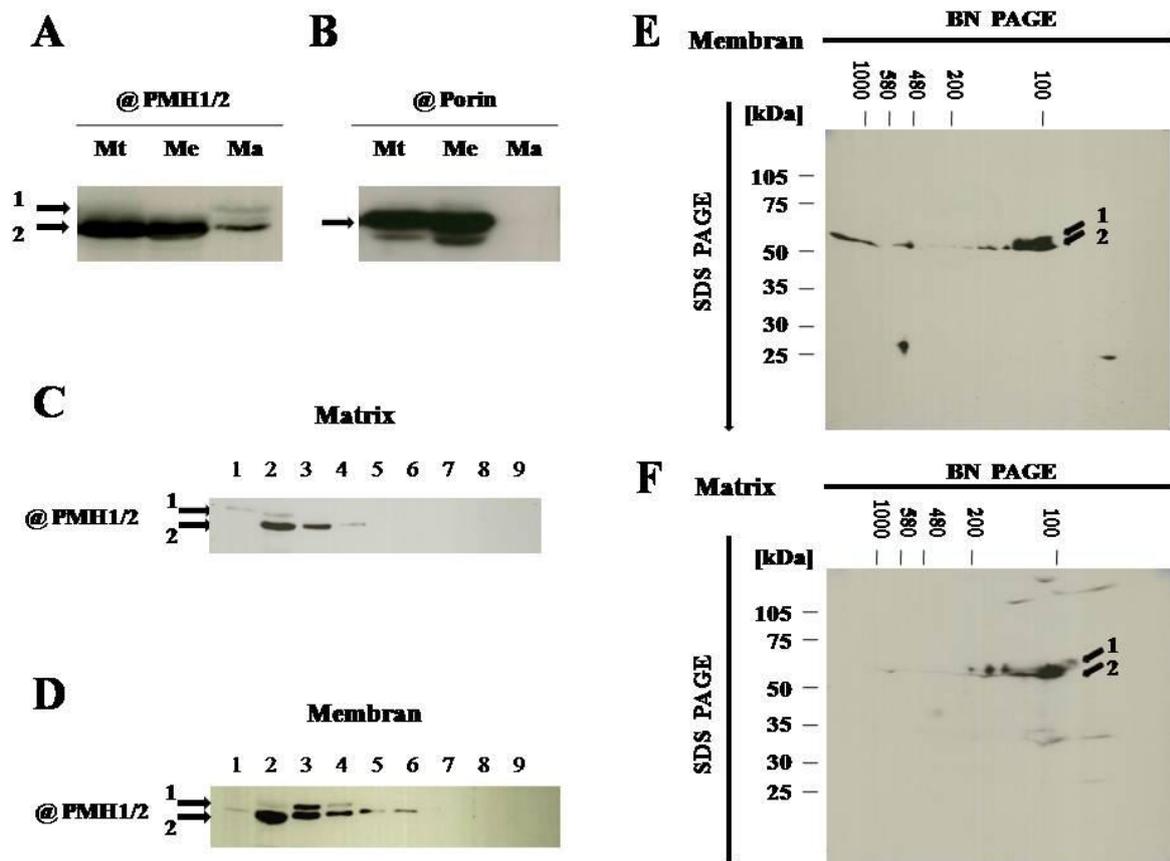


Abbildung 4.2: PMH1 und/oder PMH2 und deren Komplexe werden in mitochondrialen Membran-Fractionen detektiert. Mitochondrien einer *A. thaliana* Zellsuspensionskultur wurden in Matrix- (Ma) und Membran- (Me) Fraktion getrennt und zusammen mit mitochondrialem Gesamtprotein über Immunodetektion (A und B) analysiert. Die beiden Proteine wurden mit dem PMH1/2-Antikörper (@PMH1/2) detektiert (A) und die Vollständigkeit der Trennung der Matrix- und Membran-Proteine mit dem Porin-Antikörper überprüft (B). Mit dem PMH1/2-Antikörper wurde ein Signal für die PMH-Proteine in der Größe von ca. 60 kDa (A, C, D: Signal 2) in der Membran-Fraktion und schwach auch in der Matrix-Fraktion detektiert. Ein zusätzliches Signal für ein Protein um 65 kDa (A, C, D: Sgnal 1) wurde in der Matrix-Fraktion detektiert. Das Auftreten von PMH1/2-Proteinkomplexen in Matrix- und Membran-Fractionen wurde über diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten von 15 % (Fraktion 2)-55 % (Fraktion 10) Saccharose (C und D) und BN-PAGE (E und F) analysiert. Die beiden durch den PMH1/2-Antikörper detektierten Banden sind erneut durch Pfeile markiert. Die Trennrichtung der ersten und zweiten Dimension der PAGE ist durch Pfeile angegeben. Die Größen der Komplexe wurden in der ersten Dimension der BN-PAGE anhand der Atmungskettenkomplexe (Komplex I: 1000 kDa, Komplex V: 580 kDa, Komplex III₂: 480 kDa, FDH: 200 kDa, Aconitase: 100 kDa) abgeschätzt. Die Größenabschätzung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte über einen parallel aufgetrennten Protein-Marker.

Nach einer Auftrennung von jeweils 5 mg mitochondrialem Membran- bzw. Matrix-Protein über diskontinuierliche Saccharose-Gradienten, wurden wie oben beschrieben, die einzelnen Stufen des Gradienten über ein 10 % Harnstoff-SDS-Gel aufgetrennt und über eine anschließende Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper analysiert. In der aufgetrennten Matrix-Fraktion wurden die beiden PMH-Proteine dabei nur in den Saccharose-Gradienten-Fraktionen 1 bis 4 nachgewiesen (Abbildung 4.2-C). Dagegen wurden die PMH-Proteine in den Fraktionen 1 bis 6 der Membran-Fraktion detektiert (Abbildung 4.2-D). Dies weist auf das Vorhandensein größerer Komplexe in der Membran-Fraktion hin.

4.2 Charakterisierung von *PMH1*- und *PMH2*-T-DNA-Insertionsmutanten

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von Funktionen einzelner Gene im Organismus der Pflanze stellt die Analyse von Pflanzenlinien dar, in denen die Expression des entsprechenden Gens durch die Insertion einer T-DNA im Gen unterbunden ist. Dabei werden Pflanzen, die eine Insertion in dem zu untersuchenden Gen tragen auf morphologische und molekulare Phänotypen hin untersucht. Diese lassen eventuell einen Rückschluss auf die Funktion des Genproduktes in der Pflanze zu. Bei dem Ausschalten von Genen macht man sich den natürlichen Mechanismus der Übertragung von DNA durch Agrobakterien und der Integration der T-DNA in das Genom der Pflanze zunutze. Wird die T-DNA in das Leseraster eines Gens, in ein Intron oder in den 5'- bzw. 3'- UTR-Bereich des Gens integriert, kann kein korrektes, reifes Transkript des Gens mehr gebildet werden. Da der Ort der Integration einer T-DNA im Genom der Pflanze dem Zufall unterliegt und nicht gesteuert werden kann, können Gene nicht gezielt durch T-DNA-Insertionen ausgeschaltet werden. Doch wurden durch das SALK Institute for Biological Studies (San Diego, USA, Alonso et al., 2003), Syngenta (Basel, Schweiz, Sessions et al., 2002) und andere Einrichtungen für *A. thaliana* eine Vielzahl von T-DNA-Insertionslinien erzeugt und die Orte der Integration in den einzelnen Pflanzenlinien über TAIL-PCR bestimmt und veröffentlicht. Anhand dieser Sequenzdaten kann die Existenz einer T-DNA-Insertionslinie für das zu untersuchende Gen ermittelt und gegebenenfalls Samen einer solchen Linie bei den Instituten erworben werden. Diese Samen werden als die T₄-Generation der Linie definiert.

4.2.1 Etablierung homozygoter *PMH2*-T-DNA-Insertionslinien

Für den Knockout eines Gens muss das entsprechende T-DNA-Allel des Gens in der Pflanze homozygot vorliegen. Um unter den Pflanzen der erworbenen Linien homozygote zu identifizieren, werden diese einzeln genotypisiert.

Für das *PMH1*-Gen war bereits eine homozygote Linie (SALK 035421) etabliert (Schmidt-Gattung, Dissertation 2006). Diese Linie weist eine T-DNA Insertion im Exon 6 des *PMH1*-Gens auf.

Für das *PMH2*-Gen wurden mehrere mögliche Linien in den Datenbanken identifiziert. Für die beiden Linien SALK 056387 und SAIL 628C06 wurden Integrationen im Exon 4 des Leserasters bzw. zwei Nukleotide stromaufwärts des potentiellen Transkriptionsstartpunktes des Gens vorausgesagt (Abbildung 4.3-A).

Mit Pflanzen der T₄-Generation der SALK 056387 Linie waren bereits erste, jedoch nicht eindeutige Genotypisierungen durchgeführt worden (Matthes, Diplomarbeit, 2006). Zur Selektion homozygoter Pflanzen wurden im Rahmen diese Arbeit je zwei Nachkommen der potentiell homozygoten Pflanzen 4 und 15 (4/1, 4/2, 15/1 und 15/2), der potentiell heterozygoten Pflanze 7 (7/1 und 7/2) und einer potentiellen Wildtyp Pflanze (WT/1 und WT/2) der T₄ Generation der SALK-Linie angezogen. Aus der SAIL-Linie 628 C06 wurden sechs Pflanzen der T₄ Generation angezogen.

Nach ca. drei Wochen wurden von allen Pflanzen Rosettenblätter abgenommen und daraus mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (50) (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers DNA isoliert. Die DNA diente der Überprüfung der exakten Lokalisation der T-DNA und der Zygote der Pflanze, die über PCR Analysen erfolgte.

Zur Überprüfung des genauen Integrationsortes der T-DNA, wurden PCR-Analysen mit Primern, die in der T-DNA bzw. in den flankierenden genomischen Sequenzen binden, durchgeführt. In einer PCR mit dem Left-Border-spezifischen Primer SynLB4, der 430 nt von der Left-Border entfernt in der T-DNA bindet, und dem genspezifischen Primer PMH2FLR5 wurde mit der DNA der SAIL-Linie ein PCR-Produkt von 650 bp erwartet. Mit den beiden genspezifischen Primern PMH2FLR5 und PMH2 GFP 2.3 sollten 650 bp der genomischen Sequenz amplifiziert werden, wenn keine T-DNA vorhanden ist (Abbildung 4.3-A). In den Pflanzen 1 bis 5 wurde mit ca. 400 bp ein um ca. 250 bp kleineres T-DNA-spezifisches Produkt detektiert. Die Sequenzierung des Produktes aus Pflanze 5 ergab, dass 250 bp der Left-Border der T-DNA in der Integration fehlen. Das genspezifische Produkt wurde nicht amplifiziert, was das Fehlen des WT-Allels impliziert (Pflanze homozygot für das T-DNA-

Allel *pmh2-2*). Für Pflanze 6 wurde umgekehrt kein T-DNA-Produkt beobachtet (Pflanze homozygot für das WT-Allel). Die Pflanzen 1 bis 4 erwiesen sich als heterozygot (Abbildung 4.3-B links).

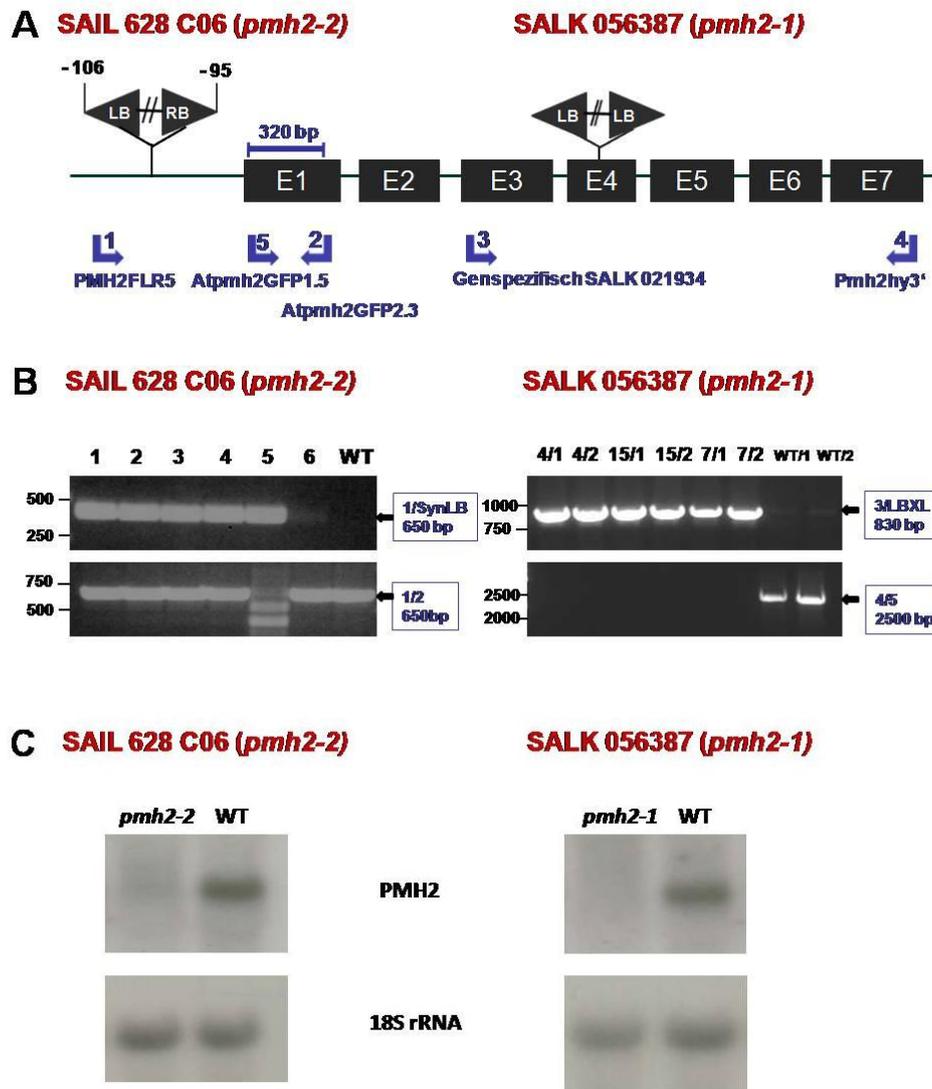


Abbildung 4.3: Analyse der *PMH2*-T-DNA-Insertionsmutanten SALK 056387 und SAIL 628 C06. (A) Die Skizze zeigt die Struktur des *PMH2*-Gens. Die schwarzen Boxen stellen dabei die Exons, die Linien dazwischen Introns dar. Die Integrationen der Sail 628 C06 (T-DNA-Allel *pmh2-2*) und der SALK 056387 (*pmh2-1*) Linien sind als Dreiecke dargestellt, die die Orientierung der Left- (LB) und Right-Border (RB) angeben. Die für die PCR-Analysen verwendeten Primer sind als blaue Pfeile dargestellt und ihre Bezeichnung darunter angegeben. Die für die Northern-Blot-Analyse verwendete Sonde ist als blauer Balken über Exon 1 angegeben. (B) PCR-Analysen zur Integration der T-DNAs in den beiden Linien. Die jeweils oberen Bilder zeigen die Ergebnisse der Left-Border-PCRs (die erwarteten PCR-Produktgrößen sind angegeben) und die unteren Bilder zeigen die Ergebnisse der genspezifischen PCRs. Die Bezeichnung der untersuchten Pflanzen ist über den Spuren angegeben. (C) Nachweis der *PMH2*-Transkripte über Northern-Blot-Analysen. Die beiden oberen Bilder zeigen die Hybridisierung der Membran mit der *PMH2*-Sonde. Die beiden unteren Bilder die Hybridisierung derselben Membran mit der 18S rRNA-Sonde.

In einer weiteren PCR mit dem Right-Border-spezifischen Primer SynRB4 und dem genspezifischen Primer PMH2 GFP 2.3 mit der DNA der homozygoten Pflanze 5 wurde eine Right-Border als zweite Grenze der T-DNA identifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzierung der PCR-Fragmente, die mit den beiden Border-Primern und den genspezifischen Primern amplifiziert wurden, ergab eine Integration der T-DNA 95 nt vor dem ATG, wobei die Right-Border in Richtung des ATG zeigt. Die Left-Border als zweite Grenze der Integration ist 106 nt vor dem ATG integriert, so dass 11 bp der genomischen Sequenz deletiert sind (Abbildung 4.3-A).

In einer PCR mit dem genspezifischen Salk-021934-Primer und dem SALK Left-Border-Primer LBXL mit DNA der Pflanzen der SALK-Linie (056387) wurde das erwartete 830 bp lange Fragment für alle Pflanzen außer dem Wildtyp amplifiziert (Abbildung 4.3-A und B rechts). Als zweite Grenze der T-DNA wurde eine zweite Left-Border mit dem genspezifischen Primer Pmh2hy3⁺ und dem SALK Left-Border-Primer LBXL identifiziert. Die Sequenzierung der beiden PCR-Produkte ergab eine Integration zwischen Nukleotid 1002 und Nukleotid 1024 des Leserasters des *PMH2*-Gens (Translationsstart ATG = +1). Das 2500 bp lange genspezifische PCR-Produkt wurde mit den Primern AtPMH2 GFP 1.5 und Pmh2hy3⁺ nur in den untersuchten Wildtyp-Pflanzen amplifiziert, was auf das Fehlen des Wildtyp-Allels in den restlichen Pflanzen schließen lässt (Abbildung 4.3-B rechts, unteres Bild). Die sechs untersuchten Pflanzen 4/1, 4/2, 15/1, 15/2, 7/1 und 7/2 der SALK-Linie 056387 waren für das T-DNA-Allel (*pmh2-1*) homozygot.

