Klonierung und funktionelle Analyse des Gens ZmPPR6 (Pentatricopeptide Repeat 6) aus einer Zea mays L. Körnermutante

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nikolay Manavski

aus Rakovski, Bulgarien

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. U. WIENAND Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. W. SCHÄFER Tag der Disputation: 24. September 2010

Hamburg, den 09. September 2010



1

Professor Dr. Axel Temming Leiter des Fachbereichs Biologie

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhalts	sverzeichnis	I
II.	Abkür	zungsverzeichnis	V
1.	Zusam	menfassung	1
2.	Einleit	ung	3
	2.1 Verl	auf der Maiskorn-Entwicklung	3
	2.2 Gen	isolierung aus Maiskörnermutanten	
	2.3 Auft	oau, Funktion und Abstammung der Mitochondrien	
	2.4 Die	Pentatricopeptide Repeat Proteinfamilie	11
	2.5 Ziels	setzung dieser Arbeit	13
3.	Mater	ial und Methoden	14
3.1	l Materi	al	14
	3.1.1 Cher	nikalien und Enzyme	
	3.1.2 Real	xtionskomplettausstattungen (Kits)	
	3.1.3 Olios	gonukleotide	15
	3.1.4 Vekt	oren	
	3.1.5 Anti	körper	
	3.1.6 Bakt	erienstämme	
	3.1.7 Pflar	nzenmaterial	17
	3.1.7.1	Körnermutanten-Kollektion der Firma Biogemma	
	3.1.7.2	In dieser Arbeit hergestellte transgene Pflanzen	
	3.1.8 Län	genstandards	18
	3.1.9 Lösi	ingen und Medien	
	3.1.9.1	Lösungen	
	3.1.9.2	Medien zur Anzucht von Bakterien	
	3.1.9.3	Medien für die Gewebekultur	20
3.2	2 Metho	den	22
	3.2.1 Anz	ucht von Pflanzenmaterial	
	3.2.1.1	Zea mays	22
	3.2.1.2	Arabidopsis thaliana	
	3.2.2 Mol	ekularbiologische Methoden	23

	3.2.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzengewebe	23
	3.2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	24
	3.2.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen	24
	3.2.2.4	Reinigung von RNA	_24
	3.2.2.5	Klonierungen	_24
	3.2.2.6	Southern Blot-Analyse	25
	3.2.2.7	Herstellung DIG-markierter Sonden	_26
	3.2.2.8	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	26
	3.2.2.9	Northern Blot-Analyse	26
	3.2.2.10	Dot Blot-Analyse von RNA	27
	3.2.2.11	Reverse Transkription und RT-PCR	28
	3.2.2.12	Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
	3.2.2.13	In vitro Transkription	30
	3.2.2.14	Sequenzierung	30
	3.2.2.15	Computergestützte Sequenzanalyse	30
3.2.3	3 Analy	se von Proteinen	31
	3.2.3.1	Mitochondrien-Isolierung aus etiolierten Maiskeimlingen	31
	3.2.3.2	Proteinextraktion aus Pflanzengewebe	31
	3.2.3.3	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	32
	3.2.3.4	Native Aufreinigung rekombinanter GST-Strep-Tag-Proteine aus <i>E. coli</i>	33
	3.2.3.5	Denaturierende Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine aus E. coli	33
	3.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
	3.2.3.7	Coomassie-Färbung	34
	3.2.3.8	Semi-Dry Proteintransfer (Western Blot)	35
	3.2.3.9	Immunodetektion	35
	3.2.3.10	Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) von Protein-RNA-Liganden	36
	3.2.3.11	Electrophoretic Mobilty Shift Assay (EMSA)	37
	3.2.3.12	Northwestern-Analyse	38
3.2.4	4 Trans	iente, biolistische Transformation von Pflanzen	_39
	3.2.4.1	Fällungsansätze	39
	3.2.4.2	Biolistische Transformation und Fluoreszenzmikroskopie	39
3.2.5	5 Stabil	e Transformation von Pflanzen	_40
	3.2.5.1	Agrobakterien-vermittelte Transformation von Arabidopsis thaliana	_40
	3.2.5.2	Biolistische Transformation von Zea mays	41
3.2.6	6 Histoc	hemischer GUS-Assay	_42
3.2.7	7 Histol	ogische Analyse von Maiskörnern	_42

		3.2.7.	1 Gewebefixierung	42
		3.2.7.2	2 Einbettung	43
		3.2.7.	3 Herstellung von Mikrotom-Schnitten	44
		3.2.7.	4 Waschen und Färben der Gewebeschnitte	44
	3.2.	8 His	tologische Analyse von Arabidopsis-Samen	45
	3.2.	9 Lic	htmikroskopie	45
4.	E	rgeb	nisse	46
	4.1	cDI	NA-basierte <i>transposon tagging</i> Strategie	46
	4.2	Ide	ntifizierung der Körnerphänotyp-auslösenden FSTs	49
	4.3	Das	s Kandidaten-FST kodiert ein Pentatricopeptide Repeat-Protein	51
		4.3.1	Analyse des <i>zmppr6</i> -Mutantenphänotyps	53
	4.4	Cha	rakterisierung von T-DNA-Insertionslinien in Arabidopsis	56
		4.4.1	Molekulare und phänotypische Analyse	56
		4.4.2	Genetische Komplementation der <i>AtPPR6</i> -Mutation	58
	4.5	Gev	vebespezifische Expression von <i>ZmPPR6</i>	61
		4.5.1	Northern Blot-Analyse des <i>ZmPPR6-</i> Transkripts	62
		4.5.2	Analyse der <i>ZmPPR6</i> -Expression mittels semiquantitativer RT-PCR	63
		4.5.3	Analyse der ZmPPR6-Promotoraktivität in Promotor-GUS-Pflanzen	64
	4.6	Sub	zelluläre Lokalisation des ZmPPR6-Proteins	66
	4.7	Suc	he nach einem ZmPPR6-assoziierten RNA-Liganden	69
	4	.7.1	Herstellung von überexprimierenden ZmPPR6-Maispflanzen	69
	4	.7.2	Immunopräzipitation eines ZmPPR6-RNA-Komplexes	72
	4	.7.3	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) und Northwestern-Analyse	
			der ZmPPR6/ <i>rps3</i> -Interaktion	76
	4.8	Ana	alyse der ZmPPR6-Funktion in Mitochondrien	79
5.	D	isku	ssion	84
	5.1	cDI	NA-basierte <i>transposon tagging</i> Strategie	
	5.2	Zm	PPR6 ist essentiell für die Entwicklung des Korns	
	5.3	AtP	PR6 aus Arabidopsis und ZmPPR6 aus Mais sind orthologe Gene	
	5.4	Zm	PPR6 kodiert ein schwach exprimiertes, Mitochondrien-lokalisiertes	
		PP	R- Protein	
	5.5	Zm	PPR6 ist möglicherweise für die Translation des <i>rps3</i> verantwortlich	
	5.6	Aus	sblick	92

6.	Lit	eratur	93
7.	An	hang	_100
•	7.1	Allel-Test	100
•	7.2	In dieser Arbeit verwendete Primer	<u>101</u>
•	7.3	Zusammenfassung der Mutanten-Screening-Ergebnisse	103

II. Abkürzungsverzeichnis

Chemikalen, Lösungen und Medien

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H_2O	Wasser
HEPES	Hydroxyethyl-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MES	2-(N-Morpholino)-ethan-sulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Murashige-Skoog
PAS	Periodsäure-Schiff-Reagenz
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumacetat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
X-Gluc	$(5-Brom-4-chlor-indolyl)-\beta-D-Glucuronsäure$

Molekularbiologisch-relevante Abkürzungen

AIMS	amplification of insertion mutagenised sites	mRNA	messenger RNA
Amp	Ampicillin	mtRNA	mitochondriale RNA
BETL	basal endosperm transfer layer	Mu	Mutator
BSA	Rinderserum Albumin	nos	Nopalinsynthase-Terminator
cDNA	Komplementäre DNA	ORF	Offener Leserahmen
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DNase I	Desoxyribonuklease I	pfu	Pyrococcus furiosus
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PPR	Pentatricopeptide Repeat
DsRED	Discosoma sp. red fluorescent protein	RACE	rapid amplification of cDNA ends
E. coli	Escherichia coli	taq	Thermus aquaticus
Emp4	Empty Pericarp4	Rev	reverse
EMSA	electrophoretic mobilty shift assay	RNA	Ribonukleinsäure
EST	expressed sequence tag	RNase	Ribonuklease
for, Fw	forward	RPS3	Ribosomales Protein S3
FST	flanked sequence tag	RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
gDNA	genomische DNA	Spec	Spectinomycin
GFP	green fluorescent protein	TAIL-PCR	thermal asymmetric interlaced PCR
GUS	β-Glucuronidase	TIR	terminal inverted repeat
HRP	Meerrettich-Peroxidase	Ubi	Ubiqutin
Kan	Kanamycin	UTR	nicht translatierter Bereich

Einheiten und sonstige Abkürzungen

Abb.	Abbildung	mm	Millimeter
ad	auffüllen bis	μm	Mikrometer
bp	Basenpaar	μΜ	Mikromol
ca.	circa	ng	Nanogramm
cm	Zentimeter	nm	Nanometer
et al.	und Andere	nM	Nanomolar
g	Gramm	OD	Optische Dichte
g	Erdbeschleunigung	рН	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
h	Stunde	p.A.	zur Analyse
inch	= 2,45 cm	psi	Pounds per Square inch
kb	Kilobasen	rpm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton	rpm	Umdrehungen pro Minute
kg	Kilogramm	RT	Raumtemperatur
1	Liter	sec	Sekunde
М	molar	U	Einheit
mA	Milliampere	UV	ultraviolett
mg	Milligramm	V	Volt
μg	Mikrogramm	v/v	Volumen per Volumen
min	Minuten	w/v	Gewicht per Volumen
ml	Milliliter	%	Prozent
μl	Mikroliter	°C	Grad Celsius
mМ	Millimolar	00	unendlich

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und molekulare Funktionsanalyse bis jetzt unbekannter, an der Kornentwicklung von Mais beteiligter Gene. Als Basis dafür diente eine *Mutator*-Transposon-induzierte Kollektion aus 60 Maiskörnermutanten, in denen die für den Mutanten-Phänotyp kausalen Gene durch ein im Rahmen des internationalen ERA-Net-Projekts *MuExpress* entwickeltes, cDNA-basiertes *transposon tagging* Verfahren identifiziert werden sollten.

Ein *pentatricopeptide repeat* (PPR) Protein kodierendes Gen, das *ZmPPR6* genannt wurde, konnte durch die innovative *transposon tagging* Methode aus einer dieser Mutanten identifiziert bzw. kloniert werden. Ein Verlust der *ZmPPR6*-Funktion in der Maismutante zeigt einen schwerwiegenden Phänotyp, der sich durch kleine, geschrumpelte, keimungsunfähige Körner auszeichnet. Nähere histologische Untersuchungen mutierter Körner haben ergeben, dass die *zmppr6*-Mutation mit Veränderungen der basalen Transferzellen des Endosperms, einer starken Reduktion des Stärkegehaltes sowie Verzögerungen der Embryoentwicklung einhergeht. Durch umfassende Ko-Segregationsanalysen sowie einen Allel-Test konnte gezeigt werden, dass die phänotypischen Korndefekte der Mutante alleine durch die *Mu*-bedingte Mutation des *ZmPPR6*-Gens zustande kommen.

Das *ZmPPR6* kodiert für ein 55 kDa Protein, das über 10 tandemartig angeordnete PPR-Motive und eine vorgeschaltete Signalsequenz für den Import in die Mitochondrien verfügt. Ein ähnlicher Phänotyp wurde in drei *Arabidopsis*-Mutantenlinien beobachtet, bei denen das homologe *PPR6*-Gen, *AtPPR6*, von T-DNA-Insertionen betroffen war. Durch eine heterologe Expression des *ZmPPR6*-Gens konnte die *atppr6*-Mutation vollständig komplementiert werden. Dies zeigt, dass der mutierte Phänotyp der *Arabidopsis*-Pflanzen alleine durch die T-DNA-Insertion bedingt war, und dass *ZmPPR6* und *AtPPR6* orthologe Gene sind.

Im Rahmen gewebe- und entwicklungsspezifischer Expressionsanalysen wurde eine insgesamt sehr schwache Expression des *ZmPPR6* festgestellt. Das Gen war hauptsächlich im Korngewebe während der Frühentwicklung exprimiert, eine schwache Akkumulation des Transkripts wurde jedoch auch in vegetativem Gewebe beobachtet. Subzelluläre Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass ZmPPR6-Protein in den Mitochondrien akkumuliert. Immunologische Untersuchungen belegten diese Lokalisation.

Höhere Pflanzen enthalten mehr als 450 kernkodierte PPR-Proteine, die in Organellen an bestimmte Ziel-RNAs sequenzspezifisch binden und posttranskriptionale Prozesse wie RNA-Editing, -Spleißen, -Restriktion, -Stabilität und Translation ermöglichen. Daher wurde zunächst der spezifische RNA-Ligand und die der RNA/ZmPPR6-Interaktion zugrundeliegende Funktion untersucht. Mittels einer Immunopräzipitation des ZmPPR6-mtRNA-Komplexes aus Mitochondrienproteinextrakt und anschließender RT-PCR wurde der 5' UTR der mRNA für das ribosomale Proten S3 (*rps3*) als potentielle ZmPPR6-Bindungsstelle identifiziert. Die Assoziation zwischen dem ZmPPR6 und dem *rps3*-Transkript konnte durch EMSA- und Northwestern-Experimente *in vitro* belegt werden.

Immunologische Untersuchungen mit einem RPS3-spezifischen Antikörper haben gezeigt, dass die Menge des RPS3-Proteins in der Mutante drastisch reduziert ist. Basierend auf dieser Beobachtung und darauf, dass eine Beteiligung an RNA-Stabilität, -Spleißing und -Editing durch experimentelle Analysen ausgeschlossen werden konnte, wurde dem ZmPPR6-Protein eine mögliche Translationsfunktion zugeschrieben.

2. Einleitung

Als Nutzpflanze nimmt Zea mays einen bedeutenden Platz in der Ernährung der der Landwirtschaft wird Mais Weltbevölkerung ein. In als Rohstoff zur Futtermittelherstellung genauso wie zur Lebensmittelproduktion im zunehmenden Maße angebaut. Das Maiskorn mit seinem hohen Stärkegehalt spielt dabei eine essentielle Rolle. Die Größe, der Zustand und die Zusammensetzung der beiden wichtigsten Komponenten des Maiskorns, Embryo und Endosperm, werden während der Samenentwicklung festgelegt und sind maßgeblich für die Ertraghaltigkeit. Schätzungen zufolge sind ca. 1000 Gene an diesem Prozess beteiligt, wobei bisher nur 10 % dieser Genfunktionen aufgeklärt sind. Die Identifizierung und ca. Charakterisierung der in diesem Entwicklungsprozess noch unbekannten Gene stellt daher eine bedeutende wissenschaftliche sowie agronomische Aufgabe dar. Im internationalen ERA-Net-Projekt *MuExpress*¹, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstanden ist, sollte eine Kollektion von 300 Körnermutanten molekularbiologisch analysiert werden, um die der Mutation zugrunde liegenden Gene zu identifizieren.

2.1 Verlauf der Maiskorn-Entwicklung

Die Entwicklung der Maispflanze ist ein komplexer Prozess, an dessen Beginn eine doppelte Befruchtung mit darauf folgender Embryogenese und Endosperm-Entwicklung steht.

Beim Eintritt des Pollenschlauchs in den Embryosack werden die von ihm getragenen zwei Spermazellen freigegeben, wobei es zu einer doppelten Befruchtung kommt: Der Zellkern der einen Spermazelle dringt in die Eizelle ein und verschmilzt mit dem Eikern, während der Zellkern der zweiten Spermazelle tief in den Embryosack vordringt und sich dort mit den beiden Polkernen vereinigt. Das Ergebnis dieses Vorgangs ist eine diploide Zygote und ein 30 Chromosomen beherbergender Primärendospermkern (Kiesselbach, 1949). Die Zygote stellt die erste Zelle des Embryos bzw. des neuen

¹ http://www.erapg.org/everyone/9587/18624/18615/18794

Sporophyten dar, während der Primärendospermkern die Basis für das triploide Nährgewebe, das Endosperm, bildet.

Die erste Zellteilung der befruchteten Eizelle findet im Gegensatz zum Endosperm nicht unmittelbar nach der Pollinierung statt, sondern erst ca. 30 bis 40 Stunden später (Randolph, 1936). Der *Proembryo* entsteht etwa drei bis vier Tage nach der Pollinierung (*days after pollination*, DAP) und ist durch eine irreguläre Zellanordnung mit fehlender Differenzierung gekennzeichnet (Abb. 2-1 B und C). Im Zuge weiterer Zellteilungen werden zwei Zellarten sichtbar: zahlreiche, kleine, dicht mit Cytoplasma bepackte Zellen des apikalen Embryobereichs und die wenigen, lang gestreckten, cytoplasmaarmen Zellen der Basalregion, die den Suspensor bilden (Abb. 2-1 D-F). Die ersten Differenzierungsschritte im *Proembryo* finden im Alter von ca. 8 bis 9 DAP im Bereich der subapikalen Embryospitze statt, wo später durch eine bevorzugt parallel zur Embryoachse erfolgende Zellteilung, die Radialsymmetrie verloren geht. Eine einseitige Ansammlung von kleinen, protoplasmareichen Zellen in der subapikalen Embryospitze ca. 10 DAP bildet dabei die Grundlage für die Entwicklung der Keimwurzel sowie des Keimsprosses, während auf der gegenüber liegenden Seite eine Schwellung die Ausbildung des Scutellums andeutet (Abb. 2-1 G und H).



Abb. 2-1 Illustrierter Verlauf der Embryogenese (A-I aus Randolph, 1936)

Radiale Longitudinal-Schnitte. **(A)** Proembryo in Zweizellstadium 32 h nach der Pollinierung. Proembryo 4 DAP **(B)**, 5 DAP **(C)**, 6 DAP **(D)**, 7 DAP **(E)** und 8 DAP **(F)**. Subapikaler Bereich des Embryos 10 DAP **(G)**, 12 DAP **(H)** und 13 DAP **(I)**. Ausdifferenzierter Embryo **(J)** (Abbe und Stein, 1954,). Kb, Keimblatt; Kr, Koleorhiza; Kp, Koleoptile; Sc, Scutellum; R, Radikula. Der weitere Verlauf der Embryoentwicklung ist insbesondere durch ein starkes Wachstum des Suspensors und eine Langstreckung des sich weiter entwickelnden Scutellums (Abb. 2-1 I) gekennzeichnet, dessen Funktion in der Versorgung des Embryos mit den im Endosperm befindlichen Nährstoffen liegt (13-14 DAP). Während der Periode zwischen 14 und 20 DAP treten die Koleoptile und das darunter liegende, erste Keimblatt in Erscheinung. Weitere 4 Blätter sowie die von der Koleorhiza umhüllte Radikula werden bis zur morphologischen Embryoreife gebildet, welche im Alter von ca. 45 DAP erreicht wird (Abb. 2-1 J).

Wie bereits erwähnt, resultiert der Primärendospermkern aus der Verschmelzung des einen Spermazellkerns mit den beiden Polkernen in der Zentralzelle des Embryosacks (Abb. 2-2). 3 bis 5 Stunden nach der Befruchtung beginnt eine kontinuierliche mitotische Teilung, die dazu führt, dass innerhalb von 50 Stunden etwa 128 – 256 zellwandfreie Kerne gebildet werden, die in einer Cytoplasmaschicht in dem nun vergrößerten, mit einer Zentralvakuole versehenden Embryosack eigebettet sind (Kiesselbach, 1949). Anschließend wird das auf diese Weise entstandene, coenocytische Endosperm einer Zellularisierung durch die von der Peripherie zur Zentralvakuole fortschreitende Ausbildung eines intranuklären Mikrotubuli-Systems und röhrenartiger, nach innen offener Zellwände, der Alveolen, unterzogen (Brown *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 1999; Olsen, 2004).



Abb. 2-2 Phasen der frühen Endospermentwicklung (Sabelli und Larkins, 2009, modifiziert)

Graphische Darstellung der doppelten Befruchtung sowie der coenocytischen und Zellularisierungs-Phase der Endospermentwicklung in der Zeitspanne von 0 bis 3 DAP. Der Pollenschlauch und Spermazellkerne sind in gelb, Pol- und Endospermkerne in rot, der Kern der Eizelle sowie die Embryokerne sind in grün dargestellt. Die Konturen des multizellulären Endosperms und des Embryos sind in rot bzw. grün gezeichnet. Der Zellularisierungsprozess schreitet fort, bis der zuvor von der Vakuole eingenommene Raum vollständig mit Zellen gefüllt ist, und dauert etwa bis zum fünften Tag nach der Pollinierung an. Kurz danach, manchmal auch während dessen, beginnt eine Differenzierung der Endospermzellen, wobei vier distinkte Gewebetypen zu unterscheiden sind: die basale Endosperm-Transferschicht (*basal endosperm transfer layer, BETL*), das Aleuron, das stärkehaltige Endosperm und die Embryo umgebende Region (*embryo surrounding region, ESR*). Jeder Zelltyp besitzt eine eigene, spezifische Morphologie sowie Funktion und ist durch eine charakteristische Genexpression gekennzeichnet (Lopes und Larkins, 1993; Olsen, 2001; Bommert und Werr, 2001).

Mehrere basale, in unmittelbarer Nähe von der Plazenta-Chalaza-Region gelegene Zellschichten beenden ihren Teilungsprozess zu einem Zeitpunkt, zu dem die Zellularisierung des Endosperms noch nicht vollständig abgeschlossen ist, und beginnen ihre Differenzierung zu Transferzellen. Diese Zellen sind durch ausgedehnte Zellwand-Invaginationen (wall ingrowths) sowie eine vergrößerte Plasmamembranoberfläche, welche die Nährstoffaufnahme begünstigt, gekennzeichnet. Sie fungieren als Brücke zwischen dem maternalen und filialen Gewebe und gewähren den Transport gelöster Nährstoffe (hauptsächlich Zucker und Aminosäuren) von der Mutterpflanze zum Endosperm (Thompson et al., 2001). Zu den weiteren Charakteristika der BETL-Zellen gehört das dichte, mitochondrienreiche Cytoplasma, welches mit dem hohen, für die Differenzierung der Transferzellen notwendigen Stoffwechselumsatz in Verbindung gebracht wird. So führt zum Beispiel eine Mutation des EMP4, eines Pentatricopeptide Repeat-Protein kodierenden Gens aus Mais, welches die Expression mitochondrialer Gene reguliert, zu einer Fehlbildung der *BETL*-Zellen und einer solchen des Endosperms (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2007). Ähnliche genmutationsbedingte Beeinträchtigungen der BETL-Ausbildung wurden bei zwei weiteren Maiskörnermutanten, globby1-1 und *miniature1*, berichtet (Costa *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2009).

Die äußerste, einzellige Schicht des Endosperms, das Aleuron, welche mit Ausnahme der Transfer-Region das gesamte Endosperm umgibt, differenziert sowohl durch perikline als auch antikline Zellteilung aus den äußeren Endosperm-Zellen zwischen 6 und 10 DAP und ist durch Akkumulation ölhaltiger Vesikel sowie lytischer und Proteinspeichervakuolen (Olsen *et al.*, 2001) gekennzeichnet. Durch eine aus dem keimenden Embryo ausgehende Gibberellinsäure-Stimulation werden im Aleuron Gene für die Synthese hydrolytischer und proteolytischer Enzyme aktiviert. Diese führen zur Lyse endospermaler Zellen sowie zur Mobilisierung der Endosperm-akkumulierten Stärke und Proteine, die nach Hydrolyse bzw. Proteolyse dem Embryo in Form von Polysacchariden und Aminosäuren zur Verfügung gestellt werden (Olsen *et al.*, 2001). Somit kommt dem Aleuron eine wichtige Aufgabe bei der Ernährung des keimenden Embryos zu.

Das getrocknete Maiskorn besteht bis zu 70% aus Stärke. Das Polysaccharid setzt sich aus den α -Glucan-Polymeren Amylose und Amylopektin zusammen und wird in semikristallinen Granulaten in den Amyloplasten des stärkehaltigen Endosperms akkumuliert. Stärke wird aus Saccharose durch die Enzyme ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, Stärkesynthase, Stärkeverzweigungsenzym und Stärkeentzweigungsenzym synthetisiert (Hannah, 2007). Die Akkumulation der Stärkekörner beginnt etwa 10 DAP (Charlton et al., 1995) in den peripheren Zellen des Endosperms direkt unter dem Aleuron und schreitet in Richtung Zentrum fort. Somit erhalten die Zellen im äußeren Bereich des Endosperms mehr Stärke als die im Inneren und sorgen dadurch für die Entstehung eines Stärke-Gradienten (Abb. 2-3). Neben der Stärke werden zudem in Proteinkörpern (protein bodies) Speicherproteine akkumuliert, von denen Prolamine und Globuline dominieren.



Abb. 2-3 Longitudinal-Schnitt eines Maiskorns (Sabelli und Larkins, 2009, modifiziert)

Al, Aleuron; *BETL, basal endosperm transfer layer*; E, Embryo; P, Plazenta-Chalaza-Region; Pk, Perikarp; SHEn, stärkehaltiges Endosperm.

Die Zellen der Embryo umgebenden Region sind in mehreren Schichten organisiert und erstrecken sich über die Gesamtlänge des Embryos. Ihre Differenzierung findet etwa zum Zeitpunkt der Beendung der Endosperm-Zellularisierungsphase (4 DAP) statt (Kiesselbach und Walker, 1952) und ist durch eine hohe Cytoplasma-Dichte und die Ausbildung eines komplexen Membran-Systems gekennzeichnet. Die Hauptaufgabe dieser hoch stoffwechselaktiven Zellen besteht darin, den Embryo primär über einen apoplastischen Transport mit Zucker zu versorgen (Cossegal *et al.*, 2007). Mit zunehmendem Embryowachstum jedoch schrumpfen die Zellen des ESR fortlaufend, wobei bereits im Alter von 12 DAP lediglich kleine Überbleibsel im Basal-Endosperm zu erkennen sind.

2.2 Genisolierung aus Maiskörnermutanten

Das normale Produkt der doppelten Befruchtung bei Mais ist das ruhende, reife Maiskorn mit wohl entwickeltem Embryo und stärkehaltigem Endosperm (Lowe und Nelson, 1946). Pflanzen mit vielseitigen Beeinträchtigungen in der Entwicklung des Embryos oder Endosperms werden als *dek*-Mutanten (*defectiv kernels*) bezeichnet (Neuffer und Sheridan, 1980). Man unterscheidet zwei Haupttypen: Mutanten mit ausgeprägter Keimungsunfähigkeit und solche, die nach direkter Aussaat reifer Körner oder im Zuge einer Kultivierung unreifer Embryonen in der Lage sind, Sporophyten hervorzubringen. Sheridan und Neuffer (1981) zufolge ist die erste Gruppe durch Entwicklungsdefekte, die zweite durch Ernährungsstörungen bedingt. Solche Abweichungen werden zum großen Teil durch Mutationen einzelner Gene ausgelöst (Dolfini *et al.*, 2007) und stellen ein wichtiges Forschungsobjekt zur Untersuchung der Identität der betroffenen Gene und Aufklärung ihrer Funktion dar.

Mais gehört zu den ersten Pflanzenspezies, von denen eine Mutanten-Kollektion basierend auf dem *Mutator (Mu)*-Transposon für *reverse genetic* Analysen erstellt wurde (Bensen *et al.*, 1995). Das *Mu*-Transposon wurde 1978 von Robertson erstmals als hoch mutagenes, transposables Element beschrieben. Es setzt sich aus zwei endständigen *Terminal Inverted Repeats (TIRs)* (Barkan und Martienssen, 1991) und einem dazwischen liegenden Sequenzbereich zusammen, der die Gene für die Transposase und ein Helfer-Protein trägt. Die Aufgabe der letzteren besteht darin, die Excision des Transposons und dessen nachfolgende Insertion in einen neuen Locus durchzuführen (Kim und Walbot, 2002). Aufgrund der hohen Mutationsfrequenz von 10⁻³ bis 10⁻⁵ Mutationen pro Locus und Generation (Bennetzen, 1996) sowie der Tatsache, dass es präferenziell in den 5'-Genbereich inseriert (Hanley, 2000), ist das *Mu*-Element für die zielgerichtete Mutagenese von Genen besonders geeignet. Diese Eigenschaften hat sich die französische Firma Biogemma (Paris, Clermont Ferrand) für die Erzeugung von 27.500 Maismutanten durch die hochfrequente Transposition eines endogenen *Mu*-Elements zunutze gemacht. 6.000 Mutantenlinien wurden nach Phänotypen selektiert, die vornehmlich das Endosperm betreffen, so dass in dieser Kollektion eine Anreicherung von Genen zu erwarten ist, die in der Endosperm-Entwicklung involviert sind. 300 dieser Linien wiesen eine saubere 3:1 Aufspaltung des Mutantenphänotyps über einen Zeitraum von drei Generationen auf und wurden für die Identifizierung der *Mu*-induzierten Genmutation berücksichtigt. Mindestens zwei Rückkreuzungen, die mit diesen Linien durchgeführt wurden, führten zu einem sehr homogenen genetischen Hintergrund. 60 dieser Mutantenlinien wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Zur Identifizierung von Genen, die von Transposon-Insertionen betroffen sind, wurden die TAIL-PCR- (*Thermal Asymmetric Interlaced*) (Liu und Whittier, 1995) und die AIMS-Methode (Amplification of Insertion Mutagenised Sites) (Frey et al., 1998) entwickelt. Bei beiden Verfahren handelt es sich um genomische PCR-Ansätze, bei denen ausgehend von einem Primerpaar, welches sich aus einem degenerierten Primer bzw. Adapterprimer und einem TIR-spezifischen Oligonukleotid zusammensetzt, die Amplifikation bzw. die Identifizierung Transposon-flankierender Gensequenzen erfolgen kann. Aufgrund der Tatsache jedoch, dass bei Mais ca. 40 % der Mu-Insertionen in nicht exprimierten Bereichen des Genoms lokalisiert sind, bestehen viele der Amplifikate aus nicht genkodierenden Sequenzen und sind somit in vielen Fällen nicht Teil des Gens, dessen Mutation zum Phänotyp der untersuchten Pflanze führt. Um die Komplexität der resultierenden Proben zu reduzieren und gleichzeitig den Genidentifizierungserfolg zu erhöhen, wurde im Rahmen des internationalen ERA-Net-Projekts MuExpress eine neue Mutanten-Screening-Strategie entwickelt, bei der Mu-Insertionen in Transkripten identifiziert werden, die im Maiskorn exprimiert sind². Diese cDNA-basierte Strategie wurde in dieser Arbeit angewendet, um die dem Mutanten-Körnerphänotyp zugrunde liegende Gene in 60 Körnermutanten zu identifizieren.

