

Identifizierung und Charakterisierung der
mRNA processing bodies von
Arabidopsis thaliana

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Christian Weber
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2007

D30

vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Nover

Gutachter: Jun. Prof. Dr. Pascal von Koskull-Döring

Datum der Disputation: 26. März 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Glossar	vi
1 Einleitung	1
1.1 mRNA als zentrales Molekül in der zellulären Genexpression	1
1.2 Die biologische Rolle von mRNA-Abbau	3
1.3 Die mRNA-Abbauwege in Eukaryonten	3
1.3.1 Deadenylierungs-abhängiger mRNA-Abbau	3
1.3.2 Entfernung fehlerhafter mRNA über speziellen Abbau	5
1.3.3 Endonukleolytischer Abbau	5
1.4 Der 5'-3' mRNA-Abbau	6
1.4.1 Deadenylasen	6
1.4.2 Die Decapping-Maschinerie	6
Dcp2	8
Dcp1	8
1.4.3 5'-3' mRNA-Exoribonuklease	9
1.5 Der Decapping-Komplex und regulatorische Proteine	10
1.6 mRNA-Abbau und mRNA-Translation	11
1.7 Der 5'-3' mRNA-Abbau findet in spezialisierten Strukturen statt	12
1.8 RNA Stressgranula speichern mRNA	14
1.9 mRNA-Abbau in Pflanzen	15
1.10 Ziele der Arbeit	17

2	Material und Methoden	18
2.1	Molekularbiologische Arbeiten	18
2.1.1	Allgemeine Arbeiten mit Nucleinsäuren	18
2.1.2	Semi-quantitative RT-PCR Analyse	18
2.1.3	Protein Analysen	19
2.1.4	HPLC Analysen	20
2.1.5	Expressions Vektoren	22
2.1.6	Gewinnung eines Antiserums gegen <i>Arabidopsis</i> Dcp1	27
2.2	Arbeiten mit Pflanzen	28
2.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien	28
2.2.2	Allgemeine Arbeiten mit pflanzlichen Protoplasten	28
2.3	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.4	Mikroskopie	30
2.4.1	Subzelluläre Lokalisationsanalysen	30
2.4.2	BIFC Analyse und GFP-Fluoreszenzmikroskopie	31
2.4.3	Elektronenmikroskopie	31
	Ultrastruktureinbettungen	31
	Immunogold Einbettungen	31
	Ultramikrotomie und Elektronenmikroskopie	32
	Immunogoldmarkierungen an Ultradünnschnitten	32
2.5	Bioinformatische Analysen	33
2.5.1	Sequenzanalysen und Datenbanksuche	33
2.5.2	Zugangsnummern der Proteinsequenzen	33
2.5.3	Zugangsnummern der EST-Sequenzen	34
2.5.4	Microarray Analyse	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Identifizierung von 5'-3' mRNA-Abbau Proteinen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	35

3.1.1	Dcp1	35
3.1.2	Dcp2	39
3.1.3	LSm Proteine	42
3.2	Expressionsanalyse	45
3.3	Lokalisationsanalyse	45
3.3.1	Subzelluläre Lokalisation von GFP-Dcp1 und GFP-Xrn4	46
3.3.2	Subzelluläre Lokalisation von GFP-Dcp2	47
3.3.3	Subzelluläre Lokalisation von GFP-LSms	49
3.4	Interaktionsanalyse der mRNA-Abbau Proteine	50
3.5	Interaktionsanalyse im pflanzlichen Expressionssystem	52
3.5.1	Interaktionen in zytoplasmatischen Foci	54
3.5.2	Interaktionen im Nukleus und Zytoplasma	54
3.5.3	Das Interaktom	57
3.6	Gewinnung eines Antikörpers gegen At Dcp1	58
3.7	Analyse von Dcp1 und Dcp2 Komplexen	60
3.8	Subzelluläre Lokalisation von endogenem Dcp1	62
3.9	Dcp1-Foci sind P-bodies	66
3.10	P-bodies reagieren auf Stress	68
3.11	P-bodies, RNA Stressgranula und Hitzestressgranula	70
4	Diskussion	75
4.1	Nachweis von endogenem Dcp1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
4.2	Das Interaktionsnetzwerk	78
4.3	Vorteile der mRNA-Prozessierung in P-bodies	80
4.4	Assemblierung der P-bodies	81
4.5	Rolle des 5'-3' mRNA-Abbaus in Pflanzen	82
4.6	Substrate der P-bodies	84
4.7	P-bodies und ihre Rolle unter Stressbedingungen	85

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	v
4.8 P-bodies, RSGs und HSGs	87
5 Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis	95
A Lokalisationsanalyse	107
B Split YFP Analyse	109
Publikationen	117
Danksagung	118
Erklärung	120
Curriculum Vitae	121

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

In der vorliegenden Arbeit wurden alle englisch-sprachigen Fachbegriffe ins Deutsche übersetzt, für die es sinnvoll möglich war. Ansonsten wurde die englische Bezeichnung beibehalten, da es sich in diesen Fällen zumeist um Bezeichnungen handelt, die zum Eigennamen geworden sind. Diese Begriffe sind in der folgenden Tabelle näher beschrieben.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Begriffe

3-AT	3-Amino 2,4,6-triazol
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)
BIFC	Bimolecular fluorescence complementation analysis (Split YFP), Methode zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Protein-Protein Interaktionen
C-Terminus	Carboxy-Terminus des Proteins
Decapping	Prozess des 5'-3' mRNA-Abbau, bei dem die mRNA Kappenstruktur (Cap) enzymatisch entfernt wird
Dcp1	regulatorische Untereinheit des Decapping Komplexes
Dcp2	enzymatische Untereinheit des Decapping Komplexes, Decapping Enzym
DIC	Differenzieller Interferenz Kontrast (Mikroskopie) (differential interference contrast)
EST	expressed sequence tag, Nachweis einer mRNA in einem Gewebe
GFP	green fluorescent protein
3 HA	dreifache Wiederholung des Hämagglutinin Antigenepitops des Influenza Virus

His 3	Gen codierend für die Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydrase
Hs	Homo sapiens
HSG	Hitzestressgranula
Hsp	Hitzestressproteine
IF	Immunofluoreszenz
Le	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)
Lsm	Sm-like proteins; RNA-Bindeproteine mit charakteristischer und hochkonservierter SM-Domäne
Mt	<i>Medicago truncatula</i> (Gestutzter Schneckenklee, Leguminose)
N-Terminus	Amino-Terminus des Proteins
PBy	P-body, mRNA processing body, Ort des 5'-3' mRNA-Abbau
RNAi	RNA Interferenz
ORF	open reading frame, codierende Sequenz für ein Protein
Os	<i>Oryza sativa</i> (Reis)
RSB	RNA Stress Granula, analoge Strukturen zu den Stress Granula (SG) der Säugerzellen, die für die Speicherung von mRNA unter Stressbedingungen dienen.
RFP	red fluorescent protein
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SG	Stress Granula; Speicherkompartimente der Säugerzellen für mRNA unter Stressbedingungen
Strep	kurze Peptidsequenz, die als Antigen dient
Tag	an ein Protein angehängte Peptidsequenz, die zum Nachweis des Proteins in Lokalisations- bzw. Western Analysen dient
T-DNA	Transfer DNA von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Xrn	5'-3' mRNA-Exoribonuklease
YFP	yellow fluorescent protein

1 Einleitung

Wachstum und die Entwicklung von Organismen sowie deren Fähigkeit, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, erfordert die regulierte Expression von Genen. Eine zentrale Stellung nimmt dabei die Regulation auf transkriptioneller Ebene ein. Weiterhin spielen post-transkriptionelle Mechanismen wie zum Beispiel mRNA-Export, mRNA-Translation, mRNA-Abbau als auch Proteinmodifikation eine sehr wichtige Rolle. Diese Mechanismen bieten der Zelle zusätzliche Möglichkeiten sowie das erforderliche Maß an Flexibilität, schnell auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren.

1.1 mRNA als zentrales Molekül in der zellulären Genexpression

Die messenger RNA (mRNA) ist ein kurzlebiges Zwischenprodukt beim Transfer der genetischen Information von DNA zum Protein. Sie bietet einen wichtigen Angriffspunkt für die Regulation der Genexpression, da die Menge der mRNA sowie die Zugänglichkeit für die Translationsmaschinerie direkt die Synthese eines Proteins bestimmt.

Die mRNAs der Eukaryonten werden kotranskriptionell durch kovalente Bindung eines methylierten Guanodin (m⁷G, Kappenstruktur) am 5' Ende und durch Anheftung eines Poly A Schwanzes (70-300 Nukleotide) am 3' Ende modifiziert (Abb. 1.1). Diese charakteristischen Strukturen werden von Proteinen gebunden (messenger ribonucleoprotein: mRNP) und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulären Prozessen wie zum Beispiel mRNA-Splicing, Export und Translation sowie mRNA-Abbau.

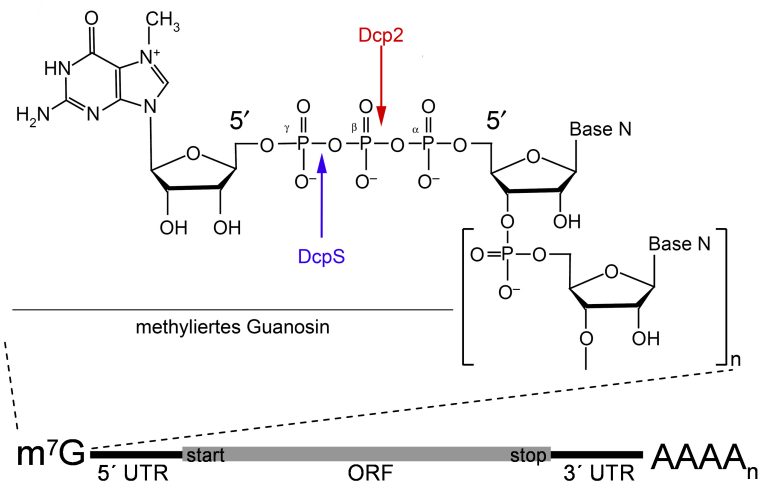


Abbildung 1.1: Charakteristische Strukturen eukaryontischer mRNA. Die mRNA besteht aus einem offenen Leserahmen (ORF), einer 5' UTR und einer 3' UTR (untranslatierte Region). Die mRNA ist an ihren beiden Enden mit einer Kappenstruktur (5' Ende) und einem poly A Schwanz (3' Ende) modifiziert. Die Kappe besteht aus einem 7-methyl-Guanosin, das über eine 5'-5'-Triphosphat-Bindung mit dem ersten Nucleotid der mRNA verknüpft ist. Die Kappenstruktur wird bereits während der Transkription durch die Guanylyltransferase kovalent mit der neu synthetisierten mRNA verknüpft und anschließend durch die Guanine-N7-methyltransferase modifiziert. Die Pfeile zeigen die Schnittstellen der jeweiligen Decapping Enzyme an. Bei der Hydrolyse durch Dcp2 entsteht ein m⁷GDP und ein Transkript mit 5' Monophosphat Ende, wohingegen bei der Hydrolyse durch DcpS m⁷GMP und eine mRNA mit 5' Diphosphat Ende entsteht. Dcps ist auch am Abbau des m⁷GDP, dass aus dem Abbau durch Dcp2 resultiert, beteiligt.

1.2 Die biologische Rolle von mRNA-Abbau

Der mRNA-Abbau ist eine kritische Komponente der eukaryontischen Genexpression und ermöglicht die Feinregulation der basalen Genexpression. So kann im eukaryontischen Organismus bei veränderten Umwelteinflüssen die Genexpression schnell beeinflusst werden. Es existieren zahlreiche Beispiele, bei denen die mRNA-Stabilität durch verschiedene Signale reguliert wird. Die mRNA-Abbauwege spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Abwehr von Viren, in der mRNA-Biogenese, beim Abbau von fehlerhaften mRNAs, sie sind an RNA Interferenz-Mechanismen (siRNA und miRNA) beteiligt und verdeutlichen die zentrale Funktion des mRNA-Abbaus in der eukaryontischen Genexpression (Dykxhoorn et al., 2003; Kim, 2005).

1.3 Die mRNA-Abbauwege in Eukaryonten

Durch die einfache gentechnische Handhabung von *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) stammen die meisten Erkenntnisse über mRNA-Abbau aus Experimenten mit diesem Organismus. Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass vier mRNA-Abbaumechanismen bis zu den höheren Eukaryonten konserviert sind: (1) deadenylierungs-abhängiger 5'-3' mRNA-Abbau, (2) deadenylierungs-abhängiger 3'-5' mRNA-Abbau, (3) spezialisierter deadenylierungs-unabhängiger mRNA-Abbau wie zum Beispiel der Abbau von fehlerhafter mRNA und (4) deadenylierungs-unabhängiger endonukleolytischer mRNA-Abbau (Abb. 1.2).

1.3.1 Deadenylierungs-abhängiger mRNA-Abbau

Die deadenylierungs-abhängigen Abbauwege stellen die Hauptabbauwege dar und sind auch in höheren Eukaryonten konserviert. Der Abbau der deadenylierten mRNA vom 3' Ende wird durch einen Multiproteinkomplex katalysiert, der aus mehreren 3'-5' Exoribonukleasen besteht und als Exosom bezeichnet wird. Das Exosom ist auch an zahlrei-

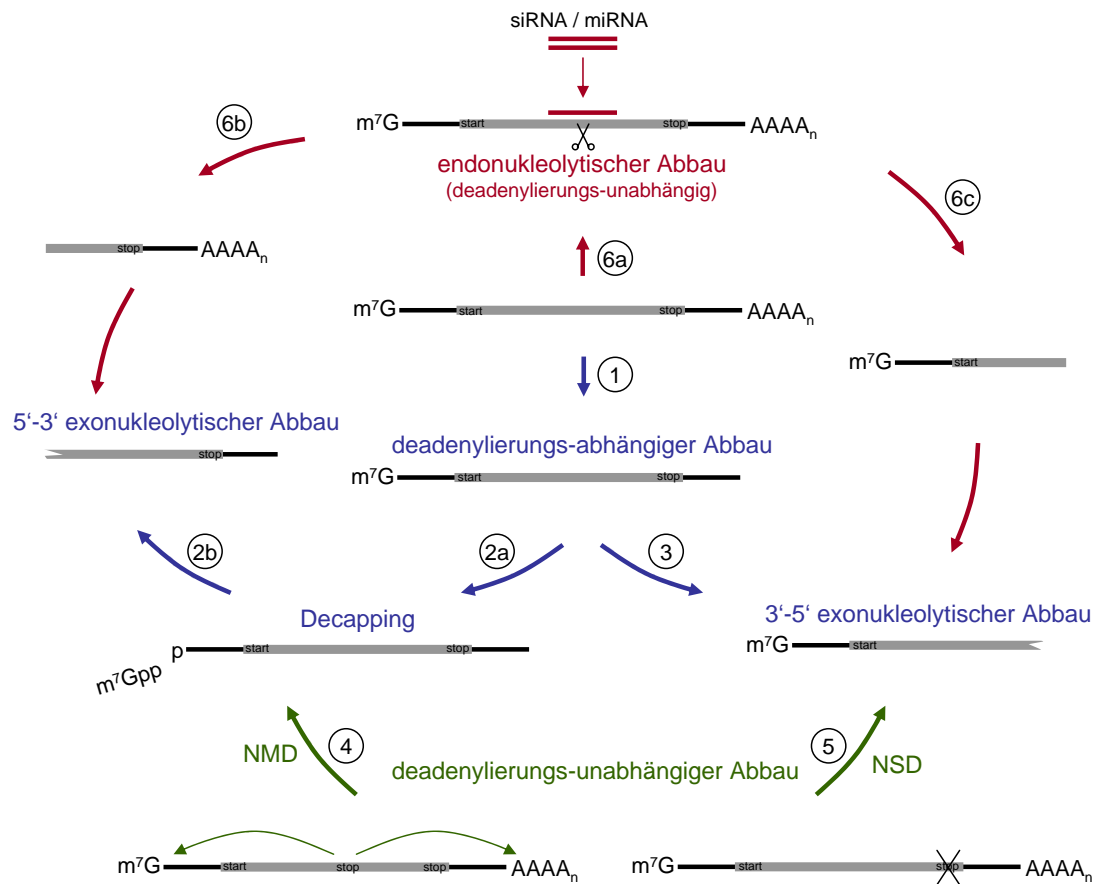


Abbildung 1.2: Übersicht über eukaryotische mRNA-Abbaumechanismen. (1) Der generelle Abbau von mRNA ist deadenylierungsabhängig (blau). (2) Danach wird die mRNA entweder nach einer Decapping-Reaktion in 5'-3' Richtung oder (3) decapping-unabhängig in 3'-5' Richtung abgebaut. (4) Nonsense mRNA (NMD) werden über einen deadenylierungs-unabhängigen Decapping-Mechanismus der 5'-3' Exoribonuklease zugeführt (grün). (5) Wenn die mRNA kein Stop-Kodon (NSD) enthält, wird sie dem 3'-5' Abbau zugeführt (grün). (6) In höheren Eukaryonten wird der Abbau von vielen mRNAs durch kleine einzelsträngige mRNAs (siRNA/miRNA; 19-25 nts) reguliert (rot). Diese kleinen mRNAs befinden sich in einem RISC-Komplex (RNA inducing silencing complex), der an eine komplementäre Sequenz in der Ziel-mRNA bindet und die Spaltung der mRNA induziert. Die ungeschützten 5'- und 3'-Enden erlauben anschließend einen schnellen Abbau über die allgemeinen Abbaumechanismen.

chen mRNA-Reifungsprozessen im Zellkern beteiligt (van Hoof und Parker, 1999; Butler, 2002). Beim 5'-3' mRNA-Abbau wird nach der Deadenylierung die 5' Kappenstruktur der mRNA entfernt, und damit die mRNA für den exonukleolytischen Abbau durch eine 5'-3' Exoribonuklease zugänglich gemacht.