Ob die Insertion der T-DNAs in das *PMH2*-Gen die Bildung eines reifen Transkripts unterbindet, wurde für beide T-DNA-Linien mit Northern-Blot-Analysen untersucht. Dafür wurden Samen der Pflanzen 5 (*pmh2-2*) und 6 (wt) (SAIL 628 C06) bzw. der Pflanzen 4/1 und wt1 (SALK 056387) in einer Streusaat ausgebracht und unter Langtagbedingungen angezogen. Nach 14 Tagen wurde das Pflanzenmaterial geerntet und mit dem RNeasy[®] Plant Mini Kit (50) RNA nach Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen, Hilden, Deutschland). Mit jeweils 10 µg RNA pro Pflanzen-Linie wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. In den Nachkommen der Pflanze 4/1 der SALK-Linie wurde kein Transkript nachgewiesen (Abbildung 4.3-C rechts). In den Nachkommen der homozygoten Pflanze der SAIL-Linie deutete ein sehr schwaches Signal in der erwarteten Größe das Vorhandensein kleinerer Mengen des *PMH2*-Transkriptes an (Abbildung 4.3-C links). Das *pmh2-2*-Allel ist somit kein Knockout-Allel.

Daraufhin wurde die Menge des gebildeten reifen *PMH2*-Transkriptes in den Pflanzen 5 und 6 der SAIL-Linie durch quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt. Dazu wurde Gesamt-RNA

mit Hilfe des oligo(d)T Primers DTXSC in cDNA umgeschrieben und diese cDNA mittels einer Real-Time PCR mit den Primern pmh2qPCR_2H und pmh2qPCR_2R wie unter 3.3.2 beschrieben untersucht. Dabei wurde eine Reduktion des *PMH2*-Transkripts auf 11,5 ($\pm 0,1$) % in der homozygoten *pmh2-2*-Pflanze festgestellt (Tabelle 4.1). Die Bildung eines reifen *PMH2*-Transkripts ist also durch die Integration der T-DNA 95 nt vor dem Translationsstart des *PMH2*-Gens nicht völlig unterbunden. Das *pmh2-2*-Allel ist kein Knockout-, sondern ein Knockdown-Allel.

Probe		Zielgen Cp-Werte		Referenzgen Cp-Werte	Ratios	
	Zielgen	Replikate	Referenz- gene	Replikate	Zielgen/ Referenzgen	Normalisierte Ratios
wt	<i>PMH2</i>	24,92	<i>PP2A</i>	25,03		
	<i>PMH2</i>	24,81	<i>PP2A</i>	25,42		
	<i>PMH2</i>	24,99	<i>PP2A</i>	25,15		
			<i>UBC9</i>	26,2		
			<i>UBC9</i>	25,96		
			<i>UBC9</i>	26,01		
Mittelwert		24,91 ($\pm 0,09$)		25,63 ($\pm 0,49$)	1,648 ($\pm 0,19$)	1
homozygot knockout	<i>PMH2</i>	28,08	<i>PP2A</i>	25,3		
	<i>PMH2</i>	28,17	<i>PP2A</i>	25,27		
	<i>PMH2</i>	28,15	<i>PP2A</i>	25,3		
			<i>UBC9</i>	26,15		
			<i>UBC9</i>	26,18		
			<i>UBC9</i>	26,21		
Mittelwert		28,13 ($\pm 0,05$)		25,73 ($\pm 0,49$)	0,1895 ($\pm 0,007$)	0,115 ($\pm 0,001$)

Tabelle 4.1: Ergebnis der Real-Time Q-RT-PCR-Analyse des *PMH2*-Transkripts in der homozygoten Pflanze (Pflanze 5) und der WT-Pflanze (Pflanze 6) der SAIL 628C06-Linie. In Spalte 3 sind die als Triplikate gemessenen Cp-Werte für das Zielgen *PMH2* und deren Mittelwert für die homozygote und die WT-Pflanze angegeben. In Spalte 5 sind die Cp-Werte und der Mittelwert für die Referenzgene der Protein-Phosphatase 2A (PPA2, At1g13320) und dem Ubiquitin-Conjugating-Enzyme 9 (UBC9, At4g27960) aufgelistet. Der Mittelwert wird aus den Triplikaten beider Referenzgene zusammen gebildet. In Spalte 6 sind die aus den Cp-Mittelwerten nach dem Algorithmus der $\Delta\Delta$ Cp-Methode der LightCycler 480[®]-Software LCS480 1.5.0.39 berechneten Ratios von Referenzgenen zu *PMH2* angegeben. Die Bildung dieser Ratio dient dazu, Schwankungen in der Qualität der in die PCR eingesetzten cDNA-Menge heraus zu rechnen. In der letzten Spalte der Tabelle ist die normalisierte Ratio angegeben. Dabei wird der Wert der Wildtyp Pflanze auf 1 gesetzt und der Wert für die homozygote T-DNA-Insertionspflanze relativ dazu angegeben (Spalte 7).

4.2.2 Detektion von PMH1 und PMH2 in den T-DNA-Insertionsmutanten

Um die Funktion der PMH1- und PMH2-Proteine mit Hilfe der Knockout-Mutanten näher zu charakterisieren, wurden von den beiden Linien *pmh1-1* und *pmh2-1* Zellsuspensionskulturen aus dem Hypokotyl etiolierter Keimlinge angelegt. Daraus konnten Mitochondrien in großen Mengen isoliert werden.

Die submitochondriale Lokalisation der beiden einzelnen Proteine wurde bereits in Wildtyp-Mitochondrien untersucht. Dabei wurden ein Auftreten in der Membran-Fraktion und nur zum geringen Teil in der Matrix-Fraktion festgestellt. Nun sollte überprüft werden, in welchen Anteilen die beiden Proteine in den Membran- bzw. Matrix-Fraktionen vorkommen. Dazu wurden die Mitochondrien der beiden Mutanten-Kulturen und einer Wildtyp-Kultur wiederum in Matrix- und Membran-Fraktionen getrennt und jeweils über Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper analysiert.

Es wurden Signale, die einer apparenten Masse von ca. 60 kDa entsprechen, in nicht-fraktionierten Mitochondrien sowie in Membran-Fraktionen aller drei Pflanzenlinien identifiziert. Lediglich in der Matrix-Fraktion der Wildtyp-Probe wurde ein schwaches Signal in der entsprechenden Größe detektiert. In den Spuren mit *pmh2-1* mitochondrialem Protein erscheinen die Signale wesentlich schwächer als in den Spuren mit *pmh1-1* mitochondrialem Protein (Abbildung 4.4-A). PMH1 scheint also in deutlich geringeren Mengen in den Mitochondrien vorzuliegen als PMH2. Zusätzlich zu dem Signal, das zu den Proteinen der erwarteten Größe von 60 kDa korrespondiert, wird durch den gleichen Antikörper wieder ein zweites Signal, das einer apparenten Masse von ca. 65 kDa entspricht, in allen Proben angezeigt. Da dieses Signal unabhängig vom Genotyp der Kultur erscheint, zeigt es weder PMH1, noch PMH2 an (Abbildung 4.4-A).

Um die Vollständigkeit der Trennung der Mitochondrien in Matrix- und Membran-Fraktionen zu überprüfen, wurde auch hier eine zweite Immunodetektion mit einem Antikörper gegen Porin durchgeführt. Wie erwartet wurden auch dieses Mal nur Signale im mitochondrialen Gesamtprotein und in den Membran-Fraktionen beobachtet (Abbildung 4.4-B), so dass von einer weitgehend vollständigen Trennung der beiden Fraktionen ausgegangen werden konnte.

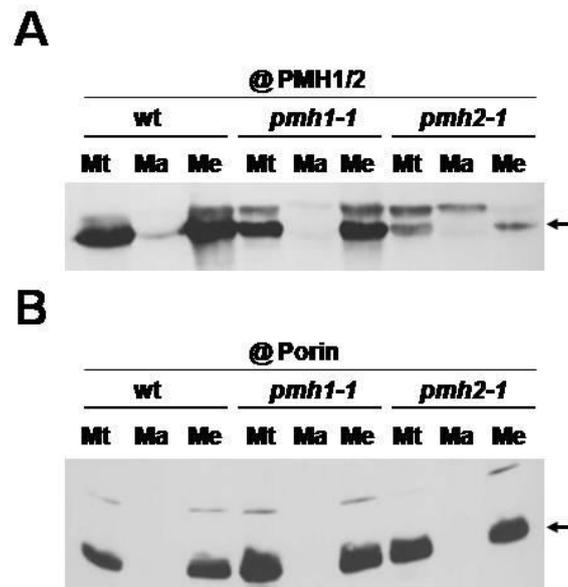


Abbildung 4.4: Detektion von PMH1 und PMH2 in mitochondrialen Membranen von *Arabidopsis thaliana*. (A) Mitochondrien von 4 Tage alten Zellsuspensionskulturen der *pmh1-1*, *pmh2-1* und einer Wildtyp Linie (wt) wurden in Matrix- (Ma) und Membran-Fractionen (Me) getrennt und zusammen mit den jeweiligen mitochondrialen Gesamtproteinen (Mt) über Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper (@PMH1/2) detektiert. (B) Die Vollständigkeit der Trennung der Matrix- und Membran-Proteine wurde durch Immunodetektion mit dem Porin-Antikörper überprüft. Die zu den entsprechenden Proteinen korrespondierenden Signale sind mit Pfeilen markiert.

Im Weiteren sollte getestet werden, ob sich die beiden PMH-Proteine auch im Gesamtlysate von 14 Tage alten Keimlingen nachweisen lassen und welchen Anteil die jeweiligen Proteine haben. Dazu wurden die oberirdischen Teile von auf Erde unter Langtagbedingungen angezogenen *pmh2-1*-, *pmh1-1*- und Wildtyp-Keimlingen in flüssigem Stickstoff gefroren und gemörsert. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (1x) aufgenommen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nichtlösliche Bestandteile wurden für 10 min bei 18.000 x g abzentrifugiert. Es wurde Proteinlysate entsprechend 12 mg Ausgangsmaterial über Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper analysiert. Ein zweites Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zu den mitochondrialen Proteinlysaten wurden in den Gesamt-Proteinlysaten aus Wildtyp- und aus *pmh1-1*-Keimlingen ein Protein in der richtigen Größe detektiert. Allerdings waren die Signale nur sehr schwach und für die *pmh2-1* Mutante wurde kein Signal beobachtet (Abbildung 4.4-C, linkes Bild schwarzer Pfeil). Das Verhältnis der Proteinmenge von PMH1 zu PMH2 stellt sich also im Gesamtproteom von *A. thaliana* ähnlich dar, wie im mitochondrialen Proteom. Die Signale konnten keiner distinkten Bande im gefärbten SDS-Gel (Abbildung 4.4-C, rechtes Bild) zugeordnet werden.

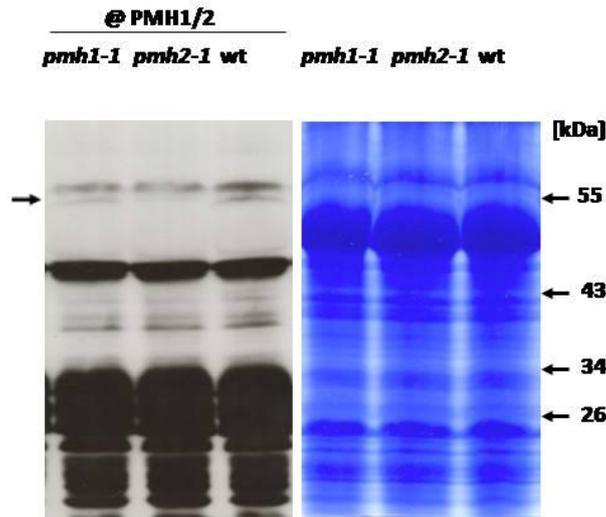


Abbildung 4.5: Detektion von PMH1 und PMH2 im Gesamtproteom von *A. thaliana* Keimlingen. Pflanzengesamtlysat von 14 Tage alten Keimlingen der beiden Mutanten-Linien (*pmh1-1* und *pmh2-1*) und einer Wildtyp-Linie (wt) wurde über Immunodetektions-Analysen untersucht (links) und mit einem parallel gelaufenen Coomassie gefärbten Gel verglichen (rechts). Die zu PMH1 bzw. PMH2 korrespondierenden Signale sind mit einem Pfeil markiert. Die Proteingrößen wurden entsprechend einem parallel gelaufenen Proteinmarker angegeben.

4.2.3 Analyse der PMH1/2-Protein-Komplexe in den T-DNA-Insertionsmutanten

Wie bereits unter 4.1 beschrieben, sind PMH1 und/oder PMH2 Teil hochmolekularer Protein-Komplexe. Unklar war bis dahin noch, ob beide PMH-Proteine in Komplexen vorliegen und wenn, welchen Anteil die einzelnen Proteine an diesen Komplexen haben. Deshalb wurden in den *pmh1-1*- und *pmh2-1*-Mutanten hochmolekulare Protein-Komplexe untersucht. Dazu wurden Mitochondrien aus den entsprechenden Zellsuspensionskulturen und einer Wildtyp-Zellkultur isoliert und die mitochondrialen Proteine mit Hilfe von 2 % DDM Detergenz in ACA 750 Puffer solubilisiert. Die Auftrennung der Protein-Komplexe nach ihrer Größe erfolgte jeweils über einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten mit neun Stufen von 15 – 55 % (w/v) Saccharose durch Ultrazentrifugation (siehe 3.5.4). Jeweils 50 µl der Gradienten-Fractionen 1 bis 9 wurden im Anschluss über Immunodetektion analysiert. Dabei stellt die erste Fraktion jeweils die auf den Gradienten aufgetragene Probe dar und die Fraktionen 2 bis 9 die Saccharose-Stufen 15 % bis 50 %. Nach Immunodetektion mit dem PMH1/2-Antikörper wurde in der *pmh1-1*-Mutante die gleiche Verteilung der Signale über die Gradienten-Fractionen beobachtet, wie für die Wildtyp-Mitochondrien (Abbildung 4.6-A). Die Verteilung der Signale über die Fraktionen 1 bis 6 deuten daraufhin, dass PMH2 in hochmolekularen Protein-Komplexen vorhanden ist. In den Fraktionen des *pmh2-1*-Mutante-

Gradienten waren nur sehr schwache Signale zu sehen. Da der Antikörper wie in den Abbildungen 4.1, 4.2 und 4.4 bereits gezeigt ein weiteres Protein mit etwas größerem Molekulargewicht anzeigt, wurde zur eindeutigen Identifizierung des PMH1-Proteins die Fraktionen 1 und 2 des Gradienten der Wildtyp-Mitochondrien parallel mit den Fraktionen 1 bis 7 der *pmh2-1*-Mitochondrien über Immunodetektion analysiert. Auf diese Weise wurde das untere der beiden beobachteten Signale eindeutig PMH1 zugeordnet (Abbildung 4.6-B). Die Verteilung der Signale über die Fraktionen 1 bis 5 deutet auch für das PMH1-Protein auf das Auftreten hochmolekularer Protein-Komplexe hin.

Diese Analyse ergab, dass sowohl PMH1 als auch PMH2 in hochmolekularen Protein-Komplexen vorkommen, wobei PMH2 den eindeutig dominanten Anteil der beiden Proteine ausmacht.

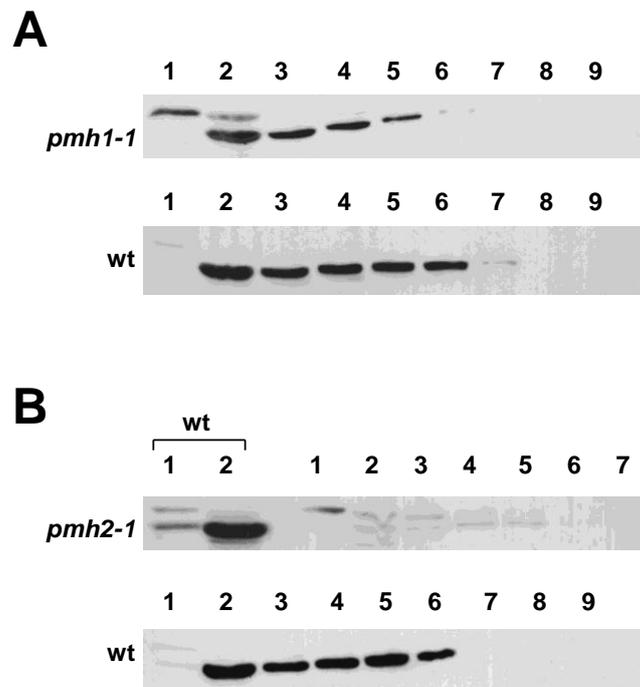


Abbildung 4.6: PMH1 und PMH2 kommen in hochmolekularen Protein-Komplexen vor. Mitochondriales Gesamtprotein von einer *pmh1-1*- (A oben) und einer Wildtyp-Zellsuspensionskultur (wt) (A unten und B unten), sowie einer Kälte behandelten *pmh2-1*-Zellsuspensionskultur (B oben) wurde über diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten von 15-55 % in 5 % Stufen aufgetrennt. Die abgenommenen Fraktionen entsprachen der Reihe nach: Fraktion 1- geladene Probe, Fraktion 2- 15 % Saccharose, 3- 20 %, 4- 25 %, 5- 30 %, 6- 35 %, 7- 40 %, 8- 45 %, 9- 50 % und Fraktion 10- 55 % Saccharose. Die Verteilung der beiden PMH-Proteine über die Fraktionen wurde über Immunodetektions-Analysen mit dem PMH1/2-Antikörper analysiert. Da in den *pmh2-1*-Mitochondrien nur sehr schwache Signale beobachtet wurden, wurden die Fraktionen 1 bis 7 mit den Fraktionen 1 und 2 der Wildtyp-Mitochondrien parallel analysiert (B oben). Das PMH1-Protein wurde eindeutig identifiziert.