² Eine detaillierte Beschreibung dieser Strategie ist im Ergebnis-Abschnitt dargestellt.

2.3 Aufbau, Funktion und Abstammung der Mitochondrien

Mitochondrien sind längliche, plastische Organellen mit einer charakteristischen Länge von ungefähr 2 µm und einem Durchmesser von 0,5 µm. Abhängig von dem Zelltyp und dem physiologischen Zustand kann ihre Gestalt und Größe variieren. Mitochondrien sind von zwei Membransystemen umschlossen, einer glatten äußeren und einer ausgedehnten, stark gefalteten inneren Membran. Somit entstehen zwei Mitochondrien-Kompartimente: der Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Membran und die Matrix, die von der inneren Membran begrenzt wird.

Die äußere Membran ist für Ionen und kleine Moleküle vollständig permeabel (< 10 kDa). Diese Eigenschaft wird durch den hohen Gehalt an porenbildendem Porin verliehen, einem ca. 35 kDa großen Protein, welches als spannungsabhängiger Anionenkanal fungiert. Die innere Membran mit ihren zahlreichen Einstülpungen, den Cristae, ist dagegen für fast alle Ionen und Moleküle (mit Ausnahme von O₂, CO₂, H₂O) undurchlässig. Für den Im- und Export wichtiger Metabolite (wie ATP, Pyrovat, Citrat usw.) sind zahlreiche, in der inneren Membran lokalisierte Transporter verantwortlich. Die innere Membran trägt zudem die Komplexe der Atmungskette und enthält ATP-Synthasen.

Der wichtigste Prozess, der in den Mitochondrien abläuft, ist die oxidative Phosphorylierung, durch die der größte Teil des zellulären ATP erzeugt wird. Elektronen der energiereichen Moleküle NADH und FADH₂, die bei der Glykolyse, Fettsäureoxidation und im Citratzyklus entstehen, werden durch eine Reihe von Proteinkomplexen der inneren Mitochondrienmembran schrittweise auf Sauerstoff übertragen. Die Reduktion des Sauerstoffs führt dazu, dass Protonen aus der mitochondrialen Matrix herausgepumpt werden und sorgt damit für die Erzeugung eines pH-Gradienten sowie eines elektrischen Transmembran-Potentials (Mitchel, 1961). Bei dem Rückfluss der Protonen durch die ATP-Synthasen in die Mitochondrienmatrix wird ATP aus ADP und anorganischem Phosphat gebildet. Aufgrund dieser ATP-erzeugenden Eigenschaft werden Mitochondrien als "Kraftwerke der Zelle" bezeichnet. Neben der oxidativen Phosphorylierung sind in den Mitochondrien der Citratzyklus, die β-Oxidation der Fettsäuren sowie Teile des Harnstoff-Zyklus lokalisiert, die Reduktionsäquivalente für die ATP-Erzeugung bereitstellen. Der Endosymbiontenhypothese zufolge stammen die Mitochondrien von aeroben Proteobakterien ab, die von einem amöboiden Urkaryonten durch Endozytose aufgenommen und dadurch zu Endosymbionten geworden sind (Schwartz und Dayhoff, 1978). Im Laufe der Evolution verloren Endosymbionten ihre Eigenständigkeit und wurden zu semi-autonomen Organellen. Diese Entwicklung ging unter anderem mit dem weitgehenden Verlust prokaryotischer Gene und dem Transfer genetischer Information in den Zellkern einher. Das heutige Mitochondriengenom (Chondrium) liegt zirkulär in mehreren Kopien in der Matrix vor und zeichnet sich bei höheren Pflanzen durch einen relativ großen Umfang aus. So erstreckt sich das Mais-Chondrium über eine Länge von 570 kb und umfasst 58 identifizierte Gene, die die Information für 33 bekannte Proteine (meist Untereinheiten der Atmungskette, und der Ribosomen), 4 ribosomale RNAs und 21 tRNAs kodieren (Clifton *et al.*, 2004).

Schätzungen zufolge enthält das Mitochondrien-Proteom der höheren Pflanzen 2.000-3.000 Proteine (Millar *et al.*, 2005), von denen 90% kernkodiert sind und posttranslational in die Mitochondrien importiert werden (Rehling *et al.*, 2001; Endo und Kohda, 2002; Pfanner und Chacinska, 2002). Die Expression und Regulation der mitochondrienkodierten Gene ist diversen posttranskriptionalen Schritten unterworfen, an denen kernkodierte Proteine beteiligt sind. Somit steht die mitochondriale Transkription und Translation unter strenger Kontrolle des Zellkerns. Eine jüngst entdeckte, kernkodierte RNA-bindende Proteinfamilie, die *Pentatricopeptide Repeat* Proteinfamilie, nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation posttranskriptionaler Prozesse in Organellen ein.

2.4 Die Pentatricopeptide Repeat Proteinfamilie

Die <u>Pentatricopeptide Repeat</u> (PPR) Familie wurde zum ersten Mal bei Arabidopsis thaliana durch Genomanalyse entdeckt (Small und Peeters, 2000). Die ausnahmslos kernkodierten Mitglieder sind durch ein sich wiederholendes, tandemartig angeordnetes, degeneriertes Sequenzmotiv aus 35 Aminosäuren charakterisiert. Obwohl bis jetzt keine experimentellen Informationen über die Proteinstruktur existieren, wurde aufgrund von Vorhersagen und der offensichtlichen Gemeinsamkeit mit dem *Tetratricopeptide Repeat*-Motiv postuliert, dass das PPR-Motiv aus zwei anti-parallelen α -Helices besteht, welche im Tandem eine superhelikale Struktur bilden. Letztere formt eine hydrophile, positiv geladene Furche, die für die Bindung hydrophiler, negativ geladener Liganden wie RNA verantwortlich ist (Small und Peeters, 2000). Zu den weiteren Charakteristika gehört das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz, welche den Import in eines der beiden Organellen, Chloroplasten oder Mitochondrien, vermittelt (Lurin *et al.*, 2004).

Die PPR-Proteinfamilie ist im Pflanzenreich besonders groß. Alleine bei *Arabidopsis* gibt es 441 Mitglieder, von denen die meisten durch Intron-lose Gene kodiert werden (Lurin *et al.*, 2004). Bis dato konnte gezeigt werden, dass PPR-Proteine in Organellen in Prozesse wie RNA-Editing (Kotera *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2006; Chateigner-Bouti *et al.*, 2008), Translation (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005; Uyttewaal *et al.*, 2008), RNA-Spleißen (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; De Longevialle *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2007), RNA-Stabilität (Beick *et al.*, 2008) und RNA-Restriktion (Meierhoff *et al.*, 2003) involviert sind. Basierend auf diesen Studien wird den PPR-Proteinen eine essentielle Funktion bei der posttranskriptionalen Regulation innerhalb der Mitochondrien und Chloroplasten zugeschrieben.

Fünf PPR-kodierende Gene, *CRP1* (Fisk *et al.*, 1999; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005), *PPR2* (Williams und Barkan, 2003), *PPR4* (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006), *PPR5* (Beick *et al.*, 2008) und *EMP4* (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2007), sind bis heute bei Mais charakterisiert worden. Lediglich das *EMP4*, welches aus einer Maiskörnermutante isoliert wurde, kodiert für ein Mitochondrien-lokalisiertes PPR-Protein. Der Ausfall der EMP4-Funktion ist mit Beeinträchtigungen der Expression bestimmter Mitochondrien-Transkripte verbunden und wirkt sich letal auf die Embryoentwicklung aus.

Trotz des offensichtlichen Fortschritts, der in den letzten Jahren in der Aufklärung der Hauptrolle der PPR-Proteine gemacht worden ist, bleibt die exakte biologische Funktion und Substratspezifität schleierhaft. Deshalb sind weitere Studien über die regulierende Wirkung und die Bindeeigenschaften der PPR-Proteine erforderlich.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des internationalen ERA-Net-Projekts *MuExpress* entstanden³. Dessen hauptsächliches Ziel besteht in der Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die in Kornentwicklungsprozesse involviert sind. Im Fokus des Projekts steht eine aus 300 *Zea mays* L. Körnermutanten bestehende, Transposon-induzierte Pflanzenkollektion, die molekularbiologisch analysiert werden sollte, um die dem Phänotyp zugrunde liegenden Gene zu identifizieren.

60 Transposon-induzierte Körnermutanten sollten mit Hilfe eines in *MuExpress* entwickelten, cDNA-basierten Mutanten-*Screening*-Verfahrens in dieser Arbeit analysiert werden. Identifizierte Kandidatengene sollten durch umfangreiche Ko-Segregationsanalysen hinsichtlich ihres Kopplungsverhaltens mit dem Mutanten-Phänotyp überprüft werden. Gene, welche die gesetzten Kriterien erfüllten, sollten nachfolgend in Abhängigkeit von den ersten Ergebnissen bioinformatischer Analysen weiterführenden Untersuchungen zur Aufklärung ihrer Funktion sowie ihres phänotypischen Einflusses unterzogen werden. Entwicklungs- und gewebespezifische Expressionsanalysen sowie subzellulären Lokalisationsstudien sollten Einblicke in die orts- und zeitspezifische Aktivität des Kandidatengens liefern.

³ http://www.erapg.org/everyone/9587/18624/18615/18794

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse* (p.A.) von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldenburg), Duchefa (Haarlem,NL), Fluka (Neu-Ulm), GE-Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Takara Bio Inc (Gennevilliers) bezogen.

3.1.2 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

Plant Genomic DNA Mini Kit High-Speed Plasmid Mini Kit Plasmid Midi Kit NucleoSpin® RNA Clean-up XS NucleoSpin® Extract II Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit TOPO®TA Cloning Kit DIG Northern Starter Kit Prime-It®II Random Primer Labeling Kit SMART™ RACE cDNA Amplification Kit Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit Avegene (Taiwan) Avegene (Taiwan) Avegene (Taiwan) MACHEREY-NAGEL (Düren) MACHEREY-NAGEL (Düren) Avegene (Taiwan) Invitrogen (Karlsruhe) Roche (Mannheim) Stratagene (Heidelberg) Clontech (St-Germain-en-Laye) Roche (Mannheim)

3.1.3 Oliogonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert und in der DST-Qualität (*desalt*) verwendet. Mit LiChrosolv[®]-Wasser wurden 100 μ M Stock- und 10 μ M Arbeitslösungen angesetzt und bei – 20°C gelagert. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide ist dem Anhang (7.3, Seite 103) zu entnehmen.

3.1.4 Vektoren

Vektor	Beschreibung	Merkmale	Ursprung
pET30a	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	Kan ^r , Induzierbarer <i>T7-</i> Promotor, C-terminales 6xHis-Tag	Novagen, Merck (Schwalbach)
pET41b(+)	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	Kan ^r , Induzierbarer <i>T7</i> - Promotor, N-terminales GST-Tag, C-terminales 6xHis-Tag	Novagen, Merck (Schwalbach)
pCR®2.1- TOPO®	Klonierungs- und Sequenzierungsvektor	Amp ^r , Kan ^r , MCS <i>, LacZα,</i> <i>M13-</i> Primerbindungs- Stellen	Invitrogen (Karlsruhe)
pUbi-GFP	GFP-Reportergenvektor	Kan ^r , <i>Ubiqutin</i> -Promotor, <i>gfpII, nos</i> -Terminator, basiert auf <i>pMON 30049</i> (Monsanto, St. Louis)	J. Kluth, Universität Hamburg
pUbi-DsRed	dsRed-Reportergenvektor	Amp ^r , <i>Ubiqutin</i> -Promotor, <i>DsRed</i> exspress, <i>nos</i> - Terminator, basiert auf <i>pUbi-cas</i> (Christensen <i>et al.</i> , 1992)	R. Brettschneider, Universität Hamburg
pUbi-GUS	GUS-Reportergenvektor	Amp ^r , <i>Ubiqutin</i> -Promotor, <i>gus, nos</i> -Terminator, basiert auf <i>pUbi-cas</i>	R. Brettschneider, Universität Hamburg
p35S-pat	Pflanzlicher Selektionsmarker	Amp ^r , <i>CaMV35S</i> -Promotor, nos-Terminator, pat-Gen	Bayer CropScience, P. Eckes, Frankfurt
pCHF5	Binärer Expressionsvektor	Kan ^r , Spec ^r , <i>CaMV35S</i> - Promotor, <i>RBSC</i> -Terminator, <i>pat</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>mas</i> -Promotors	C. Fankhauser, Universität Genf, Schweiz

Tab. 3.1-1: Verwendete Vektoren

Name	Zielvektor	Insert/Enzym(e)	Verwendungszweck
GST:ZmPPR6:Strep	pET41b(+)	1.356 bp, über	Überexpression von rekombinantem
		Spel, Xhol	Protein, in vitro Interaktion
ZmPPR6:His	pET30a	1.305 bp, über	Überexpression von rekombinantem
		VspI, XhoI	Protein, Antikörper-Produktion
pUbi-ZmPPR6:GFP	pUbi-GFP	1.481 bp, über	Subzelluläre Proteinlokalisation,
		BamHI	transiente Transformation
pUbi-ZmPPR6:DsRed	pUbi-DsRed	1.481 bp, über	Subzelluläre Proteinlokalisation,
		BamHI	transiente Transformation
pUbi-EMP4:GFP	pUbi-GFP	1.856 bp, über	Subzelluläre Proteinlokalisation,
		BamHI	transiente Transformation
pUbi-EMP4:DsRed	pUbi-DsRed	1.856 bp, über	Subzelluläre Proteinlokalisation,
		BamHI	transiente Transformation
pUbi-ZmPPR6:Strep	pUbi-GUS	1.509 bp, über	Überexpression, stabile Mais-
		BamHI	Transformation
pZmPPR6-GUS	pUbi-GUS	1.270 bp, über	Gewebespezifische Expression, stabile
		Xbal und Pstl	Mais-Transformation
p35S-ZmPPR6	pCHF5	1.475 bp, über	Mutanten-Komplementation, stabile
		BamHI, XbaI	Arabidopsis-Transformation
p35S- ZmPPR6:DsRed	pCHF5	930 bp, über	Subzelluläre Proteinlokalisation,
		BamHI, XbaI	stabile Arabidopsis-Transformation

Tab. 3.1-2: In dieser Arbeit hergestellte Vektoren mit signifikanter Relevanz⁴

3.1.5 Antikörper

<u>Verwendete Primärantikörper</u>	
Polyklonal Anti-ZmPPR6-Antikörper aus Kaninchen (1:500)	Diese Arbeit
Anti-ZmPPR6-Peptid-Antikörper aus Kaninchen (1:500)	Diese Arbeit
Anti-RPS3-Peptid-Antikörper aus Kaninchen (1:250)	Diese Arbeit
Monoklonaler Anti-His-Antikörper aus Maus (1:2.000)	Qiagen (Hilden)
StrepMAB-Classic-Antikörper aus Maus (1:2.000)	IBA BioTAGnologies
	(Göttingen)

⁴ Sämtliche *TOPO*-Klone wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Verwendete Sekundärantikörper

Stabilized Goat-Anti-Rabbit HRP Konjugat (1:2.000)	Pierce, Perbio Science (Bonn)
Stabilized Goat-Anti-Mouse HRP Konjugat (1:2.000)	Pierce, Perbio Science (Bonn)

3.1.6 Bakterienstämme

Organismus	Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
E. coli	TOP10F'	F'{laclq Tn10 (Tet ^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
E. coli	XL-1 blue MRF' Kan ^r	Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ${}^{g}Z\Delta M15Tn10$ (Kan ^r)]	Stratagene (Heidelberg)
E. coli	XL-1 blue MRF' Tet ^r	Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ${}^{a}Z\Delta M15Tn10$ (Tet ^r)]	Stratagene (Heidelberg)
E. coli	BL21[DE3]	F - <i>ompT hsdS</i> B(r_B - m_B -) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen (Darmstadt)
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	Gent ^r , Rif ^r , pMP90 (pTiC58ΔT-DNA)	Koncz und Schell (1986)

Tab. 3.1-3:	Verwendete Bakteriens	stämme

3.1.7 Pflanzenmaterial

Tab. 3.1-4: Verwendete Pflanzenlinien

Organismus	Linie(n)	Herkunft
Zea mays	A188	Green und Philips (1975)
	Н99	Mais Inzuchtlinie H99
	Black Mexican Sweet	http://www.maizegdb.org/
	<i>Mu</i> -Transposon-induzierte Maiskörnermutanten*	Biogemma (Frankreich, Clermont Ferrand, Paris)
Arabidopsis thaliana	Col-0	Zur Verfügung gestellt von M. Sauter, Universität zu Kiel
	Salk_045714	Alonso <i>et al</i> . (2003), Salklinie
	Slak_061950	Alonso <i>et al</i> . (2003), Salklinie
	Salk_091917	Alonso <i>et al</i> . (2003), Salklinie
Allium fistulosum		Supermarkt

3.1.7.1 Körnermutanten-Kollektion der Firma Biogemma*

27.500 Maismutanten wurden durch die hochfrequente Transposition eines endogenen *Mu*-Elements von der Firma Biogemma (Frankreich) erzeugt. Hierfür wurde eine Transposonlinie (B. Taylor, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra, Australia) mit Maishybridlinien (Limagrain, Frankreich) gekreuzt. 6.000 Körnermutanten wurden in der F₂-Generation identifiziert. 300 dieser Mutanten, die eine saubere 3:1 Segregation des Körnerphänotyps zeigten und bei denen der Phänotyp über 3 Generationen stabil blieb, wurden für die Identifizierung der *Mu*-induzierten Genmutation berücksichtigt. 60 dieser Mais-Insertionsmutanten wurden in dieser Arbeit auf molekularer Ebene analysiert.

3.1.7.2 In dieser Arbeit hergestellte transgene Pflanzen

Organismus	Transgene-Linie	Ursprungslinie	Verwendeter Vektor
Zea mays	pUbi-ZmPPR6:Strep	A188 x H99	pUbi-ZmPPR6:Strep
	pZmPPR6-GUS	A188 x H99	pZmPPR6-GUS
Arabidopsis	p35S-ZmPPR6_6	Salk_061950	p35S-ZmPPR6
thaliana	p35S-ZmPPR6:DsRed	Col-0	p35S-ZmPPR6:DsRed

Tab. 3.1-5: Transgene Pflanzen

3.1.8 Längenstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurde standardmäßig der *GeneRuler*[™] *DNA Ladder Mix* (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Als RNA-Längenstandard diente die *RiboRuler*[™] *High Range RNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot).

Für die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE fand die *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) eine Anwendung.

3.1.9 Lösungen und Medien

Für die Herstellung aller Medien, Puffer und Lösungen wurde über eine Aufbereitungsanlage (Milli-Q Plus Water System, Millipore, Bradford, MA, USA) aufgereinigtes Wasser der Qualität *aqua bidest* verwendet. Dies wird im Folgenden als H₂O angegeben. Die Sterilisierung erfolgte entweder durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 2·10 5 Pa oder mit Hilfe von Sterilfiltern der Ausschlussgrenze 0,22 oder 0,45 $\mu m.$

3.1.9.1 Lösungen⁵

MOPS (10x) (Agarosegelelektrophorese von RNA)	400 100 10	mM mM mM	4-Morpholinopropansulfonsaure Natriumacetat EDTA (pH 8.0)
			ph 7.2 mit NaOh
SSC (20x)	3	М	NaCl
(Nukleinsäuretransfer)	300	mM	Natriumcitrat (pH 7.0)
TAE (50X)	2	М	Tris-Acetat
(Agarosegelelektrophorese)	100	mM	EDTA (pH 8.0)
TBE (10x)	1	М	Tris
(Agarosegelelektrophorese)	0,9	М	Borsäure
	10	mМ	EDTA
X-Gluc-Färbelösung	50	mМ	NaPO₄-Puffer (pH 7.0)
(histochemischer GUS-Assay)	0,5	mМ	K-Ferrocyanid
	0,5	mМ	K-Ferricyanid
	10	mМ	EDTA
	0,1	%	Triton [®] X-100
	1	mМ	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β -D- glucuronid

3.1.9.2 Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium	10	g	Caseinhydrolysat
(E. coli-Nährmedium)	5	g	Hefeextrakt
	10	g	NaCl
	ad 1	l	H ₂ O
			рН 7.4

⁵Alle anderen in dieser Arbeit verwendete Lösungen und Puffer sowie deren Zusammensetzung sind dem Methodenabschnitt zu entnehmen.

LB-Festmedium	1	1	LB-Medium
(E. coli-Nährmedium)	15	g	Agar
YEP- Medium	10	g	Hefeextrakt
(Agrobakterien-Nährmedium)	10	g	Pepton
	5	g	NaCl
	ad 1	1	H ₂ O
			pH 7.5 mit NaOH
YEP- Festmedium	1	1	YEP-Medium
(Agrobakterien-Nährmedium)	15	g	Agar
SOC-Medium	2	0%	Trunton
(F coli-Transformation)	0.5	70 0/2	Hefeevtrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mМ	KCl
	10	mМ	MgCl ₂
	10	mМ	$MgSO_4$
	20	mМ	Glucose
	ad 1	1	H ₂ O

Zur Selektion von Bakterien wurden folgende Antibiotika verwendet:

100	mg/l	Ampicillin (Amp ¹⁰⁰)
30	mg/l	Kanamycin (Kan ³⁰)
50	mg/l	Kanamycin (Kan ⁵⁰)
100	mg/l	Spectinomycin (Spec ¹⁰⁰)
30	mg/l	Gentamycin (Gent ³⁰)

3.1.9.3 Medien für die Gewebekultur

MS-Medium ⁶ (2x)	8,8	g	Murashige & Skoog Medium
(Mais- und Arabidopsis-Gewebekultur)	d Arabidopsis-Gewebekultur)		mit Vitaminen (Duchefa)
	1	1	H ₂ O
			pH 6.0 mit KOH

4,4	g	Murashige & Skoog Medium mit Vitaminen (Duchefa)
5,98	mМ	L-Glutamin
1,3	mМ	Prolin
0,67	mМ	Asparagin
30	g	Saccharose
2	mg	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
1	l	H ₂ O
		pH 6.0 mit KOH
1,5	g	Phytagel
ad 250	ml	H ₂ O
100	ml	N6-Makrosalzlösung
2	ml	N6-Mikrosalzlösung
200	mg	Inositol
8	ml	Fe/Na-EDTA
2	ml	N6-Vitamine
200	mg	Casaminosäure
5,8	g	Prolin
3,8	mg	AgNO ₃
40	g	Saccharose
2	mg	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
	4,4 5,98 1,3 0,67 30 2 1 1 1,5 ad 250 100 2 200 8 2 200 8 2 200 8 2 200 5,8 3,8 40 2	4,4 g 5,98 mM 1,3 mM 0,67 mM 30 g 2 mg 1 l 1,5 g ad 250 ml 100 ml 2 ml 200 mg 8 ml 2 ml 200 mg 8 ml 2 ml 200 mg 5,8 g 3,8 mg 40 g 2 mg

Zur Herstellung von festem MS- oder N6.1.100.25-Medium wurde das Phytagel zunächst autoklaviert, das MS- und N6.1.100.25-Medium wurden steril filtriert. Das Phytagel wurde aufgekocht und mit dem gleichem Volumen MS- bzw. N6.1.100.25-Medium (2x) versetzt. Zur Modifikation wurde den Medien Sucrose (0,7 M, 2% oder 3%) oder/und Phosphinotricin (5 mg/l) zugegeben. Die Festmedien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

⁷ Nach Songstad *et al.*, 1992.

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht von Pflanzenmaterial

3.2.1.1 Zea Mays

Die Maispflanzen wurden entweder nach Aussaat in Einheitserde oder nach *in vitro*-Kultur im Gewächshaus unter folgenden, kontrollierten Bedingungen angezogen: 18°C Tag, 16°C Nacht, 16 Stunden Licht (23.000-25.000 lux), 55-95% Luftfeuchtigkeit.

Zur Anzucht etiolierter Maiskeimlinge wurden Maiskörner zunächst für 30 min in Na-Hypochlorid-Lösung (1% Na-Hypochlorid, 0,2% Mucasol) oberflächensterilisiert. Nach fünfmaligem Waschen mit sterilem H₂0 wurden die Maiskörner unter sterilen Bedingungen auf wassergetränktes Papier in Weckgläser gelegt und 7 Tage bei 26°C im Dunkeln gehalten.

Für das *Embryo Rescue*-Experiment wurden aus oberflächensterilisierten Maiskaryopsen 18 Tage nach der Befruchtung die Embryonen isoliert und daraus *in vitro* auf MS-Medium (3.1.9.3) unter kontrollierten Bedingungen (bis zur Keimung: 26°C im Dunkeln, bis zur Wurzelbildung: 16h Licht, 24°C) Pflanzen regeneriert. Diese wurden anschließend in Erde überführt und im Gewächshaus unter den oben beschrieben Bedingungen weiter kultiviert.

Die *Black Mexican Sweet-(BMS*)-Zellsuspensionskultur aus Mais wurde in MSO-Medium (3.1.9.3) bei 26°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 70 rpm im Dunkeln kultiviert. Eine Subkultivierung erfolgte nach 7 Tagen in frischem MSO-Medium. (Zur Kultivierung der *BMS*-Zellen auf Festmedium wurde das MSO-Medium mit 3g/l Gelrite[™] (Duchefa, Harlem, Niederlande) verfestigt. Die Suspensionszellen werden bei 26°C im Dunkeln inkubiert und vierzehntägig umgesetzt.)

3.2.1.2 Arabidopsis thaliana

Die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* erfolgte überwiegend auf einem Gemisch aus gleichen Teilen Sand und Einheitserde.

Zur *in vitro* Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die Samen 3 min in 70% (v/v) Ethanol und anschließend 2 min in Na-Hypochlorid-Lösung (1% Na-Hypochlorid, 0,2% Mucasol) oberflächensterilisiert. Zur Entfernung der Chemikalien-Reste wurden die Samen fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen und unter sterilen Bedingungen auf dem entsprechenden MS-Medium gleichmäßig ausgelegt. Nach Erreichen des Vierblattstadiums wurden die Pflanzen auf Erde umgesetzt.

Die Kultivierung erfolgte in einer Phytokammer unter folgenden Langtagbedingungen: 16 h Licht (150 μE m⁻²s⁻²), 22-24°C, 60-70% Luftfeuchtigkeit.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie z.B. Ethanolfällung, Phenol-Chloroform-Extraktion, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Agarosegelelektrophorese, sowie die Herstellung allgemeiner Medien und Puffer wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von Enzymen und Kits wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Herstellerangaben verfahren.

3.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus Pflanzengewebe im Minimaßstab wurde mit Hilfe des *Plant Genomic DNA Mini Kits* (Avegene, Taiwan) durchgeführt. Die Zerkleinerung des Gewebes zu einem feinen Pulver erfolgte in der Schwingmühle MM300 der Firma Retsch (Haan). Dazu wurde das frisch entnommene Gewebe (ca. 100 mg Frischgewicht) in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit zwei Stahlkugeln (Ø 5 mm) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und durch 1,5-minütiges Schütteln (30 Schwingungen/sec) zermahlen.

Die Gewinnung hochqualitativer gDNA im größeren Maßstab (50 – 100 μg per Gramm Gewebe) erfolgte nach der von Dellaporta *et al.* (1983) beschriebenen Methode. Genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen im Minimaßstab erfolgte unter Verwendung des *High-speed Plasmid Mini Kits* (Avegene, Taiwan).

Zur Gewinnung hochqualitativer Plasmid-DNA zwecks Pflanzentransformation fand der *Plasmid Midi Kit* (Avegene, Taiwan) eine Anwendung.

Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Gesamt-RNA wurde aus diversen Pflanzengeweben nach der von Kluth *et al.* (2002) beschriebenen Methode extrahiert. Alternativ wurde die "Trizol-Methode" nach dem Protokoll von Chomecynski *et al.* (1987) angewendet. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch ermittelt und durch Agarosegelelektrophorese verifiziert.

Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.2.4 Reinigung von RNA

Zur Entfernung störender Verunreinigungen wie z.B. Ethanol-, Phenol- oder Chloroform-Reste, welche eine hemmende Wirkung auf die anschließende enzymatische Reaktion haben könnten, wurde die extrahierte RNA in manchen Fällen einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Hierzu fand der Kit *NucleoSpin® RNA Clean-up XS* (MACHEREY-NAGEL, Düren) eine Anwendung.

3.2.2.5 Klonierungen

Klonierung von Expressionskonstrukten

Alle Klonierungen wurden standardmäßig wie folgt durchgeführt. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels *Pfu*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und spezifischer Oligonukleotide, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, amplifiziert. Nach Verifizierung der richtigen Fragment-Größe durch Agarosegelelektrophorese wurde das PCR-Produkt aus dem Gel mit Hilfe der Kits *NucleoSpin*® *Extract II* (MACHEREY-NAGEL, Düren) oder *Gel/PCR DNA Fragments*

Extraction Kit (Avegene, Taiwan) isoliert und einer Restriktion unter Verwendung der entsprechenden Restriktionsendonukleasen unterzogen. Parallel dazu wurde der Zielvektor mit den entsprechenden Enzymen restringiert und dessen 5'-Enden mit Hilfe der calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) dephosphoryliert. Der auf diese Weise präparierte Vektor wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus diesem eluiert. Nach Konzentrationsbestimmung beider DNA-Fragmente wurden diese unter Verwendung der T4-DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) ligiert und in E. coli-Zellen transformiert. Alle klonierten **DNA-Fragmente** wurden nach Plasmid-Isolierung durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

TOPO®-TA-Klonierung

Die Klonierung mittels *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) bzw. *Advantage*[®]2 *Polymerase Mix* (Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich) amplifizierter PCR-Produkte zwecks *in vivo* Fragment-Amplifikation und -Sequenzierung erfolgte in den Vektor *pCR*[®]2.1.TOPO[®] unter Anwendung des *TOPO*[®]*TA Cloning Kits* der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande).

3.2.2.6 Southern Blot-Analyse

Die Methode der Southern Blot-Hybridisierung wurde verwendet, um das Vorhandensein eines Transgens innerhalb des Genoms nachzuweisen bzw. dessen Kopienzahl zu ermitteln. Dazu wurde zunächst 15 μ g restringierte gDNA auf einem 0,8%-igen Agarosegel bei geringer Spannung (25 V) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 5 min in 250 mM HCl, zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCl pH7.2, 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA) geschwenkt. Der DNA-Transfer auf eine *Hybond NX-Nylon Membran* (GE-Healthcare, Freiburg) erfolgte über Nacht mittels Kapillarkräften unter Verwendung von 20x SSC. Die Membran wurde anschließend 2 min in 2x SSC gewaschen und die DNA durch UV-Licht (1200 μ J/cm2) im Crosslinker (UVC-1000, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) kovalent an die Membran gebunden.

Der DNA-Nachweis erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit DIG-11-dUTPmarkierten DNA-Fragmenten (3.2.2.7). Die Durchführung der Hybridisierung, sowie die anschließende Chemilumineszenz-basierte Immunodetektion von Digoxigenin erfolgten gemäß Handbuch *The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation* (Roche Diagnostics, Mannheim).

Die Membran wurde auf *Hyperfilm™MP* (GE-Healthcare, Freiburg) bei Raumtemperatur exponiert.

3.2.2.7 Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch den direkten Einbau von DIG-11-dUTP in das gewünschte PCR-Produkt. Hierzu wurde das zu markierende DNA-Fragment in einem Standard-PCR-Ansatz (3.2.2.12) amplifiziert, wobei das in der dNTP-Mischung enthaltene dTTP gegen ein Gemisch aus 6,5 mM dTTP und 3,5 mM DIGdUTP ausgetauscht wurde.

3.2.2.8 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die Generierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente erfolgte unter Anwendung des *Prime It*®*II Random Primer Labeling Kits* (Stratagene, Heidelberg). Dazu wurde pro Markierungsreaktion 25-50 ng PCR-Produkt und 50 μ Ci [α ³²P]-dCTP (GE-Healthcare, Freiburg) eingesetzt. Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wurden *Nukleotide MicroSpin*TM*S-300 HR*-Säulen der Firma GE-Healthcare (Freiburg) verwendet.

3.2.2.9 Northern Blot-Analyse

Die elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte nach Sechzach *et al.* (1977) in einem 1%-igen (w/v) denaturierenden Agarosegel (6% (v/v) Formaldehyd, 1x MOPS, 20 ng/ml Ethidiumbromid) in 1x MOPS Laufpuffer (3.1.9.1). Der Transfer der RNA auf *Hybond*^M *XL-Nylonmembran* (GE-Healthcare, Freiburg) oder eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) erfolgte über Nacht mittels Kapillartransfer mit 20x SSC als Transferflüssigkeit. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran kurz in 2x SCC geschwenkt und im Crosslinker (UVC-1000, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) mit UV-Licht (1200 µJ/cm2) bestrahlt. Zur Beurteilung des Transfererfolges wurde die Membran 15 min in RNA-Färbelösung (0,3 M Natriumacetat,

0,05% (w/v) Methylenblau) inkubiert und die RNA durch Differenzierung mit H₂O sichtbar gemacht.

Hybridisierung der Northern-Membran mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Die Membran wurde zunächst 3 h bei 68°C in Prähybridisierungslösung (1 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 70 µg/ml denaturierte Fischsperma-DNA) unter Rotation inkubiert. Die ³²P-markierte Sonde wurde für 5 min auf 100°C erhitzt, sofort auf Eis gekühlt und vorsichtig am Rand der Hybridisierungsröhre in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht in einem Hybridisierungsofen unter ständiger Rotation.

Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurde die Membran 10 min bei 68°C mit vorgewärmtem W1-Puffer (1x SSC) und zweimal 7 min bei 68°C mit vorgewärmtem W2-Puffer (1x SSC, 1% (v/v) SDS) gewaschen. Abschließend wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt und in einem durchsichtigen Plastikbeutel eingeschweißt.

Die Exposition auf *Hyperfilm™MP* (GE-Healthcare, Freiburg) mit unterschiedlichen Zeiten erfolgte bei -80°C.

Hybridisierung der Northern-Membran mit DIG-markierten antisense-Transkripten

Die Herstellung der DIG-markierten *antisense*-Transkripte, die Hybridisierung der Membran sowie die immunologische Detektion der RNA-Sonden-Hybride erfolgten mit Hilfe von *DIG Northern Starter Kit* der Firma Roche (Mannheim).

Die Membran wurde auf *Hyperfilm™MP* (GE-Healthcare, Freiburg) bei Raumtemperatur exponiert.

3.2.2.10 Dot Blot-Analyse von RNA

Je 1 µl der aus der Ko-Immunopräzipitation (3.2.3.10) gewonnenen "Pellet"- und "Überstand"-RNA wurden auf *Hybond*TM *XL-Nylonmembran* (GE-Healthcare, Freiburg) aufgetragen und mittels UV-Strahlung fixiert (3.2.2.9). Die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde sowie die anschließende Exposition erfolgten analog zu 3.2.2.9.

3.2.2.11 Reverse Transkription und RT-PCR

Die Erststrang-cDNA wurde abhängig von der nachfolgenden Anwendung mit Hilfe verschiedener cDNA-Synthese-Kits generiert. Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Reverse Transkription standardmäßig 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Für die Transkriptanalyse der *Mu*-Transposon-induzierten Maismutantenlinien wurde Gesamt-RNA aus Maiskörnern extrahiert (3.2.2.3) und unter Anwendung des *SMART*TM *RACE cDNA Amplification Kits* (Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich) und der *PrimeScript*TM *Reverse Transcriptase* (Takara Bio Inc, Gennevilliers, Frankreich) zunächst 5'- und 3'-RACE-(<u>Rapid Amplification of cDNA Ends</u>)-*Ready*-cDNA synthetisiert. Die anschließende 5'- und 3'-RACE-PCR sowie die darauf folgende 5'- und 3'-RACE-*nested*-PCR wurden entsprechend mit Primer Muoligo1 bzw. dem *nested*-Primer Muoligo2 durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen erfolgten gemäß Benutzerhandbuch des *SMART*TM *RACE cDNA Amplification Kits* unter Anwendung des *Advantage*®2 *Polymerase Mix* (Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich).

Zur Analyse Protein-assoziierter RNAs wurden 3 µl der aus der Ko-Immunopräzipitation gewonnenen "Pellet"-RNA (3.2.3.10) zunächst mittels *E. coli Poly(A) Polymerase* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) polyadenyliert, aufgereinigt (3.2.2.4) und mit Hilfe des *Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits* (Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich) und der *PrimeScript™ Reverse Transcriptase* (Takara Bio Inc, Gennevilliers, Frankreich) revers transkribiert. Die anschließende cDNA-Amplifikation durch *long distance* RT-PCR erfolgte mit dem *Advantage*®2 *Polymerase Mix* (Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich).

Zur Untersuchung mitochondrialer Transkripte wurde eine Erststrang-cDNA-Synthese mit dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche, Mannheim) vorgenommen. Hierzu wurden 4 μ g Gesamt-RNA zunächst mit *RNase-free DNase I* (Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt und unter Verwendung von *random hexamer* Primer revers transkribiert. Für die anschließende RT-PCR wurde 1 μ l Erststrang-cDNA als *Template* eingesetzt.

3.2.2.12 Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die selektive Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte wurde eine Standard-PCR unter Verwendung von *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot), *Pfu*-Polymerase
(Fermentas, St. Leon-Rot) oder *Advantage*[®]*2 Polymerase Mix* (Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich) durchgeführt. Als *Template* wurde Plasmid-DNA, cDNA oder gDNA eingesetzt. Die 50 µl-Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Taq- und *Pfu-*Polymerase-Ansatz

- x µl Template-DNA (0,2 100 ng)
- 5 μl *Taq*-Puffer (10x) oder *Pfu*-Puffer (10x) + MgSO₄
- 1 μ l Fw-Primer (10 μ M)
- 1 μ l Rev-Primer (10 μ M)
- 1 μ l dNTPs (10 mM je dNTP)
- 1 μl DMSO (100%)
- 6 μ l MgCl₂ (25 mM) nur bei *Taq*
- 1 μl *Taq*-Polymerase LC (1U/μl) oder *Pfu*-Polymerase (2,5 U/μl)

ad 50 μ l H₂O

Advantage®2 Polymerase Mix-Ansatz

- x μ l Template-DNA (0,2 100 ng)
- 5 μl Advantage-PCR-Puffer (10x)
- 1 μ l Fw-Primer (10 μ M)
- 1 μ l Rev-Primer (10 μ M)
- 1 μ l dNTPs (10 mM je dNTP)
- 1 μl Advantage[®]2 Polymerase Mix
- $ad \; 50 \quad \mu l \quad H_2 O$

Alle Standard-PCR-Programme leiteten sich von folgendem Schema ab:

1. Denaturierung	94°C	3 min		
2. Denaturierung	94°C	30 sec	5	
3. Primer-Annealing	opt. T°C	30 sec		18 – 35 Zyklen
4. Elongation	72°C	0,5 – 4 min		
5. Abschluss-Elongation	72°C	5 min		
6. Reaktionsstop	4°C	8		

Die *Annealing*-Temperatur lag 1°C bis 4°C unter der Schmelztemperatur der Primer (meist zwischen 58°C und 68°C). Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments und betrug 30 sec/kb (*Taq*-Polymerase) bzw. 1-2 min/kb (*Pfu*-Polymerase).

Die optimalen PCR-Bedingungen wurden durch Variieren der Annealing-Temperatur, MgCl₂-Konzentration, *Template*-Konzentration und Zyklenzahl gefunden.

3.2.2.13 In vitro Transkription

Die *in vitro* Synthese von RNA, die als Sonde in Northern Blot-, EMSA- oder Northwestern-Analysen diente, erfolgte mit Hilfe der *T7 RNA Polymerase*. Dazu wurde zunächst die T7-Promotorsequenz, welche in dem Überhang-Primer enthalten war, mittels PCR in das gewünschte DNA-Fragment eingebaut. Je nachdem, ob ein *sense*-(EMSA und Northwestern) oder *antisense*-Transkript (Northern Blot) erwünscht war, wurde der T7-Promotor mit Hilfe des *forward*- bzw. *reverse*-Primers eingebaut.

Die Generierung von DIG-markierten RNA-Sonden erfolgte unter Anwendung des *DIG Northern Starter Kits* (Roche, Mannheim), während die Synthese "kalter", nicht markierter RNA, welche als spezifischer Kompetitor in dem EMSA-Experiment diente, mit Hilfe der *T7 RNA Polymerase* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) geschah.

3.2.2.14 Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma DNA-Cloning Service (Hamburg) durchgeführt.

3.2.2.15 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Auswertung und Editierung von DNA-Sequenzierungen erfolgte mit den Softwaren *FinchTV* (Geospiza Inc.) und *DNASTAR 4.05* (DNA Star Inc, USA). Die Analyse von DNA-Sequenzen im Hinblick auf vorhandene Restriktions-Schnittstellen wurde mit dem Programm *NEBcutter V2.0* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) durchgeführt. Für die Darstellung von Alignments wurde *GeneDoc* (Nicholas und Nicholas, 1997) und *ClustalW2* (Larkin *et al.*, 2007) verwendet. Die Vorhersage von Signalpeptiden erfolgte mit *targetP* (Emanuelsson *et al*, 2007) und *Predotar* (Small *et al.*, 2004). Ferner wurden folgende Internet-Ressourcen verwendet: NCBI blast (Mcginnis und Madden, 2004), TAIR (Swarbreck, 2008), T-DNA Express (Alonso *et al.*, 2003), ExPASy Proteomics Server (Gasteiger *et al.*, 2003), PlantRBP/POGs (http://plantrbp.uoregon.edu/).

3.2.3 Analyse von Proteinen

3.2.3.1 Mitochondrien-Isolierung aus etiolierten Maiskeimlingen

Die Mitochondrien-Extraktion aus etiolierten Maiskeimlingen erfolgte in Anlehnung an die von Takenaka und Brennicke (2007) beschriebene Methode. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, Gefäße und Puffer wurden vorgekühlt.

10 g etiolierte Keimlinge wurden in 30 ml Extraktionspuffer (0,3 M Mannitol, 30 mM MOPS, 1 mM EGTA, pH7.8 mit KOH, frisch dazu 0,1% (w/v) BSA und 2 mM DTT) mit Hilfe eines *Warring-Blendors* zerkleinert (2x 5 sec höchste Stufe) und durch vier Lagen Miracloth (Calbiochem ,La Jolla, CA) filtriert. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde das Filtrat auf zwei sterile 30 ml Zentrifugen-Röhrchen verteilt und mehreren aufeinanderfolgenden niedertourigen Zentrifugations-Schritten (10 min/600g, 10 min/1.300g und 10 min/2.100g) unterworfen. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig in frische Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Mitochondrien wurden im Anschluss sedimentiert (20 min/7.000g), das Mitochondrienpellet in 50 ml Extraktionspuffer (ohne BSA) vorsichtig resuspendiert und erneut pelletiert (20 min/7.000g). Die Mitochondrien wurden in 2 ml Extraktionspuffer (ohne BSA) aufgenommen, auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und sedimentiert (10 min/20.000g). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Mitochondrienpellet in flüssigem N₂ schockgefroren.

Die isolierten Mitochondrien wurden bei -80°C gelagert.

Zur Analyse der Mitochondrien-Proteine wurde das Mitochondrien-Pellet in 150 μ l *Strep*-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) und 50 μ l 4x *NuPAGE LDS Sample Buffer* (Invitrogen, Groningen, Niederlande) aufgenommen, 10 min bei 70°C erhitzt und direkt für die SDS-PAGE eingesetzt.

3.2.3.2 Proteinextraktion aus Pflanzengewebe

Die Gewebezerkleinerung erfolgte in der Schwingmühle analog zu 3.2.2.1. Frisch homogenisiertes Gewebe wurde mit etwa dem gleichen Volumen Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,5% (v/v)

Triton[®]X-100, *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Mannheim)) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Sedimentation (15 min/4°C/20.000g) wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung des *BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad, München). Rinderserumalbumin (BSA) (Fermentas, St. Leon-Rot) diente als Referenz.

3.2.3.3 Überexpression rekombinanter Proteine in E. coli

Die Überexpression rekombinanter Proteine erfolgte ausschließlich im *E. coli*-Stamm BL21[DE3] mit Hilfe der Expressionsvektoren pET30a und pET41b(+) der Firma Novagen (Darmstadt).

Mit einer frisch transformierten BL21(DE3)-Kolonie wurde zunächst eine 2 – 50 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. 0,1 – 2 L LB-Medium wurden mit der Vorkultur (2 ml Vorkultur pro 100 ml LB-Medium) beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bei 37°C und 180 rpm angezogen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 3 – 5 h. Im Falle einer nachfolgenden nativen Protein-Aufreinigung wurde die Bakterienkultur vor der Induktion der Proteinexpression 30 min auf Eis gekühlt, erst dann mit IPTG induziert und bei 22°C/180 rpm inkubiert. Die Überexpression zwecks denaturierender Aufreinigung erfolgte bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (15 min/4°C/5.000 rpm) sedimentiert und entweder bei – 20°C gelagert oder für die Protein-Aufreinigung weiterverwendet.

Zur Analyse der Expressionseffizienz wurde je 1 ml Aliquots vor und nach der Induktion aus der Bakteriensuspension entnommen und auf eine OD_{600nm} von 0,5 mit LB-Medium eingestellt. Die Zellen aus je 1 ml-Suspension wurden abzentrifugiert (2 min/RT/20.000g) und das Zellsediment in 75 µl *Strep*-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) und 25 µl 4x *NuPAGE LDS Sample Buffer* (Invitrogen, Groningen, Niederlande) aufgenommen. Bis zur SDS-PAGE-Analyse wurden die Proteinproben bei -20°C bewahrt.

3.2.3.4 Native Aufreinigung rekombinanter GST-Strep-Tag-Proteine aus E. coli

Zur Isolierung besonders reiner, rekombinanter Proteine wurden diese mit einem Nterminalen GST- sowie einem C-terminalen *Strep*-Tag fusioniert und zwei hintereinander folgenden Affinitätschromatographie-Schritten unterzogen.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Aufreinigungs-Schritte bei 4°C durchgeführt. E. coli-Zellen aus 450 ml Expressionskultur wurden in 15 ml GST-Lysispuffer (4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim), pH 7.3) resuspendiert, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurde anschließend in flüssigem N2 schockgefroren, bei 37°C aufgetaut und viermal 15 Sekunden (mit 30sekündigen Kühlintervallen) bei 20-30 Watt Ausgangsleistung mit einem Branson Sonifier 250 (Hannover) aufgeschlossen. Zur Gewinnung eines klaren Lysats wurden die zellulären Bestandteile abzentrifugiert (15 min/4°C/20.000g) und der Kulturüberstand durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm steril filtriert. Das Lysat wurde mit 400 µl *GST-Bind*[™] *Resin* (Novagen) versetzt, 1 h bei niedriger Geschwindigkeit im Über-Kopf-Schüttler inkubiert und nachfolgend auf eine 10 ml Chromatographie-Säule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) geladen. Der Fluss durch die Säule erfolgte über die Gravitationskraft. Nach dreimaligem Waschen mit je 5 ml GST-Lysispuffer wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 1 ml GST-Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM reduziertes Glutathion) eluiert.

Das Eluat wurde mit 100 µl *Strep-Tactin*-Matrix (IBA, Göttingen) versetzt, 1 h im Über-Kopf-Schüttler inkubiert und auf eine 10 ml Chromatographie-Säule geladen. Die Matrix wurde dreimal mit je 2 ml *Strep*-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen und das rekombinante Protein abschließend mit 300 µl *Strep*-Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert.

3.2.3.5 Denaturierende Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine aus E. coli

Für die Herstellung eines Anti-ZmPPR6-Antikörpers wurde eine denaturierende Protein-Aufreinigung aus 1,8 L Expressionskultur durchgeführt.

Die *E. coli*-Zellen wurden in 50 ml His-Lysispuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF) aufgenommen und durch einen

wiederholten Zyklus von Einfrieren (N₂) und wieder Auftauen (42°C) zum Platzen gebracht. Nach der Sonifizierung (3.2.2.14) wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min/15°C/20.000g) sedimentiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 10 mM β-Mercaptoethanol sowie 1% (v/v) Tween®20 versetzt. Das klare Lysat wurde dann mit 1 ml *Ni-NTA Agarose* (Qiagen, Hilden) vermengt, 1 h bei Raumtemperatur im Über-Kopf-Schüttler inkubiert und nachfolgend in eine 10 ml Chromatographie-Säule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) überführt. Nachdem das Zelllysat durchgeflossen war, wurde die *Ni-NTA Agarose* dreimal mit je 10 ml His-Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1% (v/v) Tween®20) gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte mit 4 ml His-Elutionspuffer (5,5 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% (v/v) Tween®20).

Die Herstellung des polyklonalen Anti-ZmPPR6-Antikörpers sowie eines Anti-RPS3-Peptid-Antikörpers (LKRRDKSRPGKDKGR) in Kaninchen wurden bei Eurogentec (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben.

3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden das *NuPage*[®] *Gel System* und die damit kompatiblen *NuPAGE*[®] *Novex*[®] *10% Bis-Tris Gels* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Proteinproben wurden mit entsprechendem Volumen 4x *NuPAGE LDS Sample Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und 10 min bei 70°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MES-Laufpuffer (50 mM MES, 50 mM Tris, 3,5 mM SDS, 1,0 mM EDTA) bei 30-50 mA pro Gel.

3.2.3.7 Coomassie-Färbung

Zur Sichtbarmachung elelektrophoretisch aufgetrennter Proteine in Polyacrylamidgelen wurden diese mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese 30 min in Coomassie-Färbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,1% (w/v) Coomassie-Brillant-Blau) geschwenkt und anschließend zur Klärung des Hintergrunds in Coomassie-Entfärbelösung (10% (v/v) Methanol, 10%(v/v) Eisessig) über Nacht inkubiert.

3.2.3.8 Semi-Dry Proteintransfer (Western Blot)

Durch Western-Transfer lassen sich Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf einer polymeren, proteinbindenden Membran immobilisieren und stehen somit für weitere Anwendungen (Immunodetektion, Northwestern) zur Verfügung.

Das zu blottende SDS-Gel wurde vermessen, in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20% (v/v) Methanol, 1,3 mM SDS, pH 9.2) überführt und darin 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Auf die Größe des Gels wurden 6 Filter-Papiere und eine *Hybond™ECL™* Nitrozellulose-Membran (GE-Healthcare, Freiburg) oder *Roti®-PVDF* Membran (Carl Roth, Kahrsruhe) zugeschnitten, in den Transferpuffer gegeben und 5 min darin äquilibriert. Im Falle eine PVDF-Membran, welche vorwiegend zum Transfer coomassie-gefärbter Proteine verwendet wurde, wurde diese vorher durch eine 30-sekündige Inkubation in Methanol aktiviert. Auf der unteren Elektrode des Elektroblots *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad Laboratories, München) wurde ein luftblasenfreies Sandwich aus 3 Lagen Filter-Papier, der Membran, dem SDS-Gel und weiteren 3 Lagen Filter-Papier aufgebaut und durch Auflegen der zweiten Elektrode sowie des Abschlussdeckels die Apparatur geschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA pro Gel (ca. 2 mA/cm2). Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der Größe der zu blottenden Proteine und lag zwischen 60 und 90 min.

Die Membran mit den darauf geblotteten Proteinen wurde direkt für die Immunodetektion oder den Northwestern weiterverwendet.

3.2.3.9 Immunodetektion

Die folgende Immunodetektions-Methode basiert auf dem *Western Blot Protocol* der Firma Novagen (2001).

Die Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde zunächst 5 min in 1x TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 7,5 mM NaCl) äquilibiriert und anschließend für 1 h in *Blocking*-Lösung (5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS) bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde zweimal 5 Minuten in 1x TBSTT (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween[®]20, 0,2% (v/v) Triton[®]X-100) und einmal 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran in *Blocking*-Lösung überführt, welche eine geeignete Primär-Antikörper-Konzentration enthielt und für

mindestens 60 min bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4° C geschüttelt. Die Membran wurde wie oben beschrieben gewaschen und dann 1 Stunde mit dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper in *Blocking*-Lösung inkubiert.

Anschließend wurde die Membran fünfmal 5 Minuten mit 1x TBSTT gewaschen. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mit dem *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Pierce, Perbio Science, Bonn). Hierzu wurde die Membran 5 min in einem Gemisch aus 500 µl Luminol, 500µl Peroxid-Puffer und 5-8 ml 1x TBSTT inkubiert, in einem klaren Plastikbeutel eingeschweißt und auf *Hyperfilm*^mMP (GE-Healthcare, Freiburg) exponiert.

3.2.3.10 Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) von Protein-RNA-Liganden

Zur Untersuchung der *in vivo* Assoziation von Proteinen mit ihren spezifischen RNA-Liganden wurde der Protein-RNA-Komplex mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern aus einem Proteinextrakt präzipitiert. Die aus dem Präzipitat isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, mittels *long distance*-RT-PCR amplifiziert und durch anschließende Sequenzierung identifiziert. Das Experiment wurde wie folgt durchgeführt.

Eine angereicherte Mitochondrien-Fraktion wurde aus etiolierten Maiskeimlingen der ZmPPR6-überexprimierenden Maislinie *pUbi-ZmPPR6:Strep*-2 gewonnen (3.2.3.1). Das Mitochondrienpellet wurde in eiskaltem Lysispuffer (30 mM HEPES-KOH pH7.7, 10 mM Mg Acetat, 60 mM K Acetat, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5% (v/v) Nonidet P-40, *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Mannheim)) resuspendiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und auf Eis aufgetaut. Das Lysat wurde 30 min auf Eis inkubiert und gelegentlich kurz gevortext. Die Membran-Trümmer wurden anschließend pelletiert (15 min/4°C/20.000g), der klare Mitochondrien-Proteinextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gekühlt.

100 µl *Dynabeads*[®] *Protein A* (Invitrogen, Niederlande) wurden zweimal mit 0,5 ml Ko-IP-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,5% (v/v) NP-40, *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Mannheim)) gewaschen und im Anschluss in 100 µl Ko-IP-Puffer aufgenommen. Zur Immobilisierung der Antikörper wurden 40 µl Anti-PPR6-Serum oder 40 µl Präimmunserum (Negativ-Kontrolle) zu den gewaschenen *Dynabeads*[®] *Protein A* gegeben und 2 h bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die *Dynabeads*[®] *Protein A* dreimal mit 500 µl Ko-IP- Puffer gewaschen, in 800 µl Ko-IP-Puffer (ergänzt mit 360 U *RiboLock™ RNase Inhibitor* (Fermentas, St. Leon-Rot)) aufgenommen und mit 100 µl Mitochondrien-Proteinextrakt (enthält ca. 1 mg Protein) versetzt. Die Ko-IP erfolgte über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler. Im Anschluss wurden die *Dynabeads® Protein A* mit Hilfe eines magnetischen Separators pelletiert und der Überstand zur Isolierung der "Überstand"-RNA verwendet. Zur Gewinnung der "Pellet-RNA" wurden die pelletierten *Dynabeads® Protein A* sechsmal mit 1 ml Ko-IP-Puffer gewaschen, in 200 µl des selben Puffers aufgenommen und nach Zugabe von 1% (v/v) SDS sowie 10 mM EDTA 30 min bei 55°C inkubiert. Die "Pellet"- und "Überstand"-RNAs wurden Phenol-Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 750 µl Ethanol 100%, 80 µl Na-Acetat 3 M pH 5.2, 13 µl LiCl 8 M und 1,3 µg Glycogen über Nacht bei -80°C präzipitiert. Die RNA wurde pelletiert (30 min/20.000g/4°C) und die RNA-Pellets in je 10 µl H₂0 aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnen RNA wurde entweder für Dot Blot-Analysen (3.2.2.10) oder cDNA-Synthese (3.2.2.11) eingesetzt.

3.2.3.11 Electrophoretic Mobilty Shift Assay (EMSA)

Die *in vitro* Interaktion von putativen RNA-bindenden Proteinen und ihren RNA-Liganden wurde mittels EMSA untersucht. Diese Technik basiert auf der Veränderung des Laufverhaltens markierter Nukleinsäuren während der Elektrophorese, wenn diese als Nukleinsäure-Protein-Komplex vorliegen.