Welcher Abbauweg den Hauptweg darstellt, ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise bestehen dabei Unterschiede zwischen den Organismen. In Hefe ist jeder Weg für das Zellwachstum ausreichend, wohingegen ein Ausfall beider Abbauwege zum Tode führt (Johnson und Kolodner, 1995; Anderson und Parker, 1998).

1.3.2 Entfernung fehlerhafter mRNA über speziellen Abbau

Der Abbau von mRNA ohne vorhergehende Deadenylierung findet bei der Qualitätskontrolle von mRNA (mRNA surveillance) statt. Dieser Mechanismus ermöglicht es der Zelle, fehlerhafte mRNA, die zum Beispiel ein verfrühtes Stopkodon (NMD: nonsense-mediated decay) oder kein Stopkodon (NSD: non-stop mediated decay) enthalten, dem deadenylierungs-unabhängigem Abbau zuzuführen. Im Falle des NMD Abbauweges wird die fehlerhafte mRNA dem 5'-3' Abbauweg zugeführt, wohingegen mRNA ohne Stopkodon vom Exosom abgebaut wird (Muhlrads und Parker, 1994; Frischmeyer et al., 2002; Cao und Parker, 2003; van Hoof et al., 2002). Dieser Mechanismus bewahrt die Zelle vor der Produktion fehlerhafter Proteine, die schädliche Auswirkungen auf die Zelle haben können (Amrani et al., 2006).

1.3.3 Endonukleolytischer Abbau

Neueste Erkenntnisse zeigen, dass in höheren Eukaryonten die Stabilität von mRNA auch über 19-25 bp RNA Fragmente (siRNA und miRNAs) reguliert wird. Diese können sich sequenzspezifisch an eine mRNA komplementär anlagern und einen endonukleolytischen Schnitt in dieser induzieren, der die mRNA direkt für das Exosom und die 5'-3' Exoribonuklease zugänglich macht (Dykxhoorn et al., 2003; Kim, 2005).

1.4 Der 5'-3' mRNA-Abbau

Der 5'-3' mRNA-Abbau wurde bisher hauptsächlich in Hefe und in Säugerzellen aufgeklärt. Im folgenden beziehen sich die Beschreibungen größtenteils auf diese Organismen. Auch wenn bereits deutliche Unterschiede zwischen diesen Organismen beobachtet wurden, deutet sich an, dass die Grundmechanismen in allen Eukaryonten konserviert sind (Abb. 1.3).

1.4.1 Deadenylasen

Die Deadenylierung der mRNA ist der erste und die Geschwindigkeit bestimmende Schritt im 5'-3' mRNA-Abbau (Übersicht in Meyer et al., 2004). In Hefe wurden zwei Deadenylasen (3'-5' Exoribonukleasen) charakterisiert: (1) die zytoplasmatische Deadenylase PAN (poly A binding protein (PABP)-dependent poly A nuclease) und (2) Ccr4/Pop2 Komplex (auch Caf1) (Sachs und Deardorff, 1992; Lowell et al., 1992; Tucker et al., 2001, 2002). Die Deadenylase PAN ist für die Kontrolle der Poly A Länge neu synthetisierter mRNAs verantwortlich. Dagegen scheint der Ccr4/Pop2 Komplex die Haupt-Deadenylase im Zytoplasma zu sein. Diese beiden Deadenylasen sind auch in höheren Eukaryonten konserviert (Albert et al., 2000; Temme et al., 2004). In Säugerzellen und Pflanzen ist noch eine zusätzliche Deadenylase PARN (poly A ribonuclease) bekannt, die in Hefe und *Drosophila* nicht vorhanden ist. Bisherige Untersuchungen konnten jedoch keine zentrale Rolle von PARN im mRNA-Abbau der Säugerzellen nachweisen. Jedoch konnte für das PARN aus *Arabidopsis thaliana* eine Rolle während der Entwicklung der Pflanze identifiziert werden (Chiba et al., 2004).

1.4.2 Die Decapping-Maschinerie

Im Zytoplasma hat die Kappenstruktur der mRNA eine zentrale Funktion in der Regulation der Translation der mRNA. Sie bietet eine spezifische Erkennungsstruktur für Translationsinitiationsfaktoren, deren Bindung indirekt den Abbau der mRNA durch

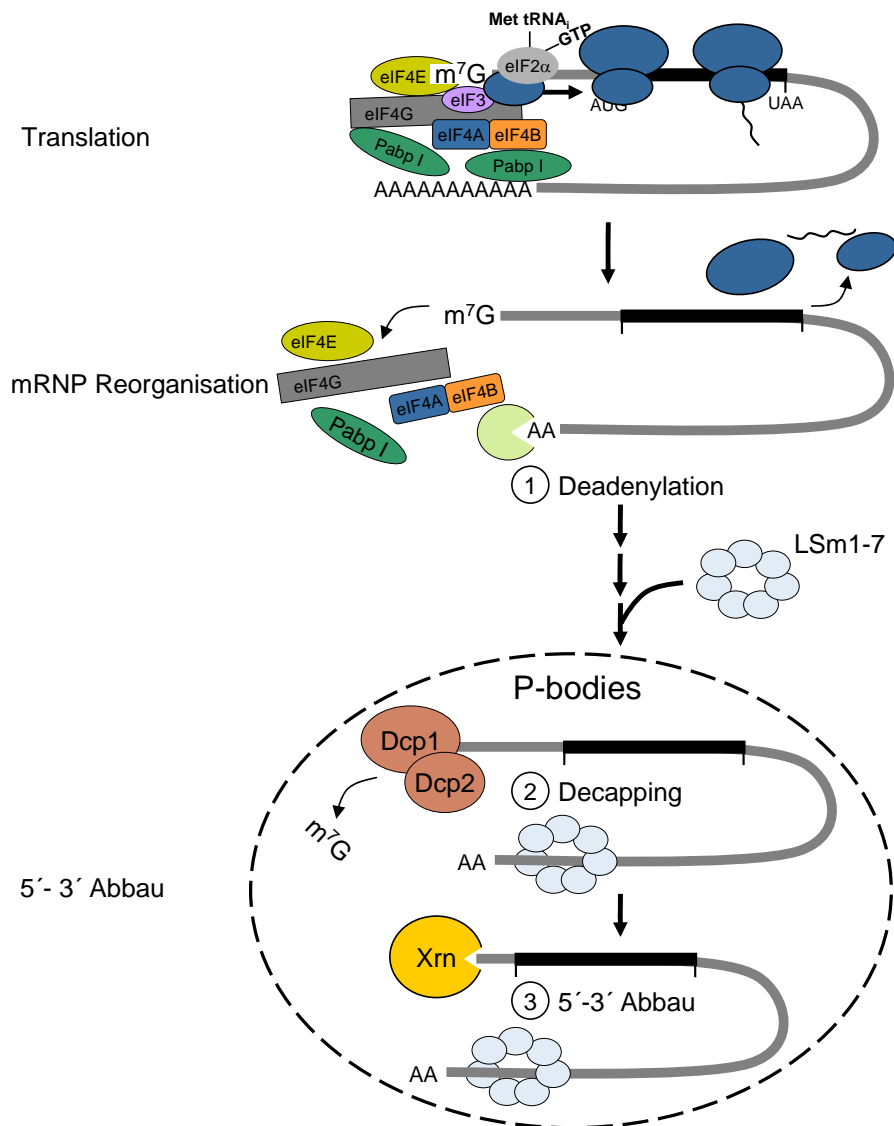


Abbildung 1.3: Der 5'-3'-mRNA-Abbau bei Eukaryoten. Er besteht aus drei Hauptschritten und (1) beginnt mit der schrittweisen Deadenylierung der mRNA, die sich im Polysomenverband befindet und translatiert wird. Sobald der Poly A Schwanz eine kritische Länge erreicht, findet eine Reorganisation in der mRNP-Zusammensetzung statt, die die mRNA in einen translationsinkompetenten Zustand überführt. Die daran beteiligten Mechanismen sind noch nicht verstanden. Eine wichtige Rolle bei der Transition spielt der heptamere LSM 1-7 Komplex. Er bindet an die deadenylierte mRNA und verstärkt die Bindung des Decapping-Komplex (Dcp1/ Dcp2) an die mRNA (2). Anschließend wird die Kappenstruktur entfernt und ermöglicht den 5'-3' mRNA-Abbau durch die Exoribonuklease (Xrn) (3). Die Decapping-Reaktion und der exonukleolytische Abbau geschieht in zytoplasmatischen Mikrokompartimenten, den P-bodies (mRNA processing bodies).

Exonukleasen verhindert (Schwartz und Parker, 2000; Gallie, 2002; Wilkie et al., 2003) (Abb. 1.3). Das Entfernen der Struktur führt zu einem schnellen und kompletten Abbau der mRNA (Wilusz et al., 2001). Aufgrund der zentralen Stellung der Kappenstruktur, ist die Decapping-Reaktion ein fein regulierter Prozess. Bei der Decapping-Reaktion des 5'-3' mRNA-Abbaus wird die m⁷pppX Kappenstruktur der mRNA enzymatisch durch den Decapping-Komplex (Dcp1 / Dcp2) entfernt und führt zur Bildung von m⁷GDP und einem Transkript mit 5' Monophosphat-Ende (Abb. 1.1). Das Decapping-Enzym Dcps (Scavenger enzyme), welches ein m⁷GMP produziert, entfernt die Struktur nur von kurzen Oligonukleotiden, die aus dem Abbau durch das Exosom resultieren. Es ist weiterhin für den Abbau von m⁷GDP verantwortlich, das durch den Decapping-Komplex entsteht (Abb. 1.1).

Dcp2

Die enzymatisch aktive Untereinheit des Decapping-Komplex ist das Dcp2 (Abb. 1.1). Es trägt das charakteristische Nudix/MuT Motiv, das verantwortlich für die enzymatische Aktivität ist. Dieses Motiv ist in vielen Proteinen zu finden, die die Hydrolyse von Nukleosid-Diphosphat-Bindungen, gebunden an einen Rest X (Nudix), durchführen. Die Nudix-Domäne befindet sich im N-terminalen Teil des Proteins, der besonders konserviert ist. In dieser Region finden sich auch die charakteristischen Motive Box A und Box B. Während Box B für die RNA-Bindung verantwortlich ist, trägt Box A zur spezifischen Spaltung der α - β -Phosphat-Brücke bei (Piccirillo et al., 2003).

Dcp1

Die Aktivität von Dcp2 ist abhängig von Dcp1 (Dunckley und Parker, 1999; Lykke-Andersen, 2002; van Dijk et al., 2002, Wang et al., 2002). Die exakte Rolle von Dcp1 konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Derzeitige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Dcp1 eine wichtige regulatorische Komponente der Decapping-Reaktion darstellt

(She et al., 2004). Detaillierte Untersuchungen von Sc Dcp1 haben ergeben, dass der N-terminale Teil des Proteins zu einer neuen Klasse von EVH1/WH1 Domänen gehört, die eine Oberfläche für Interaktionen mit Prolin-reichen Liganden bieten (Renfranz und Beckerle, 2002). In Säugerzellen existieren zwei Homologe (hDcp1a, hDcp1b). hDcp1a spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der TGF β (transforming growth factor) induzierten Transkription. Dcp1 konnte weiterhin in Komplex mit dem Translationsinitiationskomplex beobachtet werden und scheint außerdem eine aktive Rolle in der Translationstermination zu spielen (Vilela et al., 2000; Kofuji et al., 2006).

Die Analyse von Phänotypen lieferte auch Hinweise darauf, dass Dcp1 eine Rolle im Zellwachstum und der Entwicklung haben könnte. Zum Beispiel können Dcp1 Mutanten von Hefe nicht bei 36°C wachsen (Beelman et al., 1996; Hatfield et al., 1996). *Schizosaccharomyces pombe* Dcp1 Deletionsmutanten sind nicht lebensfähig (Sakuno et al., 2004). In *Drosophila* führt die Deletion von Dcp1 zu schweren Defekten in der Reifung des Embryos, die aus der Fehllokalisierung von maternaler mRNA während der Oogenese resultieren (Lin et al., 2006).

1.4.3 5'-3' mRNA-Exoribonuklease

In Hefe und in Säugerzellen wurde eine 5'-3' Exoribonuklease (Xrn1) identifiziert. Diese baut mRNA hydrolytisch in 5'-3' Richtung zu 5' Mononukleotiden ab, wohingegen mRNAs mit intakter Kappenstruktur gegen diesen Abbau geschützt sind. Die Exoribonuklease Xrn1 ist in Hefe und Säugerzellen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. In Hefe konnte auch eine Rolle in der Reifung von 5' Enden von ribosomaler RNA (rRNA) und im Abbau von Prozessierungsintermediaten identifiziert werden (Stevens et al., 1991; Henry et al., 1994). Die Prozessierung der rRNA im Zellkern wird zusätzlich von Xrn2/Rat1 durchgeführt. Xrn2p ist ausschließlich nukleär lokalisiert und ist essentiell für das Wachstum von Hefe. Es wird vermutet, dass es hauptsächlich für die das Trimming (verkürzen) der 5' Enden von rRNAs und mehreren snoRNAs während

ihrer Reifung wichtig ist (Kenna et al., 1993; Petfalski et al., 1998; Villa et al., 2000).

1.5 Der Decapping-Komplex und regulatorische Proteine

Die exakte Zusammensetzung des Decapping-Komplexes ist bisher nicht aufgeklärt. Über Interaktionsstudien mit Dcp1 und Dcp2 aus verschiedenen Organismen wurde gezeigt, dass diese Proteine miteinander interagieren (Fromont-Racine et al., 2000; Lykke-Andersen et al., 2002; van Dijk et al., 2002; Lehner und Sanderson, 2004). In Säugerzellen wird diese Interaktion von dem Protein Ge-1 / Hedls (human enhancer of decapping large subunit) vermittelt, und die Decapping-Aktivität von Dcp2 wird auch durch Hedls *in vitro* erhöht (Fenger-Grøn et al., 2005; Yu et al., 2005). Hedls ist in Hefe nicht vorhanden, und dies verdeutlicht, dass Unterschiede in der Zusammensetzung der Decapping-Komplexe existieren.

Es konnten auch zahlreiche Regulatoren wie zum Beispiel Dhh1/ p54, Edc1-3 (enhancer of decapping) des Decapping-Komplexes identifiziert werden, die bis zu den höheren Eukaryonten konserviert sind (Dunckley und Parker, 1999; Tharun und Parker, 1999; Steiger et al., 2003; Eystathioy et al., 2002; Cougot et al., 2004; Sakuno et al., 2004). Allerdings ist die zeitliche und funktionelle Beziehung zwischen diesen Proteinen sowie deren Einfluß auf die Decapping-Reaktion noch nicht genau bekannt.

In Hefe und Säugerzellen wurde weiterhin ein zytoplasmatischer, heterooligomerer und ringförmiger Komplex aus sieben LSm Proteinen (Sm-like proteins, LSm 1-7) identifiziert, der für die ersten Schritte des 5'-3' Abbaus benötigt wird (Tharun und Parker, 2001). Die Proteine der Sm-Protein-Familie wurden ursprünglich in Komplex mit kleinen mRNA Partikeln im Zellkern identifiziert und sind an der Reifung von snRNP und dem prä-mRNA-Splicing beteiligt. Dieser Prozess wird von dem nukleären LSm 2-8 Komplex vermittelt. Die Sm-Proteine sind durch das zweiteilige SM-Sequenz-Motiv charakterisiert, das bereits in Archaeobakterien zu finden ist und aus sieben hoch konservierten Aminosäuren besteht, die von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren umgeben

sind (Hermann et al., 1995; Séraphin, 1995; Salgado-Garrido et al., 1999). Die Sm-Domäne dient der Oligomerisierung und Bindung an RNA. Der Name der Domäne stammt aus früheren Studien, bei denen diese Domäne als Antigen bei Autoimmunerkrankheiten identifiziert werden konnte (Tan, 1989).