4.2.4 Makroskopischer Phänotyp der *pmh1-1*- und *pmh2-1*-Mutanten

Je nach Bedeutung eines Proteins für die Pflanze kann dessen Fehlen Auswirkungen auf die Entwicklung und den Habitus der Pflanze haben. Der ausgebildete Phänotyp kann Hinweise geben, an welchem Prozess im Metabolismus ein Protein beteiligt ist. Zur makroskopischen Charakterisierung des *PMH1*- bzw. *PMH2*-Knockouts auf *A. thaliana* Pflanzen, wurde die Entwicklung der Pflanzen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen untersucht. Dazu wurden in einem Versuchsansatz Pflanzen auf Standard-MS-Platten angezogen (Abbildung 4.7-A und B). Auf horizontal inkubierten Platten wurde das Keimungsverhalten der *pmh1-1*- und *pmh2-1*-Samen (Abbildung 4.7-A) und auf vertikal inkubierten Platten die Entwicklung der Pflanzen im gesamten Keimlingsstadium beobachtet (Abbildung 4.7-B). In einem zweiten Versuchsansatz wurden Samen der beiden Linien auf Erde ausgebracht (Abbildung 4.7-C und D) und die Entwicklung der Pflanze bis zur Bildung der Infloreszenzen verfolgt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zu vergleichenden Mutanten- und Wildtyp-Pflanzen gleichzeitig auskeimten. Für beide Versuche wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen mit 16 h Licht bei 21 °C und 8 h Dunkel bei 4 °C (A) bzw. mit 16 h Licht und 21 °C und 8 h Dunkel bei 4 °C (B) angezogen.

Tage nach Auslegen der Samen	Linie	Anzuchtbedingung A			Anzuchtbedingung B		
		Mittelwert Wurzellänge [mm]	Anzahl Pflanzen	T-Test	Mittelwert Wurzellänge [mm]	Anzahl Pflanzen	T-Test
5	<i>pmh1-1</i>	4,1 ± 0,6	62	1,98E-18	1,6 ± 0,5	64	4,54E-38
	<i>wt col</i>	6,8 ± 1,2	62		2,6 ± 1,0	64	
6	<i>pmh1-1</i>	5,3 ± 1,1	58	9,28E-12	2,8 ± 0,7	63	3,09E-47
	<i>wt col</i>	8,1 ± 1,4	59		4,8 ± 1,5	63	
7	<i>pmh1-1</i>	5,7 ± 1,0	54	3,10E-12	4,0 ± 0,8	63	7,51E-46
	<i>wt col</i>	8,8 ± 1,5	57		6,1 ± 1,8	63	
8	<i>pmh1-1</i>	6,2 ± 1,2	54	1,08E-17	5,9 ± 0,9	63	1,66E-47
	<i>wt col</i>	9,1 ± 1,6	56		8,4 ± 2,2	63	
9	<i>pmh1-1</i>	6,3 ± 1,2	53	4,94E-16	7,2 ± 1,1	63	1,56E-42
	<i>wt col</i>	9,1 ± 1,8	56		10,2 ± 2,7	63	
10	<i>pmh1-1</i>	6,3 ± 1,2	53	5,83E-11	8,5 ± 1,1	63	1,36E-46
	<i>wt col</i>	9,2 ± 1,6	56		11,5 ± 2,8	63	

Tabelle 4.2: Wurzellängen von *pmh1-1*-Pflanzen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die Tabelle zeigt die Wurzellängen von *pmh1-1*- und Wildtyp-Pflanzen bei Anzucht auf MS-Platten nach 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Tagen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die *pmh1-1*-Pflanzen zeigen unter beiden Bedingungen signifikant kürzere Wurzeln als die Wildtyp-Pflanzen (Signifikanztest (T-Test) Spalten 5 und 8).

Bei den Samen der *pmh1-1*-Linie auf MS-Platten unter Anzuchtbedingung B wurde nach drei Tagen eine um ca. 6 Stunden verzögerte Keimung beobachtet. Bei Samen der *pmh2-1*-Linie trat dagegen keine Keimungsverzögerung auf (Abbildung 4.7-A). In der weiteren Entwicklung der Keimlinge auf MS-Platten unter beiden Anzuchtbedingungen wurde die Ausbildung kürzerer Wurzeln für die Pflanzen der Linie *pmh1-1* verzeichnet (Abbildung 4.7-B, Tabelle 4.2). Für die Pflanzen mit einem *PMH2*-Knockout wurde keine Verkürzung der Wurzeln unter Anzuchtbedingung B beobachtet (Daten nicht gezeigt).

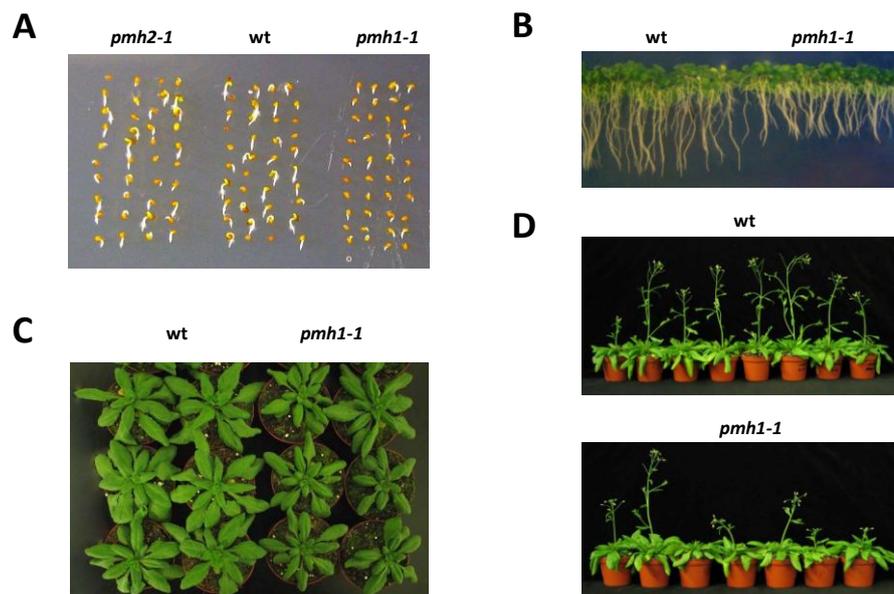


Abbildung 4.7: Analyse des makroskopischen Phänotyps der *pmh1-1*-Mutanten. Samen von *A. thaliana* Wildtyp *columbia* und der *pmh1-1*-Linie wurden sterilisiert und auf Standard-MS-Medium ausgebracht. Die Platten wurden unter Langtagbedingungen mit 16 h Licht bei 21 °C ($160\text{-}200 \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$) und 8 h Dunkel bei 4 °C horizontal für drei Tage (A) oder vertikal für 13 Tage unter denselben Bedingungen (B) inkubiert. Parallel wurden *pmh1-1*- und Wildtyp-Pflanzen auf Erde unter den gleichen Bedingungen bis ins adulte Stadium angezogen (C und D). Die *pmh1-1*-Pflanzen zeigten in allen Versuchen eine verzögerte Entwicklung.

4.2.5 Molekulare Phänotypen in den T-DNA-Insertionsmutanten

Neben den Untersuchungen zum makroskopischen Phänotyp der Mutanten wurde auch auf molekularer Ebene nach Phänotypen gesucht, die einen Hinweis auf die Funktion dieser beiden Proteine liefern können.

Für Vertreter der Familie der DEAD-Box Proteine wurden Funktionen in allen Bereichen des RNA-Metabolismus nachgewiesen (Cordin et al., 2006, Linder, 2006), so dass auch für PMH1 und PMH2 Funktionen in allen Prozessen von der Transkription bis zur Degradation

der RNA in Betracht gezogen werden mussten. Analysiert wurden die Steady-State-Transkriptmengen einiger mitochondrialer Transkripte und speziell die Splicing-Effizienz der Introns mitochondrialer mRNAs. Darüberhinaus wurde das RNA-Editing am Beispiel des *nad2*-Transkriptes und die 5'- und 3'-Endprozessierung aller mitochondrialer mRNAs analysiert. Für die Reifung der Enden wurden in den Mutanten keine zum Wildtyp abweichenden Prozessierungsereignisse detektiert (Binder und Jonietz, unveröffentlichte Daten).

4.2.5.1 Die Steady-State-Level einiger reifer mitochondrialer Transkripte sind in den *pmh2*-Mutanten reduziert

Zunächst wurde untersucht, ob der Knockout von *PMH1* oder *PMH2* Auswirkungen auf die Steady-State-Transkriptmengen reifer mitochondrialer mRNAs und speziell auf das Spleißen von „*cis*-splicing“ und/oder „*trans*-splicing“ Introns hat. Das mitochondriale Genom von *A. thaliana* kodiert für 57 Gene. Davon enthalten 9 Gene insgesamt 18 „*cis*-splicing“ und fünf „*trans*-splicing“ Introns, die alle zu den Gruppe II-Introns gehören (Tabelle 4.3) (Unsold et al. 1997).

Gen	„ <i>cis</i> -splicing“ Introns	„ <i>trans</i> -splicing“ Introns
<i>nad1</i>	2	2
<i>nad2</i>	3	1
<i>nad4</i>	3	-
<i>nad5</i>	2	2
<i>nad7</i>	4	-
<i>cox2</i>	1	-
<i>rpl2</i>	1	-
<i>rps3</i>	1	-
<i>ccb6c</i>	1	-

Tabelle 4.3: Übersicht über die Introns mitochondrialer Gene in *A. thaliana*

Um erste Hinweise auf eine Veränderung im Spleißen der einzelnen Introns zu erhalten, wurden PCR-Analysen mit Primern komplementär zu den flankierenden Exons durchgeführt. Die Expression von *PMH1* und *PMH2* wird durch Kälte verstärkt und beide Gene sind zum Beginn der Keimung stark exprimiert (<https://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp>). Deshalb wurde für die PCR-Analysen RNA aus Kälte (4 °C) behandelten angekeimten Samen und aus 24 h Kälte behandelten 14 Tage alten Keimlingen für die Analysen verwendet. Es wurden jeweils 5 µg RNA der *pmh1-1*-, *pmh2-1*- und *pmh2-2*-Mutanten mit Random

Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann mit dem GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt und mit 100 µl ddH₂O von der verwendeten Säule eluiert. Jeweils 1 µl davon wurde in die nachfolgenden PCR-Analysen eingesetzt. Für die einzelnen Introns wurden PCR-Reaktionen mit Primern komplementär zu den flankierenden Introns durchgeführt, so dass die resultierenden PCR-Produkte für gespleißte Moleküle kürzer waren, als für ungespleißte. Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese analysiert. Für alle *cis*-spleißenden Introns wurde das erwartete PCR-Produkt, das sich von der gespleißten RNA ableitet, detektiert. Für einzelne Introns wurde jedoch gegenüber dem Wildtyp eine Reduktion in der Menge an PCR-Produkt, das von gespleißtem Transkript amplifiziert wurde, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Um dies für das *nad2*-Transkript quantitativ zu untersuchen, wurden Multiplex-PCRs mit den Intron flankierenden Primern und einem dritten Primer, komplementär zur Intronsequenz durchgeführt. Dadurch konnten die Sequenzen der gespleißten und ungespleißten Transkripte in einer PCR gemeinsam amplifiziert werden (Abbildung 4.8-A). Für die beiden Introns zwischen den Exons a und b und den Exons d und e wurde eine Reduktion in der Menge an gespleißtem Transkript und ein Anstieg in der Menge des ungespleißten Transkripts gefunden (Abbildung 4.8-B oberen beiden -Bilder). Die Reduktion zeigte sich in den Samen stärker als in den Keimlingen (Daten nicht gezeigt). Zur Amplifikation des gesamten *nad2*-Transkripts über alle Exons und Introns, wurde eine PCR mit Primern komplementär zu Exon a (Primer 1) und Exon e (Primer 4) durchgeführt. Auch hierbei wurde eine Reduktion des Steady-state-Levels des *nad2*-Transkripts beobachtet (Abbildung 4.8-B drittes Bild). Die Reduktion war auch hier für die Samenproben wieder stärker als für die Keimlinge (Daten nicht gezeigt).

Um beurteilen zu können, ob eine Reduktion der Menge des gesamten *nad2*-Transkripts und damit eine Reduktion in der Transkription des *nad2*-Gens vorlag, wurde eine PCR zur Amplifikation des Exon d durchgeführt. Mit dieser PCR wurden gespleißte und ungespleißte Transkripte gleichermaßen amplifiziert. Dabei wurden gleiche Mengen *nad2*-Transkript in Mutanten und Wildtyp detektiert (Abbildung 4.8-B, unteres Bild).

Um die Steady-State-Transkriptmengen der verschiedenen Transkripte durch eine unabhängige Methode zu überprüfen, wurden Northern-Blot-Analysen auf die *nad2*-, *nad4*-, und *nad7*-Transkripte durchgeführt. Zusätzlich wurden Northern-Blot-Analysen von *nad9*- und *atp8*-mRNAs durchgeführt, die beide keine Introns enthalten und deren Prozessierung somit unabhängig vom Spleißen ist.

Dazu wurden jeweils 10 µg RNA aus 14 Tage alten Keimlingen der Mutanten-Linien auf

denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Duralon-UV-Membran transferiert. Zur Detektion der einzelnen Transkripte wurde jede Membran mit einer mit α -dCTP radioaktiv markierten genspezifischen DNA-Sonde (Tabelle 4.4) hybridisiert und die Signale mit Hilfe von photosensitiven Filmen detektiert (Abbildung 4.8-C, oberen Bilder). Zum Nachweis, dass von allen Linien gleiche RNA-Mengen eingesetzt wurden, wurden alle Membranen in einer zweiten Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid komplementär zur cytosolischen 18S rRNA hybridisiert (Abbildung 4.8-C untere Filmreihe).

Untersuchtes Gen	Primer	Länge des Fragmentes	Lage der Sonde in Bezug auf ATG
<i>nad2</i>	nad2 ab splicing a	1309 bp	+148 bis +1457
	nad2 cde splicing 1		
<i>nad4</i>	Atnad4-fl.3' A	1732 bp	-209 bis +152,
	Atnad4-fl.5' B		
<i>nad7</i>	nad7 ab splicing 1	1090 bp	+1 bis 1090
	Atnad7-10		
<i>nad9</i>	nad9 NS.H	574 bp	+1 bis +572
	nad9 NS.R		
<i>atp8</i>	Atatp8-NS.H	368 bp	+ 10 bis +377
	Atatp8-NS.R		

Tabelle 4.4: Sonden für die Northern-Hybridisierungen gegen mitochondriale mRNAs. Für die Sonden der verschiedenen mitochondrialen mRNAs wurden mit den angegebenen Primern cDNA-Fragmente der angegebenen Länge amplifiziert.

Sowohl für *nad2* und *nad4* (Abbildung 4.8-C), als auch für *nad7* (Daten nicht gezeigt) wurde in den *pmh2*-Mutanten eine Reduktion der reifen mRNAs beobachtet, während in der *pmh1-1* Mutante keine Reduktion zu sehen war. Außerdem wurde auch für die reife mRNA des Intron-freien *nad9*-Gens eine Reduktion im Steady-State-Level in den *pmh2*-Mutanten detektiert. Für das Intron-freie *atp8*-Gen wurde dagegen keine Reduktion reifer Transkripte beobachtet. Für die *pmh2*-Mutanten wurde neben der Reduktion der Steady-State-Level der reifen mRNAs eine erhöhte Menge an längeren RNAs detektiert, sichtbar als diffuse dunklere Signale im oberen Bereich der Membran. Eine Northern-Blot-Analyse für die *nad2*-Transkripte mit RNA aus Kälte behandelten Samen zeigte identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Der Knockout bzw. Knockdown von *PMH2* zeigt also einen Einfluss auf die Steady-State-Menge verschiedener mitochondrialer mRNAs.

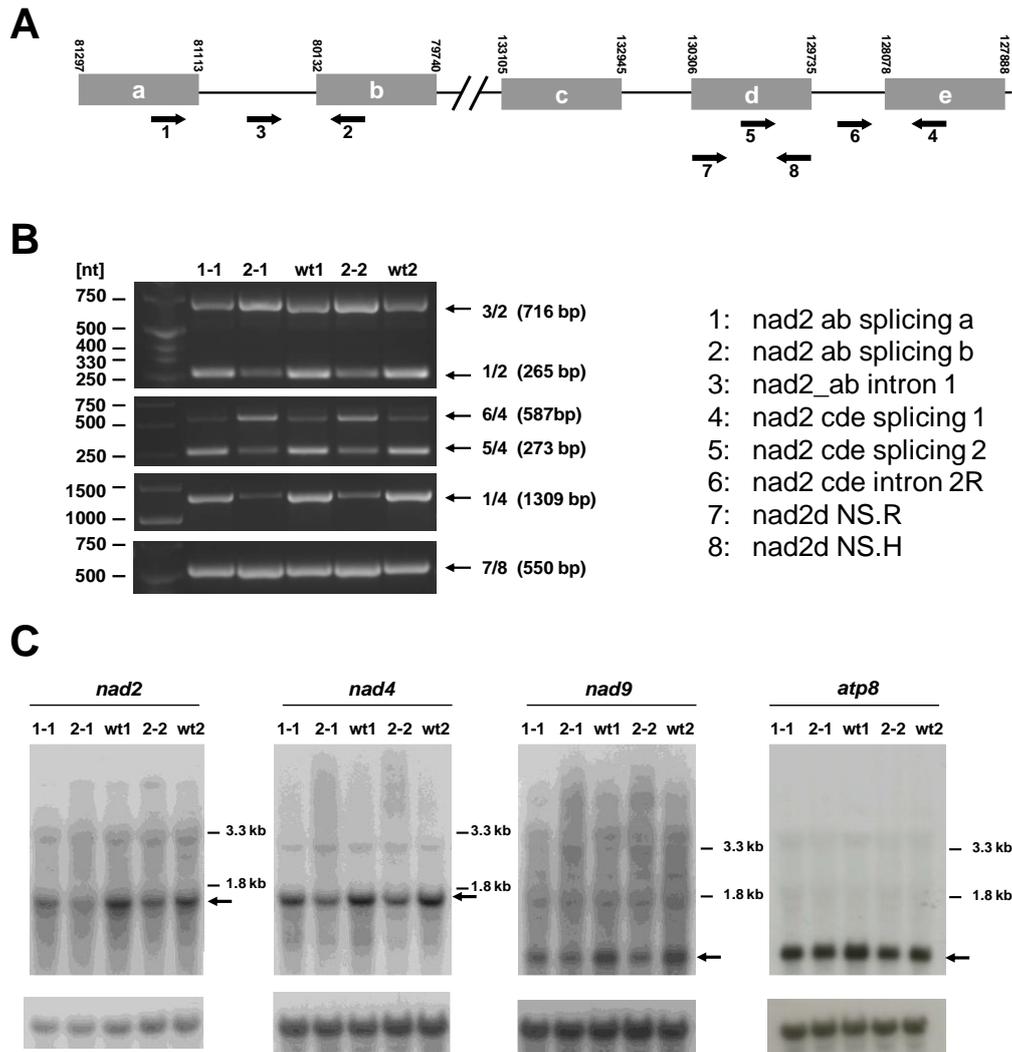


Abbildung 4.8: Analyse der Steady-State-Level mitochondrialer Transkripte. (A) Das Leseraster des *nad2*-Gens umfasst 5 Exons, die an zwei verschiedenen Loci im mitochondrialen Genom (*nad2-ab* und *nad2-cde*) kodiert sind. (B) Zur Analyse der *nad2*-Transkriptreifung wurde mit Samen-RNA der *PMH1* und *PMH2* T-DNA Insertions-Mutanten verschiedene PCR-Analysen durchgeführt. Die Lage der verwendeten Primer (rechts) ist in A schematisch dargestellt und die korrespondierenden PCR Produkte und ihre Größen rechts neben den Bildern in B angezeigt. Die Proben wurden über den einzelnen Spuren wie folgt bezeichnet: 1-1: *pmh1-1*; 2-1: *pmh2-1*; 2-2: *pmh2-2*, wt1: unabhängiger Columbia Wildtyp; wt2: Columbia Wildtyp aus der SAIL 628 C06 Linie. Das Spleißen des Introns zwischen den Exons a und b wurde über eine PCR mit den Primern 1 und 2 (265 bp), sowie dem Intron-spezifischen Primer 3 (716 bp) überprüft (oberes Bild). Die PCR wurde für das Intron zwischen den Exons d und e mit den Primern 4 und 5 (273 bp), sowie 6 (587 bp) analog durchgeführt (zweites Bild). Die gesamte cDNA wurde mit den Primern 1 und 4 amplifiziert (1309 bp, drittes Bild). Das einzelne Exon d wurde mit den Primern 7 und 8 amplifiziert (550 bp). (C) Die Steady State Level der *nad-2*, *nad4*-, *nad9*- und *atp8*-Transkripte wurden über Northern-Blot-Analysen untersucht. Die Signale der Transkripte sind mit schwarzen Pfeilen angezeigt (obere Bildreihe). Die gleichmäßige Beladung aller Spuren mit RNA wurde über eine Hybridisierung mit einem Oligonukleotid gegen die cytoplasmatische 18S rRNA überprüft (untere Bildreihe)