Das rekombinante Protein wurde zunächst in *E. coli* überexprimiert (3.2.3.3) und mittels Affinitätschromatographie (3.2.3.4) aufgereinigt. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde wie in Abschnitt 3.2.2.7 beschrieben hergestellt. Die Bindungsreaktionen (25 μ l) wurden in 1x EMSA-Puffer (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 0,25 mg/ml BSA, 5 μ g/ μ l HefetRNA, 4 mM Dithiothreitol) durchgeführt. Die verwendeten Protein- und RNA-Konzentrationen sind in Abschnitt 4.7.3 in Abb. 4-22 aufgeführt. Die "kalte" sowie die DIG-markierte RNA-Sonde wurden vor der Zugabe in das Reaktionsgemisch für 3 min bei 94°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Die Bindungsreaktionen wurden 20 min bei 25°C inkubiert, anschließend mit 3 μ l 10 x RNA-Ladepuffer (50% Glycerol, 100 mM Tris-HCl pH7.5, 0,15% Orange G, 50 mM EDTA) versetzt und sofort auf ein 2%-iges MetaPhor® Agarosegel (Biozym, Hessisch Oldendorf) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht in 1x TBE-Puffer (Invitrogen, Niederlande) bei 4°C und einer elektrischen Spannung von 35 V. Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) sowie die anschließende RNA-Fixierung erfolgten wie im Abschnitt (3.2.2.9) beschrieben. Die Anti-DIG-Antikörper-basierte Detektion der DIG-markierten RNA-Sonde sowie der anschließende Chemilumineszenz-Antikörper-Nachweis wurden mit Hilfe von *DIG Northern Starter Kit* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Exposition der Membran auf *Hyperfilm™MP* (GE-Healthcare, Freiburg) erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.3.12 Northwestern-Analyse

Die Northwestern-Analyse dient der Identifizierung von RNA-Protein-Komplexen. Sie basiert auf der Fähigkeit markierter RNA mit auf einer Membran immobilisierten Proteinen zu interagieren. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Gesamt-Proteinextrakte verwendet werden können, was eine Aufreinigung des zu untersuchenden RNA-bindenden Proteins überflüssig macht.

Zur Gewinnung von Gesamt-Protein aus einer *E. coli*-Überexpressionskultur wurden die Zellen einer 1 ml Zellkultur ($OD_{600} = 0,7$) pelletiert (2 min/20.000g/RT) und in 150 µl Strep-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 4x LDS Sample Buffer (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Zellen durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C lysiert und gleichzeitig deren Proteine denaturiert. 5 µl, 10 µl und 20 µl von dem auf diese Weise gewonnen Gesamt-Protein wurden mittels SDS-PAGE (3.2.3.6) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.3.8). Zur Renaturierung der Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Renaturierungs-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 % (v/v) NP-40) geschwenkt. Nach viermaligem Waschen in Renaturierungs-Puffer für je 15 min wurde die Membran zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen 1 h bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7.5, 5 mM Mg-Acetat, 2 mM DTT, 5 % (w/v) BSA, 0.01 % (v/v) Triton[®]X-100 und 100 μ g/ml Hefe-tRNA) inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran mit 350 ng DIG-markierter RNA in 10 ml Blocking-Puffer (ohne BSA) 2 h bei 4°C hybridisiert und anschließend viermal 5 min in Blocking-Puffern (ohne BSA) gewaschen. Die Detektion der Protein-gebundenen DIG-RNA-Sonde erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2.9 beschrieben.

3.2.4 Transiente, biolistische Transformation von Pflanzen

Zur Untersuchung der subzellulären Protein-Lokalisation wurden transiente, biolistische Transformationen verschiedener Gewebetypen mit GFP- und DsRed-Fusionskonstrukten vorgenommen.

3.2.4.1 Fällungsansätze

Die Goldpartikel mit einem Durchmesser von 0,4 – 0,8 µm (Heraeus, Karlsruhe) wurden dreimal in Ethanol gewaschen, in H₂O aufgenommen, zu Einheiten von je 50 µl (ca. 2,5 mg Gold) in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zu einem Goldpartikel-Aliquot wurden 5 µg Plasmid-DNA gegeben und 1 min lang gevortext. Im Deckel des Reaktionsgefäßes wurden 50 µl CaCl₂ (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M) vermischt. Unmittelbar nach dem Verschließen des Deckels wurde der Fällungsansatz 1 min lang auf dem Vortex gründlich gemischt. Nach einer 10-sekündigen Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, die pelletierten Goldpartikel in 250 µl Ethanol gewaschen und nach erneutem Pelletieren in 120 µl Ethanol aufgenommen.

3.2.4.2 Biolistische Transformation und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Transformation wurden Epidermiszellen von Frühlingszwiebeln (*Allium fistulosum* L.) und *BMS*-Zellen (3.2.1.1) eingesetzt.

Für jeden Beschuss wurden je 10 µl des vollständig resuspendierten Fällungsansatzes auf einen *Macrocarrier* aufgetragen und in der biolistischen Kammer des *PDS-1000/He BIOLISTIC*® *PARTICLE DELIVERY SYSTEMs* der Firma BioRad (München) auf der zweiten Schiene von oben positioniert.

Transformation von Allium fistulosum L.

Ein ca. 2 cm langes Stück des weißen Stängelteils der Frühlingszwiebel wurde herausgeschnitten, der Länge nach halbiert und die innersten Schichten entfernt. Das Zwiebelstück wurde mit der Innenseite nach oben auf Wasseragar gelegt und durch leichtes Andrücken fixiert. Die Transformation erfolgte mit einem Druck von 1.100 psi in der fünften Schiene von oben. Im Anschluss wurden die Zwiebeln mit der Innenseite nach unten auf feuchtes, saugfähiges Papier überführt und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 16 h wurde die beschossene Epidermisschicht abgezogen und auf einem mit Wasser beschichteten Objektträger überführt.

Transformation von BMS-Zellen

Eine dünne *BMS*-Zellschicht mit einem Durchmesser von ca. 1 cm wurde auf osmotisches Medium (N6.1.100.25 (3.1.9.3), 0,7 M Sucrose) verteilt und 3 h darauf inkubiert. Die Zellen wurden in der vierten Schiene von oben mit einer Partikel-Beschleunigung von 1.350 psi transformiert, anschließend auf dem osmotischen Medium bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und am darauf folgenden Tag auf einem Objektträger in Wasser mikroskopiert.

Die Visualisierung der Fluoreszenzsignale erfolgte am Mikroskope *Imager.Z1 AX10* der Firma Zeiss (Jena) bei 63-facher Vergrößerung mit einem GFP- (Anregung: 450-490 nm, Strahlteiler: 495 nm, Emission: 500-550 nm) und einem DsRed-Filtersatz (Anregung: 538-562 nm, Strahlteiler: 570 nm, Emission: 570-640 nm). Überstrahlungen aus den anderen Fokusebenen wurden mit dem Einsatz eines *ApoTomes* vermieden. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit dem Software *AxioVision 4.8* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

Des Weiteren fand das Inversmikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss (Jena), ausgestattet mit einem GFP- (Anregung BP 470/40 nm, Emission: BP 525/50nm) und einem DsRed-Filtersatz (Anregung BP 546/12nm, Emission: LP 590 nm), einer Nikon DS-5M CCD-Kamera und der zugehörigen Software Eclipsenet (Nikon, Tokyo, Japan) eine Anwendung.

3.2.5 Stabile Transformation von Pflanzen

3.2.5.1 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Arabidopsis thaliana

Es wurden zunächst chemisch kompetente *Agrobakterien* des Stammes *GV3101* hergestellt. Dazu wurden 50 ml YEP/Gent³⁰/Kan⁵⁰-Medium mit einer selektiven 2 ml-Vorkultur beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 28°C/150 rpm angezogen. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min/RT/5.000 rpm), das Zellsediment in 10 ml 0,15 M NaCl resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min/RT/5.000 rpm). Die Zellen wurde in 1 ml eiskaltem 20 mM CaCl₂ resuspendiert, mit 15% (v/v) Glycerol versetzt und als 200 μ l-Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren. Die kompetenten *Agrobakterien* wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein *Agrobakterien*-Aliquot 10 min auf Eis aufgetaut, mit 1 μg zu transformierender, zirkulärer Plasmid-DNA versetzt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach Einfrieren des Transformationsansatzes in flüssigem Stickstoff erfolgte ein dreiminütiger Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend auf einer YEP/Gent³⁰/Kan⁵⁰/Spec¹⁰⁰-Agarplatte ausplattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert.

Die stabile *Agrobakterien*-vermittelte *Arabidopsis*-Transformation wurde in Anlehnung an die von Clough und Bent (1998) beschriebene Blütentauch (*floral dip*)-Methode wie folgt durchgeführt.

Die zu transformierenden *Arabidopsis*-Pflanzen (30-40) wurden auf Erde angezogen (3.2.1.2). Zur Gewinnung einer möglichst hohen Anzahl von Blütentrieben wurden Primär- und Sekundärinfloreszenzen abgeschnitten.

Mit einer Einzelkolonie wurden 20 ml YEP/Gent³⁰/Kan⁵⁰/Spec¹⁰⁰-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 28°C und 150 rpm angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min/RT/5.000 rpm) und in 20 ml YEP-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 0,6 g Sucrose und 10 μ l Silwet L-77 wurde die gesamte *Agrobakterien*-Suspension mit Hilfe einer Pipette wiederholt auf die noch geschlossenen Blüten gegeben. Die transformierten Pflanzen wurden mit einer Plastiktüte zugedeckt, für 24 h dunkel gestellt und anschließend bis zum Reifen der Samen unter Langtagbedingungen (3.2.1.2) kultiviert.

Die T₁-Generation wurde auf Erde angezogen und transgene Pflanzen im Vierblattstadium durch Besprühen mit Herbizid-Lösung (250 mg/L Phosphinothricin, 0,1% (v/v) Tween®20) selektiert. Die Herbizid-Behandlung wurde insgesamt dreimal im Abstand von 2 bis 3 Tagen wiederholt.

3.2.5.2 Biolistische Transformation von Zea mays

Die Generierung transgener Maispflanzen erfolgte mittels biolistischer Transformation von embryogenem Kallusgewebe. Als Ausgangsmaterial dienten hierzu Embryonen aus einer Kreuzung der Maislinien A188 und H99. Die Transformation sowie die darauf folgende Regenerierung transgener Pflanzen wurden nach Brettschneider *et al.* (1997) durchgeführt.

3.2.6 Histochemischer GUS-Assay

Ein histochemischer GUS-Assay wurde zur optischen Identifizierung der ß-Glucuronidase-Aktivität in stabil transformierten Maispflanzen durchgeführt. Dazu wurde transgenes Gewebe mit X-Gluc-Färbelösung (3.2.9.1) überschichtet und 24 h bei 37°C inkubiert. Für die bessere Sichtbarkeit der GUS-Signale in grünem Gewebe wurde das Chlorophyll mit einem Gemisch aus Ethanol und Essigsäure (3:1) für 2 bis 4 h bei 50°C entfernt. Die Dokumentation erfolgte mikroskopisch oder durch Einscannen des Gewebes.

3.2.7 Histologische Analyse von Maiskörnern

Die Morphologische Analyse von Maiskörnern wurde nach Hueros *et al.* (1995) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet folgende Schritte: Gewebefixierung, Einbettung der Körner in Paraffin, Herstellung von Mikrotomschnitten, Waschen und Färben der Schnitte.

3.2.7.1 Gewebefixierung

Zur Herstellung des Fixativs wurden 100 ml PBS-Puffer (28 mM NaH₂PO₄, 72 mM Na₂HPO₄, pH 7.2) mit 4 g Paraformaldehyd versetzt und solange bei 70°C geschüttelt, bis das Paraformaldehyd vollständig gelöst war. Die Lösung wurde durch Miracloth (Calbiochem ,La Jolla, CA) filtriert, auf Eis gekühlt und mit 0,1% (v/v) Glutaraldehyd versetzt.

Maiskörner im Alter von 12 bis 18 Tagen nach der Befruchtung wurden zur besseren Penetration des Fixativs seitlich parallel zur Embryoachse getrimmt und in ein Glasgefäß mit 10 ml eiskaltem Fixativ gegeben. Nach der Präparation aller Körner wurde das Fixativ durch frisches ersetzt und die Körner 16-24 h bei 4°C darin inkubiert. Nach dem Fixiervorgang wurden die Proben zweimal 15 min in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und wie folgt mittels Ethanol unter Eiskühlung dehydriert:

- Zweimal 20 min in 10% Ethanol
- Zweimal 20 min in 20% Ethanol
- Zweimal 20 min in 30% Ethanol
- Zweimal 20 min in 40% Ethanol
- Zweimal 20 min in 50% Ethanol
- Zweimal 20 min in 60% Ethanol
- Zweimal 30 min in 70% Ethanol
- Zweimal 20 min in 80% Ethanol
- 60 min in 100% Ethanol
- 45 min in 3:1 Ethanol/Xylol
- 45 min in 1:1 Ethanol/Xylol
- 45 min in 1:3 Ethanol/Xylol
- 60 min in 100% Xylol

3.2.7.2 Einbettung

Im Anschluss an die Dehydrierung erfolgte eine sukzessive Körner-Paraffinierung. Dazu wurden die Körner 16 Stunden bei Raumtemperatur, 4 Stunden bei 30°C und über Nacht bei 42°C jeweils in Paraffin (*Paraplast Plus*, Roth, Karlsruhe) gesättigtem Xylol inkubiert. Das *Paraplast Plus*/Xylol-Gemisch wurde anschließend gegen frisch geschmolzenes *Paraplast Plus* ausgetauscht und die Proben 3 Tage bei 60°C darin inkubiert. Das *Paraplast Plus* wurde jeweils morgens und abends durch frisches ersetzt.

Die Körner wurden in mit geschmolzenem *Paraplast Plus* gefüllte Wägschalen überführt und mit Hilfe einer zuvor erhitzten Pinzette orientiert. Zur Aushärtung des Paraffins wurden die Wägschalen auf Eis gestellt.

Die auf diese Weise eingebetteten Maiskörner wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.7.3 Herstellung von Mikrotom-Schnitten

Ca. 2 cm³ gewebehaltige Blöcke wurden mit Hilfe eines zuvor erhitzten Skalpells zurechtgeschnitten und auf Holzblöckchen fixiert. Die Gewebeblöcke wurden im Mikrotom (38160, Leitz Wetzlar, Deutschland) eingespannt und Schnittbänder mit einer Schnittbreite von 12 µm angefertigt. Diese wurden anschließend mit Hilfe eines feinen Pinsels auf mit Wasser beschichtete Objektträger (*Superfrost-Plus™*, Roth, Karlsruhe) überführt und auf eine 42°C Heizplatte gelegt. Zur vollständigen Streckung der Schnittbänder wurden diese über Nacht auf der Heizplatte belassen und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.7.4 Waschen und Färben der Gewebeschnitte

Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Gewebeproben folgenden Schritten unterzogen:

- Zweimal 10 min in 100% Xylol
- Zweimal 10 min in 100% Ethanol
- 5 min in 70% Ethanol
- 5 min in 50% Ethanol
- 5 min in 30% Ethanol
- 5 min in PBS-Puffer

Anschließend wurden die Schnitte mit Azur B (Trimethylthionin) oder mit dem PAS (*Periodic Acid Schiffs*)-Reagenz der Firma Roth (Karlsruhe) gefärbt.

Färbung mit Azur B

Mit Azur B wurden Primär-, Sekundärzellwände und Zellkerne in Maiskörnern sichtbar gemacht. Dazu wurden die entparaffinierten, rehydrierten Schnitte 3 min in Azur B-Färbelösung (0,0025% (w/v) Azur B in PBS pH 4.0) inkubiert, mehrmals mit H₂0 gespült und wie folgt dehydriert:

- 5 min in 30% Ethanol
- 5 min in 50% Ethanol
- 5 min in 70% Ethanol
- Zweimal 10 min in 100% Ethanol
- Zweimal 10 min in 100% Xylol

Die Gewebeschnitte wurden mit Entellan (Merck, Darmstadt) beschichtet und mit einem Deckglas luftblasenfrei versiegelt.

PAS-Färbung

Zur Färbung von Stärkekörnern des Maisendosperms wurden die Schnitte zunächst 10 min in 1% Periodsäure inkubiert und dreimal 5 min mit H₂O gewaschen. Das Färben mit dem Schiffs Reagenz erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden mit lauwarmem H₂O (> 35 °C) gespült und wie oben beschrieben (Färbung mit Azur B) dehydriert und eingedeckt.

3.2.8 Histologische Analyse von Arabidopsis-Samen

Die Analyse von *Arabidopsis*-Embryonen in unreifen Samen ohne eine Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte mit Hilfe des *Hoyer's*-Mediums (7,5 g Gum arabicum, 100 g Chloralhydrate, 5 ml Glycerin in 30 ml H₂O). Dazu wurden die Samen vorsichtig aus den Schoten entfernt und auf einem Objektträger in *Hoyer's*-Medium mehrere Stunden bis Tage geklärt.

3.2.9 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der angefärbten Maiskörner-Präparate sowie der *Arabidopsis*-Samen wurden mit dem Mikroskop *Axioskop*, einer *AxiocamMRc5 CCD*-Kamera und der Software *AxioVision* (4.6.3) der Firma Zeiss (Jena) angefertigt. Maiskörner-Schnitte und geklärte *Arabidopsis*-Samen wurden in Dichromat-Filter mikroskopiert, *Arabidopsis*-Schoten und reife Samen wurden im Dunkelfeld aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 cDNA-basierte transposon tagging Strategie

Die bis dato verwendeten, großmaßstäbigen forward genetic Verfahren (AIMS und TAIL-PCR, Frey et al., 1998, Liu et al., 1995) zur Identifizierung von Mu-Insertionflankierenden Sequenzen basieren auf der Untersuchung genomischer Fragmente und sind mit langwierigen, umfassenden Analysen verbunden. Ein Nachteil dieser Methoden liegt darin, dass bei großgenomigen Organismen wie Zea mays etwa 40% der Mu-Insertionen in den nicht kodierenden Bereichen liegen und somit höchst wahrscheinlich für den Mutanten-Phänotyp nicht kausal sind. Um die daraus resultierende Komplexität der zu untersuchenden DNA-Proben zu reduzieren bzw. den Klonierungserfolg zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit eine neue Mutanten-Screening-Strategie etabliert, welche innerhalb des internationalen ERA-NET-Projekts MuExpress in Kooperation mit der Firma Biogemma⁸ (Frankreich) entwickelt wurde. Diese auf cDNA basierende Herangehensweise erlaubt die Identifizierung von Mu-Insertionen in Transkripten, welche während der Maiskorn-Entwicklung exprimiert sind, und gewährt dadurch nicht nur die Eliminierung von Mu-Insertionen in nicht kodierenden Bereichen des Genoms, sondern auch Insertionen in Genen, die nicht im Maiskorn transkribiert werden. Im Weiteren wird die Strategie detailliert beschrieben.

Es wurden zunächst für jede Mutantenlinie Wildtypkörner aus einem heterozygoten Maiskolben ausgesät, welche eine Population aus heterozygoten und Wildtyp-Geschwisterpflanzen in einem Verhältnis 2:1 hervorbrachten. Aus unterschiedlichen Wildtyppflanzen und zwei heterozygoten Individuen wurden Wildtyp- bzw. Mutanten-Körner zwecks RNA-Extraktion entnommen. Zur Erfassung von Transkripten regulatorischer Gene, welche während der frühen Kornentwicklung exprimiert sind, wurden die aus verschiedenen Geschwisterpflanzen stammenden Maiskörner in einem Alter von 13 Tagen nach der Pollinierung geerntet. Gesamt-RNA (3.2.2.3) aus einem Wildtyp- und zwei Mutanten-Körnern jeder Linie wurde als Basis für die Synthese der 5'- und 3'-RACE-*ready*-cDNA (3.2.2.11) verwendet.

⁸Alle Mutantenlinien, deren Feldanzucht, Phänotypisierung sowie die Beschaffung des Pflanzenmaterials wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Biogemma (Frankreich) zur Verfügung gestellt bzw. durchgeführt.



Abb. 4-1 Schematische Darstellung der cDNA-basierten Mutanten-Screening-Strategie

Im ersten Schritt wird die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA ausgehend von dem mit einer Adaptersequenz (blau) ausgestatteten *Oligo*-dT-Primer unter Verwendung der *MMLV* (<u>Moloney Murine Leukemia Virus</u>) Reverse Transcriptase in cDNA umgeschrieben. Das Enzym weist eine terminale Transferase-Aktivität auf, wodurch es 3 dC-Reste an das 3'-Ende der Erststrang-cDNA hinzufügt. Das Kit-interne *SMART II™ A Oligonucleotide*, welches an seinem 3'-Ende drei dG-Reste enthält, geht Basenpaarung mit dem C-reichen Bereich der ErststrangcDNA ein und dient der Reversen Transkriptase als verlängertes *Template*. Die fertigen 5'und 3'-Erststrag-cDNA-Populationen enthalten somit an ihrem 5'- bzw. 3'-Ende eine Adaptersequenz, welche für die nachfolgende *touchdown*- und *nested*-PCR als Bindungsstelle der Kit-internen Primer UPM und NUP zur Verfügung steht. Während der reversen Transkription, welche in zwei separaten 5'- und 3'-Reaktionen abläuft, wird eine Adaptersequenz am 5' bzw. 3'-Enden der cDNA eingebaut (Abb. 4-1). *Touchdown*-RT-PCR wurde In der nachfolgenden der zur Adaptersequenz komplementäre Primer UPM in Kombination mit einem <u>Terminal Inverted Repeat (TIR)</u>spezifischen Transposon-Primer (MuOligo1) verwendet, um den unbekannten, Transposon-flankierten Bereich (*Flanked Sequence Tag, FST*) jeweils in der 5'- und 3'cDNA-Population zu amplifizieren. Zur Erhöhung der Spezifität der Amplifikate wurde im Anschluss der Touchdown-RT-PCR eine nested-PCR mit Primern NUP/MuOligo2 durchgeführt. Somatische Transpositions-Ereignisse wurden eliminiert, indem für die weitere Analyse nur solche Amplifikate berücksichtigt wurden, die auf der gleichen Höhe in beiden Mutanten-Proben auftraten, jedoch abwesend in der Wildtyp-Kontrolle waren. Diese wurden nach Elution aus dem Gel in den pCR®2.1.TOPO®-Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

Zur weiteren Beurteilung der Kausalität des Kandidaten-FSTs wurde zunächst anhand der gewonnen Sequenz einen FST-spezifischen Primer (FST-x) abgeleitet und in einer Validierungs-(Ko-Segregations)-PCR in Kombination mit dem TIR-spezifischen Primer MuOligo2 eingesetzt. Als Template diente hierfür genomische DNA aus denselben Maiskörnern, welche als Ausgangsmaterial für die Identifizierung der FSTs verwendet wurden. Da im Wildtyp keine *Mu*-Insertion im Kandidatengen erwartet wird, sollte mit der Primer-Kombination FST-x/MuOligo2 im Falle der Wildtypkontrolle keine Amplifikate entstehen, dagegen sollte das *FST* in beiden Mutanten-Proben vorhanden sein. Waren diese Voraussetzungen erfüllt, so wurde die Kausalität des Kandidatengens über eine großmaßstäbige Ko-Segregations-PCR-Analyse weiter überprüft. Für diese wurden zunächst ungefähr zweimal 60 Wildtypkörner aus jeweils zwei heterozygoten Geschwister-Maiskolben der jeweiligen Mutanten-Linie ausgesät. Aus den resultierenden Pflanzen wurde Blattmaterial entnommen und daraus genomische DNA extrahiert. Nach Selbstbestäubung der Pflanzen wurden die reifen Maiskolben phänotypisiert und die gDNA-Proben entsprechend dem Phänotyp in "Wildtyp" sowie "Mutanten" sortiert. Die großmaßstäbige Ko-Segregations-PCR wurde wie oben mit der Primer-Kombination *FST*-x/*Mu*Oligo2 durchgeführt. Lediglich *FST*s, die eine ausnahmslose Kopplung mit dem Mutanten-Phänotyp in der Ko-Segregationsanalyse aufwiesen, wurden für die weitere Gencharakterisierung und Funktionsanalyse berücksichtigt.

4.2 Identifizierung der Körnerphänotyp-auslösenden FSTs

Mittels der oben beschriebenen *forward genetic* Technik wurden 60 der von Biogemma erzeugten 300 Körnermutanten (3.1.7.1) in dieser Arbeit analysiert. Eine Liste dieser Mutanten sowie die Zusammenfassung der *Screening*-Ergebnisse ist dem Anhang zu entnehmen (7.3, Seite 103).

Ein 3' Kandidaten-*FST* wurde in insgesamt sechs Mutanten-Linien (D0016, D0432, E1252, E1263, F0127 und F0919) amplifiziert. Das resultierende Bandenmuster ist am Beispiel der Linie E1252 in Abbildung 4-2 A dargestellt. Sequenzanalysen des *FST*s haben gezeigt, dass es sich bei allen sechs Linien um dasselbe Insertionsereignis des *Mu1.7*-Transposons handelte. Desweiteren wurden die bei einer *Mu*-Insertion typisch auftretenden, gleichgerichteten Sequenzwiederholungen (*direct repeats*) entdeckt (Abb. 4-2 B).

Eine Validierungs-PCR mit dem *FST*-spezifischen Primer NM29 und *Mu*Oligo2 bestätigte zunächst die Segregation dieses *FST*s mit dem Mutanten-Phänotyp, da ein Amplifikat erwartungsgemäß nur in beiden Mutantenkörnerproben auftrat (4-2 C). Um die Kausalität des *FST*s zu verifizieren, wurde eine großmaßstäbige Ko-Segregations-PCR mit 300 gDNA-Proben aus Blattmaterial der Linien D0016, D0432 und E1252 durchgeführt. In allen 200 analysierten Mutantenproben konnte das erwartete *FST* detektiert werden, während das entsprechende Amplifikat in den restlichen 100 Wildtypindividuen abwesend war (4-2 D).

Zum Nachweis der *Mu*-Insertion wurde desweiteren eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. 10 gDNA-Proben aus Wildtyppflanzen und weitere 10 aus heterozygoten Individuen wurden zunächst mit *Sac*I restringiert. Die Schnittstellen dieser Restriktions-Endonuklease flankieren die *Mu*-Insertion im Kandidaten-Gen und erlauben dadurch eine Unterscheidung zwischen Transposon-unterbrochenen und Insertions-freien DNA-Fragmenten. Nach der Hybridisierung mit einer *FST*-spezifischen Sonde wurde in allen aus heterozygoten Pflanzen stammenden gDNA-Proben ein Banden-*Shift* detektiert, welcher durch die Insertion des *Mu*-Elements zustande kam (4-2 E). Diese hundertprozentige Kopplung der *Mu*-Insertion mit dem Mutanten-Phänotyp belegt die Kausalität des isolierten Kandidaten-*FSTs*. Die Isolierung einer zweiten Allel-Linie, die eine *Mu*-Insertion an einer anderen Stelle des kodierenden Bereiches des Kandidaten-*FSTs* aufwies (Abb. 4-3 A) und ebenfalls einen mutierten Körnerphänotyp zeigte (siehe



Anhang, S. 100), bestätigt eindeutig, dass der beobachtete Phänotyp in beiden Linien durch die entsprechenden *Mu*-Insertionen im Kandidaten-Gen zustande kommt.

Abb. 4-2 Das Kandidaten-FST der Linie E1252 ko-segregiert mit dem Körner-Phänotyp

(A) 5' und 3' *nested*-PCR-Produkte der Linie E1252. Das ca. 1 kb große Kandidaten-*FST*, präsent in beiden Mutanten-Proben (Mu) und abwesend im Wildtyp (WT), ist durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Der Asterisk markiert ein weiteres Kandidaten-FST, bei dem es sich um eine verkürzte Variante des 1 kb *FST*s handelt. Es ist das Produkt einer "falschen" Bindung des Oligo(dT)-Primers an einen A-reichen Bereich des Kandidaten-Gens.

(B) Position der *Mu1.7*-Insertion im Kandidaten-*FST*. Die gleichgerichteten Sequenz-Wiederholungen (*direct repeats*), welche die *Mu*-Insertion flankieren, sind durch einen Unterstrich hervorgehoben. Die Pfeile markieren die Position der Primer, welche in der Ko-Segregations-PCR (**C** und **D**) eingesetzt wurden.

(C) Validierungs-PCR mit gDNA aus einem Wildtyp-Korn (WT) und zwei Mutanten-Körnern (Mu) der Linie E1252. Die PCR wurde mit Primern NM29 und *Mu*Oligo2 durchgeführt.

(D) Teil der Ergebnisse der großmaßstäbigen Ko-Segregations-PCR mit gDNA aus Blattmaterial 10 Wildtyp- und 10 heterozygoter Pflanzen der Linie E1252 (Primer: siehe **C**).

(E) Southern Blot-Analyse mit gDNA aus Blattmaterial 10 Wildtyp- und 10 heterozygoter Pflanzen der Linie E1252. Die DNA wurde mit *Sac*I geschnitten und mit einer DIG-markierten *FST*-spezifischen Sonde (Siehe Abb. 4-3 A) hybridisiert. Der Banden-*Shift* in den heterozygoten gDNA-Proben, welcher mit der *Mu1.7*-Insertion korrespondiert, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die geringe Größe des *Shifts* ist durch das Vorhandensein einer *Sac*I-Schnittstelle ca. 230 bp stromabwärts des *TIR*-Endes des *Mu1.7*-Elements zu erklären.

4.3 Das Kandidaten-FST kodiert ein Pentatricopeptide Repeat-Protein

Für die weiterführenden Experimente zur Charakterisierung des Körner-Phänotypauslösenden *FST*s sollte zunächst eine *full length* cDNA mittels RACE generiert werden. Dazu wurden anhand der vorhandenen Sequenzdaten Gen-spezifische Primer (MN1, NM2, NM31, NM33) abgeleitet und zur Amplifikation des offenen Leserahmens (ORF) sowie des nicht translatierten Bereiches (*untranslated region*, UTR) eingesetzt.

Die isolierte cDNA weist eine Größe von 1.976 bp auf und umfasst einen ORF von 1.470 bp sowie einen 5' UTR von 201 bp. Der Poly(A)-Schwanz liegt 305 bp stromabwärts des Stoppkodons (Abb. 4-3 A). Um einen Einblick in die Intron-Exon-Organisation des Gens zu gewinnen, wurde ein Sequenz-Alignment der cDNA mit einem genomischen Klon (MAGIv4_67802) vorgenommen. Die dabei resultierende 100%-ige Homologie deutete darauf hin, dass es sich hierbei um ein intronloses Gen handelt.