Der LSM 1-7 Komplex verstärkt die Decapping-Reaktion auf bisher unbekannt Weise. Er bindet bevorzugt an das 3' Ende deadenylierter mRNA und bildet stabile Komplexe mit der Decapping-Maschinerie und der 5'-3' Exoribonuklease (Boeck et al., 1998; Bouveret et al., 2000; Fromont-Racine et al., 2000; He und Parker 2000; Tharun und Parker, 2001; Tharun et al., 2000; Lehner und Sanderson, 2004).

1.6 mRNA-Abbau und mRNA-Translation

Die Regulation des Abbaus wird hauptsächlich vom PABP (poly A binding protein), das den Poly A Schwanz bindet, vermittelt. Dabei hat die Länge des poly A Schwanzes einen bedeutenden Einfluss auf die Decapping-Reaktion (Decker und Parker, 1993; Muhlrads et al., 1994; 1995). So findet Decapping an mRNAs statt, die nur noch eine poly A Länge von ca. 12 nt aufweisen, welche die minimale Länge für die Bindung von PABP ist (Sachs et al., 1987; Decker und Parker, 1993). Die Art und Weise, wie PABP die Decapping-Reaktion reguliert, ist bisher nicht bekannt. Der regulatorische Einfluss von PABP ist wahrscheinlich mit seiner Funktion in der Translation verknüpft. Es wurde beobachtet, dass PABP mit dem Translationsinitiationskomplex (Cap binding complex), der unter anderem aus eIF4G, eIF4E, eIF4A und eIF4B besteht, interagiert und die Bildung einer mRNA-Schleife (mRNA closed loop model) hervorruft, die die Voraussetzung für eine effiziente Translationsinitiation ist (Tharun und Sachs, 1996; Gallie, 2002) (Abb. 1.3, 1.4). Weiterhin kann PABP die Kappenstruktur auch direkt binden und könnte damit den Abbau regulieren.

Weitere Untersuchungen an Translationsinitiationsfaktoren deuten darauf hin, dass eine effiziente Translation, beziehungsweise die Translationsinitiation als die Geschwin-

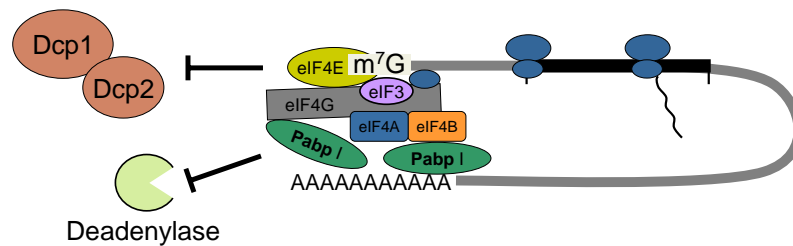


Abbildung 1.4: Aktuelles Modell, wie die aktive Translation von mRNA den Abbau verhindern könnte. Eine zentrale Stellung nimmt dabei PABP ein, welches den Ringschluss der mRNA ermöglicht, sowie das eIF4E das an die Kappe bindet. Erst wenn der Initiationskomplex destabilisiert wird, ist die mRNA zugänglich für mRNA abbauende Proteine.

digkeit bestimmender Schritt, die mRNA vor dem Abbau schützt und damit Translation und Abbau in Konkurrenz stehen (Muhlrad et al., 1995; Peltz et al., 1992; Beermann und Parker, 1994; La Grandeur und Parker, 1999; Schwartz und Parker, 1999). So verringern Faktoren, die die Assoziation der mRNA mit Ribosomen erhöhen, die mRNA-Abbaurrate und umgekehrt (Muhlrad et al., 1995; La Grandeur und Parker, 2000; Schwartz und Parker 2000; Tharun und Parker, 2001). Bisher ist allerdings nicht geklärt, wie die aktive Translation den mRNA-Abbau verhindert. Eine Möglichkeit ist, dass durch die Bildung der mRNA-Schleife und die enge Bindung der mRNA durch Proteine, der Zugang für die Abbau Maschinerie verhindert wird (La Grandeur und Parker, 2000; Wilusz et al., 2001) (Abb. 1.4).

1.7 Der 5'-3' mRNA-Abbau findet in spezialisierten Strukturen statt

Lokalisationsstudien von 5'-3' mRNA-Abbauproteinen (Dcp1, Dcp2, Xrn1, LSM1-7) haben in Hefe und Säugerzellen zur Entdeckung von neuen zytoplasmatischen Strukturen geführt, die als Processing bodies (P-bodies, PB) bezeichnet werden (Bashkirov et al., 1997; Eystathioy et al., 2002; Ingelfinger et al., 2002; Lykke-Andersen, 2002; van Dijk

et al., 2002; Sheth und Parker, 2003; Cougot et al., 2004). Es zeigte sich, dass die Faktoren, die am mRNA-Abbau nach der Deadenylierung beteiligt sind, in den P-bodies lokalisiert sind (Abb. 1.3). Viele Untersuchungen, insbesondere an Hefe, deuten darauf hin, dass die P-bodies aktive Zentren für den mRNA-Abbau sind, in denen Decapping und 5'-3' exonukleolytischer Abbau statt findet (Muhrad und Decker, 1994; Poole und Stevens, 1997; Sheth und Parker, 2003; Teixeira et al., 2005).

Weitere Hinweise stammen aus der Analyse von Hefe Mutanten, bei denen die Schlüsselenzyme des 5'-3' mRNA-Abbau (Dcp1, Dcp2, Xrn1) deletiert sind. Diese Mutanten wiesen stark vergrößerte P-bodies auf, weil bereits für den Abbau bestimmte mRNAs in den P-bodies akkumulierten (Sheth und Parker, 2003). In höheren Eukaryonten ist der Nachweis von mRNA-Abbau in den P-bodies nicht möglich, da keine mRNA-Abbau Intermediate in detektierbaren Mengen auftreten, beziehungsweise die 5'-3' Exoribonuklease nicht durch poly G Sequenzen geblockt wird (Kastenmayer et al., 1998). Allerdings wurde in Säugerzellen auch eine Vergrößerung der P-bodies beobachtet, bei denen die Expression von Xrn1 über RNAi reduziert wurde. Eine Akkumulation von Abbauintermediaten in P-bodies konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (Cougot et al., 2004).

Die P-bodies sind besonders durch ihre hohe Dynamik charakterisiert. Die Größe und Anzahl der P-bodies variiert in Abhängigkeit vom Status der Translationsmaschinerie, weil die Translation und der Abbau der mRNA in Konkurrenz zueinander stehen (Caponigro und Parker, 1996; Schwartz und Parker, 2000; Ramirez et al., 2002; Sheth und Parker, 2003; Khanna und Kiledjian, 2004; Teixeira et al., 2005). Dies konnte auch durch Studien der P-bodies unter verschiedenen Stressbedingungen gezeigt werden. Diese zeigten, dass unter Bedingungen, die zur Umprogrammierung der Translation führen, die P-bodies besonders groß sind (Teixeira et al., 2005). Das heißt, die Größe der P-bodies hängt direkt von dem Verhältnis aus mRNA-Zufluss und deren Abbau ab.

1.8 RNA Stressgranula speichern mRNA

Vor der Entdeckung der P-bodies konnten bereits in Säugerzellen unter verschiedenen Stressbedingungen die Bildung von mRNA-haltigen Aggregaten, den Stress Granula (SG), beobachtet werden. Diese sind sehr ähnlich in der Proteinzusammensetzung zu den RNA-Granula in Keimzellen (germ cell granules) und neuronalen Zellen (neuronal granules) (Schisa et al., 2001; Kosik und Krichevsky, 2002; Leathermann und Jongens, 2003). Die Stress Granula sind sehr dynamisch und ihre Größe ist wie bei den P-bodies direkt von der Translationsrate abhängig (Kedersha et al., 2000). Da Stress Granula untranslatierte poly A mRNA enthalten, wird vermutet, dass die Rekrutierung der mRNAs in die Stress Granula deren Stabilität und Translation reguliert und die mRNA unter günstigen Bedingungen wieder frei gesetzt und entweder der Translation oder dem Abbau zugeführt wird. Die Stress Granula werden auch als mRNA-Speicherkompartimente bezeichnet. In Zusammenarbeit mit Dr. M. Fauth konnten auch bei Untersuchungen von *Lycopersicon peruvianum* Zellkulturen sowie *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana glauca* nach einer kurzen Stressphase zytoplasmatische Strukturen identifiziert werden, die analog zu den Stress Granula sind und als RNA Stressgranula bezeichnet werden (RSG) (siehe Abschnitt 3.11). Aktuelle Studien in Säugerzellen deuten an, dass die P-bodies und die Stress Granula während der Stressantwort in einer funktionellen Beziehung zueinander stehen und möglicherweise Komponenten zwischen diesen Strukturen direkt ausgetauscht werden.

In den Stress Granula wird die poly A mRNA in Form von 48S* Prä-Initiationskomplexen gespeichert (Abb. 1.5). Neben der poly A mRNA bestehen diese aus frühen Translationsinitiationsfaktoren (z.B. eIF4E, eIF4G, PABP) sowie der kleinen ribosomalen Untereinheit, jedoch fehlen der Initiationsfaktor eIF5 sowie der ternäre Komplex aus eIF2 α , Met-tRNA und GTP (Kedersha et al., 1999; 2002; Kimball et al., 2003). Außerdem wurden weitere RNA-Bindeproteine in den Stress Granula identifiziert, die die Funktion und Struktur von mRNA regulieren (HuR, Smaug, Staufen, TTP, CPEB). Die

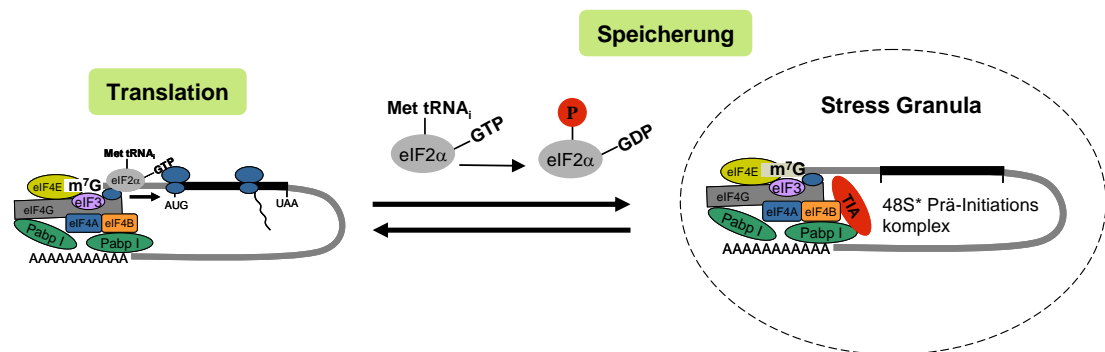


Abbildung 1.5: Modell der Speicherung von polyA mRNA unter Stressbedingungen in Säugerzellen. Während einer Stressphase wird der Initiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert und führt zum Block der Translationsinitiation. Dabei wird das Protein TIA in 48S* Prä-Initiationskomplexe eingebaut, die alle für die Initiation nötigen Faktoren enthalten außer eIF5 und dem ternären Komplex aus eIF2 α , Met-tRNA und GTP. Die Eigenschaft von TIA selbst zu aggregieren unterstützt die Akkumulation und Speicherung der nicht-translatierten mRNA in den Stress Granula. Unter günstigen Bedingungen wird eIF2 α dephosphoryliert und die gespeicherten mRNA können wieder in den Polysomenverband inkorporiert werden oder möglicherweise auch dem Abbau zugeführt werden.

Assemblierung der Stress Granula wird unter anderem von den Prion-artigen Proteinen TIA-1 und TIAR reguliert (Gilks et al., 2004; Übersicht in Anderson und Kedersha, 2006).

1.9 mRNA-Abbau in Pflanzen

Der mRNA-Metabolismus in Pflanzen ist bisher nur sehr wenig charakterisiert worden. Die meisten Erkenntnisse stammen von Untersuchungen der regulatorischen Sequenzen von spezifischen mRNAs wie z.B. das DST Element (downstream element), das die Stabilität von mRNA reduziert (Gil et al.; 1994, Petracek et al., 1997). Außerdem konnte für einige pflanzliche Gene gezeigt werden, dass sie durch bestimmte Signale auf mRNA-Ebene reguliert werden. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Stabilität

der Ferredoxin mRNA (Fed-1) durch Licht und die Stabilität der α -Amylase mRNA (α Amy3) durch Kohlenstoffquellen reguliert werden (Sheu et al., 1996; Petracek et al., 1997). Allerdings sind die mRNA-Abbaumechanismen, die an der Regulation beteiligt sind, weitestgehend unbekannt.

Es gibt viele Hinweise, dass die oben beschriebenen mRNA-Abbaumechanismen in Pflanzen konserviert sind. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass mRNAs mit verfrühten Stopkodons schnell abgebaut werden (van Hoof und Green, 1996). Weiterhin konnte eine Deadenylase PARN (poly A ribonuclease) identifiziert werden, welche für die Deadenylierung eines großen Teils der mRNA verantwortlich und essentiell während der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* ist (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004). Es konnten außerdem zwei Proteine (Rrp4, Rrp41) identifiziert und charakterisiert werden, die Teil eines großen Komplexes sind, der wahrscheinlich funktionell mit dem Exosom verwandt ist (Chekanova et al., 2000; 2002).

Erste Hinweise, dass essentielle Komponenten des 5'-3' mRNA-Abbaus in Pflanzen konserviert sind, stammen von der Charakterisierung von drei verschiedenen 5'-3' Exoribonukleasen (Xrn2-4). Xrn4 ist das funktionelle Homolog von Xrn1 in Hefe, wie durch Komplementationsstudien von der Xrn1 Deletionsmutante gezeigt werden konnte (Kastenmayer und Green, 2000). Das Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und ist wahrscheinlich ausschließlich dort für den 5'-3' Abbau verantwortlich. Weiterhin zeigten weitere Untersuchungen des Xrn4 eine Funktion bei RNAi induziertem mRNA-Abbau und als Komponente des Ethylen-vermittelten mRNA-Abbaus (Gazzani et al., 2004; Olmedo et al., 2006). Xrn2 und Xrn3 dagegen sind nukleäre Proteine und spielen vermutlich eine wichtige Rolle in der Prozessierung von rRNA und snoRNA (Petfalski et al., 1998; Villa et al., 2000).

1.10 Ziele der Arbeit

mRNA-Abbau ist ein essentieller Prozess der Genexpression, der den Zellen ermöglicht, die Qualität und die Quantität der mRNA zu kontrollieren. Besonders unter Stressbedingungen könnte der mRNA-Abbau eine wichtige Rolle neben der Speicherung von mRNAs und der Regulation der Proteinhomöostase zum Schutz vor schädigenden Einflüssen spielen. Bisher sind die mRNA-Abbau Mechanismen der Pflanzen jedoch noch nicht verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Erkenntnisse über den 5'-3' mRNA-Abbau erhalten werden. Im Vordergrund stand die Frage nach der Existenz von P-bodies in *Arabidopsis thaliana* und die Identifikation und Charakterisierung deren Komponenten. Die Kenntnis der konservierten Proteine des 5'-3' mRNA-Abbau in Hefe und Säugerzellen sollte für die Identifikation von Homologen im Genom von *Arabidopsis thaliana* dienen. Die Analyse der Expression von ausgewählten Proteinen sowie die Bestimmung des Interaktionsnetzwerks zwischen diesen Proteinen sollten Hinweise auf eine Beteiligung am 5'-3' mRNA-Abbau liefern. Durch Lokalisationsanalysen im transienten Expressionssystem sollte sowohl die Lokalisation der Proteine analysiert werden, als auch die Existenz von P-bodies überprüft werden. Folgeziel dieser Studien war die Erstellung eines Antikörpers gegen ein Markerprotein, der die Detektion und den Nachweis von P-bodies in *Arabidopsis thaliana* ermöglicht. Dabei sollte die Existenz der P-bodies durch Untersuchung auf charakteristische Eigenschaften nachgewiesen werden. Weiterhin sollten Erkenntnisse über die Rolle der P-bodies unter Stressbedingungen gewonnen werden. Dabei sollte besonders durch Koloalisationsstudien von Markerproteinen der P-bodies und RNA Stressgranula, beziehungsweise Hitzestressgranula (beteiligt an der Regulation der Proteinhomöostase unter Stressbedingungen, Nover et al., 1983, 1989), Informationen über die Beziehungen dieser Mikrokompimente zueinander erhalten werden. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob es sich um verschiedene und unabhängige Strukturen handelt, beziehungsweise ob Verbindungen zwischen diesen Strukturen bestehen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.1.1 Allgemeine Arbeiten mit Nucleinsäuren

Alle Arbeiten mit DNA, Plasmid Mini- und Midi-Präparationen, Restriktionsverdau von Plasmid DNA und PCR amplifizierten DNA Fragmenten sowie Ligationen mit T4 DNA Ligase und alle Arbeiten in den *Escherichia coli* Sicherheitsstämmen Dh5 α beziehungsweise BL21 wurden nach Standardprotokollen von Sambrook et al. (2001) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten DNA modifizierenden Enzyme stammen von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). PCR basierte Klonierungen wurden unter Verwendung der Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Finland) mit einem GeneAMP-PCR System 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Langen) und folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 2 min 94°C, 30x (30 sec 94°C, 30 sec 55°C, variabel 72°C), 7 min 72°C, ∞ 4°C. Die Aufreinigung von Nucleinsäurefragmenten wurde nach Auftrennung im 1% igen Agarosegel mit Hilfe des Qiaex II Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll vorgenommen.