4.2.5.2 RNA-Editing des *nad2*-Transkripts ist in den *pmh1*- und *pmh2*-Mutanten nicht beeinflusst

Nachdem ein Einfluss des PMH2-Proteins auf das Steady-State-Level verschiedener mitochondrialer Transkripte nachgewiesen war, sollte exemplarisch für das *nad2*-Transkript überprüft werden, ob der Knockout bzw. der Knockdown des *PMH2*-Gens darüberhinaus einen Einfluss auf die Effizienz des C zu U Editings im *nad2*-Transkript hat.

Da die Reduktion des Steady-State-Levels reifer *nad2*-mRNAs in Samen stärker ausgeprägt war als in Keimlingen, wurde auch für diese Analysen RNA aus Samen verwendet und wie unter 4.2.5.1 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Die *nad2*-Transkripte wurden mit den Primern 1 und 4 (Abbildung 4.7-A) amplifiziert und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nach Aufreinigung mit dem Primer 1 bei 4base lab GmbH (Reutlingen, Deutschland) sequenziert.

Die Positionen der betrachteten Editing-Stellen sind im Bezug auf das ATG des Transkripts angegeben: in Exon b: 341, 344, 389, 394, 400, 427, 441, 461, 528, 530, 558, sowie in Exon c: 585, 642 und 695 (REDIdb – RNA Editing Database, http://biologia.unical.it/py_script/search.html).

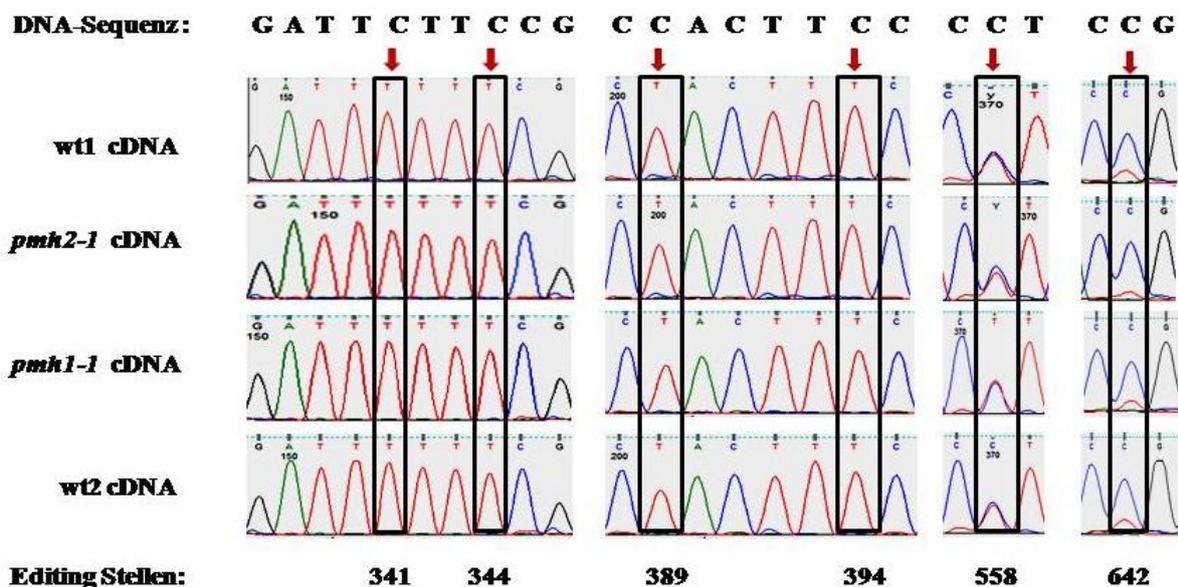


Abbildung 4.9: Chromatogramm der cDNA-Sequenz des *nad2*-Transkripts aus *pmh1-1*-, *pmh2-1*-Mutanten, wt1 und wt2. Die Editing-Stellen sind mit einem schwarzen Rahmen umgeben und unter den Chromatogrammen bezeichnet. Die jeweils untersuchte Mutante ist links neben den Chromatogrammen angegeben. Die Identität einer Base ist über die Farbe des jeweiligen Peaks im Chromatogramm verdeutlicht: Schwarz-G, grün-A, rot-T und blau-C.

Editiertes Nukleotid	Editing Effizienz
341	100 %
344	100 %
389	100 %
394	100 %
400	100 %
427	100 %
441	-
461	100 %
528	-
530	100 %
558	50%
585	-
642	20%
695	100 %

Tabelle 4.5: Editing-Effizienzen einiger Stellen im *nad2*-Transkript. Die Positionen der Editing-Stellen sind im Bezug auf das ATG des Transkriptes angegeben.

Die entsprechenden Stellen wurden in den erhaltenen Sequenz-Chromatogrammen der Mutanten- und Wildtyp-Proben verglichen (Beispiel Abbildung 4.9). Die Identität der jeweiligen Basen wurde überprüft und bei teilweisem RNA-Editing der Anteil an editierter und nicht editierter Base betrachtet. Dabei waren sowohl für die Stellen mit 100% RNA-Editing als auch für die Stellen mit teilweisem RNA-Editing keine Unterschiede in den Chromatogrammen zu sehen.

4.2.6 Der Atmungskettenkomplex I ist in der *pmh2-1*-Mutante nicht reduziert

Die Zusammensetzung der großen Protein-Komplexe und Superkomplexe der Atmungskette in Mitochondrien von Pflanzen wurde in den letzten Jahren intensiv mit Hilfe der BN-PAGE untersucht (Jansch, 1996, Eubel, 2003, Heazlewood, 2003, Perales, 2005). Der Komplex I der Atmungskette besteht in *A. thaliana* aus mehr als 30 Untereinheiten (Heazlewood, 2003). Davon sind neun Untereinheiten im mitochondrialen Genom und die restlichen Untereinheiten im Kern kodiert. Heazlewood et al. (2003) konnten die vier mitochondrial kodierten Untereinheiten *nad1*, *nad5*, *nad7* und *nad9* durch massenspektrometrische Analysen des Atmungskettenkomplex I nach einer Auftrennung in einer BN-PAGE identifizieren.

Nachdem eine Reduktion der Steady-State-Transkriptmengen der mitochondrialen mRNAs der *nad2*-, *nad4*-, *nad7*- und *nad9*-Gene in den *pmh2*-Mutanten beobachtet wurde, sollte überprüft werden, ob dies auch zu Veränderungen bei den Steady-State-Mengen der entsprechenden Proteine führt und einen Einfluss auf die Zusammensetzung oder die beobachtete Menge an Komplex I im mitochondrialen Proteom hat. Dazu wurden Mitochondrien aus einer *pmh2-1*- und einer Wildtyp-Zellsuspensionskultur isoliert und deren

Proteom mittels BN-PAGE/Tris-Tricin-SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden über Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 4.10).

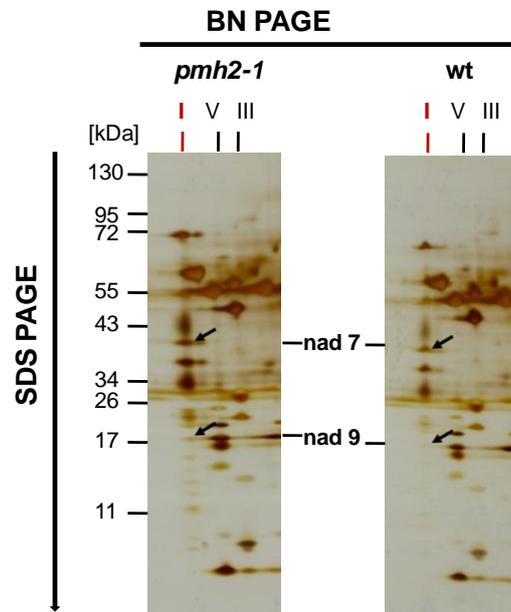


Abbildung 4.10: BN-PAGE von mitochondrialen Protein-Komplexen einer *pmh2-1*- und einer Wildtyp-Zellsuspensionskultur. Dargestellt sind Ausschnitte der silbergefärbten zweiten Dimension der BN-PAGE der *pmh2-1*-Mutante (linkes Bild) und des Wildtyps (rechtes Bild), die die Atmungsketten Komplexe I, V und III zeigen. Die Komplexe sind mit römischen Ziffern bezeichnet. Die Trennrichtung der BN-PAGE bzw. der SDS-PAGE ist mit Pfeilen angegeben. Die Proteingrößen wurden mit Hilfe eines parallel gelaufenen Proteinmarkers bestimmt. Die Spots der *nad7*- und *nad9*-Untereinheiten sind mit kleinen Pfeilen im Gelbild angezeigt.

In der BN-PAGE wurde kein Unterschied in der Untereinheitenzusammensetzung oder in der detektierten Menge an Komplex I zwischen der *pmh2-1*-Mutante und dem Wildtyp beobachtet. Es stellen sich auf beiden Gelen dieselben Protein-Spots in gleichen Mengenverhältnissen zueinander dar. Die Spots der *nad7* und *nad9* Untereinheiten wurden vergleichend zu den Gelen nach Heazlewood et al. (2003) identifiziert. Die Spots treten in gleicher Intensität im Gel mit Wildtyp-Protein und im Gel mit *pmh2-1*-Protein auf (Abbildung 4.10). Die Bildung des Atmungskettenkomplex I und seine Stabilität scheinen also zumindest in den Mitochondrien einer Zellsuspensionskultur durch den Knockout des *PMH2*-Gens nicht beeinflusst zu sein.

4.3 Analyse von *PMH2*-RNAi-Pflanzen im *pmh1-1*-Hintergrund

Da die beiden DEAD-Box-Proteine PMH1 und PMH2 in *A. thaliana* neben der gemeinsamen mitochondrialen Lokalisation auch eine hohe Ähnlichkeit von 76 % identischen Aminosäuren aufweisen, stellte sich die Frage, ob beide Proteine zumindest teilweise in ihrer Funktion redundant sein könnten. Obwohl beide Helikasen unterschiedliche Expressionsmuster zeigen, sollte überprüft werden, ob ein Ausschalten bzw. eine Reduktion beider Proteine Auswirkungen auf den Phänotyp der Pflanzen hat. Beide Gene liegen auf Chromosom 3 des Genoms von *A. thaliana* und sind nur durch 2500 bp von einander getrennt.

Für *A. thaliana* wird eine Rekombinationswahrscheinlichkeit von 1 % für einen genomischen Bereich von ca. 150 kb angegeben (Puchta and Hohn, 1996). Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, bei Kreuzung von zwei *PMH1*- und *PMH2*-T-DNA-Insertionspflanzen durch homologe Rekombination eine Doppelmutante zu erhalten, mit ca. 0,02 % so gering, dass mehrere tausend Pflanzen einer solchen Kreuzung genotypisiert werden müssten, um eine *PMH1/PMH2*-Doppelmutante zu identifizieren. Deshalb sollte alternativ versucht werden, eine Reduktion der Transkriptmenge von *PMH2* durch RNA-Interferenz zu erzielen. Dabei wird durch 21 – 23 nt einzelsträngige, zum Transkript komplementäre RNA-Fragmente (siRNAs) der Abbau eines Transkripts induziert. Die Menge des Transkripts wird reduziert, jedoch niemals völlig ausgelöscht. Zur Erzeugung von siRNAs werden Konstrukte mit Inverted-Repeat-Sequenzen des Zielgens unter der Kontrolle eines konstitutiven oder eines induzierbaren Promotors in die Pflanze eingebracht. Wird diese Sequenz transkribiert, faltet sich diese einzelsträngige RNA aufgrund dieser Repeats zu einem Doppelstrang und der Mechanismus der RNA-Interferenz wird ausgelöst.

4.3.1 Klonierung eines RNA-Interferenz-Konstruktes für *PMH2*

Für die Klonierung des *PMH2*-RNAi-Konstruktes wurde das Gateway®-System von Invitrogen verwendet (Karimi et al., 2007). Es lag bereits der Einstiegs-Vektor pENTR1A mit den ersten 313 Nukleotiden ab dem ATG des *PMH2*-Leserasters vor (Diplomarbeit Matthes, 2006, Abbildung 4.11-A). Dieser Teil entspricht der potentiellen Präsequenz des Proteins. Im pENTR1A befindet sich diese Sequenz zwischen zwei voneinander verschiedenen attachment sites attL1 und attL2. Diese können mit den attachment sites attR1 und attR2 des Zielvektors pH7GWIWG2(I) (Karimi et al., 2005) mit Hilfe der Integrase des λ -Phagen (Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix) rekombinieren, wobei das Insert *in vitro* in den Zielvektor

übertragen wird. Die Integration wurde über PCR mit dem *PMH2*-genspezifischen Primer AtPMH2 GFP 2.3 und den Vektor-Intron-spezifischen Primern GW1 bzw. GW1 AS überprüft. Durch die PCRs wurden die erwarteten Produkte von 741 bp bzw. 785 bp amplifiziert (Abbildung 4.11-B). Zusätzlich wurde ein Kontroll-Verdau des Plasmids mit dem Enzym Eam1104I durchgeführt. Die erwarteten Banden (179 bp, 464 bp, 774 bp, 1258 bp, 1286 bp, 2670 bp und 4838 bp) wurden beobachtet und zeigten, dass die *PMH2*-Sequenz korrekt in den Vektor pH7GWIWG2(I) integriert war (Abbildung 4.11-C). Das Plasmid wurde daraufhin in Agrobakterien des Stammes GV2260 transformiert und die erhaltenen Klone erneut durch PCR mit den genannten Primern überprüft. Alle getesteten Klone enthielten das Plasmid (Daten nicht gezeigt).

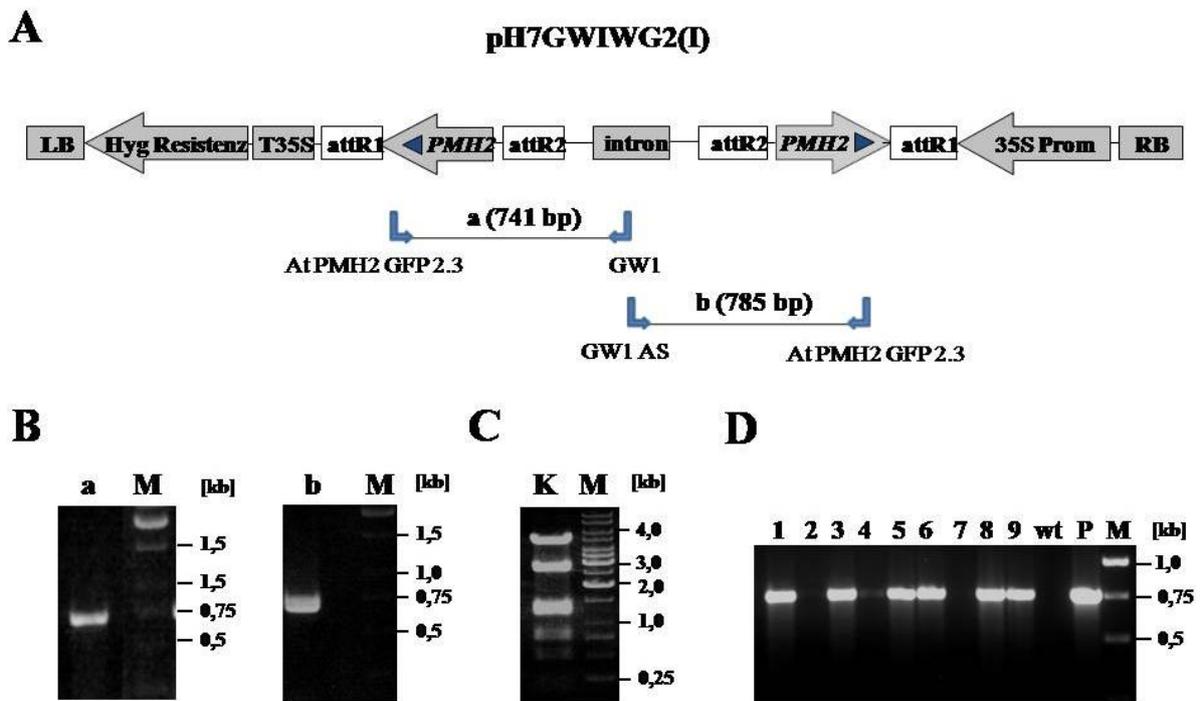


Abbildung 4.11: pH7GWIWG2(I)-*PMH2*-RNAi-Konstrukt. (A) Aufbau der T-DNA des pH7GWIWG2(I)-*PMH2*-RNAi-Vektors mit 313 nt des *PMH2*-Leserasters. Die Primer zur Überprüfung des Konstruktes durch PCR sind als blaue Pfeile, die resultierenden PCR Produkte als schwarze Balken (a und e) und deren Größe in Klammern über den Balken gegeben. (B) PCR-Analyse des Konstrukts. Anhand der Spurenbezeichnung können die PCR Produkte den theoretisch erwarteten PCR Produkten in (A) zugeordnet werden. M: Marker. (C) Kontrollverdau des Plasmids. K: Klon. (D) Genotypisierung der potentiellen *PMH2*-RNAi-Linien 1 bis 9 der T1-Generation. Als Kontrolle wurde eine Wildtyp-Pflanze (wt) parallel analysiert und das transformierte Plasmid (P) ebenfalls in die PCR-Analyse mit den Primern AtPMH2 GFP 2.3 und GW1 mit einbezogen.