Das abgeleitete Protein setzt sich aus 489 Aminosäuren zusammen und weist eine kalkulierte Molekularmasse von 55 kDa auf. *In silico* Analysen der Aminosäure-Sequenz haben gezeigt, dass das Protein 10 tandemartig angeordnete *Pentatricopeptide Repeat* (PPR)-Motive besitzt und somit zu der PPR-Proteinfamilie gehört. Um es von den 5 bis dato charakterisierten Mais-PPR-Genen abzugrenzen, wird das hier beschriebene Gen bzw. Genprodukt in Weiterem als *ZmPPR6* bzw. ZmPPR6 bezeichnet. Die Zugehörigkeit zu der PPR-Proteinfamilie wurde zudem durch die Tatsache gestützt, dass mittels Datenbankrecherchen identifizierte homologe Proteine aus *Arabidopsis* (At1g77360) und Reis (Os03g55340.1), die im weiteren Verlauf der Arbeit als AtPPR6 bzw. OsPPR6 bezeichnet werden, eine hoch konservierte PPR-Motiv-Anordnung relativ zu jener des ZmPPR6 zeigen (Abb. 4-3 B). Desweiteren wurden mit Hilfe der POGs (*Putative Orthologous <u>G</u>roups*)-Datenbank AtPPR6 und OsPPR6 als putativ orthologe Proteine identifiziert. Unter Berücksichtigung der hohen Aminosäure-Sequenzhomologie (Abb. 4-3 C) zwischen OsPPR6 und ZmPPR6 (97%) sowie zwischen AtPPR6 und ZmPPR6 (80%) wurde postuliert, dass die drei Proteine ortholog zueinander sein müssen.

Neben dem PPR-Domänen-Abschnitt wurden auch die N-Termini der drei putativ orthologen Proteine computergestützt näher untersucht. Diese sind durch einen Abschnitt unpolarer Aminosäuren mit geringem Anteil an den negativ geladenen Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure und einem hohen Gehalt an Arginin, Alanin und Serin gekennzeichnet. Basierend auf dieser relativen Aminosäurehäufigkeit wurde ein Transitpeptid für den Import in die Mitochondrien für alle drei Proteine von mehreren Algorithmen vorhergesagt.



Abb. 4-3 cDNA- und Protein-Struktur des ZmPPP6

(A) Schematische Darstellung der *ZmPPR6*-cDNA. Die Position der *Mu*-Insertionen in beiden *ZmPPR6*-Allel-Linien ist relativ zum Startcodon (ATG) angegeben und durch Dreiecke abgebildet. Der ORF ist durch einen hell grauen Balken, die UTRs durch dunkel graue Balken dargestellt. Der Abdeckbereich der Sonde ist abgebildet.

(B) PPR-Motiv-Anordnung in ZmPPR6, OsPPR6 und AtPPR6. Mitochondriale Transitpeptide (mt) und PPR-Domänen (P) sind graphisch dargestellt. Die Aminosäure-Positionen der putativen Transitpeptid-Schnittstellen (wenn vorhergesagt) sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

(C) Sequenzvergleich der putativ orthologen PPR6-Proteine aus Mais, Reis und *Arabidopsis*. Identische Aminosäuren, die in allen drei Peptid-Sequenzen auftreten, sind schwarz unterlegt, solche, die nur in zwei Spezies vorkommen, sind grau markiert. Die 10 überlappenden PPR-Motive sind als schwarze Linien unterhalb der Peptid-Sequenz dargestellt.

4.3.1 Analyse des zmppr6-Mutantenphänotyps

Zmppr6 ist eine letale, rezessive Körnermutation, die im sich entwickelnden Maiskolben im Alter von 11 DAP makroskopisch sichtbar wird. Sie zeichnet sich durch kleine, blasse Karyopsen aus, welche durch den Druck der umgebenden Wildtypkörner oft deformiert erscheinen (Abb. 4-4 A). Die Embryonen aus Mutantenkörnern in einem Alter von 18 DAP sind wesentlich kleiner als jene des Wildtyps gleichen Alters, weisen allerdings keine auffälligen, morphologischen Anomalitäten auf (Abb. 4-4 B). Zu einem späteren Zeitpunkt der Kornentwicklung jedoch ist eine Veränderung der Morphologie mutierter Embryonen zu beobachten, die vermutlich ebenfalls mit dem Druck der benachbarten Wildtypkörner einhergeht (Abb. 4-4 C und D).

Zmppr6-Körner zeichnen sich durch eine Keimungsunfähigkeit aus. Um den Phänotyp von *zmppr6*-Pflanzen zu analysieren, wurden durch *Embryo Rescue* homozygote Nachkommen erzeugt. Trotzt einer hohen Keimungsrate wiesen die resultierenden Sämlinge ein deutlich verlangsamtes Wachstum auf (Abb. 4-4 E). Neben einem stark ausgeprägten Zwergwachstum (ca. 20 cm) zeigten die homozygoten *zmppr6*-Pflanzen im adulten Alter eine stark reduzierten Anzahl an Blattwirteln und wiesen männliche Sterilität auf, was dazu führte, dass eine homozygote Nachkommenschaft nicht erhalten werden konnte.



Abb. 4-4 Der zmppr6-Phänotyp

(A) Heterozygoter Maiskolben im Alter von 25 DAP
(B) Wildtyp- (rechts) und Mutantenembryonen (links) 18 DAP
(C) und (D) Mutantenembryonen 30 DAP
(E) Homozygote (links) und Wildtyppflanzen (rechts) nach *Embryo Rescue* Balken in B, C und D = 1 mm, Balken in E = 10 cm

Die Tatsache, dass homozygote Embryonen auf synthetischem Medium keimfähig sind, lässt vermuten, dass die Letalität der *zmppr6*-Mutation vielmehr auf Veränderungen im Nährgewebe, als auf direkte Entwicklungsdefekte des Embryos beruht.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Morphologie der mutierten Maiskörner in einem Alter von 12 DAP in Gewebeschnitten untersucht. Die mikroskopische Analyse hat gezeigt, dass sowohl der Embryo als auch das Endosperm in ihrer Entwicklung deutlich zurück geblieben waren (Abb. 4-5 B). Mutierte Körner waren eingefallen und wiesen lückenhafte Regionen zwischen Aleuron und Perikarp auf, welche als Konsequenz des entwicklungsgestörten Endosperms zustande kamen. Desweiteren waren *zmppr6*-Embryonen auffällig unterentwickelt, während Wildtyp-Embryonen gleichen Alters eine weitgehende Differenzierung aufwiesen.

Neben den Entwicklungsstörungen waren zudem strukturelle Veränderungen im Nährgewebe zu verzeichnen. Die unterste Zellschicht des Endosperms, welche als *BETL*⁹ bezeichnet wird und eine zentrale Rolle im Nährstofftransport einnimmt, war durch strukturell irreguläre Zellen unterbrochen, bei denen die für diese Region typischen Zellwand-Einwachsungen (*wall ingrowths*) nicht vorhanden waren (Abb. 4-5 D und F). Desweiteren war eine insgesamt schwache Ausprägung der Zellwand-Einwachsungen in der *BETL* mutierter Körner zu beobachten.

Für die normale Keimung des Embryos ist die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen von essentieller Bedeutung. Die Nährstoffe bzw. deren Vorläufer, unter denen die Stärke mengenmäßig die wichtigste ist, werden hauptsächlich vom Endosperm produziert und während des Keimungsprozesses zur Verfügung gestellt. Um den Gehalt der Stärke in Wildtyp- und Mutanten-Körnern zu untersuchen, wurden longitudinale Schnitte mit dem Periodsäure-Schiff (PAS)-Reagenz gefärbt (3.2.7.4) und mikroskopisch analysiert. Eine sehr starke Reduktion des Stärkegehalts in der zentralen Region des stärkehaltigen Endosperms, die auf eine Beeinträchtigung der Stärkebiosynthese schließen lässt, war in den mutierten Körnern zu beobachten (Abb. 4-4 H).

⁹ *BETL* = <u>Basal Endosperm Transfer Layer</u>, Basale Endosperm-Transferschicht.



Abb. 4-5 Veränderungen des Embryos und Endosperms in zmppr6-Körnern 12 DAP

(A) bis (H) 12 µm longitudinale Gewebsschnitte von Mutanten- (B, D, F, H) und Wildtypkörnern (A, C, E, G) im Alter von 12 DAP gefärbt mit Azur B (A bis F) und PAS (G, H). Die Doppelpfeile in B markieren die Lücke zwischen Aleuron und Perikarp, während die Pfeile in D und F strukturell veränderte Zellen in *BETL* kennzeichnen. *BETL*, *Basal Endosperm Transfer Layer*; E, Embryo; En, Endosperm; P, Pedizel; Pk, Perikarp; SHEn, stärkehaltiges Endosperm. Balken in (A) und (B) = 1 mm, in (C) und (D) = 100 µm, in (E) und (F) = 60 µm, in (G) und (H) = 40 µm.

4.4 Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien in Arabidopsis

Wie bereits demonstriert (4.3.1), ruft das *ZmPPR6*-Nullallel einen Körnerphänotyp hervor, der sowohl den Embryo als auch das Endosperm betrifft. Da *Arabidopsis thaliana* als Modelpflanze für Genomanalyse ein putativ orthologes *PPR6*-Gen besitzt, stellte sich die Frage, ob der Verlust der *AtPPR6*-Genfunktion in *Arabidopsis* zu einem vergleichbaren Phänotyp führen würde. Die molekulare und phänotypische Analyse der drei T-DNA-Mutantenlinien *AtPPR6-1*, *AtPPR6-2* und *AtPPR6-3* wird im Folgenden vorgestellt.

4.4.1 Molekulare und phänotypische Analyse

Die T-DNA-Insertionslinien *AtPPR6-1 (Salk_045714), AtPPR6-2 (Salk_091917)* und *AtPPR6-3 (Salk_061950)* entstammen der *Salk*-Kollektion (Alonso *et al.*, 2003) und enthalten laut Angaben des Herstellers eine T-DNA-Insertion im kodierenden Bereich des *AtPPR6-*Gens. Zur Analyse der T-DNA-Insertion wurde das aus heterozygoten Pflanzen stammende Saatgut ausgesät und die resultierenden Sämlinge genotypisiert. Lediglich ³/₄ der Samen waren in der Lage zu keimen und brachten Pflanzen hervor, welche mittels genomischer PCR hinsichtlich der T-DNA-Insertion als Wildtyp- oder heterozygot, jedoch nicht als homozygot identifiziert wurden (Abb. 4-6 B). Sequenzanalysen der amplifizierten PCR-Produkte haben gezeigt, dass es sich bei den Linien *AtPPR6-1* und *-2* um das gleiche Insertionsereignis handelt. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass die T-DNA in den drei Linien im ORFs des *AtPPR6*-Gens insertiert war (Abb. 4-6 A).

Saatgut der identifizierten, heterozygoten Pflanzen der drei Linien wurde auf einen möglichen Samen-Phänotyp hin untersucht. Ungefähr ¼ der Samen innerhalb der unreifen Schoten wiesen eine transluzide Erscheinung auf und zeichneten sich durch eine verspätete Embryoentwicklung aus (Abb. 4-7 A, Seite 58). Fünfundsiebzig Prozent der reifen Samen glich dem Wildtyp, die restlichen 25% waren klein, kollabiert und unfähig zu keimen. Eine sehr kleine Prozentzahl der mutierten Samen keimte auf mit 3% Sucrose ergänztem MS-Medium und brachte Sämlinge mit gestörtem Phänotyp hervor (Abb. 4-7 B, Seite 58). Diese Beobachtungen zeigen, dass der insertionsbedingte Ausfall der *AtPPR6-* bzw. *ZmPPR6-*Genfunktion in den entsprechenden Spezies einen vergleichbaren Phänotyp auslöst.



Abb. 4-6 Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien AtPPR6-1, -2 und -3

(A) Schematische Darstellung des intronlosen *AtPPR6*-Gens. Die Position der T-DNA-Insertionen in den drei *AtPPR6*-Linien ist relativ zum Startcodon (ATG) angegeben und durch Dreiecke abgebildet. Der ORF ist durch einen Balken dargestellt. Die Bindungsstellen der für die Genotypisierung verwendeten Primer sind durch Pfeile angezeigt.

(B) Genomische PCR zwecks Genotypisierung der Insertionsmutanten. Der Nachweis des Wildtyp-Allels (*AtPPR6*) erfolgte mit Primern NM10/NM11, das T-DNA-unterbrochene *atppr6*-Allel wurde mit Primern NM10/NM12 amplifiziert. Lediglich Pflanzen, die im Bezug auf das mutierte *atppr6-Allel* wildtyp oder heterozygot waren, konnten identifiziert werden. Die Abwesenheit von homozygoten Pflanzen deutet auf eine Letalität der *atppr6*-Mutation hin, wenn diese im homozygoten Zustand vorliegt.



Abb. 4-7 Phänotypische Analyse der T-DNA-Insertionslinien AtPPR6-1, -2 und -3

(A) Phänotyp unreifer Samen. Die Abbildung zeigt unreife, segregierende Schoten der drei Linien (oben) und Nahaufnahmen der mit Hoyer's Medium geklärten Wildtyp und Mutanten-Samen aus den korrespondierenden Schoten (unten). Die Wildtypsamen besitzen ausgewachsene Embryonen, während die Embryonenentwicklung in mutierten Samen in Halb-Torpedo-Stadium arretiert ist.

(B) Phänotyp reifer Samen und daraus resultierender Sämlinge der Linie AtPPR6-3.

4.4.2 Genetische Komplementation der AtPPR6-Mutation

Die bisherigen Analysen haben gezeigt, dass Transposon-Insertionen im *ZmPPR6*-Gen zu einem Körnerphänotyp führen. Ein ähnlicher Samenphänotyp wurde bei *Arabidopsis*-Linien beobachten, in denen das putativ orthologe *PPR6*-Gen durch T-DNA-Insertionen "ausgeknockt" war. Durch eine Komplementation der *AtPPR6*-Mutation sollten weitere Beweise dafür erbracht werden, dass der beschriebene Phänotyp in *Arabidopsis* einzig und allein durch den Verlust der *AtPPR6*-Funktion bedingt ist. Desweiteren sollte überprüft werden, ob das *ZmPPR6*-Gen funktionell ortholog zum *AtPPR6*-Gen ist. Zu diesem Zweck sollte der *atppr6*-Phänotyp durch die Expression des *ZmPPR6* aus Mais komplementiert werden.

Für die Expression des *ZmPPR6* wurde zunächst ein binäres Expressionskonstrukt (*p35S-ZmPPR6*) unter der Kontrolle des *35S*-Promotors hergestellt. Dazu wurde der kodierende Bereich des *ZmPPR6* durch PCR mit Primern NM1/NM39 amplifiziert und

über *Bam*HI/*Xba*I in den binären Vektor *pCHF5* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Fankhauser, Universität Genf, Schweiz) kloniert (Abb. 4-8 A). Der resultierende Vektor wurde für die stabile *Arabidopsis*-Transformation mittels *Agrobakterien*-vermittelter Blütentauch (*floral dip*)-Methode (3.2.5.1) eingesetzt. Angesichts der Tatsache, dass homozygote *atppr6*-Pflanzen aufgrund des schwerwiegenden Phänotyps kein reproduktives Alter erreichen konnten, wurden Nachkommen heterozygoter *AtPPR6*-Pflanzen der drei Linien für die Transformation verwendet.

Saatgut aus den Transformanden wurde ausgesät und transgene Sämlinge der T₁-Generation durch Behandlung mit dem Herbizid Basta® vorselektiert. Putativ transgene, Basta®-resistente Pflanzen wurden mittels genomischer PCR auf das Vorhandensein des *ZmPPR6*-Transgens hin überprüft. Zudem wurden Genotypisierungs-Analysen hinsichtlich des *AtPPR6*-Allels zur Klassifizierung der Pflanzen in Wildtyp, hetero- und homozygot mittels Multiplex-PCR durchgeführt (Abb. 4-8 C). Eine *atppr6-3-Arabidopsis*-Pflanze¹⁰, die im Bezug auf das mutierte *atppr6-3*-Allel homozygot war und gleichzeitig das *ZmPPR6*-Transgen trug, wurde durch die oben beschriebene PCR-Analyse identifiziert (Abb. 4-8 C). RT-PCR-Untersuchungen haben gezeigt, dass in der besagten Pflanze das *AtPPR6-3*-Transkript erwartungsgemäß fehlte, während die mRNA des *ZmPPR6*-Transgens nachweisbar war (Abb. 4-9 B, Seite 61).

Der Phänotyp sowie das Wachstum dieser Pflanze waren ununterscheidbar von jenen des Wildtyps (Abb. 4-9 C, Seite 61). Dies lässt die Aussagen zu, dass der mutierte Phänotyp der T-DNA-Insertionslinie tatsächlich durch das "Ausknocken" des *AtPPR6*-Gens zustande kommt, und dass sich der *atppr6-3*-Mutanten-Phänotyp in *Arabidopsis* durch die Expression des *ZmPPR6* aus Mais vollständig komplementieren lässt. Letzeres zeigt wiederum, dass *ZmPPR6* funktionell ortholog zu *AtPPR6* ist.

Nachfolgend konnten zwei weitere, unabhängige homozygote *atppr6-3*-Pflanzen identifiziert werden, die ebenfalls durch die Expression des *ZmPPR6*-Gens erfolgreich komplementiert wurden (Ergebnisse nicht gezeigt).

¹⁰ Zur Minimierung der Probenanzahl wurden weitere Analysen zur Beurteilung des Komplementations-Erfolges lediglich mit der *AtPPR6-3*-Linie durchgeführt.



Abb. 4-8 Heterologe Expression von *ZmPPR6* in *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinie *AtPPR6-3*

(A) Schematische Darstellung des binären *p35S-ZmPPR6*-Konstrukts. LB = T-DNA *left border*, RB = T-DNA *right border*, *p35S* = *Cauliflower mosaic virus (CaMV)* Promotor, *ZmPPR6* = ORF von *ZmPPR6*, *bar* = *bar*-Gen zur Vermittlung von Basta[®]-Resistenz unter der Kontrolle des *mas*-Promotors (Promotor des Mannopin-Synthasegens von *Agrobakterium*).

(B) Graphische Darstellung der Primerbindungsstellen im *p35S-ZmPPR6*-Transgen und *AtPPR6-3*-Allel.

(C) Genotyp-Analyse der *p35S-ZmPPR6*-tragenden *AtPPR6-3*-Pflanzen mittels genomischer PCR. Das Vorhandensein des *p35S-ZmPPR6* wurde durch Amplifikation mit Primern NM29/NM30 in der oberen Hälfte demonstriert. Zur Genotypisierung der transformierten *AtPPR6-3*-T₁-Generation wurde eine Multiplex-PCR mit zwei *AtPPR6-3*-spezifischen Primern (NM10/NM11) und einem T-DNA-spezifischen Oligonukleotid (NM12) durchgeführt. Die identifizierte, homozygote *atppr6-3*-Pflanze, die zusätzlich das *p35S-ZmPPR6*-Transgen enthält, ist durch eine rote Umrandung hervorgehoben. Die Art der Amplifikate ist links, die verwendeten Primer rechts gezeigt. *AtPPR6-3*-Genotyp: +/+, Wildtyp; +/-, heterozygot; -/-, homozygot.



Abb. 4-9 Heterologe Expression von *ZmPPR6* in *Arabidopsis* komplementiert den Mutantenphänotyp der *knock out*-Linie *AtPPR6-3*

(A) Schematische Darstellung der Primer und ihrer Bindungsstellen im *p35S-ZmPPR6*-Transgen und *AtPPR6-3*-Allel, verwendet für die PCR-Analyse in **B**.

(B) Genomische und RT-PCR-Analyse einer Col-O-Pflanze sowie einer homo- und einer heterozygoten *atppr6-3*-Pflanze transformiert mit *p35S-ZmPPR6*. Genomische Kontaminationen in der RT-PCR wurden durch eine Test-PCR mit RNA als Template ausgeschossen. *AtPPR6-3*-Genotyp: +/+, Wildtyp; +/-, heterozygot; -/-, homozygot.

(C) Phänotyp einer 3 Wochen alten Col-0-Pflanze, einer 10 Wochen alten, homozygoten *atppr6-3*-Pflanze sowie einer erfolgreich komplementierten, 3 Wochen alten, homozygoten *atppr6-3/p35S-ZmPPR6*-Pflanze.

4.5 Gewebespezifische Expression von ZmPPR6

Wie in den vergangenen Kapiteln gezeigt wurde, ruft der Verlust der *ZmPPR6*-Funktion in Mais einen schwerwiegenden Körnerphänotyp hervor. Damit liegt die Vermutung nahe, dass *ZmPPR6* in den jungen Karyopsen während der frühen Kornentwicklung exprimiert sein muss. Um diese Annahme zu überprüfen, sollte die entwicklungs- und gewebespezifische Expression des *ZmPPR6* mittels Northern Blot und semiquantitativer RT-PCR analysiert werden. Ferner sollten Maispflanzen mit einem Reportergen-Konstrukt, in dem das ß-Glucuronidase-Gen (*GUS*) unter der Kontrolle des *ZmPPR6*-Promotors steht, stabil transformiert werden. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Folgenden präsentiert.

4.5.1 Northern Blot-Analyse des ZmPPR6-Transkripts

Zur Ermittlung des *ZmPPR6*-Expressionslevels wurden Northernblot-Experimente mit Gesamt-RNA aus vegetativem sowie reproduktivem Maisgewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchgeführt. Dazu wurden die angefertigten Filter zunächst mit einem radioaktiv markierten DNA-Fragment (Abdeckbereich der Sonde siehe Abb. 4-3 A) hybridisiert. Selbst nach einer zweiwöchigen Exposition der Membran konnten keine Hybridisierungssignale detektiert werden. Um Durchführungsfehler auszuschließen, wurde das Experiment wiederholt, wobei die Menge an eingesetzter Gesamt-RNA teilweise verdoppelt wurde (bis zu 30 µg). Auch der zweite Versuch führte zum ähnlichen, negativen Ergebnis. Auf Grundlage dieses Resultats wurde postuliert, dass *ZmPPR6* sehr schwach exprimiert sein muss. Um die Detektionssensitivität zu erhöhen, wurde eine weitere Northern-Membran mit einem DIG-markierten antisense-Transkript hybridisiert, welches den Bereich von 458-1470 bp des ZmPPR6-ORFs umfasste. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-RNA ZmPPR6aus einer transgenen, überexprimierenden Arabidopsis-Pflanze (atppr6-3/p35S-ZmPPR6, siehe Kapitel 4.4.2) verwendet. Mit der DIG-markierten Sonde ließ sich das ZmPPR6-Transkript der Positivkontrolle sehr deutlich detektieren, der Nachweis des endogenen ZmPPR6 in diversem Maisgewebe blieb jedoch auch mit dieser Methode erfolglos (Abb. 4-10).



Abb. 4-10 Northern Blot-Analyse der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression des *ZmPPR6*

5 μg Gesamt-RNA aus diversem Maisgewebe wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine positivgeladene Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten *ZmPPR6*-RNA-Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die RNA im Agarosegel mit Ethidiumbromid (oben), die RNA auf der Membran mit Methylenblau (Mitte) gefärbt. Gesamt-RNA aus einer *ZmPPR6*-überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanze (*p35S-ZmPPR6*, siehe 4.4.2) diente als Positivkontrolle.

Der Fakt, dass sich das *ZmPPR6*-Transkript durch die konventionellen Northern Blot-Techniken nicht nachweisen lässt, zeigt, dass die Expression des *ZmPPR6* in den getesteten Gewebetypen sehr schwach ist.

4.5.2 Analyse der ZmPPR6-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR

Wie im vorherigen Abschnitt demonstriert, erwies sich die Northern Blot-Hybridisierung als nicht sensitiv genug, um das *ZmPPR6*-Transkript zu detektieren, was auf eine relativ schwache Expression des Gens schließen ließ. Zur Bestimmung der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression von *ZmPPR6* wurde darum die semiquantitative RT-PCR als sensitivere Transkript-Nachweismethode gewählt. Hierzu wurde die *ZmPPR6*-cDNA in diversen Gewebetypen in einem RT-PCR-Profil mit geringer Zyklenzahl¹¹ amplifiziert und mittels Southern Blot-Analyse detektiert (Abb. 4-11).



Abb. 4-11 Semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression des *ZmPPR6*

1 µg Gesamt-RNA aus diversem Maisgewebe wurde nach *DNase I*-Behandlung in cDNA umgeschrieben und in einer RT-PCR mit *ZmPPR6*-spezifischen Primern (NM37/NM38) bei einer geringen Zyklenzahl (18 Zyklen) amplifiziert. 5 µl der PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten *ZmPPR6*-Sonde (Abdeckbereich der Sonde siehe Abb. 4-3 A) hybridisiert (oben). Als Referenz wurde die cDNA des Haushaltsgen *ZmJR27* (Lorbiecke *at el.*, 2005) amplifiziert (Mitte). Die Qualität und Quantität der angesetzten RNA wurde durch Ethidiumbromid-Färbung der ribosomalen RNA im Agarosegel überprüft (unten).

¹¹ Das PCR-Profil mit 18 Zyklen sollte eine Sättigung der PCR-Produkte ausschließen.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten eine hauptsächliche Expression des *ZmPPR6*-Gens im embryonalen Korngewebe während der Frühentwicklung. Die Expression im Endosperm hingegen war im Verhältnis dazu deutlich schwächer ausgeprägt. Darüber hinaus war eine schwache Expression auch in Pollen, Blatt, Wuzel und Sämling zu verzeichnen, was auf eine konstitutive Expression des *ZmPPR6*-Gens hindeutet.

4.5.3 Analyse der ZmPPR6-Promotoraktivität in Promotor-GUS-Pflanzen

Die gewebespezifische Aktivität des *ZmPPR6*-Promotors sollte als Nächstes durch Promotor-GUS-Studien untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Reportergen-Konstrukt (*pZmPPR6-GUS*) hergestellt, in dem das *GUS*-Gen unter der Kontrolle des *ZmPPR6*-Promotors steht (Abb. 4-12 A). Dazu wurde ein 1,2 kb stromaufwärts des Translationsstarts gelegenes Fragment, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit den *ZmPPR6*-Promotor umfasste, aus Mais gDNA der Linie A188 mit Primern NM34/NM35 amplifiziert. Das *Pst1/Xba*I-restringierte PCR-Produkt wurde in den *pUbi-GUS*-Vektor ligiert, in dem der *Ubiquitin*-Promotor (*pUbi*) durch einen *Pst1/Xba*I-Verdau herausgeschnitten wurde. Um die Funktionalität des resultierten Konstrukts (*pZmPPR6-GUS*) zu überprüfen, wurde eine transiente, biolistische Transformation von 12 DAP Maisembryonen vorgenommen. Die punktuelle Blaufärbung des Embryogewebes, welche als Nachweis für ß-Glucuronidase-Aktivität dient, bestätigte die Funktionsfähigkeit des *pZmPPR6-GUS*-Konstrukts (Abb. 4-12 B).

Mit dem *pZmPPR6-GUS*-Konstrukt wurde embryogenes Kallusgewebe biolistisch transformiert und transgene Maispflanzen regeneriert (3.2.5.2). Zwei Basta[®]-resistente Regenerate wurden auf das Vorhandensein des *pZmPPR6-GUS*-Transgens mittels genomischer PCR und Sothern Blot analysiert. Lediglich bei einer der beiden Pflanzen konnte jedoch das vollständige *pZmPPR6-GUS*-Transgen detektiert werden (Abb. 4-12 C und D). Zum Nachweis der *ZmPPR6*-Promotoraktivität wurden eine Reihe Gewebetypen aus der T₁-Generation dieser Pflanze mit X-Gluc gefärbt. Im Gegensatz zu den Erwartungen, wonach die stärkste *ZmPPR6*-Expression im Embryo sein sollte (siehe Abb. 4-11), wurde keine Blaufärbung im Embryo-Gewebe gesichtet. Eine *GUS*-Expression war lediglich im Pedizel-Bereich in ca. 75% der getesteten Maiskörner eines Maiskolbenes detektierbar (Abb. 4-13 A).


Abb. 4-12 Herstellung transgener pZmPPR6-GUS-Maispflanzen

(A) Schematische Darstellung des *pZmPPR6-GUS*-Konstrukts. Die Position der Primer (Pfeile) sowie der Schnittstellen der Enzyme *Pst*I und *Eco*RI sind angegeben.

(B) Transiente Expression des *pZmPPR6-GUS*-Konstrukts in einem 12 DAP Embryo nach biolistischer Transformation.

(C) Nachweis des *pZmPPR6-GUS*-Transgens in zwei putativ transgenen Maispflanzen durch genomische PCR. Die Bindungsstellen der verwendeten Primer (NM34/NM36) sind in **A** durch Pfeile gekennzeichnet.

(C) Nachweis des pZmPPR6-GUS-Transgens in zwei putativ transgenen Maispflanzen mittels Southern Blot. 15 µg gDNA wurde mit PstI/EcoRI bzw. nur mit PstI geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIGmarkierten Gus-Sonde hybridisiert (freundlicherweise von AMPII zur Verfügung gestellt). Die PstI/EcoRI-Restriktion sollte einen Aufschluss über die Vollständigkeit des Konstrukts, der PstI-Verdau über die Anzahl der Integrations-Ereignisse geben. Als Positivkontrolle diente das pZmPPR6-GUS-Plasmid, welches ebenfalls PstI/EcoRI restringiert wurde. Das Volllänge-Fragment des zweiten Regenerats ist rot umrandet.