2.1.2 Semi-quantitative RT-PCR Analyse

Die Gesamt RNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde mittels einer modifizierten Trimethode isoliert (Chomczynski et al., 1987). Dazu wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff pulverisiert, mit 1 ml TRI-Lösung (0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,8 M Guanidiniumthiocyanat, 0,1 M Na Acetat, 5 % Glycerin) versetzt und nach 10 minütiger Inku-

bation bei Raumtemperatur die Zellwandbruchstücke bei 10.000 rpm sedimentiert. Nach Chloroform induzierter Phasentrennung (1 Volumen) und RNA Fällung mit Isopropanol und Hochsalzlösung (1,2 M NaCl, 0,5 M Na Citrat, 0,1 % DEPC) wurde die RNA mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 30 μ l DEPC behandeltem Wasser gelöst. Die cDNA wurde mit 1 μ g Gesamt RNA und oligo dT Primern gemäß Herstellerangaben hergestellt. Die cDNA Menge wurde durch eine PCR mit Primern für Aktin 7 (At5g09810) standardisiert. Anschließend erfolgte die PCR-Amplifikation mit Transkript spezifischen Primern (Tabelle 2.1).

Gen	Primer	PCR Produkt (bp) cDNA/ gDNA
LSm1	(2822) 5'-gtcgtgggctggtcctga-3'	363 / 1292
	(2823) 5'-ccattctcttcctcattgttc-3'	
LSm2	(1468) 5'-ggaaacaacatgggtgtctttcttac-3'	305 / 874
	(1469) 5'-tatttcagaattcgccaccctagc-3'	
LSm5	(1470) 5'-gtctgaccatggcgaacaatccttcacagc-3'	287 / 948
	(1471) 5'-ggttcagagaattcttctccatcttcgggagac-3'	
LSm8	(1472) 5'-ctgtaccatggcggcaactactg-3'	317 / 1420
	(1473) 5'-ctatattgaattcatgcactacgggttc-3'	
Dcp1	(2635) 5'-atcagcattcctcaccaacctca-3'	391 / 391
	(2636) 5'-ttgtctctgctgataaccggacca-3'	
Dcp2	(2637) 5'-tgcttgccatacgtgaggtctt-3'	396 / 1367
	(2638) 5'-tttgcttccactgttgctgtcc-3'	
Aktin 7	(2267) 5'-gccaaagagcagttcttcagtgg-3'	474 / 873
	(2268) 5'-ctcaccaccagcaaccagataag-3'	

Tabelle 2.1: Verwendete RT-PCR Primer für Expressionsanalysen

2.1.3 Protein Analysen

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* wurden diese durch Mörsern in flüssigem Stickstoff unter Verwendung

eines nativen Extraktionspuffers (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 25 % Glycerin, 14,2 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 25 mM, KCl 5 mM, MgCl₂, 5 % Saccharose, 2 μ g ml⁻¹ Pefabloc (Roche Diagnostics, Mannheim) extrahiert. Zur Extraktion der Proteine aus Protoplasten wurden die Zellen nach Zentrifugation (5 min, 4°C, 10.000 rpm) mit nativen Extraktionspuffer versetzt und mit Ultraschall auf Eis (10 sec, 10 % Stärke, 10 % Zyklen) lysiert. Die Extrakte wurden nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 4°C, 10.000 rpm) auf einem 3,4-20 % igem nativen Gel (Chen et al., 1994) elektrophoretisch aufgetrennt. Für die denaturierende SDS-PAGE wurden die Proben zusätzlich mit 4x SDS Probenpuffer versetzt und in einem 12 % igen SDS-Polyacrylamid Gel nach Denaturierung bei (5 min, 95°C) elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dasse) erfolgte im Semi-Dry-Blotverfahren unter der Verwendung von Semi-Dry Puffer nach Sambrook et al., (2001). Die Proteindetektion erfolgte unter der Verwendung der jeweils angegebenen Antikörper (Tabelle 2.2). Als sekundäre Antikörper wurden Meerettich-Peroxidasegekoppelte Antikörper verwendet. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus der Firma Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA) sowie lichtempfindlicher Röntgenfilme. Belichtete Filme wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert.

Für die RNase Behandlung wurden die nativen Extrakte mit RNase A (1,7 μ g/ μ l) versetzt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend mit SDS versetzt.

2.1.4 HPLC Analysen

Die HPLC Analyse wurde wie in Port et al. (2004) beschrieben durchgeführt. Als Extraktionspuffer wurde eine Variante des nativen Puffers (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 % Glycerin, 14,2 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM, MgCl₂, 2 μ g ml⁻¹ Pefabloc (Roche Diagnostics, Mannheim)) verwendet. Der Elutionspuffer war identisch aber ohne Glycerin versetzt und enthielt 250 mM NaCl.

Antikörper	Epitop	Organismus	Verdünnung	Hersteller
α HA	YPYDVPDYA	Maus	1:2.000 _W	BabCO, Kalifornien, USA
α Myc	EQKLISEEDL	Maus	1:2.000 _W	Sigma-Aldrich, Steinheim
α Strep	WSHPQFEK	Kaninchen	1:5.000 _W 1:200 _{EM}	IBA, Göttingen
α prä-Dcp1 (prä-SA 274)	entfällt	Meer- schweinchen	1:2.000 _{IF} 1:2000 _W	Eurogentech, Belgien
α Dcp1 (SA 274)	aa 46-370	Meer- schweinchen	1:2.000 _{IF} 1:2000 _W	Eurogentech, Belgien
α eIF2 α	eIF2 α	Kaninchen	1:500 _{IF} 1:2000 _W	Lax et al., 1986
α Hsp17 CI	Ps Hsp18.1 CI	Kaninchen	1:500 _{IF}	Eurogentech, Belgien
α gpcy2	Meer- schweinchen IgG	Esel	1:100 _{IF}	Dianova, Hamburg
α mcy3	Maus IgG	Esel	1:200 _{IF}	Dianova, Hamburg
α rcy3	Kaninchen IgG	Ziege	1:1.000 _{IF}	Dianova, Hamburg
α rcy2	Kaninchen IgG	Ziege	1:500 _{IF}	Dianova, Hamburg
α rHRP	Kaninchen IgG	Ziege	1:10.000 _W	Sigma-Aldrich, Steinheim
α mHRP	Maus IgG	Ziege	1:10.000 _W	Sigma-Aldrich, Steinheim
α gpHRP	Meer- schweinchen IgG	Ziege	1:10.000 _W	Sigma-Aldrich, Steinheim
α r12nm	Kaninchen	Ziege	1:10.000 _{EM}	Dianova, Hamburg

IF - Immunfluoreszenz

W - Western Analyse

EM - Immunogold-Detektion

IgG - Immunglobuline

Tabelle 2.2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

2.1.5 Expressions Vektoren

Die erstellten und verwendeten Vektoren und die jeweiligen Klonierungsstrategien sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Angegebene Primer- und Klonnummern beziehen sich auf die Stammsammlung des Arbeitskreises. Die pflanzlichen Expressionsvektoren basieren auf der Serie von pRT Vektoren (Töpfer et al., 1988). Die pRT Split YFP und pRT-RFP Vektoren wurden durch Klonierung von PCR amplifizierten Sequenzen, die für die N-terminale (aa 1-154) und C-terminale (aa 155-238) Hälfte von YFP (yellow fluorescent protein) beziehungsweise Cherry-RFP (red fluorescent protein) kodieren, hergestellt. Als Template für die PCR dienten Split YFP Vektoren beziehungsweise Cherry-RFP Vektoren, die freundlicherweise von Klaus Harter (Universität Tübingen, Walter et al., 2004) beziehungsweise Roger Y. Tsien (University of California, San Diego, Shaner et al., 2005) zur Verfügung gestellt wurden. Die 2μ Vektoren pBDGal4 (aa 1-147, Trp) und pADGal4 (aa 768-881, Leu2) der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) wurden für die Hefe-Zwei-Hybrid Analysen verwendet. Die jeweiligen codierenden Sequenzen wurden hinter die jeweiligen Domänen im Leseraster eingesetzt. Für die Expression von Dcp1-BD wurde ein modifizierter 2μ Vektor (aa 1-147,Ura) verwendet, bei dem die Expression unter der Kontrolle des ADH Promotors beziehungsweise Terminators lag.

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategie

Vektor	Klonierungsstrategie	Nr.
Vektoren basierend auf pRT Serien von Töpfer et al., 1988		
pRTdS GFP-LSm1	Umklonierung der kodierenden Sequenz über NcoI, NheI vom pRT LSm1-3HA in pRTdS GFP. Der pRT LSm1-HA Vektor wurde mit folgenden Primern erstellt: (1466) 5'-cagtggccatggcgtgggctgg-3' (1467) 5'-ggatacaatctgaattcatcaaagtc-3'	CW 153
pRTdS GFP-LSm2	Umklonierung der kodierenden Sequenz über NcoI, NheI vom pRT LSm2-3HA in pRTdS GFP. Der pRT LSm2-HA Vektor wurde mit folgenden Primern erstellt: (1468) 5'- ggaacaaccatgggtgtcttttcttac-3' (1469) 5'-atrtcagaattcgcaccctagc-3'	CW 154
pRTdS GFP-LSm5	Umklonierung der kodierenden Sequenz über NcoI, NheI vom pRT LSm5-3HA in pRTdS GFP. Der pRT LSm5-HA Vektor wurde mit folgenden Primern erstellt: (1470) 5'-gtctgacatggcgaacaatccttcacagc-3' (1471) 5'-ggttcagagaattcttctccatcttcgggagac-3'	CW 155
pRTdS GFP-LSm8	Umklonierung der kodierenden Sequenz über NcoI, NheI vom pRT LSm8-3HA in pRTdS GFP. Der pRT LSm8-HA Vektor wurde mit folgenden Primern erstellt: (1472) 5'-ctgtacatggcggcaactactg-3' (1473) 5'-ctatattgaattcatgcactacgggttc-3'	CW 156
pRTdS GFP-Dcp1	Klonierung von PCR amplifiziertem cDNA Fragment über BglII, XbaI in pRTdS GFP. (1994) 5'-agtggccacagatcttcaaacgggaag-3' (1995) 5'-cacgaattctagagttattgttgaagtgc-3'	CW 37

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategie

Vektor	Klonierungsstrategie	Nr.
pRTdS GFP-Dcp2	Umklonierung der kodierenden Sequenz über NcoI, NheI vom pRTdS Dcp2-Strep in pRTdS GFP. Der pRTdS Dcp2-Strep Vektor wurde mit folgenden Primern erstellt: (2260) 5'-ggtacaaaaaacatggcgggcctcc-3' (2262) 5'-caaactgacgctagcagctgaattacc-3'	CW 70
pRTdS GFP-Xrn4	Klonierung von PCR amplifiziertem cDNA Fragment über NcoI, NheI in pRTdS GFP. (1426) 5'-aatccgcatgggagtagaccgg (1427) 5'-caactaatgctagccaagttgcacctcg-3'	CW 46
pRTdS RFP-Dcp1	Umklonierung der kodierenden Sequenz über NcoI, NheI vom pRTdS Dcp1-Strep in pRTdS Cherry.	CW 157
pRTdS Dcp1-Strep	Klonierung von PCR amplifiziertem cDNA Fragment über NcoI, NheI in pRTdS-Strep (JT 6). (1422) 5'-atttataaacatggctcaaacgggaag-3' (1423) 5'-cagcgcagctagcttgttgaagtgc-3'	CW 13
pRTdS Ubp-Strep	Nt Ubp	MF
pRT Ubp-Ha	Nt Ubp	MF
pRTdS Cherry (RFP)	PCR Amplifikation von Cherry (RFP) vom pRSET-Cherry Vektor (Shaner et al., 2005). Klonierung in den pRTdS Vektor über PagI, XbaI in pRTdS Vektor. (2679) 5'-gccatcatgatcagcaaggcgag-3' (2680) 5'-tctagaggatccttagctagcggtagcccatggggagatc tagtccggactgtacagctegtc-3'	MF

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategie

Vektor	Klonierungsstrategie	Nr.
Die Split-YFP Vektoren wurden durch Umklonierung der kodierenden Sequenzen über NcoI, NheI aus den oben genannten Vektoren in pRTdS Dcp1 myc-N-YFP (N) (CW 94) beziehungsweise pRTdS Dcp1 Ha-C-YFP (C) (SA 13) kloniert		
pRTdS Dcp1 (N)	Klonierung von PCR amplifizierten myc-N-YFP in pRTdS Dcp1-Strep mit NheI, XbaI	CW 94
pRTdS Dcp1 (C)	Klonierung von PCR amplifizierten Ha-C-YFP in pRTdS Dcp1-Strep mit NheI, XbaI	SA 13
pRTdS Dcp2 (N)		CW 91
pRTdS Dcp2 (C)		CW 77
pRTdS Xrn4 (N)		CW 88
pRTdS Xrn4 (C)		SA 19
pRTdS Lsm1 (N)		SA 6
pRTdS Lsm1 (C)		SA 14
pRTdS Lsm2 (N)		SA 7
pRTdS Lsm2 (C)		SA 15
pRTdS Lsm5 (N)		SA 8
pRTdS Lsm5 (C)		SA 16
pRTdS Lsm8 (N)		SA 9
pRTdS Lsm8 (C)		SA 17
pRT104 (N)	PCR Amplifikation von N-YFP Fragment (Walter et al., 2004). Klonierung in pRT104 Vektor über NheI, XbaI. 5'-ccgctgctagcatgtaccatacagat-3' 5'-gaaattctagatcttactgtacagctcg-3'	SA 21
pRT104 (C)	PCR Amplifikation von N-YFP Fragment (Walter et al., 2004). Klonierung in pRT104 Vektor über NheI, XbaI. 5'-ccgctgctagcatggagcaaaagttg-3' 5'-gaaattctagatcttagccatgatatag-3'	SA 22

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategie

Vektor	Klonierungsstrategie	Nr.
Vektoren basierend auf pAD-Gal4 (MP 59) und pBD-Gal4 (FB 5)		
Klonierung der PCR amplifizierten At cDNA Fragmente über SalI, NotI		
pAD Dcp1	(2590)5'-gatttatagtcgacgtctcaaaacgg-3' (1617)5'-gaccagcggccgctcattgttgaag-3'	CW 102
pBD Dcp1	Primer wie oben	CW 109
pAD Dcp2	Klonierung von PCR amplifiziertem cDNA Fragment über XhoI, NotI in den jeweiligen Hefe Vektoren, die mit SalI, NotI geschnitten wurden. (2589) 5'-acgactcgaggcggcctccatcgatcatc-3' (1882)5'-ggtggcggccgcttcaagctgaattaccagattcc-3'	CW 128
pBD Dcp2	Primer wie oben	CW 110
pAD Xrn4	(2592) 5'-cggaaatcgtcgacgggagtagccg-3' (2597) 5'-ctcaagcggcggtcacaaagtttgacc-3'	CW 108
pBD Xrn4	Primer wie oben	CW 115
pAD LSm1	(2595) 5'-cgagtggcgtcgacggcgtggg-3' (1703) 5'-tgctagcggccgctcaatcaaagtcaagaaatccc-3'	CW 104
pBD LSm1	Primer wie oben	CW 111
pAD LSm2	(2593) 5'-gcaggaacgtcgacgttgttctttc-3' (2591) 5'-gatacaaagatggcggccgcatcagccac-3'	CW 105
pBD LSm2	Primer wie oben	CW 112
pAD LSm5	(2596) 5'-ctcgagtgggtcgacggcgaac-3' (1702) 5'-tgctagcggccgctcattctccatcttcgggagacc-3'	CW 106
pBD LSm5	Primer wie oben	CW 113
pAD LSm8	(2594) 5'-cgagtggcgtcgacggcggc-3' (2597) 5'-gaccatgctcggccgctcaatgcactacg-3'	CW 107
pBD LSm8	Primer wie oben	CW 114

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategie

Vektor	Klonierungsstrategie	Nr.
pDcp1-BD	Klonierung von PCR amplifiziertem cDNA Fragment über SalI, NotI. Der Vektor basiert auf YEplac195 (Gietz und Sugino, 1988). (2641)5'-ctttgatttgctgacgatgtctcaaac -3' (2642)5'-gaccagcgcggccgattgttg-3'	CW 126
pGex4T1-Dcp1	Umklonierung vom EcoRI Fragment aus pRTdS Dcp1-Strep in pGex4T1 (Amersham Pharmacia, Freiburg)	CW 35

2.1.6 Gewinnung eines Antiserums gegen *Arabidopsis* Dcp1

Der polyklonale Antikörper gegen Dcp1 wurde gegen in *Escherichia coli* exprimiertem GST-Dcp1 hergestellt. Da GST-Dcp1 instabil war, wurde ein verkürztes Dcp1 (aa 46-370) verwendet. Zur Expression des GST-Dcp1 wurde 50 ml einer pGEX-Dcp1 transformierten *E. coli* BL21 Kultur für 4 h bei 30°C mit IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid) induziert. Die Zellen wurden in 1x PBS Probenpuffer aufgenommen und auf Eis mittels Ultraschallbehandlung (30 sec, 70 % Stärke, 70 % Zyklen) aufgeschlossen. Die Proben wurden nach Denaturierung (5 min, 95°C) auf einem 10 % igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung des GST-Dcp1 wurde das Gel mit Coomassie (0,1% Coomassie Brilliant Blue 250, 50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure) gefärbt und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden anschließend von der Firma Eurogentech (Seraing, Belgien) für die Immunisierung von Meerschweinchen verwendet. In dieser Arbeit kam für die Detektion von Dcp1 ausschließlich die finale Blutung (SA 274) sowie das Präimmunserum (prä-SA 274) zum Einsatz.