Mit Hilfe der Agrobakterien wurde das Plasmid dann über floral dip in *A. thaliana pmh1-1* Pflanzen transformiert. Die von den transformierten Pflanzen erhaltenen Samen der ersten Generation (T1) wurden sterilisiert und auf MS-Selektionsplatten mit Hygromycin angezogen, um Pflanzen, die das Konstrukt enthalten, zu identifizieren. Die so erhaltenen Pflanzen wurden nach ca. drei Wochen auf Erde umgesetzt. Um die Integration der T-DNA in das Genom der Pflanzen nachzuweisen, wurde aus Blattmaterial dieser Pflanzen nach Edwards et al. (1991) Gesamt-DNA extrahiert und PCR-Analysen mit den Primer AtPMH2 GFP 2.3 und GW1 (Abbildung 4.9-A) durchgeführt. Für die Pflanzen 1, 3, 5, 6, 8 und 9 wurde die T-DNA nachgewiesen (Abbildung 4.9-D). Es wurden also sechs unabhängige *PMH2*-RNAi-Linien aus dieser Transformation etabliert.

4.3.2 Analyse des *PMH2*-Steady-State-Levels in transformierten Pflanzen

Nachdem Pflanzen mit dem RNAi-Konstrukt identifiziert worden waren, sollte überprüft werden, ob es aufgrund der Integration dieses Konstruktes zu einem RNA-Interferenz-Effekt für das *PMH2*-Transkript in diesen Pflanzen kommt.

Dazu wurde RNA aus Blüten der bereits getesteten Pflanzen isoliert und mit Hilfe des oligo(d)T Primers DTXSC und der M-MLV-Reverse Transkriptase RNaseH(-) Point Mutant (Promega) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR mit den Primern pmh2 RT 3' und pmh2 RT 5' mit dieser cDNA als Template durchgeführt. Dabei wurde für alle Pflanzen ein PCR-Produkt wie in einer parallel analysierten Wildtyp-Pflanze amplifiziert. Nur die PCR-Produkte der Pflanzen 6 und 9 erschienen etwas schwächer. Da eine solche PCR jedoch keine quantitativen Aussagen erlaubt, wurde eine quantitative Real-Time RT-PCR durchgeführt.

Um die beiden Pflanzen 6 und 9 näher zu untersuchen, wurden jeweils sechs Nachkommen (a bis f) dieser Pflanzen (T2-Generation) zusammen mit sechs Wildtyp- und sechs *pmh1-1*-Pflanzen angezogen und nach sechs Wochen die jüngsten Rosettenblätter und Blütenmaterial abgenommen. Aus dem Blattmaterial wurde nach Edwards et al. (1991) Gesamt-DNA extrahiert und mittels PCR-Analysen auf das RNAi-Konstrukt überprüft. In zwei Nachkommen der Linie 6 (Pflanzen 6c und 6e) und in einer Pflanze der Linie 9 (Pflanze 9f) wurde das Konstrukt im Genom nachgewiesen. Aus Rosettenblättern und aus Blüten der Pflanzen 6c, 6e, 9f, sowie aus einem Pool aus den Pflanzen 6a, b und d, welche das RNAi-Konstrukt nicht enthielten, und einem Pool aus den *pmh1-1* Pflanzen a, b und c einer nichttransformierten Linie wurde RNA isoliert. Die RNA wurde wie beschrieben in cDNA

umgeschrieben und davon jeweils 0,5 µl pro Ansatz in die Real-Time PCR mit den Primern pmh2qPCR_2H und pmh2qPCR_2R eingesetzt. Die Pflanzen 6 abd dienen in der Auswertung in einer relativen Quantifizierung als Kalibrator, dessen *PMH2*-Transkriptmenge demzufolge auf 100 % gesetzt wurde.

Probe	Pflanze	Zielgen	Referenzgene	<i>PMH2</i> -Transkriptmenge
Blatt	6 abd	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	100 %
	6 c	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	39,0 (± 8,0) %
	6 e	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	48,6 (± 10,0) %
	9 f	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	53,9 (± 9,0) %
	pmh1-1 abc	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	118,1 (± 19,0) %
Blüte	6 abd	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	100 %
	6 c	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	72,0 (± 6,0) %
	6 e	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	73,0 (± 6,0) %
	9 f	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	91,0 (± 5,0) %
	pmh1-1 abc	<i>PMH2</i>	<i>UBC9/PP2A</i>	117,0 (± 11,0) %

Tabelle 4.6: Real-Time PCR-Analyse der *PMH2*-Transkripte in *T₂-PMH2-RNAi*-Pflanzen. Dargestellt ist die Menge des *PMH2*-Transkripts in den Blättern und Blüten der *PMH2*-RNAi-Pflanzen 6c, 6e und 9f der zweiten Generation im Vergleich zu einem Pool aus drei Pflanzen derselben Linie, die das Konstrukt nicht enthalten. Zusätzlich wurde ein Pool aus *pmh1-1* Pflanzen einer nichttransformierten Linie parallel untersucht.

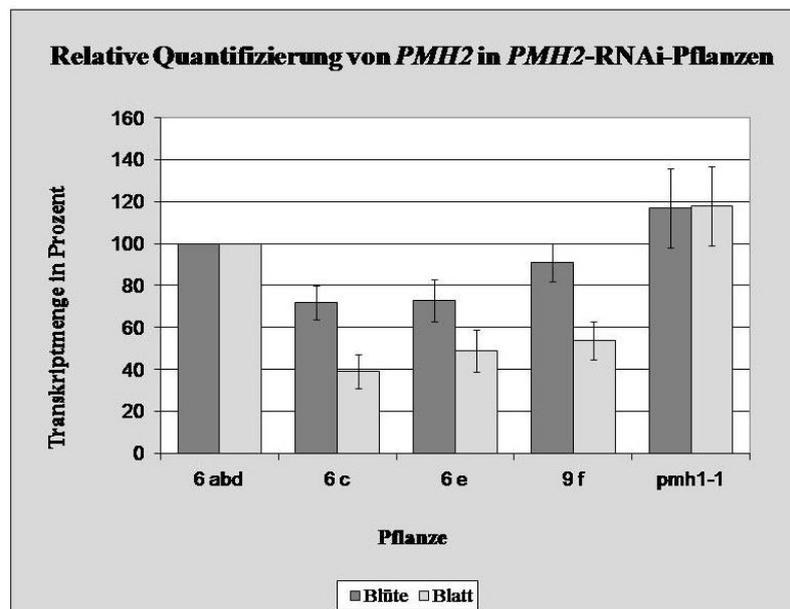


Abbildung 4.12: Relative *PMH2*-Transkriptmengen in den *PMH2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu *pmh1-1*-Pflanzen. Die Transkriptmenge des Pools aus drei Pflanzen der Linie 6 (6a, 6b und 6d), die das RNAi-Konstrukt nicht enthalten, wurde auf 100 % gesetzt. Die *PMH2*-Transkriptmengen der RNAi-Pflanzen 6c, 6e und 9f und des Pools aus normalen *pmh1-1*-Pflanzen sind relativ dazu dargestellt. Die Standardabweichungen sind als schwarze Fehlerbalken angegeben.

In den Blüten der untersuchten Pflanzen wurde nur eine geringe Reduktion der *PMH2*-Transkriptmenge um ca. 25 % für die Pflanzen 6 c und 6 e und keine Reduktion in der Pflanze 9 f beobachtet. In den Blättern der untersuchten Pflanzen wurde eine stärkere Reduktion der *PMH2*-Transkriptmenge auf 39 % (6 c), 49 % (6 e) und 54 % (9 f) gemessen.

Alle drei Pflanzen zeigten während des gesamten Wachstumszyklus auf Erde keine Veränderungen im sichtbaren Phänotyp im Vergleich zu den *pmh1-1*-Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Die Reduktion der *PMH2*-Transkriptmenge reicht für die Ausbildung eines möglichen sichtbaren Phänotyps vermutlich nicht aus.

5 Diskussion

DEAD-Box-Proteine bilden eine große Familie von RNA-bindenden Proteinen mit ATPase- und RNA-abhängiger Helikase-Aktivität, die in nahezu allen Organismen aus allen Reichen des Lebens vorkommen. Sie sind an allen Prozessen des RNA-Metabolismus beteiligt (Cordin et al., 2006, Linder, 2006). Über DEAD-Box-Proteine und ihre Funktionen in den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* war bisher noch nichts bekannt. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden vier dieser Proteine in den Mitochondrien von *A. thaliana* identifiziert und ihre Expression zum Teil charakterisiert. Die beiden sehr ähnlichen Proteine PMH1 und/oder PMH2 wurden darüberhinaus in RNA-abhängigen hochmolekularen Protein-Komplexen identifiziert (Matthes et al., 2007, Schmidt-Gattung, Dissertation, 2005). Um Hinweise auf die Funktionen der beiden Proteine zu bekommen, wurden in dieser Arbeit diese Komplexe jetzt weiter charakterisiert. Weiterhin wurden für das *PMH2* Gen T-DNA-Insertionsmutanten etabliert. Mit diesen Mutanten und der bereits etablierten *PMH1*-Mutante sollten für beide Proteine *in vivo* Funktion(en) identifiziert und charakterisiert werden.

5.1 PMH2 liegt in deutlich größeren Mengen in den Mitochondrien vor als PMH1

Für die Detektion der beiden Proteine PMH1 und PMH2 wurde ein Antikörper hergestellt (Matthes et al., 2007). Da die beiden für die Immunisierung verwendeten Peptide in beiden Proteinen nahezu identisch sind, konnte in Immunodetektionsanalysen mit Proteinlysaten aus Wildtyp-Mitochondrien nicht zwischen beiden Proteinen unterschieden werden. Durch die Etablierung der T-DNA-Insertionsmutanten war nun die Möglichkeit gegeben, durch Betrachtung der einzelnen Proteine durch Immunodetektion das Mengenverhältnis beider Proteine zueinander zu bestimmen. Dazu wurden Zellsuspensionskulturen der *pmh1-1*- und der *pmh2-1*-Mutanten angelegt, die der Isolierung von Mitochondrien dienen. Ein Immunodetektionsexperiment mit mitochondrialem Proteinlysate aus der *pmh1-1*-Mutante erlaubte die spezifische Detektion des PMH2-Proteins anhand eines deutlichen Signals, das einem Protein in der erwarteten Größe von ca. 60 kDa entspricht. In der *pmh2-1*-Mutante, die nur das PMH1-Protein exprimiert, wurde dagegen nur ein sehr schwaches Signal beobachtet (Abbildung 4.4-A, Spuren 1, 4 und 7, Pfeil). PMH2 liegt also in deutlich größeren Mengen im Mitochondrium vor. Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit den Ergebnissen der Expressionsstudien überein (Matthes et al., 2007).

Zusätzlich wurde ein Signal für ein etwas größeres Protein von ca. 65 kDa detektiert. Ein solches Signal wurde bereits in früheren Untersuchungen von aus Wildtyp-Kultur isoliertem mitochondrialem Protein beobachtet. Es wurde vermutet, dass es sich bei diesen beiden Banden um PMH1 und PMH2 handeln könnte, die getrennt voneinander laufen, oder um modifiziertes PMH-Protein dessen Laufverhalten geändert ist. Da dieses Protein jedoch in beiden Mutanten unverändert in gleichen Mengen auftritt, kann ausgeschlossen werden, dass es sich um PMH1 oder PMH2 handelt. Daraus folgt, dass der Antikörper sehr wahrscheinlich in einer Kreuzreaktion ein anderes Protein detektiert.

Das Verhältnis der Proteinmenge von PMH1 zu PMH2 stellt sich auch im Gesamtproteom von *A. thaliana* ähnlich wie im mitochondrialen Proteom dar. In einer Immunodetektionsanalyse wurden aufgrund des geringen Anteils an PMH-Protein im Gesamtproteom der Pflanze nur sehr schwache Signale im Vergleich zu Signalen aus Kreuzreaktionen des PMH1/2-Antikörpers detektiert. In der *pmh2-1*-Mutante wurde kein Signal in der entsprechenden Größe eines PMH-Proteins beobachtet (Abbildung 4.5). Das PMH2-Protein dominiert also auch im Gesamtproteinlysate grüner Pflanzen. Eine Verschiebung dieses Verhältnisses zu PMH1 wäre möglich gewesen, wenn eine größere Menge des PMH1-Proteins in einem weiteren Zellkompartiment lokalisiert wäre.

In einer früheren Studie wurde allerdings nur das PMH2-Protein zusätzlich zu der mitochondrialen Lokalisation in der Nucleoli-Fraktion identifiziert (Pendle et al., 2005). Dual Targeting ist ein noch wenig untersuchtes aber offensichtlich recht häufiges Phänomen. So sind bereits 42 Proteine in *A. thaliana* bekannt, die sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten lokalisiert sind. Sechs weitere Proteine sind gleichzeitig in Mitochondrien und Peroxisomen und ein Protein in Mitochondrien und dem Kern lokalisiert (Carrie et al., 2009). Um weitere Lokalisationen des PMH1- und des PMH2-Proteins zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die vollständigen Leseraster der *PMH1*- bzw. *PMH2*-cDNAs N-terminal an das Leseraster des GFP-Gens fusioniert. Aber weder nach transienter Transformation dieser Konstrukte in Tabak-Protoplasten, noch nach stabiler Transformation in *A. thaliana* Pflanzen wurde eine GFP-Fluoreszenz in einem der Zellkompartimente beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise wurden keine Hinweise auf eine weitere Lokalisation der beiden Proteine erhalten. Folglich konnten keine weiteren Lokalisationen für die beiden Proteine nachgewiesen werden.

5.2 PMH1 und PMH2 sind Komponenten hochmolekularer Protein-Komplexe

In früheren Untersuchungen wurden PMH1 und/oder PMH2 mittels BN-PAGE und Immunodetektionsanalysen in hochmolekularen Protein-Komplexen identifiziert. Dabei wurden Signale von Protein-Komplexen mit Größen von < 100 kDa bis > 1500 kDa beobachtet. Die Signale, die Proteine kleiner als 100 kDa anzeigen, repräsentieren vermutlich monomeres PMH1- und/oder PMH2-Protein (Matthes et al., 2007). Die Verteilung der Signale über den gesamten Größenbereich von < 100 kDa bis > 1500 kDa lässt vermuten, dass für PMH1/2 Komplexe mit variabler Assoziation einer Mehrzahl von Komponenten vorliegen. Es ist sicher, dass RNA ein Bestandteil dieser Komplexe ist, da eine RNase-Behandlung des Proteinlysates vor der BN-PAGE Analyse die Dissoziation der Komplexe oder zumindest ein Herauslösen der PMH-Proteine aus den Komplexen bewirkt. Die Größe der Komplexe deutet an, dass darin neben den PMH-DEAD-Box-Proteinen weitere Polypeptide gefunden werden. Das wird auch durch die Zusammensetzung von Komplexen mit anderen DEAD-Box-Proteinen wie zum Beispiel eIF4A oder Dhh1p unterstützt (Schütz, et al., 2008, Coller et al., 2001). Die genaue Zusammensetzung der mitochondrialen PMH-Komplexe ist bislang unklar (Matthes et al., 2007).

Die Untersuchung von mitochondrialem Proteinlysate aus *pmh1-1*-, *pmh2-1*- und Wildtyp-Zellsuspensionskulturen nach Aufschluss der Mitochondrien mit 2 % Detergenz über Saccharose-Dichte-Gradienten bestätigte mit einer unabhängigen Methode das Auftreten der PMH-Komplexe. Die Detektion der PMH-Proteine in den Fraktionen 1-5 (*pmh2-1*) bzw. 1-6 (*pmh1-1* und Wildtyp) der Saccharose-Gradienten zeigen, dass offensichtlich beide Proteine in hochmolekularen Protein-Komplexen auftreten. Allerdings ist PMH1 nur in sehr geringen Mengen nachweisbar (Abbildung 4.6).

Die kontinuierliche Verteilung der Proteine über die Fraktionen 1 bis 6 der Gradienten steht dabei im Einklang mit der kontinuierlichen Verteilung der Signale über den Größenbereich von ca. 100 kDa bis 1500 kDa in der BN-PAGE-Analyse.

Die Verteilung der Signale kann dabei verschiedene bedeuten. So könnten die unterschiedlichen Signale verschiedene Intermediate im Aufbau eines Komplexes bis zur funktionellen Einheit repräsentieren. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da Intermediate in der Regel nicht in der gleichen Konzentration auftreten wie reife Komplexe, wie die konstante Intensität der Signale über den gesamten Größenbereich indizieren würde.