Um die Richtigkeit dieser Beobachtung zu überprüfen, wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit Gesamt-RNA aus dem oberen, mittleren und unteren Bereich eines 16 DAP Maiskorns durchgeführt, welchem im Vorfeld der Embryo entfernt wurde. Auch wenn nur geringfügig, war die *ZmPPR6*-Expression erwartungsgemäß im unteren Kornbereich am stärksten (Abb. 4-13 B) und korrelierte damit mit der beobachteten Promotoraktivität. Angesichts der Tatsache jedoch, dass nur eine transgene *pZmPPR6-GUS*-Pflanze für die gewebespezifischen Promotoranalysen zur Verfügung stand, und dass die Promotoraktivität aus zeitlichen Gründen lediglich in der T₁-Generation untersucht wurde, kann dieses Ergebnis nur als ein vorläufiges gewertet werden.



Abb. 4-13 ZmPPR6-Promotoraktivität im Maiskorn

(A) 15 DAP Körner eines segregierenden *pZmPPR6-GUS*-Kolbens wurden mit X-Gluc gefärbt. Der Pfeil weist auf die *GUS*-Expression in der Pedizel-Region eines transgenen Maiskorns hin.
B) Semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *ZmPPR6*-Expression im oberen, mittleren und unteren Bereich eines 16 DAP Maiskorns, dessen Embryo zuvor entfernt wurde. Die verwendeten Kornregionen sind schematisch dargestellt. Die *ZmPPR6*-cDNA wurde mit Primern NM29/NM32 amplifiziert. Die Qualität und Quantität der RNA wurde durch Ethidiumbromid-Färbung der ribosomalen RNA im Agarosegel überprüft.

4.6 Subzelluläre Lokalisation des ZmPPR6-Proteins

Die meisten bis jetzt charakterisierten PPR-Proteine entfalten ihre Funktion entweder in den Mitochondrien oder in den Chloroplasten.

Wie bereits erläutert, wurde für ZmPPR6 eine Signalsequenz zum Transport in die Mitochondrien vorhergesagt. Um die ZmPPR6-Lokalisation in diesem Zellkompartiment experimentell zu belegen, wurden GFP- sowie DsRed-Konstrukte hergestellt und für transiente Expressionsanalysen verwendet. Dazu wurde zunächst der kodierende Bereich des *ZmPPR6* exklusive des Stoppcodons mit Primern NM1/NM2 amplifiziert und über die *Bam*HI-Schnittstelle jeweils in die Reportergen-Vektoren *pUbi-GFP* und *pUbi-*

DsRed kloniert. Als Referenz diente ZmEMP4, ein PPR-Protein, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2007). Der ORF des *ZmEMP4*-Gens wurde mit Primern NM3/NM4 amplifiziert und analog zu *ZmPPR6* in *pUbi-GFP* und *pUbi-DsRed* kloniert.

Als Erstes wurde die Lokalistation der Fusionsproteine ZmPPR6:DsRED und ZmPPR6:GFP in transient transformierten Zellen der Zwiebelepidermis analysiert. ZmPPR6 wurde in zahlreiche, kleine Zellstrukturen importiert, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die Mitochondrien handelt (Abb. 4-15).



Abb. 4-15 Subzelluläre Lokalisation von ZmPPR6 in Epidermiszellen der Zwiebel

Zwiebelepidermis wurde mit den Fusionskonstrukten *ZmPPR6:gfp* (A) und *ZmPPR6:DsRed* (B) biolistisch transformiert. Fluoreszenzsignale wurden mit dem Inversmikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss aufgenommen.

Um sicher zu stellen, dass die beobachteten Fluoreszenzsignale tatsächlich aus den Mitochondrien kamen, wurde *ZmPPR6:DsRed*¹² mit dem Referenzkonstrukt *ZmEMP4:gfp*, welches als Marker für die Mitochondrien-Lokalisation dienen sollte, in *BMS*-Zellen transient ko-exprimiert (3.2.4.2). Die Überlagerung der GFP- und DsRED-Fluoreszenz, die sich bei identischer Lokalisation beider Fusionsproteine als gelbe Signale äußert, zeigt, dass ZmPPR6:DsRED sowie ZmEMP4:GFP in den gleichen Zellkompartimenten

¹² Da *ZmPPR6:DsRed* gegenüber *ZmPPR6:gfp* stärkere Fluoreszenz aufwies, wurde *ZmPPR6:DsRed* präferenziell für die Ko-Lokalisationsanalyse verwendet.

akkumulieren und bestätigt damit die mitochondriale Lokalisation des ZmPPR6 (Abb. 4-16 A).



Abb. 4-16 Ko-Lokalisation von ZmPPR6:DsRED und ZmEMP4:GFP in BMS-Zellen

(A) *BMS*-Zellen wurden mit den Reportergen-Konstrukten *ZmPPPR6:DsRed* und *ZmEMP4:gfp* biolistisch ko-transformiert. Aufnahmen mit GFP- und DsRed-Filter sowie deren Überlagerung ist gezeigt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit *Imager.Z1 AX10* der Firma Zeiss unter Anwendung eines *ApoTomes* visualisiert.

(B) GFP- und DsRed-Nahaufnahmen einer *ZmPPPR6:DsRed/ZmEMP4:gfp* transformierten BMS-Zelle. Aufgrund der zellulären Plasmaströmung war eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale nicht möglich. Aufnahmen wurden mit dem Inversmikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss angefertigt.

4.7 Suche nach einem ZmPPR6-assoziierten RNA-Liganden

Wie bereits erläutert, sind die Mitglieder der PPR-Familie kernkodierte, RNA-bindende Proteine, die in die Mitochondrien und Chloroplasten importiert werden und dort eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression übernehmen. Sehr wenige von diesen sind bis dato charakterisiert worden und nur in seltenen Fällen konnte dabei das Ziel-RNA identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde daher das ZmPPR6 aus nativem Mitochondrienextrakt als Komplex mit seinem Ziel-RNA-Liganden immunopräzipitiert und die aus dem Präzipitat gewonnene RNA identifiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse werden im Folgenden präsentiert.

4.7.1 Herstellung von überexprimierenden ZmPPR6-Maispflanzen

In einem Vorversuch wurde getestet, ob der im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellte Anti-ZmPPR6-Antikörper (3.2.3.5), der letztendlich für die Ko-Immunopräzipotation eingesetzt werden sollte, in der Lage ist, das endogene ZmPPR6 spezifisch zu erkennen. Ein Immunoblot mit Gesamtprotein aus 7-Tage alten Maiskeimlingen sowie einer angereicherten Mitochondrienfraktion (3.2.3.1) wurde mit dem Anti-ZmPPR6-Serum inkubiert. Das ZmPPR6 konnte in keiner der getesteten Proteinfraktionen detektiert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Als Ursache dieses negativen Resultats wurden zwei Hypothesen aufgestellt: entweder ist die Funktionalität des Antikörpers unzureichend, oder der Expressionslevel des *ZmPPR6* ist so niedrig, dass das Genprodukt im Western Blot, ähnlich wie das Transkript im Northern Blot, nicht detektierbar ist. Da für das Erstere keine Optimierungsmöglichkeit bestand, wurde entschieden, das *ZmPPR6*-Gen in Maispflanzen unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors zu exprimieren. Dazu sollte ein *pUbi-ZmPPR6*-Expressionskonstrukt generiert und damit Maispflanzen stabil transformiert werden.

Für diesen Zweck wurde zunächst der ORF des ZmPPR6 exklusive des Stoppcodons unter Verwendung der Primer NM1/NM40 amplifiziert. Für den Fall, dass der Anti-ZmPPR6-Antikörper für die Immunopräzipitation nicht tauglich sein sollte, wurde mit Hilfe des *reverse*-Primers am 3' Ende des kodierten Bereichs zusätzlich ein *Strep*-Tag II¹³ eingebaut, welches als Epitop für einen alternativ zu verwendenden anti-*Strep*-Tag-

¹³ Aminosäuresequnz des *Strep*-Tag II: WSHPQFEK.

Antikörper fungieren sollte. Das PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI geschnitten und in den *pUbi-Gus*-Vektor, in dem zuvor das *Gus*-Gen durch einen *Bam*HI-Verdau entfernt wurde, vor dem *Ubiquitin*-Promotor kloniert.

Mit dem resultierten *pUbi-ZmPPR6:Strep*-Konstrukt wurde embryogenes Kallusgewebe aus einer A188/H99-Kreuzung biolistisch transformiert und transgene Maispflanzen daraus regeneriert (3.2.5.2). Auf diese Weise wurden 16 putativ transgene Regenerate gewonnen, die eine Resistenz gegen das Herbizid Basta[®] aufwiesen. Die Pflanzen wurden analog zum beinhaltenden Transgen *pUbi-ZmPPR6:Strep* benannt und von 1-16 durchnummeriert.

Um zu überprüfen, ob die erzeugten Pflanzen tatsächlich das pUbi-ZmPPR6:Strep-Transgen beinhalteten, wurden Southernblotanalysen durchgeführt (3.2.2.6). Zur Ermittlung der Anzahl der Integrationsereignisse wurde genomische DNA der putativ transgenen Pflanzen mit EcoRI geschnitten, zur Beurteilung der Vollständigkeit des *pUbi-ZmPPR6:Strep*-Transgens wurde zudem eine *Hind*III-Restriktion vorgenommen. Beide Filter wurden mit einer DIG-markierten, ZmPPR6-spezifischen Sonde hybridisiert (Abb. 4-17 A). Darüber hinaus wurde eine Northernblot-Hybridisierung durchgeführt (3.2.2.9). Hierdurch sollte das Vorhandensein des pUbi-ZmPPR6:Strep-Transkripts überprüft werden. Die molekulare Analyse mittels Southern und Northern Blot-Hybridisierung hat ergeben, dass die Hälfte dieser Pflanzen das vollständige pUbi-*ZmPPR6:Strep*-Transgen enthielten und das korrespondierende Transkript akkumulierten (Abb. 4-17 B).

Saatgut aus selbstpollinierten T₀-Pflanzen konnte jedoch nur aus den transgenen Linien *pUbi-ZmPPR6:Strep*-2,-4,-5 und -6 erhalten werden, von denen lediglich *pUbi-ZmPPR6:Strep*-2 und -5 in der T₁-Generation Basta[®]-resistente Pflanzen hervorbrachten, die das Transgen weiterhin exprimierten. Da *ZmPPR6:Strep*-2 trotzt einer hohen Integrationszahl eine stärkere Expression des *ZmPPR6:Strep*-Transgens gegenüber *ZmPPR6:Strep*-5 zeigte und das korrespondierende Protein in den Mitochondrien akkumulierte (Abb. 4-17 C), wurde diese für die Ko-Immunopräzipitations-Analyse verwendet.



Abb. 4-17 Nachweis des ZmPPR6:Strep in transgenen Maispflanzen

(A) Schematische Darstellung des *pUbi-ZmPPR6:Strep*-Konstrukts. Die Schnittstellen der bei dem Southern Blot **(B)** verwendeten Enzyme sowie der Abdeckbereich der Sonde sind angezeigt.

(B) Southern und Northern Blot-Analyse der putativ transgenen *pUbi-ZmPPR6:Strep*-Pflanzen (1-16). Zur Ermittlung der Anzahl der Integrationsereignisse mittels Southern Blot wurde die gDNA mit *Eco*RI geschnitten, zur Beurteilung der Vollständigkeit des *pUbi-ZmPPR6:Strep*-Transgens wurde eine *Hind*III-Restriktion vorgenommen. Als Positiv-Kontrolle (+) wurde das Plasmid *pUbi-ZmPPR6:Strep* mit *Hind*III restringiert. Die angefertigten Filter wurden mit einer DIG-markierten, *ZmPPR6*-spezifischen Sonde (siehe **A**) hybridisiert. Wt, Wildtyp.

Für den nicht radioaktiven Northern Blot wurden 5 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) diente dabei Gesamt-RNA aus einer *ZmPPR6*-überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanze (*p35S-ZmPPR6*, siehe 4.4.2). Die Northern-Membran wurde mit einem DIG-markierten *antisense*-Transkript hybridisiert, welches den Bereich von 458-1470 bp des *ZmPPR6*-ORFs umfasste. Als Beladungskontrolle wurde die RNA auf der Membran mit Methylenblau gefärbt. Pflanzen, die das vollständige Transgen beinhalten und das korrespondierende Transkript mit der erwarteten Größe exprimieren, sind rot hervorgehoben. Die weiter verwendete *pUbi-ZmPPR6:Strep*-2-Linie ist rot umrandet.

(C) Westerndetektion des ZmPPR6-Proteins mit einem Anti-ZmPPR6-Peptid-Antikörper im Gesamt- (GP) und Mitochondrien-Protein (MT) der transgenen *pUbi-ZmPPR6:Strep*-2-Linnie sowie einer A188-Pflanze. Je 30 µg Protein wurden eingesetzt.

4.7.2 Immunopräzipitation eines ZmPPR6-RNA-Komplexes

Zur Identifizierung der in vivo ZmPPR6-assoziierten Ziel-mtRNA wurde ein Ko-Immunopräzipitations-Experiment durchgeführt (3.2.3.10). Dazu wurde zunächst der ZmPPR6-mtRNA-Komplex mit Hilfe des Anti-ZmPPR6-Antikörpers aus einem Mitochondrienproteinlysat etiolierter Maiskeimlinge der Linie ZmPPR6:Strep-2 (4.7.1) präzipitiert. Im Gegensatz zu den kernkodierten Transkripten, die typischerweise mit einem Stabilitäts-vermittelnden Poly-A-Schwanz ausgestattet sind, werden plastidäre und mitochondriale Transkripte bei Pflanzen nicht polyadenyliert, wenn jedoch ein Poly-A-Schwanz vorhanden ist, fungiert dieser viel mehr als Abbausignal (Kudla et al., 1996; Lisitsky et al., 1996; Gagliardi und Leaver, 1999; Hayes et al., 1999; Gagliardi et al., 2001). Demzufolge wurde die aus dem Protein-Nukleinsäure-Komplex isolierte mtRNA zunächst polyadenyliert und anschließend ausgehend von einem Oligo-dT-Adapterprimer in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der am 3'- und 5'-Ende eingebauten Adaptersequenz wurde die cDNA mittels *long distance* RT-PCR amplifiziert (3.2.2.11). Zwei distinkte Amplifikate (Abb. 4-18), die im Zuge der RT-PCR erhalten wurden, wurden in den pCR[®]2.1.TOPO[®]-Vektor kloniert. Plasmid-DNA wurde aus mehreren Kolonien isolieren (3.2.2.2) und zur *Insert*-Identifizierung sequenziert. Als Negativkontrolle wurde ein analoges Experiment mit Präimmunserum durchgeführt. Die einzelnen Schritte dieses Experiments sind in Abbildung 4-19 (Seite 74) schematisch dargestellt.

Die Sequenzanalyse hat gezeigt, dass sich hinter dem 400 bp Amplifikat (Abb. 4-18) drei unterschiedliche Sequenzen verbergen. Lediglich bei einer von denen handelte sich um ein mitochondriales Transkript, nämlich um den 5'UTR der mRNA für das mitochondriale, ribosomale Protein S3 (*rps3*) (Abb. 4-20 A und B, Seite 75), daher wurde nur dieses für weitere Analysen berücksichtigt. Bei dem 250 bp Amplifikat handelte sich zwar um ein Fragment der mitochondrialen 26S rRNA, dieses kam jedoch als putative Ziel-RNA nicht in Frage, da bei einer Wiederholung der Ko-Immunopräzipitation die 26S rRNA auch in der Negativ-Kontrolle auftrat (Ergebnis nicht gezeigt).



Abb. 4-18 Analyse der ko-immunopräzipitierten mtRNA nach long distance RT-PCR

Die aus dem Präzipitat isolierten RNA, die unter Anwendung von Anti-ZmPPR6- oder Präimmun-Serum gewonnen wurde, wurde polyadenyliert und in cDNA umgeschrieben. Nachfolgend wurde die cDNA über *long distance* RT-PCR amplifiziert und auf einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Amplifikate der Kandidaten-Ziel-RNA *rps3* und der unspezifisch mitisolierten 26S rRNA (siehe Text) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Zur Verifizierung der Spezifität des Ko-Immunopräzipitations-Ergebnisses, wurde die isolierte RNA mittels Dot Blot-Hybridisierung analysiert (3.2.2.10). Dazu wurde die aus dem Pellet und dem Überstand (3.2.3.10) gewonnene RNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde mit Spezifität zum 5'UTR des *rps3* hybridisiert.

Erwartungsgemäß war der 5'UTR des *rps3* lediglich im Falle der Immunopräzipitation mit dem Anti-ZmPPR6-Antikörper angereichert (Abb. 4-20 C, Seite 75). Das Ergebnis der Dot Blot-Hybridisierung zeigt, dass das erhaltene Präzipitat spezifisch durch den Anti-ZmPPR6-Antikörper zustande kommt und nicht durch unspezifische Serum-Immunglobuline bedingt ist. Daher wurde der 5'UTR des *rps3* für weitere Analysen zur Bestätigung der spezifischen Interaktion mit ZmPPR6 berücksichtigt.



Abb. 4-19 Schematische Darstellung der Ko-Immunopräzipitation

(A) Im ersten Schritt werden die *Dynabeads*® *Protein A* mit Anti-ZmPPR6-Antikörper inkubiert, um einen *Dynabeads*® *Protein A*/Antikörper-Komplex zu generieren.

(B) Im nächsten Schritt wird der *Dynabeads*® *Protein A*/Antikörper-Komplex mit nativem Mitochondrienproteinextrakt aus überexprimierenden *ZmPPR6*-Pflanzen versetzt. Hierbei entsteht ein *Dynabeads*® *Protein A*/Antikörper/ZmPPR6-mtRNA-Komplex.

(C) Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung der ungebundenen Mitochondrien-Proteine, wird die ko-immunopräzipitierte mtRNA aus dem *Dynabeads*® *Protein A*/Antikörper/ZmPPR6-mtRNA-Komplex mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und anschließend EtOH präzipitiert.

(D) Die gewonnene mtRNA wird polyadenyliert, in cDNA umgeschrieben und über die 5'und 3'-ständige Adaptersequenz in einer *long distance* RT-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird in den *pCR*®*2.1.TOPO*®-Vektor kloniert und zur Identifizierung der mtRNA-Sequenz sequenziert.



Abb. 4-20 ZmPPR6 ist assoziiert in vivo mit dem 5'UTR der rps3-mRNA

(A) Homologer Bereich zwischen der immunopräzipitierten *rps3*-Sequenz (IP-rps3) und dem Mais-MB-Mitochondrien-Genom (MtGenom). Translationsstart ist angegeben. Da die Länge des 5'UTRs des *rps3* unbekannt ist, wurde das erste Nukleotid der isolierten Sequenz als Transkriptionsstart (+1) gesetzt.

(B) Schematische Darstellung der Intron/Exon-Organisation des *rps3*-Gens. In der oberen Hälfte der Abbildung sind die Exons (E1 und E2) durch graue Balken, der Intron durch eine schwarze Linie dargestellt. Der mit dem ZmPPR6 assoziierte Bereich (+1 bis +337) ist darunter als grauer Balken, die in **(C)** und EMSA verwendete Sonde (*5' rps3*, +135 bis +337) als schwarze Linie abgebildet.

(C) Dot Blot-Analyse der immunopräzipitierten RNAs. Je 1 μ l der aus dem Pellet (P) und dem Überstand (Ü) durch Immunopräzipitation mit Anti-ZmPPR6- bzw. Präimmunserum erhaltenen RNA wurde auf eine Nylonmembran zweifach aufgetragen und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde mit Spezifität zum 5'UTR des *rps3* (siehe **B**) hybridisiert.

4.7.3 <u>Electrophoretic Mobility Shift Assay</u> (EMSA) und Northwestern-Analyse der ZmPPR6/*rps3*-Interaktion

Wie im vorangegangenen Abschnitt demonstriert, wurde der 5'UTR des *rps3* als putativer *in vivo* ZmPPR6-Interaktionspartner identifiziert. Um die Assoziation zwischen beiden Interaktionspartner zu belegen, wurden *in vitro* Protein-RNA-Bindestudien durchgeführt. Hierbei wurde getestet, ob rekombinantes ZmPPR6-Protein in der Lage ist, an die DIG-markierte *rps3*-RNA zu binden.

Zur Analyse der ZmPPR6/*rps3*-Interaktion mittels EMSA wurde zunächst ein rekombinantes ZmPPR6-Protein in *E.coli* hergestellt. Um die Löslichkeit des heterologen Proteins zu erhöhen, wurde ZmPPR6 mit der <u>*Glutathion-<u>S</u>-<u>T</u>ransferase* (GST) fusioniert. Dazu wurde der PCR-amplifizierte ORF des *ZmPPR6* exklusive der Signalsequenz¹⁴ und des Stopcodons über die *SpeI/XhoI*-Schnittstellen in den *E. coli*-Expressionsvektor *pET41b+* kloniert. Mit Hilfe des *reverse*-Primers (NM14) wurde am 3' Ende des *ZmPPR6*-ORFs zudem ein *Strep-*Tag II eingefügt, des neben dem GST-Tag eine weitere Möglichkeit zur Protein-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglichen sollte.</u>

Rekombinantes GST-ZmPPR6-Strep-Protein wurde wie unter 3.2.3.3 sowie 3.2.3.4 beschrieben in *E.coli* überexprimiert und durch zwei hintereinander folgende Affinitätschromatographie-Schritte nahezu homogen aufgereinigt (Abb. 4-21).



Abb. 4-21 Affinitätsaufreinigung des rekombinanten GST-ZmPPR6-Strep aus E. coli

Das rekombinante GST-ZmPPR6-Strep wurde aus *E.coli*-Proteinlysat über das GST- und *Strep*-Tag II in zwei hintereinander folgenden Affinitätschromatographie-Schritten aufgereinigt, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung des Gels mit Coomassie sichtbar gemacht. Der Pfeil deutet auf das 70 kDa große GST-ZmPPR6-Strep-Protein. M, Proteinmarker: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*.

¹⁴ Sequenz ab Aminosäure 54.

Parallel dazu wurde der in Abbildung 4-20 B angezeigte, 200 bp lange Bereich aus dem 5'UTR des rps3 (5' rps3, +135 bis +337) mit den Primern NM21¹⁵/NM22 amplifiziert und durch in vitro Transkription mit Digoxigenin markiert. Unterschiedliche Mengen des rekombinanten GST-ZmPPR6-Strep-Proteins wurden mit der resultierten DIG-5'rps3-Sonde versetzt. Die Spezifität des Protein/RNA-Komplexes wurde durch Zugabe von unmarkierter "kalter" 5'*rps3-*RNA oder Anti-ZmPPR6-Serum überprüft. Um auszuschließen, dass der Protein/RNA-Komplex durch eine alleinige Interaktion zwischen dem 22 kDa großen GST-Tag und der DIG-5'rps3-Sonde zustande kommt, wurde zudem die Affinität des aufgereinigten GSTs zu der DIG-5'rps3-Sonde getestet. Um eine hohe Binde-Spezifität zu gewähren, wurden die Reaktionen im Bindungspuffer mit hoher Salzkonzentration (200 mM) und relativ großen Mengen an unspezifischer RNA (5 µg/µl tRNA aus Hefe) durchgeführt. Die RNA-haltigen Proben wurden wie unter 3.2.3.11 beschrieben im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend durch Digoxigenin-Nachweis detektiert.

Eine eindeutige Komplexbildung zwischen dem GST-ZmPPR6-Strep und der DIG-5'*rps3*-Sonde, die sich durch einen *Shift* der DIG-markierten RNA bemerkbar machte, konnte hierbei demonstriert werden (Abb. 4-22 A, Spuren 2-4). Der *"Supershift"* durch die Bindung des Anti-ZmPPR6-Antikörpers (Abb. 4-22 A, Spur 5) und die Dissoziation des GST-ZmPPR6-Strep/DIG-5'*rps3*-Komplexes durch den spezifischen Kompetitor (Abb. 4-22 A, Spuren 6-8) bestätigten zudem die Spezifität der Komplexbildung. Ferner konnte gezeigt werden, dass GST alleine keine Bindung mit der Sonde eingeht (Abb. 4-22 A, Spuren 9 und 10).

Um gänzlich auszuschließen, dass der im EMSA beobachtete Banden-*Shift* nicht durch eine Bindung eines mitaufgereinigten *E.coli*-Proteins zustanden kam, wurde die Komplexbildung zwischen dem GST-ZmPPR6-Strep und der DIG-5'*rps3*-Sonde in einem Northwestern-Experiment überprüft. Hierzu wurde Gesamt-Protein aus einer GST-ZmPPR6-Strep-überexprimierenden *E.coli*-Kultur durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach Renaturierung der membrangebundenen Proteine wurden diese mit der DIG-5'*rps3*-Sonde inkubiert und anschließend die DIG-Signale detektiert. In diesem Experiment wurde ein Signal auf der Höhe der 70 kDa-Markerbande beobachtet, welches mit der Molekularmasse des mittels

¹⁵ Enthält die T7-Promotor-Sequenz.

Immunodetektion mit ZmPPR6-spezifischem Antikörper nachgewiesenen GST-ZmPPR6-Strep-Proteins korrelierte (Abb. 4-22 B).



Abb. 4-22 Bindung von rekombinantem ZmPPR6 an den 5'UTR der rps3-mRNA

(A) Bindung des rekombinanten GST-ZmPPR6-Strep-Proteins an den 5'UTR des *rps3* mittels EMSA. Die Bindung des GST-ZmPPR6-Strep an die DIG-5' *rps3*-Sonde ist in Spuren 2-4, der *"Supershift"* in Spur 5, die Dissoziation des Protein-RNA-Komplexes durch Zugabe des spezifischen 5' *rps3*-Kompetitors in Spuren 6-8 und die Affinität des GSTs zur 5' *rps3*-Sonde in Spuren 9 und 10 gezeigt. Die Konzentration der jeweiligen Komponenten ist oberhalb des Bilds angegeben. F, freie, ungebundene RNA; K, Protein-RNA-Komplex; S, *"Supershift"*.

(B) Bindung des rekombinanten GST-ZmPPR6-Strep-Proteins an den 5'UTR des *rps3* mittels Northwestern. Ca. 250 ng, 500 ng und 1 µg des rekombinanten GST-ZmPPR6-Strep im Gesamtprotein wurden durch SDS-PAGE separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert und nach Proteinrenaturierung mit der DIG-5' *rps3*-Sonde (350 ng) inkubiert. Das Coomassie gefärbte Gel, die DIG-Signale des Northwesterns sowie die Immunodetektion des GST-ZmPPR6-Strep-Proteins mit einem ZmPPR6-spezifischen Peptidantikörper sind in der Abbildung gezeigt. M, Proteinmarker: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*.

Zusammenfassend verdeutlichen die EMSA- und Northwestern-Ergebnisse, dass das rekombinate GST-ZmPPR6-Strep-Protein in der Lage ist, an den 5'UTR des *rps3* zu binden und bestätigen dadurch das Resultat der Ko-Immunopräzipitation.

4.8 Analyse der ZmPPR6-Funktion in Mitochondrien

Im vorangegangenen Kapitel wurde demonstriert, dass ZmPPR6 mit dem 5'UTR des *rps3 in vivo* assoziiert ist und dass es *in vitro* an seine Ziel-RNA binden kann. Es stellte sich nun die Frage, welche Aufgabe die Interaktion zwischen ZmPPR6 und *rps3*-mRNA erfüllt.

Wie bereits erläutert, sind die bis dato charakterisierten PPR-Proteine in Organellen an posttranskriptionalen Prozessen wie Stabilität, Spleißen, Editieren und Translation beteiligt. Um Hinweise über die mögliche Funktion des ZmPPR6 zu gewinnen, wurde das *rps3* in Wildtyp- und *zmppr6*-Körnern näher untersucht.

Zur Gewinnung von Indizien, die auf eine mögliche Stabilitätsfunktion des ZmPPR6 hinweisen, wurde eine Northern Blot-Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus Wildtyp- und Mutantenembryonen unter Verwendung einer rps3-spezifischen Sonde durchgeführt. Sollte das ZmPPR6-Protein tatsächlich eine stabilisierende Wirkung auf das rps3-Transkript haben, so ist zu erwarten, dass in Mutantenembryonen, in denen ein funktionsfähiges ZmPPR6 aufgrund der Mu-Insertion nicht vorhanden ist, die rps3mRNA schwächer akkumuliert wird. Die Hybridisierung mit einer 5'UTR-spezifischen Sonde führte zu mehreren nahezu über das ganzen Spektrum des Markers verteilten Signalen und erschwerte damit eine eindeutige Aussage über den Expressionslevel des rps3 in den Mutanten-Embryonen (Abb. 4-23 A). Auch die Hybridisierung mit einer im zweiten Exon gelegenen rps3-Sonde ergab keine spezifischeren Signale (Abb. 4-23 B). In beiden Fällen waren jedoch keine augenfälligen Transkriptreduktionen in der Mutante zu sehen, was aber auch daran gelegen haben könnte, dass die spezifischen rps3-Signale durch die in ihrer Intensität eventuell viel stärkeren unspezifischen Ereignisse überdeckt sein könnten. Somit war es nicht möglich mittels Northern Blot-Analyse eine mögliche Stabilitäts-Funktion zuzuschreiben bzw. auszuschließen.