2.2 Arbeiten mit Pflanzen

2.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* Linien

Für die Anreicherung von Samen der verwendeten Zelllinien und zur Untersuchung des Phänotyps wurden die Samen der jeweiligen Linien (Tabelle 2.4) auf Einheitserde ausgesät und unter Langtagbedingungen angezogen. Die Erde wurde stets gleichmäßig feucht gehalten.

Für Immunfluoreszenzanalysen mit *Arabidopsis thaliana* Protoplasten wurden die jeweiligen Linien nach Sterilisation der Samen auf MS-Medium (0,44 % Murashige und Skoog Medium (Duchefa, Niederlande), 2 % Saccharose, 0,3 % Gelrite (Duchefa), Vitamine: B1 20 $\mu\text{g}/\text{l}$, B3 50 $\mu\text{g}/\text{l}$, B6 100 $\mu\text{g}/\text{l}$) angezogen. Die Anzucht erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Licht). Die Anzucht von Tabak (*Nicotiana plumbaginifolia*) erfolgte entsprechend der Standardprotokolle von Lyck et al. (1997), Kirschner et al. (2000).

Um Immunfluoreszenzanalysen von *Arabidopsis thaliana* Wurzelgeweben durchzuführen, wurden Keimlinge für vier Tage in Petrischalen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) steril angezogen. Die Aussaat erfolgte entweder auf mit destilliertem Wasser befeuchtetem Filterpapier (Kontrollbedingungen) oder in 5 ml destilliertem Wasser (anoxische Bedingungen). Für Hitzestressexperimente wurden die unter Kontrollbedingungen angezogenen Keimlinge für die jeweils angegebene Dauer bei 41°C gestresst, indem die Petrischalen in ein Wasserbad gesetzt wurden.

2.2.2 Allgemeine Arbeiten mit pflanzlichen Protoplasten

Die Isolierung, Aufreinigung und Transformation von Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana plumbaginifolia* erfolgte nach Standardprotokollen (Lyck et al., 1997; Kirschner et al., 2000). Jeweils 100.000 Protoplasten wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 2 μg Plasmid transformiert und nach 20 Stunden für die jeweiligen Analysen verwendet.

Linie	Eigenschaften	Quelle
Columbia	Wildtyp	
<i>xrn4-5</i>	trägt eine T-DNA Insertion im Xrn4 Gen	Souret et al., 2004
Columbia	(Exon 18, Position 1858 in der kodierenden Region und in Position 5007 in der genomischen Sequenz relativ zum ATG). Die Insertion führt zur Expression einer verkürzten mRNA.	

Tabelle 2.4: Verwendete *Arabidopsis* Linien

2.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Hefe-Zwei-Hybrid Analysen wurde der Hefestamm pJ69-4a verwendet (MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *trp1-901*, *leu2-3;112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *GAL2-ADE2*, *LYS2::GAL1-HIS3*, *met2::Gal7-lacZ*) (James et al., 1996). Die Transformation erfolgte gemäß dem Protokoll von Gietz und Woods (2002). Die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurde durch Kotransformation der jeweiligen Hefe-Zwei-Hybrid Vektoren und Selektion auf Minimalmedium ohne Tryptophan (W) und Leucin (L) beziehungsweise Leucin und Uracil (U) selektioniert. Um die transformierten Hefezellen auf Histidin Prototrophie zu testen, wurden Flüssigkulturen mit Minimalmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen, die Zellen zweifach mit destilliertem Wasser gewaschen und auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ 0,1 beziehungsweise 0,001 eingestellt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 5 μl auf Minimalmedium mit Histidin sowie auf Platten ohne Histidin mit steigenden Konzentrationen an 3-amino-2,4,6-triazol (3-AT) aufgetropft und 40 Stunden bei 30°C inkubiert.

2.4 Mikroskopie

2.4.1 Subzelluläre Lokalisation von Proteinen über indirekte Immunfluoreszenzanalysen

Für indirekte Immunfluoreszenzanalysen in pflanzlichen Protoplasten wurde das Protokoll von Kirschner et al. 2000 verwendet. Für indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit *Arabidopsis thaliana* Keimlingen, wurden die Pflanzen 1 h mit 3,7 % Paraformaldehyd in Mikrotubuli stabilisierendem Puffer (MTSB: 100 mM PIPES pH 6.8, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄) fixiert. Die Keimlinge wurden anschließend zweifach mit MTSB gewaschen und für 20 min in 0,5 % Triton X-100/MTSB permeabilisiert. Danach wurden sie in einer aufsteigenden und schließlich absteigenden Reihe von Ethanol-Behandlungen (50, 70, 90 und 2x 100 %) für jeweils 10 min entwässert. Die Keimlinge wurden dann jeweils zweifach mit 1x PBS und 2x SSC für 10 min und später in Standard Hybridisierungspuffer (SHB: 50 % deionisiertes Formamid in 5x SSC und 0,1 % N-lauroylsarcosyl, 0,02 % SDS, 2 % Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)) für zwei Stunden oder über Nacht bei 50°C präinkubiert. Danach wurde zweifach mit 1x PBS gewaschen. Das Blocken mit 5 % BSA und die Detektion der jeweiligen Proteine erfolgte gemäß dem Protokoll für Protoplasten und mit den in Tabelle 2.2 angegebenen Antikörpern. Die Protoplasten und Keimlinge wurden abschließend in Einbettmedium konserviert (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 24 % Glycerin, 9.6 % Mowiol 4-88 (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) und 2,5 % Diazabicyclooctane (DABCO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)). Die Objekte wurden mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop TCS SP5 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Die Datensätze wurden mit Imaris 4.1.3 (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) und Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San Jose, USA) bearbeitet.

2.4.2 BIFC Analyse und GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Für die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementationsanalyse (BIFC oder auch Split YFP) und die GFP-Lokalisationsanalyse wurden die jeweiligen Plasmide in Tabakprotoplasten (ko)transformiert. Die Protoplasten wurden lebend auf einem Objektträger, mit einem Deckgläschen bedeckt, untersucht. Die Protoplasten wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in Kombination mit dem Color-View XS Kamerasystem (Soft Imaging System, Münster Deutschland) dokumentiert.

2.4.3 Elektronenmikroskopie

Einbettung von Tabakprotoplasten für Ultrastrukturanalysen

Die Protoplasten wurden mit 4 % Paraformaldehyd/ 2,5 % Glutardialdehyd-Cacodylat-Puffer (0,15 M, pH 7,4) eine Stunde fixiert und mit 1 % OsO₄ (Osmiumtetroxid) für eine Stunde nachfixiert. Danach erfolgte eine Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 90, 2x 100 %) für je 7 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen an Epon (Epon, DDSA, MNA (3:2:2), 1 % DMP-30 (Serva, Heidelberg)) in Form eines Epon-Propylenoxid Gemisches (1:4 (30 min), 1:1 (90 min), 4:1 (120 min)) inkubiert. Danach folgte die Polymerisation bei 100°C über Nacht.

Einbettung von Tabakprotoplasten für Immunogoldmarkierungen

Die Protoplasten wurden mit 4 % Paraformaldehyd/ 0,25 % Glutardialdehyd-Pipes-Puffer (0,15 M, pH 7,4) eine Stunde fixiert und danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 90, 2x 100%) für je 7 min bei 4°C entwässert. Anschließend wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen an LR-Gold (London Resin Laboratories, London, England) in Form eines LR-Gold-EtOH Gemisches (1:1 (2h)) bei -20°C inkubiert und später in reinem LR-Gold (London Resin, Berkshire, England) über Nacht inkubiert. Die Proben wurden durch Zugabe von 0,5 % DBP bei -20°C polymerisiert.

Ultramikrotomie und Elektronenmikroskopie

Von den Immun- und Ultrastruktureinbettungen wurden an einem Reichert Ultracut S (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) 70-80 nm Schnitte angefertigt und auf Formvar beschichtete Nickel beziehungsweise Kuper-Grids (Plano, Wetzlar, Deutschland) überführt. Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit 4 % Uranylacetat für 10 min kontrastiert, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Bleicitrat (nach Reynolds 1963) für 10 min nachkontrastiert und nochmals gewaschen. Die Proben wurden mit einem Zeiss EM902 Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Ultradünnschnitte von Immuneinbettungen wurden erst nach der Immundetektion kontrastiert. Fotos wurden auf 6x9 cm Filmen (Agfa Scintia) aufgenommen, nach Herstellerangaben entwickelt und digitalisiert.

Immunogoldmarkierungen an Ultradünnschnitten

Die Ultradünnschnitte wurden nach Übertragung auf beschichtete Nickel-Grids stets mit einem Flüssigkeitstropfen (nachfolgend genannte Lösungen) bedeckt. Nach Immobilisierung auf dem Nickel-Grids folgte eine Behandlung von jeweils 15 min mit 100 mM Glycin-PBS sowie 0,1 % CWF-PBS (cold water fish skin gelatine) und 0,2 % BSA-C/ PBS (Biotrend, Köln, Deutschland). Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 0,2 % BSA-C/ PBS für 90 min bei 30°C. Nach sechsmaligem Waschen mit 0,2 % BSA-C/ PBS für je 5 min, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, gold-gekoppelten Antikörper in 0,2 % BSA-c für 90 min bei 30°C. Nach fünfmaligem Waschen mit BSA-C/ PBS und dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser für je 3 min wurde die Proben kontrastiert.

2.5 Bioinformatische Analysen

2.5.1 Sequenzanalysen und Datenbanksuche

Für die Identifizierung von homologen Aminosäuresequenzen in *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* wurde der Blastp Algorithmus auf der Internetseite des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) und des „The Arabidopsis Information Resource“ (TAIR) verwendet. Für die Identifizierung von ESTs (expressed sequence tags) für die jeweiligen Gene in *Lycopersicon esculentum* und *Medicago truncatula* wurden die cDNA Sequenzen von *Arabidopsis thaliana* verwendet um in den EST-Datenbanken des „The Institute of Genomic Research“ (TIGR) nach homologen Sequenzen zu suchen. Die erhaltenen cDNA Sequenzen wurden anschließend translatiert und für Sequenzanalysen verwendet.

Aminosäure Sequenzvergleiche wurden unter Verwendung von ClustalW (Thompson et al., 1997) mit Standardparametern durchgeführt. Die Sequenzvergleiche von Dcp1 wurden zusätzlich manuell angepasst. Phylogentische Stammbäume wurden mit Hilfe des Programms Mega 3 (Version 3.1, Kumar et al., 2004) unter Verwendung der „Minimale Evolution Methode“, mit „nearest-neighbour-joining“ als Startpunkt und 2000 bootstrap Replikaten erstellt.

2.5.2 Zugangsnummern der Proteinsequenzen

Alle Sequenzdaten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der „The GenBank/ EMBL data libraries“ unter den folgenden Zugangsnummern zu finden: At Dcp1 (At1g08370), Os Dcp1 (Os12g0156400), Hs Dcp1a (AAH07439), Hs Dcp1b (AAH43437), Mm Dcp1a (AAH66173), Mm Dcp1b (NP_001028551), Sc Dcp1p (CAA99170), At Dcp2 (At5g13570), Os Dcp2 (Os02g0805900), Hs Dcp2 (NP_689837), Mm Dcp2 (AK017809), Sc Dcp2p (NP_014281), At LSm1 (At3g14080), Os LSm1 (CT831864), Hs LSm1 (NP055277), Mm LSm1, (NM_026032), Sc LSm1p (P47017), At LSm2 (At1g03330), Os LSm2 (CT835988), Hs LSm2 (CAG46954), Mm LSm2 (NM_030597), Sc LSm2p

(P38203), At LSm5 (At5g48870), Os LSm5 (CT830514), Hs LSm5 (Q9Y4Y9), Mm LSm5 (NM_025520), Sc LSm5p (P40089), At LSm8 (At1g65700), Os LSm8 (CT834032), Sc LSm8 (P47093), Hs LSm8 (O95777), Mm LSm8 (Q6ZWM4).

2.5.3 Zugangsnummern der EST-Sequenzen

Mt Dcp1 (EST 488599), Le Dcp1 (TC82092), Mt Dcp2 (TC96797), Le Dcp2 (TC184305), Mt LSm1 (MHAM-27B_H06_M13R_048), Le LSm1 (TC185789), Mt LSm2 (TC82092), Le LSm2 (TC129449), Mt LSm5 (TC78297), Le LSm5 (BW 688394), Le LSm8 (TC121590), Mt LSm8 (TC111169).

2.5.4 Microarray Analyse

Für die Microarray Analyse wurden Datensätze verwendet, die vom AtGenExpress Konsortium veröffentlicht wurden. Die Datensätze wurden unter Verwendung der Affymetrix Gene Chips erstellt. Die Datensätze sowie Details über die Anzuchtsbedingungen sind unter www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress sowie Schmid et al. (2005) zu finden. Die gcRMA normalisierten und gemittelten Signalintensitäten wurden in absolute Werte zurückgerechnet und als „heat maps“ mit der Software GeneSpring 7.2 visualisiert. Folgende Proben wurden verwendet: Entwicklungsserie: ATGE 93, 91, 27, 33, 73, 84; Hitzestress-Serie / Sproß: ATGE 011, 051, 251, 351, 451, 551, 661, 721, 871, 921; Hitzestress-Serie / Wurzel: ATGE 012, 152, 252, 342, 422, 562, 662, 762, 852, 922.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von 5'-3' mRNA-Abbau Proteinen in *Arabidopsis thaliana*

Die Decapping Proteine Dcp1 und Dcp2 sowie der LSM1-7 Komplex stellen neben der 5'-3' Exoribonuklease die Schlüsselenzyme des 5'-3' mRNA-Abbau dar. Diese Proteine sind in allen bisher untersuchten Eukaryonten konserviert. Um neben der bisher charakterisierten Exoribonuklease At Xrn4 weitere Proteine des 5'-3' mRNA-Abbau zu identifizieren, wurde das Genom von *Arabidopsis thaliana* nach Homologen durchsucht. Für die Datenbanksuche wurden die Aminosäuresequenzen der bereits charakterisierten Proteine aus Hefe und Säugerzellen herangezogen. Um weitere Hinweise auf die Konservierung dieser Proteine in Pflanzen zu erhalten, wurden zusätzlich die EST-Datenbanken von *Medicago truncatula* (Gestutzter Schneckenklee) und *Lycopersicon esculentum* (Tomate) sowie das Genom von *Oryza sativa* (Reis) nach Homologen durchsucht. Die jeweils erhaltenen Aminosäuresequenzen (durch Translation der cDNA Sequenzen) wurden anschließend in einem Sequenzvergleich sowie einer phylogenetischen Analyse vergleichend mit den bisher charakterisierten Proteinen analysiert.