Wahrscheinlicher ist das Auftreten einer größeren Anzahl verschiedener Komplexe mit einer variablen Zusammensetzung. In der Funktion eines RNA-Chaperons können einige DEAD-

Box-Proteine wie zum Beispiel Cyt19 aus *Neurospora crassa* zum Teil unspezifisch an eine Vielzahl von RNA-Spezies binden (Jankowsky, 2007, Bhaskaran und Russel, 2007). Für PMH2 wurde gefunden, dass es die Steady-State Level verschiedener mitochondrialer mRNAs beeinflusst (Abbildung 4.8), diese also vermutlich auch bindet. Vermutet wird, dass RNAs durch die Umstrukturierung von RNA-Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Chaperone aus kinetisch stabilen, jedoch unfunktionellen Formen in ihre reaktive Form gebracht werden. Dadurch werden sie für verschiedene posttranskriptionale Schritte von der Prozessierung bis zur Degradation zugänglich gemacht (Herschlag, 1995). Als RNA-Chaperon, das möglicherweise an verschiedene mRNAs bindet, könnte PMH2 so eine Vielzahl verschiedener Komplexe bilden. Dies würde die Vielzahl der detektierten Signale in der BN-PAGE und den Saccharose-Gradienten-Analysen erklären. Unter Kälteeinwirkung werden vermehrt RNA-Moleküle falsch gefaltet (Sosnick und Pan, 2002). Dadurch wird eine größere Menge oder eine stabilere Bindung von Chaperonen an diese RNA und die daran gebundenen Komplexe benötigt, um aktive Strukturen zu stabilisieren. Das würde die Stabilisierung und die Verschiebung zu noch größeren Signalen in der BN-PAGE nach Behandlung mit Kälte erklären (Matthes et al., 2007).

Eine andere Erklärung für die vielen Signale wäre die Degradation des Komplexes unter den gewählten Versuchsbedingungen. Dagegen spricht, dass sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in der BN-PAGE und dem Saccharose-Gradienten reproduzierbar vergleichbare Ergebnisse zeigen.

Eine weitere Erklärung wäre das Auftreten der zahlreichen Signale aufgrund von Aggregation der PMH-Proteine unter den gewählten Versuchsbedingungen. Dagegen spricht, dass die Zugabe von Kaliumchlorid unter ansonsten gleichen Solubilisierungsbedingungen die beobachteten Komplexe zerstört oder zumindest PMH2 von diesen Komplexen dissoziiert und die PMH-Proteine dann nur noch in den Fraktionen 1 bis 3 der Saccharose-Gradienten zu finden sind. Darüberhinaus, lassen sich die Komplexe auch durch einen RNase-Verdau zerlegen, was für Proteinaggregate nicht der Fall sein sollte.

Ein Beispiel für große RNA-abhängige Komplexe sind Ribosomen bzw. die während der Translation an einem Transkript gebildeten Polysomen. Eine Vielzahl von DEAD-Box-Proteinen sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt (Cordin et al., 2006, Rocak et al., 2005). Auch für eine Funktion von DEAD-Box RNA-Helikasen in der Translationsinitiation sind bereits Beispiele bekannt, wie zum Beispiel der Translationsinitiationsfaktor eIF4A im Komplex mit eIF4B oder Ded1p aus *S. cerevisiae* (Iost et al., 1999). Um eine mögliche

Assoziation der PMH1/2-Proteine an Ribosomen oder Polysomen zu untersuchen, wurde vergleichend die Verteilung der ribosomalen RNAs -repräsentativ für die Ribosomen bzw. Polysomen- und der beiden Proteine über die Fraktionen der Saccharose-Gradienten betrachtet. Die ribosomalen RNAs wurden hauptsächlich in den Fraktionen 3 bis 5 beobachtet, während die PMH-Proteine in größerer Menge in Fraktion 2 und 3 und in geringeren Mengen bis in die Fraktion 7 zu beobachten waren (Abbildung 4.1-A). Nach der Behandlung des mitochondrialen Lysats mit Kaliumchlorid waren die PMH1/2-Proteine allerdings nur noch in den Fraktionen 1 und 2 des Gradienten zu finden. Die ribosomalen RNAs zeigten dagegen ein unverändertes Verteilungsmuster im Gradienten im Vergleich zu dem mitochondrialen Lysat ohne Kaliumchlorid Behandlung. Die Verteilung der rRNAs und der beiden Proteine auf dem Gradienten ist also so verschieden, sodass eine Integration in oder eine stabile Assoziation der PMH-Proteine mit Ribosomen bzw. Polysomen nicht angenommen werden kann. Eine schwache, vorübergehende Interaktion mit Ribosomen oder Polysomen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Über die Identität der beobachteten hochmolekularen Komplexe und eventueller weiterer Untereinheiten dieser Komplexe kann mit Hilfe der gesammelten Daten bisher keine Aussage getroffen werden.

5.3 PMH1 und PMH2 werden in mitochondrialen Membran-Fraktionen detektiert

Die Untersuchung der submitochondrialen Lokalisation der beiden PMH-Proteine hat gezeigt, dass PMH1 und PMH2 unter den gewählten Bedingungen in einer Ultrazentrifugation zusammen mit Membranen sedimentieren und nur zu geringen Mengen in der Matrix-Fraktion detektiert werden (Abbildung 4.2 A und B, 4.4). Dies deutet auf eine Assoziation der PMH-Proteine oder ihrer Komplexe an die innere mitochondriale Membran oder eine Integration darin hin.

PMH1 und PMH2 haben zu einem Anteil von 63 % hydrophile Aminosäuren und einen GRAVY (Grand average of hydropathy) von -0,266 bzw. -0,315. Beide Proteine weisen keine Transmembrandomänen auf und scheinen somit lösliche Proteine zu sein (<http://au.expasy.org/tools/protparam>). Damit können beide Proteine nicht eigenständig in die Membran integriert sein. Demzufolge müssten andere Proteine im Komplex mit den PMH-Proteinen an der Bindung an oder die Integration in die Membran beteiligt sein.

Verschiedene Versuche die PMH1/2-Proteine mit DNase, RNase, EDTA, den Salzen Magnesiumchlorid, Natriumchlorid und Kaliumchlorid in verschiedenen Konzentrationen,

Natriumcarbonat pH11 und den nichtionischen Detergenzien n-Dodecyl- β -D-maltosid und TritonX-100 in verschiedenen Konzentrationen bis zu 2 % aus der Membran zu lösen waren alle negativ. Die Proteine wurden immer in der verbleibenden unlöslichen Fraktion detektiert (Matthes Diplomarbeit, 2006). Das lässt zwei Möglichkeiten zur Interpretation. Zum einen könnte das Protein über die Komplexe, an die es assoziiert, sehr stabil in die Membran integriert sein. Es erscheint zum anderen allerdings sehr unwahrscheinlich, dass die beiden PMH-Proteine unter allen gewählten Bedingungen stabil in der Membran integriert bleiben insbesondere, da nach Zugabe von bis zu 2 % Detergenz die Membranen nahezu aufgelöst sein sollten. Das spricht für die Bildung großer Aggregate der Proteine unter den gewählten Versuchsbedingungen, die im Laufe der Zentrifugation parallel zu den Membranen sedimentieren. Da dies auch bei Verwendung der Detergenzien der Fall war, müsste die Aggregation bereits während der Fraktionierung der Mitochondrien in Matrix und Membran-Fraktion stattgefunden haben. Im Gegensatz zu den Untersuchungen zu PMH-Komplexen mit mitochondrialem Gesamtprotein erfolgte der Aufschluss der Mitochondrien vor der Fraktionierung durch Ultraschall in ACA-750 Puffer ohne den Zusatz von Detergenz oder Salzen. Es ist möglich, dass es unter diesen Bedingungen zu einer Aggregation der Proteine bzw. ihrer Komplexe kommt. Sollten zumindest die Komplexe an denen PMH2 beteiligt ist mit der Membran in Verbindung stehen, so müsste zumindest ein Teil dieser Komplexe hydrophobe Domänen aufweisen, die unter Umständen zu einer Aggregation nach Ultraschall-Aufschluss der Mitochondrien ohne Detergenz beitragen. Es ist denkbar, dass sich diese Aggregate auch mit nachfolgendem Zusatz von Detergenz nicht mehr lösen lassen und während der Zentrifugation sedimentieren.

In der isolierten Matrix-Fraktion wurde immer noch ein Teil der PMH-Proteine detektiert. Dabei könnte es sich um das monomere Protein handeln, das aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften in Lösung bleibt.

Die Analyse der durch Ultraschall-Aufschluss ohne Detergenz gewonnenen mitochondrialen Matrix- und Membran-Fractionen einer Wildtyp-Kultur über BN-PAGE und Saccharose-Dichte-Gradienten ergab, dass das hauptsächlich detektierte PMH2 zwar in der Matrix detektiert wird, hierbei jedoch hauptsächlich als Einzelprotein und in kleineren Komplexen/Aggregaten (Abbildung 4.2 C und F). In der Membran-Fraktion wurde dieses Protein in den Fraktionen 1 bis 6 des Saccharose-Gradienten und in der BN-PAGE-Analyse in Komplexen/Aggregaten bis über 1000 kDa detektiert. Dies stimmt mit den Beobachtungen für die PMH-Protein-Komplexe in mitochondrialem Gesamtprotein aus einem Aufschluss mit Detergenz überein. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich an dieser

Stelle allein um große Protein-Komplexe handelt oder welchen Anteil während des Versuchsablaufes eventuell gebildete Protein-Aggregate haben. Dazu müssten weitere Versuche zum Beispiel mit einer RNase- oder Kaliumchlorid-Behandlung der Fraktionen durchgeführt werden. Auch die Membranständigkeit der PMH-Proteine oder ihrer Komplexe ist bisher nicht zweifelsfrei geklärt.

5.4 Die Funktion der RNA-Helikase PMH2 im mitochondrialen RNA-Metabolismus von *A. thaliana*

Für alle Bereiche des RNA-Metabolismus sind Vertreter der Familie der DEAD-Box-Proteine mit verschiedenen Funktionen nachgewiesen worden (Cordin et al., 2006, Linder, 2006).

Mit der Etablierung der T-DNA Insertionsmutanten (Abbildung 4.3) im Rahmen dieser Arbeit war jetzt die Möglichkeit gegeben, über eventuelle makroskopische und molekulare Phänotypen speziell nach Funktionen des PMH2-Proteins im RNA-Metabolismus der Mitochondrien von *A. thaliana* zu suchen.

In detaillierten Wachstumsversuchen auf MS-Medium sowie Erde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurden keine Veränderungen in der Entwicklung oder dem Habitus der *pmh2-1*-Mutanten-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass PMH2 keine bedeutende Funktion für die Entwicklung oder die Morphologie der Pflanzen hat.

5.4.1 PMH2 beeinflusst die Steady-State-Level reifer mitochondrialer mRNAs

Auf molekularer Ebene wurde für die *pmh2-1*- und *pmh2-2*-Mutanten dagegen ein Phänotyp beobachtet. Die gesammelten Daten legen dabei eine eher assistierende Funktion von PMH2 als RNA-Chaperon nahe. Es wurde bereits vermutet, dass DEAD-Box-Proteine Reaktionen im RNA-Metabolismus nicht nur direkt über ihre Entwindungsaktivität katalysieren, sondern häufig auch indirekt als RNA-Chaperon fungieren. Dabei lösen sie kinetisch stabile aber nicht-funktionelle RNA-Konformationen (kinetische Fallen) auf und ermöglichen so eine korrekte Faltung einer RNA-Spezies in ihre reaktive Form (Rajkowitsch et al., 2007). Bei einer solchen Funktion würde ein Ausfall des Proteins für den RNA-Metabolismus bedeuten, dass nur durch Zufall korrekt gefaltete RNA-Moleküle die Reifung durchlaufen und für die anschließende Translation zur Verfügung stehen. Wird ein Teil der RNA-Moleküle auch ohne

Chaperon korrekt gefaltet, würde das keinen vollständigen Verlust der Translationsprodukte der entsprechenden RNAs bedeuten und möglicherweise nur einen schwachen Phänotyp hervorrufen. So werden in den *pmh2*-Mutanten für verschiedene mitochondriale mRNAs wie zum Beispiel *nad2*, *nad4*, *nad7*, und *nad9* reduzierte Steady-State-Level reifer Transkripte beobachtet, ohne dass eines dieser Transkripte völlig fehlt (Abbildung 4.8-C). Dies macht eine direkte spezifische Funktion in der Reifung der mRNAs dieser Gene unwahrscheinlich und lässt eine Funktion als Chaperon wahrscheinlich erscheinen.

PMH2 scheint weiterhin aufgrund der Mehrzahl der betroffenen mRNAs eher mit geringer Spezifität zu agieren. Ein genereller Einfluss auf die Transkripte aller mitochondrialen Gene kann allerdings ausgeschlossen werden, da für die mRNA des *atp8*-Gens vergleichbare Mengen in Wildtyp und Mutanten detektiert wurden (Abbildung 4.8-C).

Bei genauerer Untersuchung der Transkripte wurde festgestellt, dass das Splicing einiger mitochondrialer Gruppe II Introns reduziert ist. So wurde für das *nad2*-Transkript (Abbildung 4.8-B, oberen beiden Bilder) für zwei der „*cis*-splicing“-Introns eine reduzierte Menge an gespleißter mRNA und eine erhöhte Menge an ungespleißten RNA-Molekülen detektiert. Auch für weitere Introns wurde eine Reduktion in der Splicing-Effizienz beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein genereller Einfluss auf die Splicing-Effizienz mitochondrialer Introns muss allerdings ausgeschlossen werden, da einige Introns unverändert effizient gespleißt werden (Daten nicht gezeigt). Da mit der Reduktion des Steady-State-Level der *nad9* mRNA auch ein Transkript betroffen ist, dessen Gen kein Intron enthält und somit auch nicht gespleißt wird, scheint das PMH2-Protein weitere Schritte der Reifung der mRNAs zu beeinflussen.

Um zu überprüfen, ob PMH2 einen Einfluss auf die Reifung der Enden mitochondrialer mRNAs hat, wurden die 5'- bzw. 3'-Enden der Transkripte aller mitochondrialen Protein kodierenden Gene betrachtet. Doch es wurden keine vom Wildtyp abweichenden Enden in der *pmh2-1*-Mutante detektiert (Daten nicht gezeigt). Auch auf das Auftreten und die Effizienz des Editings im *nad2*-Transkript konnte kein Einfluss beobachtet werden. PMH2 spielt also auch in diesem Prozess keine generelle Rolle. Da allerdings nur ein Teil der Editing-Stellen und nur ein Transkript betrachtet wurde, kann ein Einfluss auf einzelne Editing-Stellen nicht ausgeschlossen werden.

Eine bedeutende Rolle von PMH2 in der Transkription erscheint ebenfalls unwahrscheinlich. So wurden in einer RT-PCR auf das Exon d des *nad2*-Transkripts, welche sowohl reife als auch pri-mRNAs amplifiziert, gleiche Mengen an *nad2*-Transkript detektiert. Weiterhin wurde in den Northern-Blot-Analysen gegenüber der Reduktion reifer Transkripte ein Anstieg

längerer Transkripte beobachtet, die vermutlich Precursor-Moleküle der reifen mRNAs darstellen. Die Gesamtmenge an *nad2*-Transkript erscheint also unbeeinflusst.

Das PMH2-Protein zeigt also eher einen Einfluss auf posttranskriptionale Prozesse als auf die Transkription. Es hat aber keinen generellen Einfluss auf alle Schritte der Reifung mitochondrialer mRNA-Transkripte. Ein Einfluss auf das Spleißen einiger Introns konnte gezeigt werden, aber die genaue Funktion des PMH2-Proteins in diesem Prozess bleibt unklar. In welcher Weise die Reifung des *nad9*-Transkripts durch PMH2 beeinflusst wird, konnte noch nicht gezeigt werden.

5.4.2 Das Steady-State-Level des Atmungskettenkomplex I ist in der *pmh2-1*-Mutante unbeeinflusst

Die mitochondrialen *nad*-Gene kodieren für Untereinheiten des Atmungskettenkomplexes I. Nachdem für die Transkripte der *nad2*-, *nad4*-, *nad7*- und *nad9*- Gene eine Reduktion der Steady-State Mengen der mRNAs detektiert wurde, sollte überprüft werden, ob dies eine Auswirkung auf die Menge der mitochondrial kodierten Proteine oder die Zusammensetzung des Atmungskettenkomplexes I hat. Für eine BN-PAGE zur Darstellung der Atmungskettenkomplexe wurde Proteinlysate aus Mitochondrien einer *pmh2-1*-Zellsuspensionskultur verwendet, da nur auf diese Weise genügend reine Mitochondrien für eine solche Analyse gewonnen werden können. Eine Wiederholung der PCR-Analysen für das *nad2*-Transkript mit RNA aus Mitochondrien dieser Zellsuspensionskultur (analog zu 4.2.5.1) zeigte allerdings nur eine schwache Reduktion der Transkripte in den Mitochondrien dieser Zellkultur an (Daten nicht gezeigt). Die BN-PAGE zeigte entsprechend auch keinen detektierbaren Unterschied in der Menge an Komplex I und keinen Unterschied in der Untereinheitenzusammensetzung des Komplexes im Vergleich zu Mitochondrien aus einer parallel angezogenen Wildtyp-Zellsuspensionskultur. Es kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, welche Auswirkung der PMH2-Knockout auf die Assemblierung und die Zusammensetzung des Komplex I in früheren Entwicklungsstadien der Pflanze hat. Eine Reduktion des Komplex I muss nicht in jedem Fall zu einem sichtbaren Phänotyp der Pflanzen führen. Für eine T-DNA-Insertionsmutante einer kernkodierten Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Δ At1g47260) in *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass der Knockout des Gens zu einer Reduktion des Komplexes um 80 % führt, ohne dass die Pflanzen unter Standardanzuchtbedingungen einen sichtbaren Phänotyp ausbilden (Perales et al., 2005). Daher ist es möglich, dass in keimenden Samen und Keimlingen, in denen auf RNA-Ebene

eine Reduktion in den Steady-State-Transkript-Leveln von Komplex I-Untereinheiten beobachtet wurde, auch auf Protein-Ebene eine Reduktion des Komplexes I vorliegt, auch wenn die *pmh2-1*-Pflanzen keinen sichtbaren Phänotyp aufweisen.