Abb. 4-23 Norhtern Blot-Analyse des *rps3*-Transkripts in Wildtyp- und Mutanten-Embryonen

(A) 15 µg Gesamt-RNA aus Wildtyp- und Mutantenembryonen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten, 5'UTR-spezifischen *rps3*-Sonder hybridisiert. Als Beladungskontrolle ist die Ethidiumbromid-Färbung der RNA im Agarosegel gezeigt. M, Marker: *RiboRuler*[™] *High Range RNA Ladder*, 200-6000 bases; Wt, Wildtyp; Mu, Mutante.

(B) Analog zu **(A)**. Die Hybridisierung erfolgte jedoch mit einer radioaktiv markierten *rps3*-Sonde mit Spezifität zum Exon 2.

Als Nächstes wurde eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Diese Analyse sollte zum einen Informationen darüber liefern, ob das *rps3*-Intron korrekt gespleißt wird, zum anderen sollte damit der Expressionslevel des *rsp3* ermittelt und dadurch die Möglichkeit einer Stabilitätsfunktion nochmals aufgegriffen werden. Dazu wurde cDNA ausgehend von gDNA-freier Gesamt-RNA aus Wildtyp- und Mutantenkörnern¹⁶ unter Verwendung von Hexanukleotiden synthetisiert und in die RT-PCR mit den Exonspezifischen *rps*3-Primern NM41/NM42 eingesetzt, die das Intron flankieren. Als Positivkontrolle für die Intron-Amplifikation diente gDNA aus einer Wildtyppflanze. In beiden cDNA-Proben wurde lediglich das Intron-lose *rps3*-Transkript amplifiziert, wobei das *rps3*-Amplifikat in der Mutante geringfügig stärker angereichert war (Abb. 4-24).

¹⁶ Um Transkripte maternalen Ursprungs zu eliminieren, wurde für die RNA-Extraktion nur Endospermund Embryo-Gewebe aus 16 DAP Maiskörnern verwendet.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das ZmPPR6-Protein höchstwahrscheinlich keine stabilisierende Wirkung auf die *rps3*-mRNA hat, und dass es keine Spleißfunktion erfüllt.



Abb. 4-24 RT-PCR-Analyse des rps3-Transkripts

Je 1 µg Gesamt-RNA aus 16 DAP Wildtyp- und Mutantenkörnern wurde für die cDNA-Synthese mit Hexanukleotid-Primern eingesetzt. Die RT-PCR wurde unter Verwendung der Intron-flankierenden Primern NM41/NM42 durchgeführt. Die Primerbindungsstellen sind in der graphischen Darstellung des *rps3*-Gens als Pfeile dargestellt. Als Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit gDNA als *Template* verwendet. Das Intron-beinhaltende Amplifikat der Kontrolle sowie das intronlose *rps3*-Produkt der RT-PCR sind gekennzeichnet. Keine ungespleißten Transkript-Produkte waren in den untersuchten cDNA-Proben zu verzeichnen. Marker: *GeneRuler[™] DNA Ladder Mix*

RNA-Editing in den Mitochondrien der höheren Pflanzen ist ein Prozess des selektiven Austausches von Cytosin durch Uridin in mRNAs sowie in einigen tRNAs (Giegé und Brennicke, 1999; Handa, 2003; Shikanai, 2006; Takenaka *et al.*, 2008). Die in diese biochemische Reaktion involvierten Enzyme sind bis dato unbekannt, mehrere kernkodierte PPR-Proteine wurden jedoch in den letzten Jahren als spezifische Editingfaktoren beschrieben (Kotera *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2006; Chateigner-Bouti *et al.*, 2008). Um eine mögliche Funktion des ZmPPR6 als Editingfaktor zu überprüfen, wurde die *rps3*-Transkriptsequenz in Wildtyp- und Mutanten-Embryonen auf Editing-Ausfälle näher untersucht. Dazu wurde aus dem genannten Gewebe Gesamt-RNA extrahiert und zur Entfernung der gDNA-Reste *DNase I* behandelt. Die RNA wurde dann in cDNA umgeschrieben, über RT-PCR mit Hilfe *rps3*-spezifischer Primer (NM21/NM43) amplifiziert, in den *pCR*[®]2.1.TOPO[®]-Vektor kloniert und anschließend je ein Klon aus der Widtyp- und Mutanten-*rps3*-cDNA sequenziert. Die erhaltenen Sequenzendaten der *rps3*-Transkripte wurden sowohl untereinander als auch mit einer aus der *GenBank* entnommenen, genomischen *rps3*-Sequenz verglichen, um auf diese Weise mögliche Editingausfälle im aus *zmppr6*-Embryonen stammenden *rps3*-Transkript ausfindig zu machen. An den Positionen in der genomischen Sequenz, an denen sich ein Cytidin befindet, wird bei selektivem RNA-Editing in der mRNA ein Austausch gegen Uridin vorgenommen. Dieser Uridinrest sorgt bei der cDNA-Synthese dafür, dass anstelle des genomisch kodierten Cytidins ein komplementärer Thymidinrest eingebaut wird.



Abb. 4-25 Darstellung eines putativen Cytidin zu Uridin RNA-Editings in *rps3*-Transkripten

Die putative Editing-Stelle 100 bp stromaufwärts des Startcodons gelegen, ist im Wildtyp*rsp3*-Transkript mit einem roten, im Mutanten-*rsp3*-Transkript mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Der Asterisk markiert die Editingposition in der genomischen Sequenz.

100 bp stromaufwärts des Startcodons gelegen, wurde ein putativer Ausfall des RNA-Editings in der *zmppr6*-RNA gefunden (Abb. 4-25). Um sicher zu stellen, dass es sich hierbei nicht um eine Polymerase bedingte Basensubstitution handelte, wurden 8 weitere Klone sequenziert. Zudem wurde die cDNA-Synthese sowie die RT-PCR wiederholt und die PCR-Produkte direkt sequenziert. Der Editingausfall an der oben genannten Stelle des *rps3*-Transkripts aus *zmppr6*-Embryonen konnte durch die weiteren Sequenzanalysen nicht bestätigt werden. Es musste daher schlussgefolgert werden, dass es sich entweder um einen Fehler der verwendeten Polymerase gehandelt hat, oder dass der Editingausfall an dieser Stelle ein einmaliges Ereignis war. Somit konnte dem ZmPPR6 keine Editingfunktion zugeschrieben werden.

Als Letztes wurde die Möglichkeit einer Translationsfunktion des ZmPPR6-Proteins überprüft. Hierzu wurde das Vorhandensein bzw. die Menge des Translationsprodukts des *rps3* im Gesamtproteinextrakt aus Korngewebe mutierter und Wildtypkörner in einem Alter von 16 DAP mittels Immunodetektion getestet. Als Primärantikörper wurde ein im Rahmen dieser Arbeit in Kaninchen hergestellter Peptidantikörper mit Spezifität für RPS3-Protein (3.2.3.5) verwendet. Bei beiden Mutantenproben konnte eine starke Reduktion bzw. Abwesenheit des ca. 65 kDa großen RPS3 festgestellt werden (Abb. 4-26).



Abb. 4-26 Immunodetektion des RPS3-Proteins im Gesamtprotein aus Korngewebe

30 µg Gesamtprotein aus Embryonen- sowie Embryonen/Endosperm mutierter und Wildtypkörner im Alter von 16 DAP wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem Anti-RPS3-Peptid-Antikörper inkubiert. Ponceau-Färbung der membrangebundenen Proteine dient als Beladungskontrolle. GP, Gesamtprotein; Mu, Mutante; WT, Wildtyp.

Aufgrund der durchgeführten Analysen zur Aufklärung der grundlegenden Funktion der ZmPPR6/*rps3*-Interaktion kann von einer Beteiligung des ZmPPR6-Proteins an der Translation des *rps3* mit großer Wahrscheinlichkeit ausgegangen werden. Um die Funktion eines Translationsfaktors jedoch zu belegen, wären weitere Studien notwendig.

5. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit standen die Identifizierung und die funktionelle Analyse unbekannter, an der Kornentwicklung von Mais beteiligter Gene. Als Ausgangsmaterial dienten hierfür 60 Transposon-induzierte Körnermutanten, in denen die für den Mutanten-Phänotyp ursächlichen Gene durch eine innovative, cDNA-basierte *forward genetic* Methode identifiziert werden sollten.

Die Kausalität eines Kandidaten-*FSTs*, das in sechs Mutantenlinien identifiziert und aufgrund seiner Zugehörigkeit zu der *Pentatricopeptide Repeat*-Proteinfamilie *ZmPPR6* genannt wurde, konnte durch umfassende Ko-Segregationsanalysen sowie einen Allel-Test belegt werden. Bioinformatischen Analysen des vollständigen ORFs zufolge kodiert das *ZmPPR6* für ein 55 kDa großes Mitochondrienprotein, welches neben der Nterminalen Signalsequenz zum Import in die Mitochondrien über 10 tandemartig angeordnete *Pentatricopeptide Repeat*-Domänen verfügt.

Durch histologische Untersuchungen an Korngewebe konnte gezeigt werden, dass der Ausfall der *ZmPPR6*-Funktion mit morphologischen Veränderungen des Nährgewebes und Retardierungen des Embryowachstums einhergeht.

Datenbankanalysen zeigten, dass das ZmPPR6 eine weitgehende Aminosäure-Sequenzhomologie zu jeweils einem PPR-Protein aus Reis (*OsPPR6*) und *Arabidopsis* (*AtPPR6*) aufweist. Unter der Annahme, dass das *ZmPPR6*-homologe Gen aus *Arabidopsis* die gleiche Funktion erfüllt, wurden drei *AtPPR6*-Insertionslinien phänotypisch und molekular näher untersucht. Anhand des *ZmPPR6*-verwandten Samenphänotyps und durch Komplementationsexperimente konnte gezeigt werden, dass *ZmPPR6* und *AtPPR6* orthologe Gene sind.

Nachdem die vorhergesagte Mitochondrien-Lokalisation des ZmPPR6-Proteins durch subzelluläre Lokalisationsstudien sowie Immunodetektion bestätigt wurde, stellte sich die Fragen nach der Rolle, die das ZmPPR6-Protein in den Mitochondrien erfüllt. Nach bisherigen Kenntnissen sind PPR-Proteine an posttranskriptionalen Prozessen spezifischer Ziel-RNAs in Organellen beteiligt (Review-Artikel: Andrès *et al.*, 2007; Delannoy *et al.*, 2007; O'Toole *et al.*, 2008; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). In Rahmen dieser Arbeit wurde daher nach einem RNA-Interaktionspartner gesucht. Eine *in vivo* Assoziation des ZmPPR6-Proteins mit der mitochondrialen *rps3*-mRNA konnte demonstriert und durch *in vitro* Bindungsanalysen belegt werden. Weiterführende Analysen habe gezeigt, dass das ZmPPR6-Protein eine mögliche Translationsfunktion erfüllt.

5.1 cDNA-basierte transposon tagging Strategie

Wie bereits dargestellt, wurde in dieser Arbeit ein auf mRNA bzw. cDNA-basierender Ansatz zur Klonierung Transposon-getaggter, in die Maiskornentwicklung involvierter Gene verwendet. Im Gegensatz zu der konventionellen TAIL-PCR- und AIMS-Methode sollte die in dieser Arbeit gewählte Strategie durch die gezielte Untersuchung transpsontragender, kornexprimierter Transkripte eine schnelle und effiziente Erfassung kornspezifischer Gene bieten.

In allen untersuchten Mutantenlinien wurde eine erfolgreiche Amplifikation Transposon-tragender Transkriptsequenzen erzielt. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass es sich bei ausnahmslos allen untersuchten Kandidaten-*FST*s um Fragmente exprimierter Gene handelte. Damit ist die der Methode zugrunde liegende und zu Projektbeginn als bedenklich eingestufte Voraussetzung bezüglich des Vorhandenseins von *Mu*-Elementen in Transkripten als erfüllt zu bewerten.

Die Identifizierung eines für den Mutanten-Phänotyp kausalen *FST*s in 6 von 60 Linien bestätigt die Erwartung, dass verstärkt kausale Mutationen durch den Nachweis von Transposon-Insertionen in der cDNA aus mutierten Maiskörnern identifiziert werden können. Die Tatsache jedoch, dass es sich bei dem kausalen *FST* der sechs Mutantenlinien um das gleiche mutierte Gen handelt, steht in Wiederspruch zu der Annahme, dass der Mutanten-Phänotyp einer jeden Linie durch den *Mu*-Insertionsbedingten Ausfall eines unabhängigen Gens zustande kommt.

Es kann festgehalten werden, dass die hier gewählte *transposon tagging* Methode generell funktionell ist. Die Frequenz der erfolgreich klonierten, kausalen Gene ist jedoch im Gegensatz zu den Erwartungen relativ gering und ist vergleichbar mit der Erfolgsrate anderer Mutanten-*Screening*-Verfahren wie zum Beispiel AIMS, bei dem die positive Bilanz bei ca. 3% liegt (U. Wienand, persönliche Mitteilung). Die Methode bedarf daher weiterer Optimierung.

Für den mäßigen Klonierungserfolg könnten mehrere mögliche Erklärungen in Frage kommen. Zum einen könnte die Erfassung kausaler Gene, die möglicherweise schwach exprimiert sind, durch die damit verbundene schwache Anreicherung der entsprechenden RT-PCR-Amplifikate erschwert werden. Zum anderen können Insertionen im Promotorbereich durch den hier gewählten Ansatz auf cDNA-Ebene nicht detektiert werden. Darüber hinaus wäre es möglich, dass von *Mu*-Insertionen betroffene Transkripte eine Instabilität und damit eine Kurzlebigkeit aufweisen, die wiederum dazu führen könnte, dass solche Transkripte in der cDNA-Population nicht präsent wären und somit nicht erfasst werden könnten.

5.2 ZmPPR6 ist essentiell für die Entwicklung des Korns

Mutationen in PPR-Genen haben verschiedene Auswirkungen auf die Entwicklung und das Wachstum der Pflanzen und sind oft mit schwerwiegenden Defekten verbunden (Lurin *et al.*, 2004; Kocabek *et al.*, 2006, Beick *et al.*, 2008). Starke Beeinträchtigungen der Samenentwicklung wurden berichtet, wenn Mitochondrien-lokalisierte PPR-Proteine von Mutationen betroffen waren (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2007; De Longevialle *et al.*, 2007).

Das in dieser Arbeit untersuchte mitochondriale PPR-Protein wurde ZmPPR6 genannt. Körner der *zmppr6*-Mutante zeigen ein gestörtes Wachstum und Keimungsfähigkeit (Kapitel 4.3.1, S. 53, Abb. 4-4). Darauf basierend wurde postuliert, dass das *ZmPPR6*-Gen eine wichtige Rolle in der Kornentwicklung einnimmt.

Um Hinweise über den genauen Wirkungsort des *ZmPPR6* zu gewinnen, wurden mikroskopische Untersuchungen an Kornzellverbänden vorgenommen. Während der frühen Kornentwicklung waren Anomalitäten in der *wall ingrowth* Ausbildung der *zmppr6-BETL*-Zellen, eine starke Reduktion des Stärkegehalts im stärkehaltigen Endosperm sowie eine verzögerte Embryoentwicklung zu verzeichnen (Kapitel 4.3.1, S. 55, Abb. 4-5). Wie bereits erörtert, stellt *BETL* die unterste Zellschicht des Endosperms dar, die in unmittelbare Nähe von der Plazenta-Chalaza-Region gelegen ist und somit als Brücke zwischen maternalem und filialem Gewebe dient. Die basalen Zellen der *BETL* sind durch die labyrinthartigen *wall ingrowths* charakterisiert, welche die Plasmamembran-Oberfläche erhöhen und somit den Transport von Saccharose und Aminosäuren aus dem maternalen *Pedicel* in das Endosperm erleichtern. Aufgrund

dieser Eigenschaft wird der *BETL* eine wichtige Rolle bei der Kornentwicklung bzw. -Füllung zugeschrieben (Thompson *et al.*, 2001).

In mehreren Studien wurde über Mutationen einzelner Gene berichtet, die zu strukturellen Abweichungen der *wall ingrowth* in der *BETL* führten, was wiederum mit schwerwiegenden Defekten der Kornentwicklung in Verbindung gebracht wurde (Kang et al., 2009; Gutierrez-Marcos et al., 2007; Costa et al., 2003). Kang et al. (2009) berichteten zudem über eine Mitochondrienakkumulation während der wall ingrowth Ausbildung und stellten daraus folgernd die Hypothese bezüglich einer möglichen, funktionellen Verbindung zwischen beiden auf. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Differenzierung der Transferzellen mit hohen Stoffwechselumsätzen verbunden ist (Offler et al., 2003) und daher mit einer Anhäufung von Mitochondrien einhergeht. In Anbetracht dessen wäre wahrscheinlich, dass die *zmppr6*-Mutation eine mögliche Fehlfunktion der Mitochondrien bedingt und so zu den beobachteten Anomalitäten in der wall ingrowth Ausbildung führt. Dies wiederum hätte eine unzureichende Zufuhr von Saccharose und Aminosäuren, die die Grundlage für die Synthese der Stärke und Speicherproteine bilden, zur Folge. Ein daraus resultierender Mangel an Stärke und Speicherproteinen im Endosperm, die nach hydrolytischem bzw. proteolytischem Abbau dem keimenden Embryo in Form von Polysacchariden und Aminosäuren zur Verfügung gestellt werden, könnte die Beeinträchtigungen der Embryokeimung und die damit verbundene Letalität der *zmppr6*-Mutation erklären.

5.3 AtPPR6 aus Arabidopsis und ZmPPR6 aus Mais sind orthologe Gene

Datenbankrecherchen Arabidopsis-Genom ergaben, dass das über nur ein nahverwandtes PPR6-Gen, das AtPPR6, verfügt. Sequenzbasierten phylogenetischen Analysen von Reis und Arabidopsis Genfamilien zufolge existieren für mehr als 80% der PPR-Gene klare Orthologe in beiden Spezies (O'Toole et al., 2008). Unter Verwendung der POGs-Datenbank, welche die Identifizierung putativ orthologer PPR-Proteine ermöglicht, wurde ein AtPPR6 orthologes PPR-Protein, OsPPR6, bei Reis gefunden. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes sowie der hohen Aminosäuresequenz-Homologie zwischen OsPPR6 und ZmPPR6 von fast 97% wurde postuliert, dass ZmPPR6 und AtPPR6 auch untereinander ortholog sein müssen. Einhergehend mit dieser Hypothese wurde eine hoch konservierte Verteilung der in allen drei Spezies vorhandenen 10 PPR-Motive gefunden (Kapitel 4.3.1, S. 52, Abb. 4-3). Das Vorkommen eines N-terminalen Mitochondrien-Transitpeptids in der ZmPPR6- und AtPPR6-Proteinsequenz deutete zudem auf einen gemeinsamen Wirkungsort hin und stütze damit die aufgestellte Vermutung hinsichtlich der Orthologie.

Die bis jetzt analysierten orthologen PPR-Proteine aus Mais und *Arabidopsis* zeigen keinen verwandten Phänotyp (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; Beick *et al.*, 2008). Untersuchung dreier *AtPPR6*-Insertionslinien haben dagegen gezeigt, dass der insertionsbedinge Ausfall der AtPPR6-Funktion zu einem *zmppr6*-ähnlichen Samenphänotyp führt (Kapitel 4.4.1, S. 58, Abb. 4-7). Um zu belegen, dass der beobachtete Phänotyp alleine durch den Verlust der *AtPPR6*-Genfunktion zustande kommt, und dass *AtPPR6* und *ZmPPR6* orthologe Gene sind, wurde die *atppr6*-Mutation durch eine heterologe Expression des *ZmPPR6*-Gens genetisch komplementiert.

Die dabei beobachtete vollständige Komplementation des mutierten Phänotyps beweist, dass es sich bei *ZmPPR6* und *AtPPR6* um orthologe Gene handelt, und dass der *Arabidopsis*-Phänotyp alleine durch die T-DNA-Insertion bedingt war (Kapitel 4.4.2, S. 61, Abb. 4-9). Somit ist das *ZmPPR6* das erste Gen aus der PPR-Familie, bei dem die Mutation des entsprechenden orthologen Gens in *Arabidopsis* zu einem vergleichbaren Phänotyp führt.

5.4 *ZmPPR6* kodiert ein schwach exprimiertes, Mitochondrienlokalisiertes PPR-Protein

Sequenzanalysen haben ergeben, dass *ZmPPR6* für ein aus 489 Aminosäuren bestehendes Protein mit 10 tandemartig angeordneten PPR-Domänen und einer vorgeschalteten Signalsequenz für den Import in die Mitochondrien kodiert. Anhand der Ko-Lokalisation mit dem Mitochondrienmarker ZmEMP4:GFP konnte experimentell belegt werden, dass ZmPPR6 als Fusion mit DsRED in die Mitochondrien importiert wird (Kapitel 4.6, S. 68, Abb. 4-16). Diese subzelluläre Lokalisation des ZmPPR6-Proteins ist nicht überraschend, denn laut Vorhersagen sind mehr als die Hälfte der PPR-Proteine der höheren Pflanzen in Mitochondrien aktiv, während nur ¼ Plastiden-lokalisiert sind (Lurin *et al.*, 2004). Eine einzige Ausnahme stellt das Zellkern-lokalisierte PPR-Protein *glutamine-rich protein23* dar (Ding *et al.*, 2006).

Das endogene Transkript des ZmPPR6 konnte durch konventionelle Northern Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden, was auf eine sehr schwache Expression des Gens hindeutet (Kapitel 4.5.1, S. 62, Abb. 4-10). Auch das entsprechende Protein konnte im Mitochondrienproteinextrakt mittels Immunodetektion mit einem ZmPPR6-spezifischen Antikörper nicht detektiert werden (Kapitel 4.7.1, S. 71, Abb. 4-17). In Übereinstimmung mit der schwachen Expression haben Datenbankanalysen zur Untersuchung von Sequenzhomologien in GenBank eine nur sehr kleine Anzahl an sequenzähnlichen ESTs ergeben. Eine allgemein schwache Expression der PPR-Genfamilie in Arabidopsis wurde experimentell mittels RT-PCR und Microarray-Analysen demonstriert (Lurin et al., 2004). Demnach war das orthologe AtPPR6-Gen in einer cDNA-Population aus Blattgewebe durch RT-PCR nicht amplifizierbar, während die kalkulierte Signalintensität der *Microarray*-Hybridsierung von 98,5 deutlich unter der durchschnittlichen, in diesem Experiment für die PPR-Genfamilie ermittelten Signalstärke von 318 lag und somit mit der schwachen Expression des ZmPPR6 korrelierte. Eine ähnlich schwache Expression wurde auch bei dem PPR-Gen *emp4* aus Mais beschrieben (Gutierrez-Marcos et al., 2007).

5.5 ZmPPR6 ist möglicherweise für die Translation des *rps3* verantwortlich

In Anbetracht der Tatsache, dass die Mitglieder der PPR-Proteinfamilie eine sequenzspezifische RNA-Bindeaktivität aufweisen, wurde mittels RT-PCR-gekoppelter Ko-Immunopräzipitation nach potentiellen ZmPPR6-assoziiertern RNA-Liganden gesucht. Die Methode der Ko-Immunopräzipitation in Kombination mit cDNA-*Arrays* ist bereits für die Identifizierung von PPR-Protein-gebundenen RNAs erfolgreich eingesetzt worden (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005; Beick *et al.*, 2008). Da für diese Arbeit jedoch keine *Microarray slides*, die alle Gene des Mais-Chondriums enthalten, zur Verfügung standen, wurde die aus dem Präzipitat extrahierte RNA nach cDNA-Synthese nicht durch die Hybridisierung eines DNA-Chips, sondern mittels RT-PCR mit unspezifischen Adapter-Primern und nachfolgender Sequenzierung identifiziert. Mit Hilfe dieser Technik wurde der 5'UTR der mRNA für das mitochondriale, ribosomale Protein S3 (*rps3*) als putative Bindungsstelle des ZmPPR6-Proteins identifiziert (Kapitel 4.7.2, S. 75, Abb. 4-20).

Deletionsmutationen im *rps3*-Gen führen zur Reduktion der mitochondrialen Proteinsynthese und sind mit schwerwiegenden Beeinträchtigungen des Pflanzenwachstums bei heteroplasmatischen Maispflanzen verbunden (Hunt und Newton, 1991; Newton *et al.*, 1996). Im homoplasmatischen Zustand ist die Mutation körnerletal. Diese Veränderungen korrelieren mit dem beobachteten *zmppr6*-Phänotyp und liefern einen Hinweis für die Gültigkeit der ZmPPR6/*rps3*-Interaktion.

Mit Hilfe von EMSA-Analysen konnte gezeigt werden, dass das in *E. coli* hergestellte, rekombinante ZmPPR6-Protein eine Affinität zum 5'UTR der *rps3*-mRNA aufweist (Kapitel 4.7.3, S. 78, Abb. 4-22). Schwächere unspezifische Bindungen bzw. unspezifische RNA-Bindungsstellen wurden durch die Verwendung einer relativ hohen Salzkonzentration (200 mM) sowie großer Mengen unspezifischer RNA (5 μ g/ μ l tRNA aus Hefe) unterbunden bzw. abgesättigt, so dass eine hohe Selektivität der Protein-RNA-Bindung im EMSA-Experiment erzielt werden konnte. Anhand von Northwestern-Analysen wurde zudem die Spezifität der ZmPPR6/*rps3*-Bindung belegt (Kapitel 4.7.3, S. 78, Abb. 4-22).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen deutlich, dass das ZmPPR6-Protein mit dem 5' UTR der *rps3*-mRNA interagiert, schließen jedoch nicht aus, dass ZmPPR6 in der Lage ist, an andere Ziel-mtRNAs zu binden. So ist zum Beispiel das PPR-Protein CRP1 aus Mais mit der 5' Region der plastidären *petA*- und *psaC*-mRNAs assoziiert (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005). Die Möglichkeit zur Bindung an multiple RNA-Liganden bedarf daher weiterer Analysen.

Nach dem bisherigen Stand des Wissens sind die PPR-Proteine keine direkten Effektoren, sondern vielmehr sequenzspezifische Faktoren, die unterschiedliche posttranskriptional aktive Enzyme bzw. Effektoren zum richtigen Wirkungsort lenken. Um Hinweise über die genaue Funktion des ZmPPR6 zu gewinnen, wurde daher die Auswirkung des *ZmPPR6*-Genausfalls auf das *rps3* untersucht.

Die Möglichkeit einer Beteiligung des ZmPPR6-Proteins an Prozessen wie RNA-Stabilität, -Editing, -Spleißen und Translation wurden näher betrachtet (Kapitel 4.8). Eine stabilisierende Funktion des ZmPPR6 konnte durch die Beobachtung ausgeschlossen werden, dass die Transkriptmenge des *rps3* in der Mutante im Wesentlichen unverändert war (Kapitel 4.8, S. 80, 81, Abb. 4-23, -24). Sequenzanalysen haben zudem gezeigt, dass in der Basenabfolge der *rps3*-Transkripte aus der Mutante keine Basensubstitutionen zu verzeichnen waren, womit eine mögliche Funktion als Editingfaktor nicht mehr in Frage kam (Kapitel 4.8, S. 81-83). Auch die Untersuchung eines möglichen Spleißdefekts führte zu einem negativen Ergebnis (S. 81, Abb. 4-24).

Nachdem eine Funktion als Spleiß-, Stabilitäts- und Editingfaktor auf diese Wiese ausgeschlossen werden konnte, wurde als Letztes die Beteiligung des ZmPPR6 an der Translation des rps3-Gens untersucht. Eine Immunodetektion mittels eines RPS3spezifischen Antikörpers hat gezeigt, dass die Menge des RPS3-Proteins in der Mutante sehr stark reduziert ist. Dies deutet darauf hin, dass das ZmPPR6-Protein möglicherweise in die Translation des *rsp3*-Gens involviert ist. Über die Initiation sowie Regulation der Translation in Organellen und insbesondere in Mitochondrien ist sehr wenig bekannt. Es wird allgemein angenommen, dass sich die der Translationsinitiation zugrundeliegenden Mechanismen aus prokaryotischen Systemen ableiten, jedoch sind die in diesen Prozess involvierten Faktoren unbekannt. Eine Ausnahme stellt das PPR-Protein CRP1 dar, welches an den 5'UTR zweier plastidären Transkripte (*petA* und *psaC*) bindet und deren Translation aktiviert (Schmitz-Linneweber et al., 2005). Die Tatsache, dass ZmPPR6 ebenfalls an den 5' UTR des *rps3*-Transkripts bindet, stützt die Möglichkeit einer ZmPPR6-Funktion als Translationsaktivator. Der 5' UTR mitochondrialer Transkripte beinhaltet nicht die für die Prokaryoten typische Shine-Dalgarno-Sequenz (Uyttewaal et al, 2007), welche mit der 16S rRNA Basenpaarung eingeht und somit die kleine Ribosomenuntereinheit zur Ziel mRNA lenkt. Es ist daher denkbar, dass diese Funktion in Mitochondrien von sequenzspezifischen Faktoren wie den PPR-Proteinen übernommen wird. Die große Anzahl der Mitochondrien-lokalisierten PPR-Proteine wäre in Übereinstimmung mit dieser Annahme. Ein Modell der möglichen Wirkung des ZmPPR6 als Initiationsfaktor bei der Translation von rps3 ist in Abb. 5-1 dargestellt.