3.1.1 Dcp1

Bei der Durchsuchung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* nach Homologen von ScDcp1 und HsDcp1a/b wurde jeweils dasselbe Homolog (*AtDcp1* At1g08370) identifiziert. Weitere identifizierte Proteine wiesen eine sehr geringe Sequenzhomologie auf und

sind nicht weiter in Betracht gezogen worden. Ebenfalls konnten für *Oryza sativa*, *Medicago truncatula* und *Lycopersicon esculentum* Homologe gefunden werden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit der des Dcp1 aus Hefe sowie aus Säugerzellen zeigt eine sehr geringe Gesamthomologie der Proteine (Abb. 3.1). Weiterhin unterscheiden sich die Proteine sehr deutlich in ihrer Größe. Bei den Proteinen der höheren Eukaryonten findet sich jedoch im N-terminalen Teil ein größerer Bereich (ca. 125 aa), der eine starke Konservierung der Aminosäuren aufweist (Abb. 3.1 A, B; Domäne I-III). Dieser Teil des Proteins scheint für dessen Funktion sehr wichtig zu sein, da Mutationen in diesem Bereich zum Verlust der Decappingreaktion führt (Renfranz et al., 2002). Diese Sequenzen sind ebenfalls im Sc Dcp1, auf drei kleinere Domänen aufgeteilt, zu finden, die durch zwei Domänen getrennt sind. Diese zusätzlichen Domänen finden sich nur bei Sc Dcp1, zum Beispiel auch nicht in Sp Dcp1 (nicht dargestellt), und scheinen keine zentrale Rolle für die Decappingreaktion zu spielen. Sie sind wahrscheinlich für Hefespezifische Funktionen verantwortlich. Mit Ausnahme von Sc Dcp1 findet sich weiterhin eine sehr große C-terminale Verlängerung. Innerhalb der pflanzlichen Vertreter findet sich ein konservierter Bereich (ca. 58 aa), der in geringem Maße auch bei dem Dcp1 der Säugetiere konserviert ist (Abb. 3.1 A, B; Domäne IV, V). Am C-Terminus findet sich weiterhin im Dcp1 der höheren Eukaryonten eine kurze konservierte Sequenz (ca. 21 aa) (Abb. 3.1 A, B; Domäne VI). Der übrige Teil der C-terminalen Verlängerung ist nur sehr wenig konserviert. Auch innerhalb der pflanzlichen Vertreter beziehungsweise innerhalb der Vertreter der Säugetiere lassen sich keine konservierten Bereiche im C-Terminus finden. Somit läßt sich vermuten, dass dieser Bereich keine besondere Rolle für die Decapping Reaktion spielt. Die nähere Verwandtschaft der Dcp1 Homologe der höheren Eukaryonten wird auch durch die phylogenetische Analyse verdeutlicht (Abb. 3.1 C). Die pflanzlichen Dcp1 beziehungsweise das Dcp1 der Säugetiere bilden jeweils eine eigene Gruppe. Im Gegensatz dazu ist das Sc Dcp1 keiner dieser Gruppen zugeordnet.

A

		I	
AtDcpl	: -----MSQNGKIIPNL--DQNSTRLNLTVLQRIDPVEIEELITAAHVTFYFNIELSQWSRK-DVEGSLFVVKRSQTP-----		: 71
OsDcpl	: -----MRPPAPATTAGAGKVTNPLAMDAEOTRLNLTVLQRLDPAVEDLITAAHVTFYFNIELNQWSRK-DVEGSLFVVKRNKQP-----		: 82
MtDcpl	: -----MSQNGKLMPNL--DQSTKLLNLTVLQRIDPVEIEELITAAHVTFYFNIELSQWSRK-DVEGSLFVVKRNKQP-----		: 71
LeDcpl	: -----MSQNGKLMPNL--DQNSTKLLNLTVLQRIDPVEIEELITAAHVTFYFNIELSQWSRK-DIEGSLFVVKRSQTP-----		: 71
HsDcpla	: -----MEAL--SRAGQMSLAALKQHDPIYITSIADLTGQ-VALYTFCPKANQW-EKTDIEGTLFVYVRSASP-----		: 63
HsDcplb	: -----MAAVAAGGL--VGRGRDLSLAALKQRHDDYINRIVDVASQ-VALYTFGHRANEW-EKTDIEGTLFVYVRSASP-----		: 68
MmDcpla	: -----MALSCSTVRRRRGSALRSKMLL--SRAEQMSLAALKQHDPIYITSIADLTGQ-VALYTFCPKANQW-EKTDIEGTLFVYVRSASP-----		: 83
MmDcplb	: -----MAAAAAGGL--PGKGDHLSLAALKRRHDDYISRIVDVASQ-VALYTFGHRANEW-EKTDIEGTLFVYVRSASP-----		: 68
ScDcplp	: -----MTGAATAAENSATQL--EFYRKALNPNVIGRYDPKIKQLLHPTP-HASLYKWDPKKDEW-NKLEYQGVLAIVLDRVDSQNTNLLPVSQPEVD		: 87
		II	
AtDcpl	: -----RFQFIVMNRNRTDNLVENLLGD-----FYEYVQGPVL	: 103	
OsDcpl	: -----RFQFIVMNRNRTDNLVEDLLSD-----FEFELQPPYL	: 114	
MtDcpl	: -----RFQFIVMNRNRTNLENVENLLGD-----FYEYIQVPYL	: 103	
LeDcpl	: -----RFQFIVMNRNRTDNLVEDLLGD-----FYEYIQVPYL	: 103	
HsDcpla	: -----YHGFIVNRLNMHNLVPEVKNKD-----LEFQLHEPFL	: 95	
HsDcplb	: -----KHGFIMNRLSMENRTEPITKD-----LDFQLQDPFL	: 100	
MmDcpla	: -----YHGFIVNRLNMHNLVPEVKNKD-----LEFQLHEPFL	: 115	
MmDcplb	: -----KHGFIMNRLSMENRTEPITKD-----LDFQLQDPFL	: 100	
ScDcplp	: IPDSQNGSNNIQVNGSDNSNRNSSGNGSYKSNDSLTYNCGKTLGSKDINYNGLIILNRINPDNFSMGIIVPNSVVKRKFVNAEEDTLNPLECMGVEVKDELV	: 191	
		III	IV
AtDcpl	: LYRNASQEVNGIWFYFNKRECEEVATLFRILS-----AYSKVNQKPKASSKSEFEELEA-----	: 158	
OsDcpl	: LYRNAAQEVNGIWFYFNQDDCAVAGVFRILN-----AYAKVPPKPKVPSTKSEFEELEA-----	: 169	
MtDcpl	: LYRNAAQEVNGIWFYFNARECEEVANLFRILN-----AYAKVPPKPKVSTKSEFEELEA-----	: 158	
LeDcpl	: LYRNASQEVNGIWFYFNKRECEEVANLFRILG-----AYSKVPTKSKVPLTKSEFEELEA-----	: 158	
HsDcpla	: LYRNASLSIYGIWFYDKNDCHRIAKLMADVVEEETRRSQQAARDKQSPSQANGCSDHRPIDILEMLSRAKDEYERNQMGDSNISSPGLQPSTQLSNLSTETLE	: 199	
HsDcplb	: LYRNARLSIYGIWFYDKKECQRIAELMKNLTQYEQKKAHQGTGAGISPVILN-SGEGKEVDILRMLIKAKDEVTKCKTCEPKKITSSAIYDNPMLIKIPVK	: 203	
MmDcpla	: LYRNASLSIYGIWFYDKNDCHRIAKLMADVVEEETRRSQQAARDKQSPSQANGCSDQRPIDILEMLSRAKDEYERNQMGDSNISSPGLQPSTQLSNLSTETLE	: 219	
MmDcplb	: LYRNGTLSIYGIWFYDKKECQRIAKLMKNLTQSEQLKACHGAGS--SPVTLN-SGEGQVVDILQMLTKAKDEVTKCKTCEPKQMTSSAICDNPMLIKIPVPR	: 201	
ScDcplp	: ITKNLKHEVYGIWIHTVSDRQNIYELIKYLENEPKDSFA-----SPVTLN-SGEGQVVDILQMLTKAKDEVTKCKTCEPKQMTSSAICDNPMLIKIPVPR	: 231	
AtDcpl	: -----	: -	
OsDcpl	: -----	: -	
MtDcpl	: -----	: -	
LeDcpl	: -----	: -	
HsDcpla	: EMPSGSQDKSAPS-----GHKHLTVEELFG--TSLPKEQPAVVGLDSEEMERLPGDASQKEPNSFLPFPFQELGGAPQSETLGVPSAAHHSVQPEITTPVLITP	: 296	
HsDcplb	: PSENQQRIQPQNQTLDPQHLSLTALFGKDKATCQETVEPQTLLHQQQQQQQQQEKLPIRQGVVRSLSYEPRRHSPPIEKQLCPAIQKLMVRSADLHP	: 307	
MmDcpla	: ETSPGSQDKSAPS-----GHKHLTVEELFG--TSLPKEQPTAMGLESEDTKLLGDASQKEPNSFLPFPFQSGGAPQSENLIHSAHHVTVQPEVSTPVLITP	: 316	
MmDcplb	: PSSSQRLLQGPAPSKTSDPEPQHLSLTALFGKDKAPCQETVTKPSRTFAHHHHHHHQQQQETRPVHHGVACSLSCPEPRKLSLPEVKQLCPAIQKLMGSPGLHP	: 305	
ScDcplp	: -----	: -	
		V	
AtDcpl	: -----KPTMAVMDGLEPSS-----TARDAPDDPAFVNFSSTMN-----LGNTASGSAGPYQS	: 208	
OsDcpl	: -----VPTSAAIDGLEPSSSSSTLVLSNAPDE-SLTDYFSGAVN-----VGNVSIITPMVGRTHQ	: 222	
MtDcpl	: -----VPTMAVMDGLEPSSSITSNVADVPDDPSFINFFSAAMG-----IGNTS-----	: 202	
LeDcpl	: -----VPTMAVIDGLEPSSSSTASNAHLPEDNSFVNFSSNALT-----IGNASNTAVQQQLYH	: 212	
HsDcpla	: ASIQTSEKHAPTYTITLPSVLSPTLPAAEAPTAQVPPSLPRNSMTMQAVKTTTQRQSPLLNQVPVPELSHASLIANQSPFRAPLNVTNTAGTSLPSVDLLQKLR	: 399	
HsDcplb	: LSELPENRCENGSTHSAEFFTGVPVQGSPPHNIIGTSRGVQNASRTQNLFEKLGSTPGAANKCDPSTPAPASSAALNRAPSTVTPVAPKGLAQPPQAYFNG	: 411	
MmDcpla	: ASIAQSGDKHPPSYTTLPSVLSPTLPAAEAPTTQVP-HLPRNSTMIQAVKTTTQRQSPLLNQVPVPELSHSLVASQSPFRAPVSLANPAGTALPSVDLLQKLR	: 418	
MmDcplb	: LPQHPEQWCKSGSPSPAGGILPGVQLGSPWNGRVAHCTQSTCRGHKLELQGGAPGAVHYKYNFCAPT-----GPVAVATQVAPGQSVAGSOLVYFSG	: 398	
ScDcplp	: -----	: -	
AtDcpl	: SAIPHQPHQPHQPHQPTIAPPVAAAAPPQIQSPPPLQSSSPLMTLFDNNPEVI---SSNSNIHTDLVTPSFFGPPRMM-AQPHLIPGVSMPSAPPLNPNNAS--	: 306	
OsDcpl	: PIESVASSHVPLIIPSAAP-----THQMGVPSG-AASAPPLPVIDTN-----VHSSHSTMLVTPAFFAPPSSSSASLVAPASSMPTASPFPHTSAD--	: 308	
MtDcpl	: -----MLRSPD--NLISLLQLL-----LLG-----LLHLLC--	: 230	
LeDcpl	: ASPATLPPRPPPPSPSSS-----APVLLSPFP--LSASSLLRPLHDAPEPD---VSAKNSNVLKVPSSFFGPPAS-SPLMPTISSVPTAPPLPLGN--	: 301	
HsDcpla	: -LTPQHDIQTQPLGKGMAMVAFSPARAGQLATPESETEPSSKTAARVAASAS---LSNMVLAP-LQSMQNGQDFVFPKVLSSALPVAGAPLVTATTAV	: 497	
HsDcplb	: SLPTQTVGHQAHREQSTLPRQTLAISGQGTSSGVIISPEQLLKLQIVQEQQLHAENRPAALAAKPPVLAQSSGTGKPLESWIMKTPATEQQLPQVIVISQQR	: 515	
MmDcpla	: -LTPQHDIQQAQPLGKGTMAPSPSSAQCQLATPESETEPSSKTAARVAASAS---LSNMVLAPLERSMQNGQDFVFPKVLSSALPVAGAPLVTATTAV	: 517	
MmDcplb	: PLQPPAPGHQALRKEQALPAQAVSLSGSQESSPTVLTQELLRKLQVHQEQ--QAAPRALAARFPVSAQGSQTEKPLEAVVSKTASMEKQAPLLQS-----	: 495	
ScDcplp	: -----	: -	
		VI	
AtDcpl	: -----HQQRSYG--TPVLQFPFPPTPPP---SLAPAPTGF--VISRDKVKEALLSLLQDEE-FIDKTRTLQNALQQ-----	: 370	
OsDcpl	: -----AHRPAYGHGTPLLQPLPPTPPAS---LTPVHNDEF--VISRDKVKDALLRLVQND--FINLLYQELQNAHA-----	: 374	
MtDcpl	: -----HWQPCR--YHLFHLY-----SVYTHQDAP--GVHSSSOAQIL-----	: 264	
LeDcpl	: -----LQRPYQ--APLLQFPFPPTPPSPLTPTSSIPNNIP--VVNNDKVEREALMLVQDDQ-FIDMIYRALNNAHHS-----	: 369	
HsDcpla	: S-----SVLLAPSVMQIVTRSSDLERKASSPSPLTIGTPESQRKPSIILSKSQLDLTHLILKNDSSPLSTLHEVYLQVLTKNKDNHNL	: 582	
HsDcplb	: IPATAAPSLMLPMVFAQPTSVPKERESGLLVPVGGQEPAAATSLLLPIQSPPEPVSITSSPLTKLQEQALLYLILKNDSSPLSTLHEVYLQVLTKNKDNHNL	: 618	
MmDcpla	: S-----SVLLSPSVMQIVTRPRAADLERKASSPSPLTIGTPAESQRKPSIILSKSQLDLTHLILKNDSSPLSTLHEVYLQVLTKNKDNHNL	: 602	
MmDcplb	: -----TCAPLRETDNGLMALGGQELPAASSNLLPLQWESSTVASRPLTKLQEQALLYLILKNDSSPLSTLHEVYLQVLTKNKDNHNL	: 578	
ScDcplp	: -----	: -	

- Abbildung wird auf nächster Seite fortgesetzt -

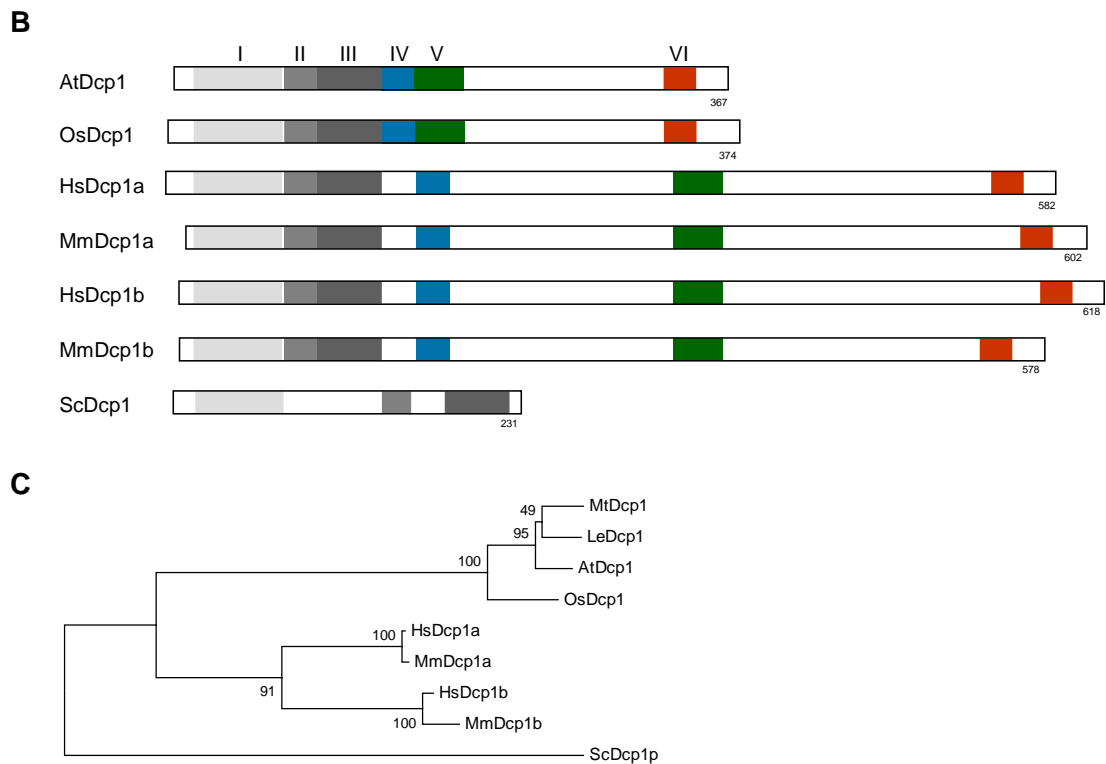


Abbildung 3.1: Sequenzanalyse von At Dcp1. (A) Sequenzvergleich von Dcp1 aus *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Medicago truncatula* (Mt), *Lycopersicon esculentum* (Le), *Homo sapiens* (Hs Dcp1a/b), *Mus musculus* (Mm Dcp1a/b), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (vorhergehende Seite). Die Aminosäuresequenzen wurden manuell ausgerichtet. Die markierten Bereiche (I-III) repräsentieren konservierte Domänen, die bei allen Homologen zu finden sind. Die Domäne IV-VI zeigt schwache Konservierungen zwischen den Homologen der höheren Eukaryonten an. Rot markierte Aminosäuren = hoch konservierte Positionen, blau beziehungsweise grün markierte Aminosäuren = schwächer konservierte Positionen. (B) Schematische Darstellung des Sequenzvergleichs von Dcp1 aus Mensch, Maus und Hefe. Die pflanzlichen Homologe sind exemplarisch durch *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* repräsentiert. Die in dem Sequenzvergleich markierten Domänen, sind durch farbige Boxen repräsentiert: schattierte Boxen = stark konservierte Domänen; farbige Boxen = geringe Konservierung. Die Gesamtlänge der jeweiligen Proteine ist auf der rechten Seite angegeben. (C) Phylogenetische Analyse der Dcp1 Homologe.