5.5 Die biologische Bedeutung der RNA Helikase PMH1 für die Pflanze

Im Rahmen der Dissertation von S. Schmidt-Gattung (2006) wurde eine *pmh1-1*-T-DNA-Insertionslinie etabliert und der Knockout des *PMH1*-Gens für homozygote Pflanzen mit diesem Allel nachgewiesen. Im Gegensatz zu *pmh2-1*-Mutanten zeigten *pmh1-1*-Mutanten einen Phänotyp während der Entwicklung der Pflanzen. Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen war ein verlangsamtes Wurzelwachstum und eine Verzögerung in der Entwicklung der Mutanten-Pflanzen bereits bei Pflanzen, die konstant bei 21 °C angezogenen wurden, zu erkennen. Durch eine Kultivierung bei 4 °C während der Dunkelperiode wurde diese verzögerte Entwicklung weiter verstärkt. Diese Beobachtungen stimmen mit den früher durchgeführten Expressionsstudien, nach denen *PMH1* vor allem in Wurzeln und Blüten exprimiert und durch die Behandlung mit Kälte stark induziert wird, überein (Matthes et al., 2007, Kim et al., 2008). Abgesehen vom verzögerten Wurzelwachstum war der beobachtete Phänotyp insgesamt sehr schwach ausgeprägt und nur im direkten Vergleich mit parallel angezogenen Wildtyp-Pflanzen zu beobachten. *PMH1* hat also keine essentielle Bedeutung für die Entwicklung der Pflanze oder ihre Stressantwort auf Kälte, auch wenn das Protein die Entwicklung der Pflanze zumindest zu beeinflussen scheint. Auf molekularer Ebene wurde bisher kein Phänotyp für die *pmh1-1*-Pflanzen gefunden. So scheint *PMH1* keinen Einfluss auf die Bildung der reifen 3'- bzw. 5'-Enden mitochondrialer mRNAs und das Spleißen der mitochondrialen Gruppe II Introns zu haben. Die Steady-State-Level reifer *nad2-*, *nad4-*, *nad7-*, *nad9-* und *atp8*-Transkripte sind unbeeinflusst. Damit wurde jedoch für die *pmh1-1*- wie auch die *pmh2*-Mutanten bisher nur ein kleiner Teil der möglichen Prozesse im RNA-Metabolismus, an denen DEAD-Box-Proteine beteiligt sein können, untersucht (Cordin et al., 2006, Linder, 2006). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass *PMH1* am RNA-Metabolismus in den Mitochondrien beteiligt ist, da das Protein in diesem Organell nachgewiesen wurde (Matthes et al., 2007). Außerdem wurde gefunden, dass das *PMH1*-Protein *in vitro* ssDNA, dsDNA und zumindest RNA-Homopolymere bindet (Kim et al., 2008). Aufgrund der hier gesammelten Daten kann nicht festgestellt werden, auf welche Weise *PMH1* im RNA-Metabolismus der Mitochondrien von *A. thaliana* wirkt oder wie es an der Kälteakklimatisierung beteiligt sein könnte. Dafür müssten in den *pmh1-1*-Mutanten weitere

Prozesse des RNA-Metabolismus näher untersucht werden.

Da die PMH1-Helikase für das Überleben der Pflanze nicht essentiell ist, ist es unwahrscheinlich, dass das Protein eine bedeutende Funktion im mitochondrialen RNA-Metabolismus hat. Allerdings könnte die Funktion von PMH1 durch andere RNA-bindende Proteine zumindest teilweise ersetzt werden. Dies wird zum Beispiel für die beiden DEAD-Box-Proteine p68 und p72/p82 in der Ribosomen-Biogenese angenommen (Jalal et al., 2007). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von PMH1 und PMH2 mit einer nahezu identischen Kernregion, welche die konservierten Motive enthält, könnte PMH2 PMH1 funktionell ersetzen und umgekehrt (Matthes et al., 2007). PMH1 und PMH2 zeigen jedoch voneinander abweichende Expressionsmuster und beide Proteine liegen in deutlich unterschiedlichen Mengen in der Zelle vor (Abschnitt 4.2.2). Außerdem wurde für die *pmh2-1*- und *pmh2-2*-Mutanten auf molekularer Ebene ein Phänotyp beobachtet, der für die *pmh1-1*-Mutanten nicht auftrat. Auf makroskopischer Ebene dagegen trat der *pmh1-1*-Phänotyp bei den *pmh2*-Mutanten nicht auf. Es scheint also unwahrscheinlich, dass beide Proteine in ihrer Funktion redundant sind, auch wenn dies nicht ausgeschlossen werden kann.

5.6 PMH2-RNAi-Pflanzen mit einem *pmh1-1* Hintergrund zeigen keinen veränderten Phänotyp

Da eine Redundanz der beiden PMH-Proteine in ihrer Funktion zwar unwahrscheinlich erscheint, jedoch eine zumindest teilweise Überlappung der Funktionen der beiden Proteine nicht ausgeschlossen werden kann, sollten Pflanzen mit einem Funktionsverlust beider Proteine untersucht werden.

Im Allgemeinen wird zur Feststellung, ob eine Redundanz in der Funktion von zwei Proteinen vorliegt eine Doppel-Knockout-Mutante durch Kreuzung von zwei Einzelmutanten erzeugt und charakterisiert. Da eine Doppelmutante aufgrund der benachbarten Lage der beiden Gene nur schwer zu isolieren ist, wurde versucht, die Expression von PMH2 in der *pmh1-1*-Knockout-Mutante durch RNA-Interferenz zu reduzieren.

Bereits in früheren Studien zur Effektivität des Posttranskriptionalen Gene Silencing durch RNA-Interferenz wurde dokumentiert, dass stark exprimierte Gene eine stärkere Reduktion des Target-Transkript-Levels in *Arabidopsis* zeigen als schwach exprimierte Gene (Kerschen et al., 2004). Aus diesem Grund wurde ein RNAi-Konstrukt zum Silencing des höher exprimierten *PMH2*-Gens (Matthes et al., 2007, Abschnitt 5.1) in *pmh1-1*-Mutanten

transformiert. Danach wurden in der ersten Generation sechs Linien mit dem Konstrukt selektioniert (Abbildung 4.9-D). Allerdings zeigten nur zwei dieser Linien einen Silencing-Effekt. Es wurde nicht überprüft, ob in den Pflanzen ohne RNAi-Effekt eine Expression des Konstruktes stattfand. Der Integrationsort eines Transgens im Genom kann aufgrund der Struktur und verschiedener Modifikationen des Chromatins der angrenzenden DNA-Sequenzen einen Einfluss auf die Stärke der Expression des Transgens haben. Eine Integration in einen inaktiven Bereich des Genoms könnte eine Erklärung für den fehlenden RNAi-Effekt in den vier Linien liefern. Der Integrationsort wurde für das übertragene Konstrukt in den erhaltenen Linien allerdings nicht betrachtet. Im folgenden wurden die beiden Linien mit RNAi-Effekt (Linie 6 und 9) näher analysiert.

Für eine exakte quantitative Analyse des RNAi-Effektes wurden Nachkommen der beiden Linien 6 und 9 mittels Real-Time RT-PCR analysiert. Dabei wurde eine maximale Reduktion der *PMH2*-Transkriptmenge auf 40 % beobachtet. Da in einem anschließenden Versuch gefunden wurde, dass für Wildtyp und die beiden RNAi-Linien sowohl auf MS-Medium als auch auf Erde die gleichen Keimungseffizienzen auftraten, kann ein Einfluss auf die Samenkeimung durch RNAi-Effekte ausgeschlossen werden.

Der erzielte RNAi-Effekt reichte nicht aus, um zu einer phänotypischen Abweichung der RNAi-Pflanzen vom Wildtyp bzw. der *pmh1-1*-Mutante zu führen (Daten nicht gezeigt).

Es ist jedoch möglich, dass bei der Selektion der Samen der T1-Generation Pflanzen mit einer stärkeren Expression des Transgens und damit eventuell einem stärkeren RNAi-Effekt aussortiert wurden.

Mit den selektionierten RNAi-Linien konnten bisher keine Ergebnisse erzielt werden, welche zur weiteren Aufklärung der Funktionen der beiden putativen RNA-Helikasen 1 und 2 beitragen können.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Funktionen der beiden DEAD-Box-Proteine PMH1 und PMH2 im mitochondrialen RNA-Metabolismus von *A. thaliana* zu bestimmen. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Lokalisation der beiden Proteine in den Mitochondrien von *A. thaliana* bereits nachgewiesen. Expressionsanalysen ergaben, dass die beiden sehr ähnlichen Proteine (76 % identische Aminosäuren) in unterschiedlichen Teilen der Pflanze exprimiert werden. In Immunodetektionsanalysen wurden PMH1 und/oder PMH2 mit Hilfe eines Antikörpers, der Peptide beider Proteine erkennt, in hochmolekularen Protein-Komplexen detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Existenz dieser Komplexe mittels Saccharose-Dichte-Gradienten Analysen bestätigt. Die Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten ergab übereinstimmend zu den vorliegenden Expressionsanalysen, dass PMH2 das deutlich stärker exprimierte Protein ist. Beide Proteine liegen in hochmolekularen Protein-Komplexen vor. Zudem wurde gezeigt, dass diese Komplexe durch Behandlung mit Kaliumchlorid dissoziiert bzw. die PMH-Proteine von den Komplexen gelöst werden. Aus der Tatsache, dass Ribosomen bzw. Polysomen unter denselben Bedingungen von Kaliumchlorid unbeeinflusst bleiben wurde geschlossen, dass eine Integration oder stabile Assoziation der PMH-Proteine an Ribosomen unwahrscheinlich ist. Dies wird auch durch die unterschiedliche Verteilung der PMH-Proteine und der ribosomalen RNAs über die Fraktionen des Saccharose-Gradienten bestätigt. Eine zeitweise oder instabile Interaktion mit Ribosomen oder Polysomen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Zusammensetzung oder Identität dieser hochmolekularen Komplexe ist bisher unklar. Auch eine Assoziation der PMH-Proteine oder von deren Komplexen an oder eine Integration in Membranen konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Die phänotypische Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten ergab, dass das PMH1-Protein nicht essentiell ist und sehr wahrscheinlich nur einen schwachen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanzen hat. Auf molekularer Ebene wurde für die *pmh1-1*-Mutanten bisher kein Phänotyp beobachtet. Die Funktion dieses Proteins im RNA-Metabolismus ist bisher unbekannt.

Im Gegensatz dazu wurde für die *pmh2*-Mutanten kein makroskopischer Phänotyp beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass PMH2 keine bedeutende Funktion für die Entwicklung oder die Morphologie der Pflanzen hat. Allerdings scheint PMH2 eine Rolle in der Reifung einiger mitochondrialer mRNAs zu spielen. So wurde eine Reduktion reifer *nad2*-, *nad4*-, *nad7*- und *nad9*-Transkripte beobachtet. Eine gleichzeitige Anreicherung

längerer vermutlich unreifer Transkripte führt zu der Annahme, dass PMH2 keine Rolle in der Transkription spielt, sondern eher an posttranskriptionalen Prozessen beteiligt ist. Da der *atp8*-Transkript-Level in *pmh2*-Mutanten unbeeinflusst ist, kann aber ein genereller Einfluss des PMH2-Proteins auf die Steady-State-Level aller mitochondrialer Transkripte ausgeschlossen werden. Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Splicing einiger aber nicht aller *cis*-splicing Introns in den *pmh2*-Mutanten reduziert war. Die Reifung des *nad9*-Transkripts, welches keine Introns enthält, war ebenfalls durch PMH2 beeinflusst. Dies zeigt, dass der Einfluss von PMH2 nicht auf den Schritt des Splicing während der Transkriptreifung begrenzt ist. Da keiner der genannten Prozesse durch den Knockout des *PMH2*-Gens vollständig unterbrochen ist, wird angenommen, dass PMH2 eher als Chaperon bei der Bildung oder Stabilisierung reaktiver RNA-Sekundärstrukturen fungiert, als eine direkte Funktion in der Reifung der genannten Transkripte erfüllt.

Eine Funktion in der Generierung reifer mRNA-Enden kann allerdings ausgeschlossen werden. Das Editing im *nad2*-Transkript erfolgt ebenfalls unabhängig von der Funktion des PMH2-Proteins.

Mit Hilfe der etablierten T-DNA-Linien kann jetzt weiter nach Funktionen der beiden PMH-Proteine im RNA-Metabolismus der Mitochondrien gesucht werden.

7 Summary

The main subject of this thesis was to determine the functions of the two DEAD-box proteins PMH1 and PMH2 in the mitochondrial RNA metabolism of *A. thaliana*. The mitochondrial localization of both proteins had been shown previously. It was also found that these highly similar proteins (76 % identical amino acids) show different expression patterns. In addition PMH1 and/or PMH2 were detected in high molecular mass protein complexes, but the amount of each of the two proteins in these complexes remained unclear. In this thesis the presence of the PMH1 and PMH2 in the high molecular mass complexes was confirmed by immunodetection analyses of sucrose density gradient fractions. The investigation of T-DNA insertion mutants revealed that PMH2 is expressed stronger than PMH1, which is consistent with the previous expression analysis. Both proteins seem to be part of high molecular mass complexes. It was found that the PMH proteins can be dissociated from the complexes by treatment of the mitochondrial lysates with potassium chloride. Under the same conditions ribosomes or polysomes remain unaffected. This observation and the different distribution of the PMH proteins and the ribosomal RNAs throughout the fractions of the sucrose gradients led to the conclusion that an integration or stable association of the proteins with ribosomes or polysomes is unlikely. Nevertheless, a weak or transient interaction of the PMH proteins with ribosomes or polysomes cannot be excluded. Up to now the composition of these high molecular mass complexes remains unclear. An integration or association of the PMH proteins and/or their complexes in or with membranes is ambiguous.

The phenotypic analysis of the T-DNA insertion mutants showed, that PMH1 is not an essential protein and has only a weak influence on the development of the plants. Up to now no molecular phenotype was observed for the *pmh1-1* mutants. The function of this protein in the mitochondrial RNA metabolism is still unknown.

In contrast no developmental or any other macroscopic phenotype was observed for the *pmh2* mutants. It was thus concluded that PMH2 has no important function in development or the morphology of the plants.

In the PMH2 mutant the steady state levels of the *nad2*-, *nad4*-, *nad7*-and *nad9* mRNAs were reduced suggesting that PMH2 participates in the maturation of some mitochondrial mRNAs. A concurrent enrichment of longer transcripts, most likely precursor RNAs, lead to the conclusion that PMH2 plays no role in the transcription, but rather is involved in posttranscriptional processes. Since the *atp8* mRNA steady-state level remains unaffected in the PMH2 knockout mutant, a general influence of the PMH2 protein on the steady-state

levels of all mitochondrial transcripts can be excluded. Further investigations showed that the splicing of some of the mitochondrial *cis-splicing* introns was reduced in the *pmh2* mutant. The fact, that the maturation of the *nad9* mRNA, which contains no introns, is also influenced by knockout of PMH2 suggests that this protein influences the steady-state levels of mitochondrial transcripts independent from splicing. In the mutant none of the posttranscriptional processes is completely blocked supporting a role of as a chaperone in the formation or maintenance of reactive secondary RNA structures. In addition, a function of PMH2 in the generation of mature mRNA ends can be excluded. Likewise PMH2 is not required for RNA editing of the *nad2*-transcripts. In summary, the exact function of the PMH2 protein during the splicing or other posttranscriptional maturation processes remains unclear. The established T-DNA lines now allow to search for further functions of these two Dead-box proteins in the RNA metabolism of *A. thaliana* mitochondria.