Abb. 5-1 Modell der rps3-Translationsinitiation in Mitochondrien

ZmPPR6 bindet spezifisch an den 5' UTR der *rsp3*-mRNA und vermittelt die korrekte Positionierung der kleinen Ribosomenuntereinheit an das *rps3*-Transkript.

5.6 Ausblick

Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, dass ZmPPR6 mit dem 5' UTR des *rps3*-Transkripts assoziiert und wahrscheinlich an seiner Translation beteiligt ist. Von Interesse nicht nur für die Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse, sondern auch generell, ist die Klärung der Frage, wie die Initiation der Translation in Mitochondrien der höheren Pflanzen vonstattengeht. Deshalb könnten weitere Analysen der der ZmPPR6/*rps3*-Interaktion mutmaßlich zugrundeliegenden Translationsfunktion als Grundlage zur Gewinnung von Einblicken in die Translationsmechanismen dienen. Allerdings wäre als erstes zu klären, ob ZmPPR6 tatsächlich an der Translation des *rps3* beteiligt ist. Mehrere Ansätze wären hierbei denkbar.

Die Annahme, dass ZmPPR6 die Rolle eines Translationsfaktors erfüllt, basiert auf der einmaligen Beobachtung, dass RPS3-Protein in der Mutante immunologisch sehr schwach detektierbar war. Eine Wiederholung der Westerndetektion wäre als Nächstes zweifellos erforderlich.

Ein weiterer hilfreicher Ansatz wäre die Durchführung einer *in organello* Translation mit Mitochondrien aus Wildtyp- und Mutantenpflanzen unter Verwendung von radioaktiv markierten Aminosäuren. Damit könnte man Unterschiede in der Synthese mitochondrialer Proteine in der Mutante feststellen und Hinweise über eine Beeinträchtigung der *rps3*-Translation gewinnen.

Darüber hinaus könnte ein Vergleich der *atppr6-* und *rps3-*Knockout-Phänotypen in der Modellpflanze *Arabidopsis* Hinweise dazu liefern, ob die Mutantenphänotypen in der Tat auf jeweils vergleichbare Ursachen zurückzuführen sind.

Wäre die Beteiligung des ZmPPR6 an der Translation des *rps3* erst einmal belegt, könnte man eine mögliche Interaktion des ZmPPR6-Proteins mit anderen Translationsfaktoren oder eine Assoziation mit den Ribosomenuntereinheiten überprüfen. Wie bereits von Uyttewaal *et al.*, (2008) demonstriert, könnten submitochondriale Lokalisationsstudien hierbei ebenfalls hilfreich sein.

Abgesehen von der Funktion, ist die *in vitro* ZmPPR6/*rps3*-Interaktion besonders geeignet zur Erforschung der Frage, wie die PPR-Proteine dieses breite Spektrum an Ziel-RNAs mit einer dermaßen hohen Spezifität erkennen. Die Aufklärung der Struktur des ZmPPR6-Proteins im Komplex mit seinem RNA-Liganden wäre daher zweifellos ein großer Fortschritt.

6. Literatur

- **Abbe EC und Stein OL**. (1954). The Growth of the shoot apex in maize: Embryogen. *American Journal of Botany* 41, 4: 285-293
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301: 653-657.
- Andrés C, Lurin C und Small ID. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiologia Plantarum* 129, (1): 14-22.
- **Barkan A, und Martienssen RA.** (1991). Inactivation of maize transposon Mu suppresses a mutant phenotype by activating an outward-reading promoter near the end of Mu1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3502-3506.
- **Beick S, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Jensen B und Barkan A.** (2008). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Molecular and Cellular Biology* 28: 5337-5347.
- **Bennetzen JL.** (1996). The Mutator transposable element system of maize. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 204: 195-229.
- Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS, Meeley RB und Briggs SP. (1995). Cloning and characterization of the maize An1 gene. *The Plant Cell* 7: 75-84.
- **Bommert P, und Werr W.** (2001). Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* 271: 131-142.
- **Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- **Brettschneider R, Becker D und Lörz H.** (1997). Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 94, 6-7 (6): 737-748.
- **Brown RC, Lemmon BE und Olsen OA.** (1994). Endosperm Development in Barley: Microtubule Involvement in the Morphogenetic Pathway. *The Plant Cell* 6, 9: 1241-1252.
- **Charlton WL, Keen CL, Merriman C, Lynch P, Greenland AJ und Dickinson HJ.** (1995). Endosperm development in Zea mays; implication of gametic imprinting and paternal excess in regulation of transfer layer development. *Development* 121, 9: 3089 -3097.

- **Chomczynski P, und Sacchi N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 1: 156-159.
- **Clifton SW, Minx P, Fauron CM-R, Gibson M, Allen J, Sun H, Thompson M, et al.** (2004). Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiology* 136, 3: 3486-3503.
- **Clough SJ und Bent AF.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacteriummediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 16, 6: 735-743.
- **Cosségal M, Vernoud V, Depège N and Rogowsky PM**. (2007). The Embryo Surrounding Region. Olsen AO: Ednosperm, Plant Cell Monographs. *Springer-Verlag* 8: 57-71
- **Costa LM, Gutierrez-Marcos JF, Brutnell TP, Greenland AJ und Dickinson HG.** (2003). The globby1-1 (glo1-1) mutation disrupts nuclear and cell division in the developing maize seed causing alterations in endosperm cell fate and tissue differentiation. *Development* 130, 20: 5009-5017.
- **Delannoy E, Stanley WA, Bond CS und Small ID.** (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochemical Society Transactions* 35, 6: 1643-1647.
- **Dellaporta SL, Wood J und Hicks JB.** (1983). A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology* 1, 4: 19-21
- Ding YH, Liu NY, Tang ZS, Liu J und Yang WC. (2006). Arabidopsis GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *The Plant Cell* 18, 4: 815-830.
- **Dolfini S, Consonni G, Viotti C, Prà MD, Saltini G, Giulini A, Pilu R, Malgioglio A und Gavazzi G.** (2007). A mutational approach to the study of seed development in maize. *Journal of Experimental Botany* 58, 5: 1197-1205.
- **Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G und Nielsen H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* 2, 4: 953-971.
- **Endo T und Kohda D.** (2002). Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1592, 1: 3-14.
- **Fisk DG, Walker MB und Barkan A.** (1999). Molecular cloning of the maize gene crp1 reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *The EMBO Journal* 18, 9: 2621-2630.

- **Frey M, Stettner C und Gierl A**. (1998). A general method for gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). *The Plant Journal* 13: 717-721.
- **Gagliardi D und Leaver CJ.** (1999). Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *The EMBO Journal* 18, 13: 3757-3766.
- **Gagliardi D, Perrin R, Marechal-Drouard L, Grienenberger JM und Leaver CJ.** (2001). Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3'- to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 47: 43541-43547.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD und Bairoch A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31, 13: 3784-3788.
- **Giegé P und Brennicke A.** (1999). RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 26: 15324-15329.
- **Green CE und Phillips RL.** (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *crop science* 15: 417-421.
- Gutiérrez-Marcos JF, Prà MD, Giulini A, Costa LM, Gavazzi G, Cordelier S, Sellam O, *et al.* (2007). Empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. *The Plant Cell* 19, 1: 196-210.
- **Handa H.** (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (Brassica napus L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research* 31, 20: 5907-5916.
- Hanley, S, D Edwards, D Stevenson, S Haines, M Hegarty, W Schuch, und K J Edwards. (2000). Identification of transposon-tagged genes by the random sequencing of Mutator-tagged DNA fragments from Zea mays. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 23, 4: 557-566.
- Hannah LC. (2007). Starch Formation in the Cereal Endosperm. Olsen AO: Ednosperm, Plant Cell Monographs. *Springer-Verlag* 8: 21-43
- **Hattori M, Miyake H und Sugita M.** (2007). A Pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of clpP Pre-mRNA in moss chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 14: 10773-10782.
- Hayes R, Kudla J und Gruissem W. (1999). Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 5: 199-202.

- **Hueros G, Varotto S, Salamini F und Thompson RD.** (1995). Molecular Characterization of BET1, a Gene Expressed in the Endosperm Transfer Cells of Maize. *The Plant Cell* 7: 747-757.
- Hunt MD und Newton KJ. (1991). The NCS3 mutation: genetic evidence for the expression of ribosomal protein genes in Zea mays mitochondria. *The EMBO Journal* 10, 5: 1045-1052.
- Kang B-H, Xiong Y, Williams DS, Pozueta-Romero D und Chourey PS. (2009). Miniature1-encoded cell wall invertase is essential for assembly and function of wall-in-growth in the maize endosperm transfer cell. *Plant Physiology* 151, 3: 1366-1376.
- **Kiesselbach TA und Walker ER.** (1952). Structure of Certain Specialized Tissue in the Kernel of Corn. *American Journal of Botany* 39, 8: 561-569.
- **Kiesselbach TA.** (1998). The structure and reproduction of corn. University of Nebraska Press.
- **Kim, Soo-Hwan, und Virginia Walbot.** (2003). Deletion derivatives of the MuDR regulatory transposon of maize encode antisense transcripts but are not dominant-negative regulators of mutator activities. *The Plant Cell* 15, 10: 2430-2447.
- Kluth A, Sprunck S, Becker D, Lörz H und Lütticke S. (2002). 5' deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. *Plant Molecular Biology* 49, 6: 669-682.
- Kocábek T, Repková J, Dudová M, Hoyerová K und Vrba L. (2006). Isolation and characterization of a novel semi-lethal Arabidopsis thaliana mutant of gene for pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein. *Genetica* 128: 395-407.
- **Koncz C und Schell J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *MGG Molecular & General Genetics* 204, 3(9): 383-396.
- **Kotera E, Tasaka M und Shikanai T.** (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433, no. 7023 (Januar 20): 326-330.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 21: 2947-2948.
- **Lisitsky I, Klaff P und Schuster G.** (1996). Addition of destabilizing poly (A)-rich sequences to endonuclease cleavage sites during the degradation of chloroplast mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 23: 13398-13403.

- Liu YG und Whittier RF. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 3: 674-681.
- **De Longevialle AF, Hendrickson L, Taylor NL, Delannoy E, Lurin C, Badger M, Millar AH, und Small I.** (2008). The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of plastid ycf3 intron 2 in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 56, 1: 157-168.
- **Lopes MA und Larkins BA.** (1993). Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell* 5, 10: 1383-1399.
- Lorbiecke R, Steffens M, Tomm JM, Scholten S, von Wiegen P, Kranz E, Wienand U und Sauter M. (2005) Phytosulphokine gene regulation during maize (Zea mays L.) reproduction." J. Exp. Bot. 56, 417: 1805-1819.
- **Lowe J und Nelson OE.** (1946). Miniature Seed-a Study in the Development of a Defective Caryopsis in Maize. *Genetics* 31, 5: 525-533.
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, *et al.* (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell* 16, 8: 2089-2103.
- **McGinnis S und Madden TL.** (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32. Web Server issue: W20-25.
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N und Schuster G. (2003). HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *The Plant Cell* 15, 6: 1480-1495.
- Millar AH, Heazlewood JL, Kristensen BK, Braun H-P und Møller IM. (2005). The plant mitochondrial proteome. *Trends in Plant Science* 10, 1: 36-43.
- **MITCHELL P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.
- **Murashige T und Skoog F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 3 (7): 473-497.
- **Neuffer MG, und Sheridan WF.** (1980). Defective kernel mutants of maize. I. Genetic and lethality studies. *Genetics* 95, 4: 929-944.
- **Newton KJ, Mariano JM, Gibson CM, Kuzmin E und Gabay-Laughnan S.** (1996). Involvement of S2 episomal sequences in the generation of NCS4 deletion mutation in maize mitochondria. *Developmental Genetics* 19, no. 3: 277-286.

- **Nicholas KB und Nicholas HBJ.** (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <u>http://www.psc.edu/biomed/genedoc</u>.
- **Offler CE, McCurdy DW, Patrick JW und Talbot MJ.** (2003). Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annual Review of Plant Biology* 54: 431-454.
- **Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T und Shikanai T.** (2006). A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 49: 37661-37667.
- **Olsen OA, Linnestad C und Nichols SE.** (1999). Developmental biology of the cereal endosperm. *Trends in Plant Science* 4, 7: 253-257.
- **Olsen OA.** (2001). ENDOSPERM DEVELOPMENT: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 233-267.
- **Olsen OA.** (2004). Nuclear endosperm development in cereals and Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* 16: 214-227.
- O'Toole N, Hattori M, Andres C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, und Small I. (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Molecular Biology and Evolution* 25, 6: 1120-1128.
- **Pfanner N und Chacinska A.** (2002). The mitochondrial import machinery: preproteinconducting channels with binding sites for presequences. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1592, 1: 15-24.
- **Randolph LF.** (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. *Jour.Agr.research* 53: 881-916.
- **Rehling P, Wiedemann N, Pfanner N und Truscott KN.** (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36, 3: 291-336.
- **Robertson DS.** (1978). Characterization of a mutator system in maize. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 51, 1: 21-28.
- **Sabelli PA und Larkins BA.** 2009. The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology* 149, 1: 14-26.
- Sambrook J, Fritsch EF, und Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schmitz-Linneweber C und Small I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science* 13, 12: 663-670.
- **Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE und Barkan A.** (2005). RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *The Plant Cell* 17, 10: 2791-2804.

- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE, Williams-Voelker PM, Kroeger TS, Vichas A und Barkan A. (2006). A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast rps12 pre-mRNA. *The Plant Cell* 18, 10: 2650-2663.
- Schwartz RM und Dayhoff MO. (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science (New York, N.Y.)* 199, no. 4327: 395-403.
- **Shikanai T.** (2006). RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63, 6: 698-708.
- **Small ID und Peeters N.** (2000). The PPR motif a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 2: 46-47.
- Small I, Peeters N, Legeai F und Lurin C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4, 6: 1581-1590.
- **Songstad DD, Petersen WL und Armstrong CL.** (1992). Establishment of Friable Embryogenic (Type II) Callus from Immature Tassels of Zea mays (Poaceae). *American Journal of Botany* 79, 7: 761-764.
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, et al. (2008). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* 36: D1009-1014.
- **Takenaka M und Brennicke A.** (2007). RNA editing in plant mitochondria: assays and biochemical approaches. *Methods in Enzymology* 424: 439-458.
- **Takenaka M, Verbitskiy D, van der Merwe JA, Zehrmann A und Brennicke A.** (2008). The process of RNA editing in plant mitochondria. *Mitochondrion* 8, 1: 35-46.
- **Thompson RD, Hueros G, Becker H-A und Maitz M.** (2001). Development and functions of seed transfer cells. *Plant Science (Shannon, Ireland)* 160, 5: 775-783.
- Uyttewaal M, Mireau H, Rurek M, Hammani K, Arnal N, Quadrado M und Giegé P. (2008). PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *Journal of Molecular Biology* 375, 3: 626-636.

7. Anhang

7.1 Allel-Test

Um auszuschließen, dass der Mutantenphänotyp nicht durch ein dicht benachbartes, mutiertes Gen bedingt ist, welches möglicherweise aufgrund eines sehr geringen Abstandes zum ZmPPR6 durch chromosomales Crossing-over nicht getrennt werden kann, sondern mit ihm gekoppelt vererbt wird, bediente man sich eines weiteren mutierten Allels. Hierzu wurde die Mu gene machine der Firma Biogemma (Frankreich, Paris, Clermont-Ferrand) mit einem aus dem ORF des ZmPPR6 abgeleiteten Oligonukleotid (NM44) und einem *TIR*-spezifischen Primer (*Mu*Oligo1) nach einem zweiten, unabhängigen Insertionsereignis durchsucht. Ein zusätzliches Allel, welches eine Mu-Insertion im ORF des ZmPPR6-Gens 394 bp stromaufwärts des Startcodons enthielt (Abb. 4-3 A) und einen ZmPPR6-ähnlichen Körnerphänotyp zeigte, wurde auf diese Weise identifiziert und ZmPPR6-2 genannt. In einem Allel-Test konnte gezeigt werden, dass Kreuzungen zwischen heterozygoten ZmPPR6 und ZmPPR6-2 Pflanzen segregierende Maiskolben hervorbringen, die eine Aufspaltung von normalen und mutierten Maiskörnern in einem zu erwarteten 3:1 Verhältnis zeigen (Abb. 7-1). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Körnerphänotyp des ZmPPR6 und ZmPPR6-2 in der Tat durch die entsprechenden Mu-Insertionen bedingt ist.



Abb. 7-1 Allel-Test zwischen ZmPPR6 und ZmPPR6-2

(A) Genotypisierung der Linien ZmPPR6 und ZmPPR6-2 mittels PCR (oben) und Southern Blot-Analyse (unten). Die PCR für ZmPPR6 wurde mit Primern NM25/NM30, für ZmPPR6-2 mit NM25/NM32 durchgeführt. Der Bindungsbereich der ZmPPR6-DIG-Sonde ist in Abb. 4-3 A dargestellt. Der Banden-Shift in den heterozygoten gDNA-Proben, welcher mit der entsprechenden Mu-Insertion korreliert, ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Heterozygote Pflanzen, die für die in (B) abgebildete Kreuzung verwendet wurden, sind rot umrandet.
(B) Maiskolben aus einer Kreuzung zwischen heterozygoten Pflanzen der Linien ZmPPR6 und ZmPPR6-2 (siehe A).
7.2 In dieser Arbeit verwendete Primer

Schnittstellen sind unterstrichen.

Tab. 7.2-1: Primer zur Generierung von GFP-/DsRed-Konstrukten

Nr. Name Schnittstelle Sequenz ATGGTA<u>GGATCC</u>ATGGGTGGCTTCCACTTC NM1 Fw BamHI_GFP_D0432 BamHI CACCAC ATGGTAGGATCCCTATCAAACAAAGGTTCT NM2 Rev BamHI_GFP_D0432 BamHI TGAGCGAG ATTA<u>GGATCC</u>ATGTGCATCTCAGTCCGCCA NM3 *Fw_BamHI_ZmEMP4* **BamHI** CGGG TAAT<u>GGATCC</u>CTGCCGGAAAATTCTACTTC NM4 **Bam**HI *Rev_BamHI_ZmEMP4* ATCAG ATGGTA<u>GGATCC</u>ATGGGTGGCTTCCACTTC NM5 Fw BamHI PPR 1-80 BamHI CACCAC AAGACAA<u>GGATCC</u>AGGTGCTTGAGGACGCT NM6 Rev BamHI PPR 1-80 BamHI CTC *Rev_BamHI_ZmEMP4* NM7 TAATGGATCCAGCGACGGGGGGGGCACCAGT BamHI Signal

Tab. 7.2-2: Primer zur Genotypisierung von Arabidopsis T-DNA-Insertionslinien

Nr.	Name	Sequenz	T-DNA-Linie
NM8	RP_N561950_545714	GAGGCGGTTGATACTTTCCTC	AtPPR6-1 und -2,
NM9	LP_N561950_545714	CTGTTCTCTGCTGGGCTATTG	(Salk_061950, Salk_045714, Gen: At1a77360)
NM10	RP_N591917	GATGAAGCTCTTGGCATTGTG	AtPPR6-3
NM11	LP_N591917	CGAGGTGAACAAGATCTCTGG	(Salk_091917, Gen: At1g77360)
NM12	LBB1 neu	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	Salk-Linien

Tab. 7.2-3: Primer zur Herstellung von *E. coli*-Expressionskonstrukten Schnittstellen sind unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
NM13	Fw pET-GST Spel	ATATAT <u>ACTAGT</u> GATGACGACGACAAGGAG CACGAGCTCGACCATAGC	SpeI
NM14	Rev pET-GST Strep Xhol	ATATAT <u>CTCGAG</u> TTATTTTTCGAACTGCGG GTGGCTCCAAGCGCTATCAAACAAAGGTTC TTGAGCGAG	Xhol
NM15	Spel_ZmPPR o.s. pET	ATGGT <u>ACTAGT</u> CTCGACCATAGCGGCGTCC G	SpeI
NM16	XhoI_ZmPPR o.s. pET	ATATAT <u>CTCGAG</u> ATCAAACAAAGGTTCTTG AGCGAG	XhoI

Nr.	Name	Sequenz	Spezifität
NM17	Fw PPR-Sonde_ SacI	AGCGTCCTCAAGCACCTC	ZmPPR6-ORF
NM18	Rev PPR-Sonde_ SacI	TATCACTGTAAACCTCTCGCATCT	(223-703 bp)
NM19	Fw Anti-sense ZmPPR	CACAGAAGTTGGATGAGGCAGTTTACAC	7mDDDC ODE
NM20	Anti-sense T7_ZmPPR	TAATACGACTCACTATAGGGTCAATCAAAC AAAGGTTCTTGAGCGAG	(458-1470 bp)
NM21	Fw T7 rps3 EMSA kurz	TAATACGACTCACTATAGGGACAACCGCGG TATGAGTTCT	rps3-5' UTR
NM22	Rev rps3 EMSA	CGTGCCATATGTCGCTTAGAC	
NM23	rps3.for	ATTCAGTTCTAGCTATTTCCGCAC	rps3-ORF
NM24	rps3.rev	AGGTCAATTAAGGATCAAATGTAGG	

Tab. 7.2-4: Primer zur Herstellung von Sonden

Tab. 7.2-5: Sonstige Primer

Nr.	Name	Sequenz	Spezifität	
NM2E	MuOliao1	TCYAAAMCASAGAAGCCAACGCCAASG	TIR des Mu-	
INIMZ 5	MuOligo1	ССТС	Transposons	
NM26	MuOliana	CYCTCTTCKTCCATAATGGCAATTATC	TIR des Mu-	
INIMZ O	MuOligoz	ТС	Transposons	
NM27	Fw_Strep_AtPPR	ATGGTAGGTCTCAAATGACGATCAGAA TTATCAATCGTCAATC	AtPPR-ORF 5'	
NM28	Rev_Strep_AtPPR	ATGGTAGGTCTCAGCGCTATCACACAA CGGCTCATTGACCA	AtPPR-ORF 5'	
NM29	gDNA-PCR 3'D0432	AGTGATATGCTTGCCGCTGGTTGC	ZmPPR6-ORF	
NM30	Fw gPCR 3' 1kb E1252 r	AATCCCATCCTTCTCCATATCCAAAAA T	ZmPPR6-ORF	
NM31	Fw seq 3' UTR ZmPPR	GGTTAATATGGGATGGGTAGATGCTCA	ZmPPR6-3' UTR	
NM32	3' UTR D0432	CTACCCATCCCATATTAACCACG	ZmPPR6-3' UTR	
NM33	Rev_ZmPPR_800_P rom	GTCCGAGGCGTCCACCGAGATA	ZmPPR6-ORF	
NM34	Fw_ZmPPR_800_Pr om_PstI	ATGTA <u>CTGCAG</u> AGCAGGCCTCCGAAAT CACCA	ZmPPR6-Promotor	
NM2E	ZmPPR_Prom_XbaI	ATAAT <u>TCTAGA</u> CGCTGAGACCGAGATC	ZmPPR6-	
111133	_Rev	GCTGCTAA	Promotor/5'UTR	
NM36	Primer GUS	TAATGAGTGACCGCATCGAA	GUS	
NM37	Fw Eco311 D0432	ATGGTAGGTCTCAAATGGGTGGCTTCC ACTTCCACCAC	ZmPPR6-ORF	
NM38	Rev Eco311 D0432	ATGGTAGGTCTCAGCGCTATCAAACAA AGGTTCTTGAGCGAG	ZmPPR6-ORF	
NM39	Rev_XbaI_ZmPPR_ pCHF5	TAATTCTAGATCAATCAAACAAAGGTT CTTGAGCGAG	ZmPPR6-ORF 5' Ende	
NM40	Rev_BamHI_ZmPP R-Strep_pUbi- Vektor	TAATGGATCCTCATTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCAGCTAGCATCAAACAAAG GTTCTTGAGCGAG	ZmPPR6-ORF 5' Ende + Strep-TagII	
NM41	Fw 5' rps3	TAGTTCAGATCCAAGTCGGTTCAGTG	rps3-Exon1	
NM42	Rev 3' rps3	CCGAGACGAAAGCCAAAGGTG	rps3-Exon2	
NM43	Rev 3' rps3	TTTGACTATATGAGATCCGCACTTTGA C	rps3-ORF 5' Ende	
NM44	RG125_R03	ACAATGTCAGGCTGGCAACC	ZmPPR6-ORF	

7.3 Zusammenfassung der Mutanten-Screening-Ergebnisse

60 der 300 *Mutator*-Transposon-induzierten Körnermutanten wurden mit dem innovativen, cDNA-basierten *transposon tagging* Verfahren, das in Abschnitt 4.1 detailliert beschrieben wurde, analysiert. Insgesamt 48 Kandidaten-*FST*s wurden dabei identifiziert bzw. kloniert. In der nachfolgenden, kleinmaßstäbigen Validierungs-PCR mit einem aus dem jeweiligen *FST* abgeleiteten Primer (*FST*-x) sowie einem TIRspezifischen Oligonukleotid (*Mu*Oligo2) haben 15 dieser *FST*s das erwartete Bandenmuster ergeben. Lediglich drei davon, die für dasselbe Protein kodierten, nämlich das ZmPPR6, welches in dieser Arbeit funktionell untersucht wurde, haben in der großmaßstäbigen Ko-Segregations-PCR eine hundertprozentige Kopplung mit dem Mutanten-Phänotyp gezeigt. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 7-1 aufgelistet.

Tab. 7.3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Mutanten-Screenings

Mutantenlinien, bei denen Kandidaten-*FST*s identifiziert wurden, sind orange hervorgehoben. Die Anzahl der 5'- bzw. 3'-*FST*s ist angegeben. *FST*s, welche in der kleinmaßstäbigen Validierungs-PCR die gesetzten Erwartungen erfüllt haben, sind als "putativ kausal" bezeichnet.

Mu-Linie	Kandidaten- <i>FST</i> s in 5' RACE	Kandidaten- <i>FST</i> s in 3' RACE	Klonierte und sequenzierte FSTs	Ergebnis der Validierungs- PCR	Ergebnis der großen Ko- Segregations- Analyse
C0424	0	0			
C0591	0	0			
C0982	0	0			
<i>C1247</i>	2	0	2	putativ kausal	nicht kausal
C2421	1	3	2	nicht kausal	
D0009	1	0	1		
D0016	1	1	2	kausal: ZmPPR6	kausal: ZmPPR6
D0201	0	0			
D0216	0	0			
D0224	2	3	5	putativ kausal	nicht kausal
D0243	1	1	2	putativ kausal	nicht kausal
D0244	3	0	3	nicht kausal	
D0386	0	3	3	nicht kausal	
D0432	1	1	2	kausal: ZmPPR6	kausal: ZmPPR6
D0455	1	0	1	nicht kausal	
D0708	0	0			
D1154	0	1	1	putativ kausal	nicht kausal
D2104	0	0			
D2152	0	0			
E0055	0	0			

Fortsetzung von Tab. 7.3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Mutanten-Screenings					
E0558	1	0	1	nicht kausal	
E0664	1	0	1	nicht kausal	
E0797	0	0			
E0823	0	0			
E0878	0	0			
E1071	0	3	3	putativ kausal	nicht kausal
E1171	0	0			
E1243	0	0			
E1252	0	3	3	kausal: ZmPPR6	kausal: ZmPPR6
E1263	0	3	2	kausal: ZmPPR6	
E2149	0	1	1	putativ kausal	nicht kausal
E2239	0	0			
F0017	0	0			
F0034	0	0			
F0059	0	0			
F0118	0	0			
F0127	0	1	1	kausal: ZmPPR6	
F0134	0	0			
F0176	0	1	1	nicht kausal	
F0241	0	0			
F0300	0	2	2	putativ kausal	nicht kausal
F0316	0	0			
F0411	0	1	1	nicht kausal	
F0484	0	1	1	putativ kausal	nicht kausal
F0507	1	0	1	nicht kausal	
F0609	0	0			
F0697	1	0	1	nicht kausal	
F0764	0	0			
F0827	0	0			
F0844	1	1	2	putativ kausal	nicht kausal
F0871	0	0			
F0919	0	1	1	kausal: <i>ZmPPR6</i>	
F0940	0	0			
F1038	0	0			
F1048	0	0			
F1074	0	1	1	nicht kausal	
F1083	0	0			
F1085	0	0			
F1160	0	0			
F1178	0	0			

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Udo Wienand für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und für den gut ausgestatteten Arbeitsplatz bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer danke ich, für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Reinhold Brettschneider für die geduldige und kompetente Betreuung sowie für alle aufbauenden, motivierenden Worte in Zeiten der Verzweifelung.

Herrn PD Dr. René Lorbiecke danke ich für seine Hilfsbereitschaft und seine guten Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Gregorio Hueros, Herrn Dr. Peter Rogowsky und Frau Dr. Virginie Guyon danke ich für die kompetente Zusammenarbeit, für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen. Bei dem Team der Firma Biogemma möchte ich mich besonders für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und dessen Aufarbeitung bedanken.

Allen Mitarbeitern von AMPI danke ich für die schöne Zeit, ihre ständige Hilfsbereitschaft und den freundlichen Umgang miteinander. Besonders danke ich Dr. Jantjeline Kluth für ihre Unterstützung und Tipps. Katja Müller danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der transgenen Pflanzen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meinem Bruder und Rie bedanken, die mich in schwierigen Zeiten stets unterstützt haben.

Danke Hans-Jürgen!