3.1.2 Dcp2

Das Decapping Protein Dcp2 ist durch die drei Domänen Box A (38 aa), Box B (21 aa) und dem MuT / Nudix Motiv Region (109 aa) charakterisiert. Bei der Datenbanksuche konnte ein eindeutiges Homolog für HsDcp2 und ScDcp2 in *Arabidopsis thaliana* (*AtDcp2* At5g13570) sowie den anderen pflanzlichen Systemen identifiziert werden. Es wurden auch weitere Proteine mit einem konservierten MuT / Nudix Motiv gefunden, da dieses Motiv in einer Reihe von Proteinen mit einer Pyrophosphatase-Aktivität konserviert ist (Bessmann et al., 1996). Allerdings wiesen diese Proteine nur eine sehr geringe Gesamthomologie auf und es waren nicht die charakteristischen Domänen Box A und Box B vorhanden. Im Gegensatz dazu zeigt der Sequenzvergleich der pflanzlichen Homologe mit dem Dcp2 aus Hefe und Säugerzellen, trotz unterschiedlicher Länge der Proteine, eine hohe Gesamthomologie (Abb. 3.2 A, B). Besonders die N-terminale Domäne weist eine sehr starke Konservierung auf. Dort finden sich auch die für die Decappingreaktion essentiellen Domänen wie Box A, Box B und die MuT / Nudix Motiv Region. Der C-Terminus der Dcp2 Homologe ist nur sehr gering konserviert und weist sehr unterschiedliche Größen bei den verschiedenen Organismen auf, der besonders groß bei ScDcp2 ist. Diesen Bereichen konnte bisher keine spezielle Funktion zugeordnet werden, jedoch scheinen sie bei der Decapping Reaktion eine entscheidende Rolle zu spielen (van Dijk et al., 2002). Die phylogenetische Analyse zeigt, dass die pflanzlichen und die tierischen Vertreter jeweils in eine eigene Gruppe fallen, wobei ScDcp2 keiner der Gruppen zugeordnet ist (3.2 C).

A

Box A

AtDcp2 : --MSGLRSSSSSKNIGNCLPSKELEDDLCSRFLNVPEDQSSFERILFLVEYAYWYEDNAVENDPKLKSLSLKEFTSLLFNSCDVLRPVYVTHIDDI1FK : 99
OsDcp2 : MAMAGGGGLNRSS--SRQLPPQELDDLCSRFLNVPKEDLESFERILFLVEYAHWFYEDNSVEHNPDKLSLSPKDFTLMFNSCAALRPYRAHLDDI1YK : 99
MtDcp2 : --MSNHHRSPSSS--YKTVLPPQELDDLCSRFLNVPKEDLQSFERILFLVEYAHWFYEDNSVENNPDKLSLSEKFTSLMFNSCDVLRPVYVAHIDDI1FK : 97
HsDcp2 : --ME-----TKRVEIPGSVLDLCSRFLNHPSEERDRAIRVCFQIELAHWFYLDYMQNTPLPQCGIRDFAKAVFSDPFLPQGEDVEKILD : 88
MmDcp2 : --ME-----PKRLEIPGSVLDLCSRFLNHPSEERDRAIRVCFQIELAHWFYLDYMQNTPLPQCGIRDFAKAVFSDPFLPQGEDVEKILD : 88
ScDcp2 : --MSLPLR----HALENTSVDRILEDDLVRFIINCPNEDLSSVERELPHFEASWFYDFIKLMNPTLPSLKI1KSPAQLI1KLCPLVWVKDIRVDEALQ : 94

MuT Motiv

AtDcp2 : DFTSYKCRVPVTGAIILDETYERCLLVKGWKGSSWSFPRGKSKDEEDHACAREVLEETGFDVSKLLKREEYIEFVFRQQRVRLYIVAGVTEDTVFAPL : 199
OsDcp2 : DFTHYKFRVPVCGAIILDDTYEKCLLVKGWKGSSWSFPRGKSKDEEDHTCAVREVLLEETGCDVSKLLKLEDYIEVSMWQQRVRLYIITGVKGDVTFAPQ : 200
MtDcp2 : DFTSYKVRVPVTGAIILDETYERCLLVKGWKGSSWSFPRGKSKDEEDHACAREVLEETGFDVSKFLNKDEYIEVIFGQQRVRLYIITAGVKDDTSFAPQ : 197
HsDcp2 : EWKEYKMGVPTYGAIILDETYENLVLLQVYLAQSGWFGPKGKVNKEAEPHDCAREVFEETGFDIKDYICKDDYIELRINDQLARLYIIPGPKTKFNFK : 189
MmDcp2 : EWKEYKMGVPTYGAIILDETYENLVLLQVYLAQSGWFGPKGKVNKEAEPHDCAREVFEETGFDIKDYICKDDYIELRINDQLARLYIIPGPKTKFNFK : 189
ScDcp2 : QFSYKYSKIPVRGAIFNENLSKILLVQGTESD-SWSFPRGKSKDEENDIDCCIREVKKEIGFDLTDYIDDNQFIERNIQGKNYKIFLISGVSEVFNFKPQ : 194

AtDcp2 : TKKEISEITWHRLDHLQF-----ASNEVITH-- : 225
OsDcp2 : TKKEISEISWHNIDELLP-----AGDDAISR-- : 226
MtDcp2 : TKKEISEIAWQRLDELQF-----SSEVISR-- : 223
HsDcp2 : TRREIRNIEWFSEIKLPC-----HRNDMTPKSKL : 218
MmDcp2 : TRREIRNIEWFSEIKLPC-----HRNDMTPKSKL : 218
ScDcp2 : VRNEIDKIEWDFPKKISKTYKSNIKYYLINSMMRPLSMWLRHQRIKNEQDKLSYAEQKLLGLITKEEQIDPGRELLNMLHTAVQANSNNNAVNSNGVQ : 295

Box B

AtDcp2 : -----GVSGLKLYMVAPFLSSLSKSWLK----- : 248
OsDcp2 : -----GVNGMKLYMVAPFLQGLKAWIAT----- : 249
MtDcp2 : -----GITGLKLYMVSPLASLKSWSI----- : 245
HsDcp2 : -----GLAPNKFMAIPIFIRPLRDLWLSRRFGDSDSDNGFSSTGTPAKPTVEKLSRTKF : 273
MmDcp2 : -----GLAPNKFMAIPIFIRPLRDLWLSRRFGDSDSDNGFSSTGTPARPTVEKLSRTKF : 273
ScDcp2 : PSSQELQHLKQSGEHNQKQDQSSFSQQQPSIFPSSLEPFPANNKNIPTPTMAMVPMNSNPQLFATMNGQPFAFPFPLPLTNNNSANPIPTVPVPPNF : 396

AtDcp2 : -----HPSVARRPNKPLKALCVWNA : 269
OsDcp2 : -----HRHPYQKSDTSARGTVWAK : 270
MtDcp2 : -----HTNLIW-----LQDLICHLK : 260
HsDcp2 : RHSQQLFPDGSFGDQWVK-----HRQPLQKPYNNHSEMSDCLK : 312
MmDcp2 : RHSQQLFPDGSFGDQWVK-----HRQPLQKSHSHGVEVSDCLK : 312
ScDcp2 : NAPPNFMAFVGNMHNLSGPAVSPFSLPAPLPRDSDGYSSSSPGLLDIILNSKKPDSNVQSSKPKLILQRGDTLNSIKQNNDETAHNSQALDLDLKL : 497

AtDcp2 : RTSVGG-----NGTATVESQNRKSELRTTMSNSRKPPELKRRTTMESHSTKPELKRKGTMESHTTATVESHTNKPVDHSDQIKPGGFS : 353
OsDcp2 : NSSTGA-----APVENPVITRTGSDPQTLDSRP-----GKSF : 302
MtDcp2 : EFVCGK-----QSTVLLKAVP-----QLWTANQQN----- : 285
HsDcp2 : GKNOQM-----RGNRKYQDSDPNQKRTNGLQ--PAKQNSLMKCEKLLHPRKLQDNFETDAVYDLPSSSEDQLEHAEQGPVACNGH : 394
MmDcp2 : AKNOQM-----RGNRKYQDSDPNQKRTNGLQ--PAKQNSLMKCEKLLHPRKLQDNFETDATCDLPCSGEESVVEHAEHGHVACNGH : 396
ScDcp2 : KPTSSQKIHASKPDTSFPLNDSVSGIQDAEYEDFESSSDEEVEVETARDERNLSNVDIGVNVMPSEKDSRRSQKPKPRNDASKTNLNASAEENSVEWGPCKSS : 598

AtDcp2 : INFKNQSVILQALESGNSA----- : 373
OsDcp2 : RNFRTDASILQSMESFLRT----- : 323
MtDcp2 : -----LNQILSLSMWLAGA----- : 300
HsDcp2 : CKFPFSSRAFLSFKFDHNAIMKILDLD----- : 420
MmDcp2 : CKFPFSSRAFLSFKFDQNAIMKILDLD----- : 422
ScDcp2 : PSTQSKQNSVGMQNKYRQEIHIGSDAYEVFESSSDEEDGKLELEEQTDQNSKLISQDILKENNFQDGEVPHRDMPTESNKSINETVGLSSTNTVTKVK : 699

AtDcp2 : ----- : -
OsDcp2 : ----- : -
MtDcp2 : ----- : -
HsDcp2 : ----- : -
MmDcp2 : ----- : -
ScDcp2 : PKVKILKRGETFASLANDKKAFFDSSSNVSSKDLLQMLRNPISSTVSNQQSPKSQHLSGDEEIMMMLKRNVSVPKQNSSEANSTSSINDANASELLGMLK : 800

AtDcp2 : ----- : -
OsDcp2 : ----- : -
MtDcp2 : ----- : -
HsDcp2 : ----- : -
MmDcp2 : ----- : -
ScDcp2 : QKEKDITAPKQPVNVDSYSQKNSAKGLLNILKKNDSYGYPRTEGGPSEMSTSMKRNDAATNNQELDKNSTELLNLYLKPPLNDGYENISNKDSSHELLNLI : 901

AtDcp2 : ----- : -
OsDcp2 : ----- : -
MtDcp2 : ----- : -
HsDcp2 : ----- : -
MmDcp2 : ----- : -
ScDcp2 : HGKNKSSAFNNVYATDGYSLASDNNENSSKLLNMLQNRSSAINEPNFVRSNGTSGSNELLSILHRK : 970

- Abbildung wird auf nächster Seite fortgesetzt -

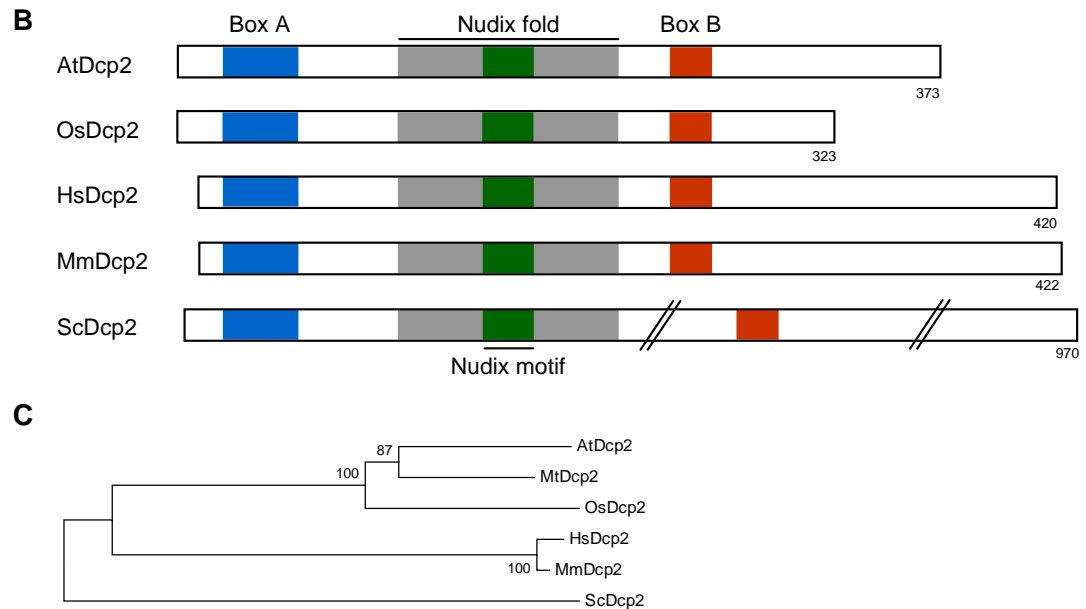


Abbildung 3.2: Sequenzanalyse von Dcp2. (A) Sequenzvergleich von Dcp2 aus *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Medicago truncatula* (Mt), *Lycopersicon esculentum* (Le), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (vorhergehende Seite). Die für Dcp2 charakteristischen und konservierten Domänen sind markiert: die N-terminale 38 aa Box A, 109 aa Nudix Region mit dem zentralen 24 aa Nudix Motiv sowie die 21 aa Box B. Rot markierte Aminosäuren = hoch konservierte Positionen, blau beziehungsweise grün markierte Aminosäuren = schwächer konservierte Positionen. (B) Schematische Darstellung des Sequenzvergleichs von Dcp1 aus Mensch, Maus und Hefe. Die pflanzlichen Homologe sind exemplarisch durch *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* repräsentiert. Die Gesamtlänge der jeweiligen Proteine ist auf der rechten Seite angegeben. (C) Phylogenetische Analyse der Dcp2 Homologe.

3.1.3 LSm Proteine

Für die LSm Proteine, die besonders durch die konservierte Sm-Domäne charakterisiert sind, finden sich im *Arabidopsis* Genom mindestens zehn Vertreter. Die Sm-Motive enthalten die typischen konservierten Aminosäuren beziehungsweise Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften (Cooper et al.; 1995, Herman et al., 1995; Séraphin, 1995). Um eine Beteiligung dieser Proteine am 5'-3' mRNA-Abbau zu untersuchen, wurden die Proteine At LSm1 (At3g14080) als Vertreter des erwarteten LSm1-7 Komplexes und LSm8 (At1g65700) als Vertreter des erwarteten LSm2-8 Komplexes gewählt (Abb. 3.3). Weiterhin wurden in die Untersuchungen die Proteine At Lsm2 (At1g03330) und At LSm5 (At5g48870) als Vertreter beider Komplexe mit einbezogen. Für diese Proteine konnten auch Homologe in *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *Lycopersicon esculentum* identifiziert werden (Abb. 3.3 A). Der Sequenzvergleich der Homologe zeigt eine signifikante Homologie mit den LSm Vertretern aus Hefe und Säugetieren. Es lassen sich eindeutig die Sm-Domänen identifizieren, die durch einen kurzen Linker von variabler Länge miteinander verbunden sind. Innerhalb der Sm-Domänen finden sich wenige Aminosäuren, die in allen LSm Proteinen konserviert sind. In den meisten Fällen sind Aminosäuren mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, meistens Hydrophobizität, konserviert. Trotz der starken Konservierung der Sm-Domänen lassen sich die jeweiligen LSm Proteine zum einen durch ihre Größe als auch ihrer Aminosäuresequenz eindeutig voneinander unterscheiden. Dies wird besonders deutlich anhand der phylogenetischen Analyse erkennbar, die zeigt, dass alle LSms in eine eigene Gruppe fallen (Abb. 3.3 C). Der hohe Grad der Konservierung aller LSms zwischen den untersuchten Organismen deutet auf wichtige Funktionen dieser Proteine hin. Weiterhin ist aufgrund der hohen Konservierung zu erwarten, dass die Bildung eines zytoplasmatischen LSm1-7 Komplexes sowie eines nukleären LSm2-8 Komplexes auch in den Pflanzen erhalten ist.