8 Literaturverzeichnis

- Alonso, J.M. et al. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, 301, 653-657
- Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M. and Davies, B. (2006) UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 47, 480-489
- Bari, R., Kebeish, R., Kalamajka, R., Rademacher, T. and Peterhänsel, C. (2003) A glycolate dehydrogenase in the mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Botany*, 55-397, 623-630
- Bhaskaran, H. And Russell, R. (2007) Kinetic Redistribution of Native and Misfolded RNAs by a DEAD-box chaperone, *Nature*, 449, 1014-1018
- Birtić, S. and Kranner, I. (2006) Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds, *Phytochem. Anal.*, 17: 144-148
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 8: 93-99
- Boudet, N., Aubourg, S., Toffano-Nioche, C., Kreis, M. and Lecharny, A. (2001) Evolution of intro/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis* and *Drosophila*, *Genome Res.*, 11, 2101-2114
- Carrie, C., Kühn, K., Murcha, M.W., Duncan, O., Small, I.D., O'Tool, N. And Whelan, J. (2009) Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*, *The plant Journal*, 57, 1128-1139
- Charollais, J., Dreyfus, M. and Iost, I. (2004) CsdA, a col-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit, *Nucleic Acids RES.*, 32-9, 2751-2759
- Cheng, Z., Collier, J., Parker, R. and Song, H. (2005) Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p, *RNA*: 11, 1258-1270
- Clough, S.J. and Bent, A.F (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 16(6): 735-743
- Collier, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A. and Parker, R. (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes, *RNA*, 7, 1717-1727
- Cordin, O., Tanner, N.K., Doere, M., Linder, P. and Banroques, J. (2004) The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity, *The EMBO Journal*, 23-13, 2478-2487
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K. and Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases, *Gene*, 367, 17-37
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.-R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*, *Plant Phys*, 139: 5-17
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, F., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated transfer to plants, *Nucleic Acids RES.*, 13: 4777-4788

- Del Campo, M., Tijerina, P., Bhaskaran, H., Mohr, S., Yang, Q., Jankowsky, E., Russell, R. and Lambowitz, A.M. (2007) Do DEAD-box proteins promote group II intron splicing without unwinding RNA?, *Molecular cell*, 28, 159-166
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, *Nucleic Acids RES.*, 19(6): 1349
- Emery, B., de la Cruz, J., Rocak, S., Deloche, O. and Linder, P. (2004) Has1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Microbiology*, 52-1, 141-156
- Eubel, H., Jansch, L. and Braun, H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II, *Plant Phys.*, 133: 274-286
- Forner, J. (2003) Transkription in Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* – Charakterisierung von mRNAs und Bestandteilen des RNA-Prozessierungsapparates, Diplomarbeit, Universität Ulm
- Fuller-Pace, F.V. (2006) DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation, *Nucleic Acids RES.*, 34-15, 4206-4215
- Gagliardi, D. and Binder, S. (2007) Expression of the plant mitochondrial genome, In: *Plant Mitochondria*, Blackwell Publishing Ltd, 50-96
- Giege, P. and Brennicke, A. (1999) RNA Editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs, *PNAS, USA*, 96-26, 15324-15329
- Gong, Z., Dong, C.-H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B. and Zhu, J.-K. (2005) A DEAD-box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 17, 256-267
- Gross, T., Siepmann, A., Sturm, D., Windgassen, M., Scarcelli, J.J., Seedorf, M., Cole, C.N. and Krebber, H. (2007) The DEAD-Box RNA Helicase Dbp5 functions in translation termination, *Science*: 315, 646-649
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A. and Millar, A.H. (2003) Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits, *BBA*, 1604: 159-169
- Herschlag, D. (1995) RNA chaperones and the RNA folding problem, *J. Biol. Chem.*, 270-36, 20871-20874
- Hoffmann, M., Kuhn, J., Däschner, K. and Binder, S. (2001) The RNA world of plant mitochondria, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 70, 119-154
- Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O'Malley, B.W. and Berget, S.M. (2002) Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72, *Mol. Cell. Biol.*, 22-16, 5698-5707
- Huang, H.-R., Rowe, C.E., Mohr, S., Jiang, Y., Lambowitz, A.M. and Perlman, P.S. (2005) The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function, *PNAS*, 102-1, 163-168
- Iost, I., Dreyfus, M. and Linder, P. (1999) Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase, *J. Biol. Chem.*, 274-25, 17677-17683
- Iost, I. and Dreyfus, M. (2006) DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids RES.*,

34-15, 4189-4197

Jalal, C., Uhlmann-Schiffler, H. and Stahl, H. (2007) Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation, *Nucleic Acids RES.*, 35-11, 3590-3601

Jankowsky, E. And Bowers, H. (2006) Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases, *Nucleic Acids RES.*, 34-15, 4181-4188

Jankowsky, E. (2007) Indifferent chaperones, *Nature*, 449, 999-1000

Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the complexes of plant mitochondria, *The Plant Journal*, 9(3): 357-368

Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R. and Barak, S. (2007) *Stress response suppressor1* and *Stress response suppressor2*, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses, *Plant. Phys.*, 145, 814-830

Karimi, M., De Meyer, B. and Hilson, P. (2005) Modular cloning and expression of tagged fluorescent protein in plant cells, *Trends Plant Sci.*, 10-3, 103-105

Karimi, M., Depicker, A. and Hilson, P. (2007) Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors, *Plant Phys.*, 145, 1144-1154

Kerschen, A., Napoli, C.A., Jorgensen, R.A. and Müller, A.E. (2004) Effectiveness of RNA interference in transgenic plants, *FEBS Letters*, 566, 223-228

Kim, J.S., Kim, K.A., Oh, T.R., Park, C.M. and Kang, H. (2008) Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions, *Plant Cell Phys.*, 49(10): 1563-1571

Klein, M., Binder, S., and Brennicke, A. (1998) Purification of mitochondria from *Arabidopsis*, *Methods Mol Biol*, 82: 49-53

Kossen, K., Karginov, F.V. and Uhlenbeck, O.C. (2002) The carboxy-terminal domain of the DExD/H protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23S rRNA, *J. Mol. Biol.*, 324, 625-636

Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685

Li, D., Liu, H., Zhang, H., Wang, X. and Song, F. (2008) OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress, *J. Experimental Botany*, 59-8, 2133-2146

Linder, P., Tanner, N.K. and Banroques, J. (2001) From RNA helicases to RNPsases, *Trends in Biochemical Sciences*, 26-6, 339-341

Linder, P. (2006) DEAD-box proteins: a family affair – active and passive players in RNP-remodelling, *Nucleic Acids RES.*, 34-15, 4168-4180

Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J. And Slonimski, P.P. (1989) Birth of the D-E-A-D box, *Nature*, 337, 121-122

Linke, P. And Weiss, H. (1986) Reconstitution of ubiquinol-cytochrome-c reductase from *Neurospora* mitochondria with regard to subunits I and II, *Meth Enzym*, 126:201-210

- Liou, G.-G., Chang, H.-Y., Lin, C.-S. and 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, 41157-41162
- Liu, F., Putnam, A. and Jankowsky, E. (2008) ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding, *PNAS*, 105, 20209-20214
- Matthes, A. (2006) Charakterisierung verschiedener RNA-bindender Proteine in den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*, Diplomarbeit, Universität Ulm
- Matthes, A., Schmidt-Gattung, S., Köhler, D., Forner, J., Wildum, S., Raabe, M., Urlaub, H. and Binder, S. (2007) Two DEAD-Box Proteins May Be Part of RNA-Dependent High-Molecular-Mass Protein Complexes in *Arabidopsis* Mitochondria, *Plant Cell Phys.*, 49: 1563-1571
- Missel, A., Souza, A.E., Nörskau, G. and Göringer, H.U. (1997) Disruption of a gene encoding a novel mitochondrial DEAD-Box-Protein in *Trypanosoma brucei* affects edited mRNAs, *Mol. Cell. Biol.*, 17-9, 4895-4903
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giege, P. And Leaver, C.J. (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial Proteome, *Plant Phys.*, 127: 1711-1727
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L., Kristensen, B.K., Braun, H.P. and Möller, I.M. (2005) The plant mitochondrial proteome, *Trends in Plant Science*, 10-1, 36-43
- Millar, A.H., Whelan, J. And Small, I. (2006) Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids, *Curr Opin Plant Biol.*, 9-6, 610-615
- Von Moeller, H., Basquin, C. and Conti, E. (2009) The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner, *Nature structural & Mol. Biol.*, 16-3, 247-254S
- Mohr, S., Matsuura, M., Perlman, P.S. and Lambowitz A.M. (2006) A DEAD-box protein alone promotes group II intron splicing and reverse splicing by acting as an RNA chaperone, *PNAS*, 103-10, 3569-3574
- Ogilvie, V.C., Wilson, B.J., Nicol, S.M., Morrice, N.A., Saunders, L.R., Barber, G.N. and Fuller Pace, F.V. (2003) The highly related DEAD box RNA helicases p68 and p72 exist as heterodimers in cells, *Nucleic Acids Res.*: 31-5, 1470-1480
- Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W. and Shaw, P.J. (2005) Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions, *Mol. Biol. Cell.*, 16-1, 260-269
- Perales, M., Eubel, H., Heinemeyer, J., Colaneri, A., Zabaleta, E. and Braun, H.P. (2005) Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I+III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*, *J. Mol. Biol.*, 350: 263-277
- Puchta, H. and Hohn, B. (1996) From centiMorgan to base pairs: homologous recombination in plants, *trends in plant science*, 1-10, 340-348
- Raczynska, K.D., Le Ret, M., Rurek, M., BonNucleic Acids Res.d, G., Augustyniak, H. And Gualberto, J.M. (2006) Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons, *FEBS Lett.*, 580: 5641-5646

- Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Konrat, R., Bläsi, U. and Schroeder, R. (2007) RNA Chaperones, RNA Annealers and RNA Helicases, *RNA Biol.*, 4-3, 118-130
- Rocak, S. and Linder, P. (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism, *nature Mol Cell Biol*, 5, 232-241
- Rocak, S., Emery, B., Tanner, N.K. and Linder Patrick (2005) Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs, *Nucleic Acids RES.*: 33-3, 999-1009
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid gelbelectrophoresis fort he separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, 166: 368-379
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoreses for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal Biochem*, 199: 223-231
- Schmidt-Gattung (2005) *Analyse der Expression und Funktion von RNA-Helikasen in Mitochondrien von Arabidopsis thaliana*, Dissertation, Universität Ulm
- Schütz, P., Bumann, M., Oberholzer, A.M., Bieniossek, C., Trachsel, H., Altmann, M. and Baumann, U. (2008) Crystal structure oft he yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein-protein interactions, *PNAS*, 105-28, 9564-9569
- Schwer, B. (2001) A new twist on RNA helicases: DExH/D-box proteins as RNPsases, *Nat Struct Biol*, 8-2, 113-116
- 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., Hutchinson, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. and Goff,, S.A. (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system, *Plant Cell*, 14, 2985-2994
- Small, ID and Peeters, N. (2000) The PPR motif – a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends Biochem Sci*, 25, 46-47
- Solem, A., Zingler, N. and Pyle A.M. (2006) A DEAD protein that activates intron self-splicing without unwinding RNA, *Molecular Cell*, 24, 611-617
- Sosnick, T.R. and Pan, T. (2002) Getting hotter with RNA, *Nat Struct Biol*, 9-11, 795-796
- Swank, RT. And Munkres, KD. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate, *Anal Biochem*, 39: 462-477
- Tijerina, P., Bhaskaran, H. and Russell R. (2006) Nonspecific binding to structured RNA and preferential unwinding of an exposed helix by the CYT-19 protein, a DEAD-box RNA chaperone, *PNAS*, 103-45, 16698-16703
- Unsel, M., Marienfeld, JR., Brandt, P. and Brennicke A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366 924 nucleotides, *Nature genetics*, 15:57-61
- Wang, Y., Duby, G., Purnelle, B. and Boutry, M. (2000) Tobacco *VDL* gene encodes a plastid DEAD Box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis, *The Plant*

Cell, 12, 2129-2142

Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. and 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 Phys., 125: 943-954

Western, T.L., Cheng, Y., Liu, J. and Chen, X. (2002) HUA ENHANCER2, a putative DExH-box RNA helicase, maintains homeotic B and C gene expression in Arabidopsis, Development, 129, 1569-1581

Wildum, S. (2003) Charakterisierung von Transkripten der mitochondrialen Gene *ccb2*, *atp8* und *atp9* sowie der putativen mitochondrialen RNA-Helikase 1 (PMH1) von *Arabidopsis thaliana*, Diplomarbeit, Universität Ulm

Yang, Q., Del Campo, M., Lambowitz, A.M. and Janowsky, E. (2007) DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation, Molecular cell, 28, 253-263

Yoine, M., Nishii, T. and Nakamura, K. (2006) Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth, Plant Cell Physiol., 47-5, 572-580

9 Anhang

9.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: (aus Rocak und Linder, 2004) Der allgemeine Aufbau von DEAD-Box-Proteinen	6
Abbildung 4.1: Fraktionierung von Ribosomen, Polysomen und mitochondrialen Protein-Komplexen auf diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten	36
Abbildung 4.2: PMH1 und/oder PMH2 und deren Komplexe werden in mitochondrialen Membran-Fraktionen detektiert	38
Abbildung 4.3: Analyse der <i>PMH2</i> -T-DNA-Insertionsmutanten SALK 056387 und SAIL 628 C06	41
Abbildung 4.4: Detektion von PMH1 und PMH2 in mitochondrialen Membranen von <i>A. thaliana</i>	45
Abbildung 4.5: Detektion von PMH1 und PMH2 im Gesamtproteom von <i>A. thaliana</i> Keimlingen	46
Abbildung 4.6: PMH1 und PMH2 kommen in hochmolekularen Protein-Komplexen vor	47
Abbildung 4.7: Analyse des makroskopischen Phänotyps der <i>pmh1-1</i> -Mutanten	49
Abbildung 4.8: Analyse der Steady-State-Level mitochondrialer Transkripte	53
Abbildung 4.9: Chromatogramm der cDNA-Sequenz des <i>nad2</i> -Transkripts aus <i>pmh1-1</i> , <i>pmh2-1</i> -Mutanten, wt1 und wt2	54
Abbildung 4.10: BN-PAGE von mitochondrialen Protein-Komplexen einer <i>pmh2-1</i> - und einer Wildtyp-Zellsuspensionskultur	56
Abbildung 4.11: pH7GWIWG2(I)- <i>PMH2</i> -RNAi-Konstrukt	58
Abbildung 4.12: Relative <i>PMH2</i> -Transkriptmengen in den <i>PMH2</i> -RNAi-Pflanzen im Vergleich zu <i>pmh1-1</i> -Pflanzen	60
Tabelle 3.1: Pipettierschema für die Reaktionsansätze in der Real-Time PCR	26
Tabelle 3.2: Pipettierschema für ein Gradientengel mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration	28
Tabelle 3.3: Pipettierschema für Tricin-SDS-Gele	31
Tabelle 3.4: Pipettierschema für Harnstoff-SDS-Gele	32
Tabelle 4.1: Ergebnis der Real-Time Q-RT-PCR-Analyse des <i>PMH2</i> -Transkripts in der homozygoten Pflanze (Pflanze 5) und der WT-Pflanze (Pflanze 6) der SAIL 628C06-Linie	43
Tabelle 4.2: Wurzellängen von <i>pmh1-1</i> -Pflanzen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	48
Tabelle 4.3: Übersicht über die Introns mitochondrialer Gene in <i>A. thaliana</i>	50
Tabelle 4.4: Sonden für die Northern-Hybridisierungen gegen mitochondriale mRNAs	52
Tabelle 4.5: Editing-Effizienzen einiger Stellen im <i>nad2</i> -Transkript	55
Tabelle 4.6: Real-Time PCR-Analyse der <i>PMH2</i> -Transkripte in T ₂ - <i>PMH2</i> -RNAi-Pflanzen	60

9.2 Abkürzungsverzeichnis

3'-Ende	Hydroxyterminus der Nucleinsäuren
5'-Ende	Phosphatterminus der Nucleinsäuren
ACA	Aminocaproic acid (2-Aminocapronsäure)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
Bidest	Bidestilliertes Wasser
BN-PAGE	Blau Native Polyacrylamidgelelektrophorese
bp	Basenpaare
C-Terminus	Carboxylterminus eines Proteins
DNA	Desoxribonucleic acid
DDM	n-Dodecyl β -D-maltosid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycoltetraessigsäure
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
GFP	Green fluorescent protein
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Min	Minute
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterninus
NTP	Nucleosidtriphosphat
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
ssRNA	single stranded RNA (einzelsträngige RNA)
MS-Medium	Murashige and Skoog Medium

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PMH	Putative Mitochondriale Helikase
PMSF	Phenylmethylsulfonsäure
PPR-Protein	Pentatricopeptide repeat Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
TEMED	Tetramethylethylendiamin
WT	Wildtyp

9.3 Publikationsliste

Originalpublikationen:

Matthes, A., Schmidt-Gattung, S., **Köhler**, D., Forner, J., Wildum, S., Raabe, M., Urlaub, H. and Binder, S. (2007) *Two DEAD-Box Proteins May Be Part of RNA-Dependent High-Molecular-Mass Protein Complexes in Arabidopsis Mitochondria*. Plant Physiol. 145: 1637–1646

Köhler, D., Schmidt-Gattung, S. and Binder, S.

Different roles of two highly similar DEAD-box proteins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*

Zur Veröffentlichung eingereicht bei Plant Molecular Biology

Poster:

Daniela Köhler, Annemarie Matthes, Stefan Binder (2007) *Biochemical characterization of two DEAD-box proteins in mitochondria of Arabidopsis thaliana*. Botanikertagung 2007 (Hamburg)

Frühere Veröffentlichungen:

Schuster, M.; Flachowsky, H.; **Köhler**, D. (2007) Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions and cultivars of the German Fruit Gene Bank and from private collections, Plant Breed., 126, 533-540

9.4 Lebenslauf

Name: Köhler
Vorname: Daniela
Geburtsdatum: 04.06.1981
Geburtsort: Querfurt, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1988 - 1992 Grundschule Albrecht-Dürer I Freiberg (Sachsen)
1992 – 2000 Geschwister-Scholl-Gymnasium Freiberg (Sachsen)
Abschluss: Abitur (08.07.2000)

Hochschulstudium:

10/2000 – 02/2006 Studium der Angewandten Naturwissenschaft an der TU
Bergakademie Freiberg (Sachsen)
03/2005 - 02/2006 Anfertigung der Diplomarbeit in der Bundesanstalt für
Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für
Obstzüchtung, Dresden-Pillnitz
Thema: „Isolierung von T-DNA flankierenden Bereichen
transgener Apfelinien“
Diplom (07.02.2006)

Promotion:

Seit 04/2006 Anfertigung der Dissertation „Funktionelle Analyse
mitochondrialer RNA-Helikase Komplexe von *Arabidopsis
thaliana*“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Stefan Binder,
Institut Molekulare Botanik, Universität Ulm

9.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen lieben Menschen bedanken, ohne deren Hilfe die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich oder zumindest deutlich schwieriger gewesen wäre.

Vielen Dank!

... besonders an Herrn Prof. Dr. Stefan Binder für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die intensive und freundliche Betreuung in den letzten drei Jahren.

... auch an die Mitglieder der Prüfungskommission, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Dr. Anita Marchfelder für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

... auch an alle lieben Kolleginnen und Kollegen in Binder-Lab Angela Hölzle, Christian Jonietz, Tanja Knill, Joachim Forner, Ulrike Tengler, Conny Guha, Angelika Müller Bärbel Weber, Sabine Thuss, Carolin Müller und Daniela Thornton für die schöne Arbeitsatmosphäre, gegenseitige Unterstützung und so manches aufmunternde Wort.

.. an Herrn Prof. Dr. A. Brennicke für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung Molekulare Botanik und die stete Unterstützung in den letzten drei Jahren.

... an alle Mitarbeiter der Abteilung Molekulare Botanik für das kollegiale Arbeitsklima und ihre immerwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

... zuletzt auch an meine Familie, ohne deren Glauben an mich und ihre bedingungslose Unterstützung ich niemals soweit gekommen wäre.

9.6 Erklärung über die in Anspruch genommenen Hilfen

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

Ulm, den