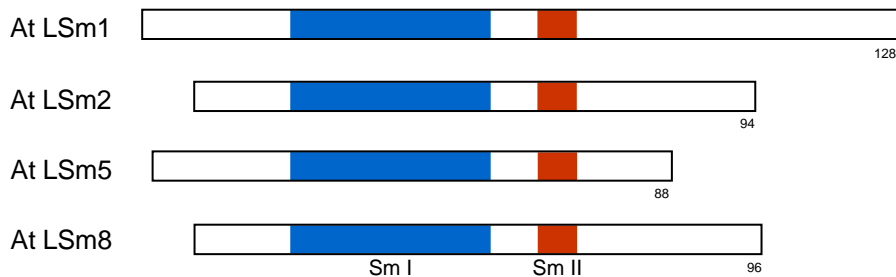
A

	<u>Sm I</u>	
AtLSm1	-----MS-WAGPEEIVLSTSLASYLDRKLLVLLRDGRKLMGTLRSFDQFANAVLEGACERVIVG--	: 58
OsLSm1	-----MSSWAGPEIPLSTSLAGFLDKKLLVLLRDGRKLLGTLCSFDQFANVVLQGACERVIVG--	: 59
MtLSm1	-----MS-WAAPEDLYLSTSLASYLDRKLLVLLRDGRKLMGTLRSFDQFANAVLEGACERVIVG--	: 58
LeLSm1	-----MS-WASPEDIYVSTSLASYLDRKLLVLLRDGRKLLGTLRSFDQFANAVLESACERAIVG--	: 58
HsLSm1	-----MN-YMPG---TASLIEDIDKKHLVLLRDGRTLIGFLRSIDQFANVVLHQTVVERIHVG--	: 53
MmLSm1	-----MN-YMPG---TASLIEDIDKKHLVLLRDGRTLIGFLRSIDQFANVVLHQTVVERIHVG--	: 53
ScLSm1	--MSANSKDRNQSNDQAKRQQNFPPKKISEGEADLYLDQYNFTTAAIVSSVDRKIFVLLRDGRMLFGVLRFTDQFANLILQDCVERIYFSEE	: 91
AtLSm2	-----MLFF---SYFKDLVGQEVTVLKNDLAIRGTLHSVDQYLNIKLEN--TRVVDQ--	: 48
OsLSm2	-----MLFF---SYFKDLVGQEVTVLKNDLAIRGTLHSVDQYLNIKLEN--TRVVDQ--	: 48
MtLSm2	-----MLFF---SYFKDLVGQEVTVLKNDLAIRGTLHSVDQYLNIKLEN--TRVVDQ--	: 48
LeLSm2	-----MLFF---SYFKDLVGQEVTVLKNDLAIRGTLHSVDQYLNIKLEN--TRVVDQ--	: 48
HsLSm2	-----MLFY---SFFKSLVGKDVVVELKNDLSICGTLHSVDQYLNIKLTD--ISVTDQ--	: 48
MmLSm2	MVFWGKPLASPRESPRANGENKRALHFCVADEDFVRLFY---SFFKSLVGKDVVVELKNDLSICGTLHSVDQYLNIKLTD--ISVTDQ--	: 84
ScLSm2	-----MLFF---SFFKTLVDQEVVVELKNDLSICGTLHSVDQYLNILKLDN--ISCTDE--	: 48
SpLSm2	-----MLFY---SFFKTLIDTEVTVLKNMDSIRGILKSDVDFLNVKLEN--ISVDA--	: 48
AtLSm5	-----MA---NNPSQLLPS---ELIDRCIGSKIWVIMKGDKELVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETYEITAE	: 58
OsLSm5	-----MSQ---NNPSQLLPS---ELIDRCIGSKIWVIMKGDKELVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETYEITAE	: 59
MtLSm5	-----MA---NNPSQLLPS---ELIDRCIGSKIWVIMKGDKELVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETYEITAE	: 58
LeLSm5	-----MSS---NNPSQLLPS---ELIDRCIGSKIWVIMKGDKELVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETYEITAE	: 59
HsLSm5	-----MAANATTNPSQLLPL---ELVDKICGSRIHIVMKSDEKIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 62
MmLSm5	-----MAANATTNPSQLLPL---ELVDKICGSRIHIVMKSDEKIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 62
SpLSm5	-----MS---MTLPL---ELIDKICGSLNWLWIMKSEREFAGTLVGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 54
ScLSm5	-----MS---LPEILPL---EVIDKTIQKVLIVLQSNREFEGLTVGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 57
AtLSm8	-----MAAT---TGLETLDVQIISVITNDGRNIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 51
OsLSm8	-----MASAG---PGLLESVDQIISVITNDGRNIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 52
LeLSm8	-----MAG---LGLLESVDQIISVITNDGRNIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 51
HsLSm8	-----MTSA---LENYINRTVAVITSDGRMIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 49
MmLSm8	-----MTSA---LENYINRTVAVITSDGRMIVGTLKGFDDVYVMVLEDTVETFEITPE	: 49
ScLSm8	-----MSAT---LKDYLNKRVIIVKVDGECILASLNGFDKNTNLFITNPNRISKEF--	: 49

Sm II

AtLSm1	--EQYCDIP-LGLYVIRGENVVLIGELDTREELPPH-MIRVSEAEIKRAQKVER---EASELRGTMRK-----RMEFLDFD	: 128
OsLSm1	--ELYCDVP-LGLYVIRGENVVLIGELDTREKDELPAH-MTCVSEAEIKRAEKAER---EARDLKGSMRK-----RMEFLDFD	: 129
MtLSm1	--DLYCDIP-LGLYVIRGENVVLIGEMDVEREELPPH-MTRVPTTEIIRRAQKVER---DASELKGTMRK-----RMEFLDLD	: 128
LeLSm1	--DLYCDIP-LGLYVIRGENVVLIGELDVKDELPPH-MTRVSEAEIIRRAQKVER---DSTDLKGSMRK-----RMEFLDMD	: 128
HsLSm1	--KKYGDIP-RGIFVVRGENVVLIGELDLEKESDTP--LQVSIIEILEEQRVEQQTLEAEKLVQALKDRGLSIPRADTLEDEY	: 133
MmLSm1	--KKYGDIP-RGIFVVRGENVVLIGELDLEKESDTP--LQVSIIEILEEQRVEQQTLEAEKLVQALKDRGLSIPRADTLEDEY	: 133
ScLSm1	--NKYAEED-RGIFMIRGENVVMLEGEVDIDKEDQPLEAMERIPFKEAWLTKQKNDEKRFKEETHKGGKMARHG--IVYDFHKSDMY	: 172
AtLSm2	--DKYPHMLSVRNCFIRGSVVRVYVQLPKDQVD---VDLLHDAAR-----REARGG-----	: 93
OsLSm2	--DKYPHMLSVRNCFIRGSVVRVYVQLPKDQVD---IDILHDAAR-----REARGG-----	: 93
MtLSm2	--DRYPHMLSVRNCFIRGSVVRVYVQLPPEGGD---IELVHDAQR-----KKPRGG-----	: 93
LeLSm2	--DKYPHMLSVRNCFIRGSVVRVYVQLPPEGGD---IELHDAAR-----REARGG-----	: 93
HsLSm2	--EKYPHMLSVRNCFIRGSVVRVYVQLPADEV---TQLLQDAAR-----KEALQKQK-----	: 95
MmLSm2	--EKYPHMLSVRNCFIRGSVVRVYVQLPADEV---TQLLQDAAR-----KEALQKQK-----	: 131
ScLSm2	--KKYPHLSGVRNCFIRGSTVRYVYLNKNMVD---TNLLQDATR-----REVMTERRK-----	: 95
SpLSm2	--SKYPHMAAVKDLFIRGSVVRVYVHMSSAYVD---TILLADACR-----RDLANNKRO-----	: 96
AtLSm5	---GRRITKLDQILLNGNIAIILVPGGSPDGE-----	: 88
OsLSm5	---GRRITKLDQILLNGNIAIILVPGGSPDVA-----	: 89
MtLSm5	---GRRITKLDQILLNGNIAIILVPGGSPDPE-----	: 87
LeLSm5	---GRRITKLDQILLNGNIAIILVPGGSPDPE-----	: 88
HsLSm5	---GRRITKLDQILLNGNIAITMLVPGGEGPEV-----	: 91
MmLSm5	---GRRITKLDQILLNGNIAITMLVPGGEGPEV-----	: 91
SpLSm5	---G-VTEKHSEMLLNGNMCMLIPGGKPE-----	: 80
ScLSm5	ESRNEKVMQHHGRMLLSGNIAIILVPGGKKTPEAL-----	: 93
AtLSm8	--EGVQQHV-LGLYIIRGDNIGVIGELDEELD---ASLDFSKLR-----AHPKLPVVH-----	: 98
OsLSm8	--EGVQQLV-LGLYIIRGDNISVVGVEVDEELD---ARLDLSNLR-----AHPKLPVIH-----	: 99
LeLSm8	--EGVQQLV-LGLYIIRGDNISVVGELDEELD---SNLDMSKLR-----AHPKLPVVH-----	: 98
HsLSm8	--QGVQVQV-LGLYIIRGDNVAVIGEIDBETD---SALDLGNIR-----AEPLNSVAH-----	: 96
MmLSm8	--QGVQVQV-LGLYIIRGDNVAVIGEIDBETD---SALDLGNIR-----AEPLNSVAH-----	: 96
ScLSm8	-----ICKAQLLRGSEIALVGLIDAENDSLAPIDEKVPMLKDTKNKIENEHVIWEKVYESKTK-----	: 109

B



- Abbildung wird auf nächster Seite fortgesetzt -

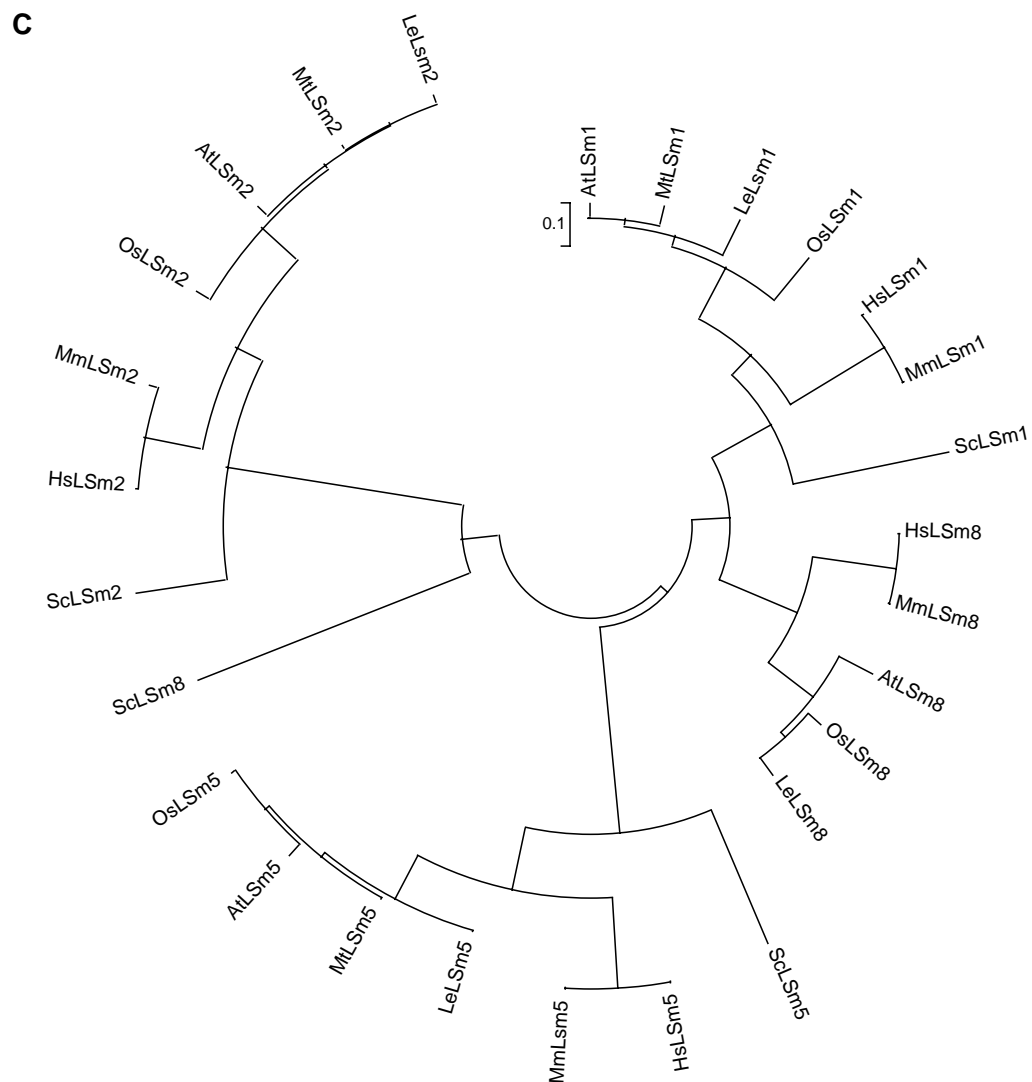


Abbildung 3.3: Sequenzanalyse von LSm1, LSm2, LSm5 und LSm8. (A) Sequenzvergleich der ausgewählten LSm Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Medicago truncatula* (Mt), *Lycopersicon esculentum* (Le), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (vorhergehende Seite). Die vorhergesagten Sm Motive I / II sind markiert. Rot markierte Aminosäuren = hoch konservierte Positionen, blau beziehungsweise grün markierte Aminosäuren = schwächer konservierte Positionen. (B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der LSm Proteine exemplarisch durch *Arabidopsis thaliana* repräsentiert. Die farbigen Boxen repräsentieren die konservierten Sm-Motive. (C) Phylogenetische Analyse der LSm Proteine.

3.2 Expressionsanalyse

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Gene in *Arabidopsis thaliana* exprimiert werden, wurden die Expressionslevel der jeweiligen mRNAs in verschiedenen Geweben sowie Zellkultur mit Gen-spezifischen Primer über semi-quantitative RT-PCR bestimmt. Für jedes Transkript konnte eine Bande mit der erwarteten Größe detektiert werden (Abb 3.4 A, Tabelle 2.1). Die Ergebnisse zeigen, dass die Gene ubiquitär exprimiert werden. Weiterhin wurden die Microarray Datensätze, die vom AtGenExpress Konsortium veröffentlicht wurden, für weitere Analysen herangezogen (Abb 3.4 A). Diese Datensätze verdeutlichen, dass die jeweiligen Gene konstitutiv exprimiert werden. Auch unter Stressbedingungen kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen im Expressionsmuster. Lediglich für Dcp2 kann eine Veränderung der Expression beobachtet werden. Die ubiquitäre und konstitutive Expression dieser Gene deckt sich mit der Annahme, dass der mRNA-Abbau einen zellulären Prozess darstellt, der zu jeder Bedingung in jeder Zelle vorhanden ist. Da keine Antikörper gegen die jeweiligen Proteine außer gegen Dcp1 (siehe Abschnitt 3.6) existieren, kann keine Aussage über die jeweiligen Proteinlevel gemacht werden. Es ist möglich, dass die Regulation der Expression der Proteine auf translationeller Ebene stattfindet.

3.3 Lokalisationsanalyse

Lokalisationstudien von mRNA-Abbau Proteinen (zum Beispiel Dcp1, Dcp2 und LSms) in einer Reihe von Organismen haben ergeben, dass diese Proteine hauptsächlich in P-bodies im Zytoplasma lokalisieren und zeigen, dass diese Eigenschaft der Proteine im Laufe der Evolution konserviert ist. Die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle ist hochdynamisch und deren Akkumulation in den P-bodies ist abhängig vom Status des mRNA-Metabolismus unter einer gegebenen Bedingung.

Erste Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit der Exoribonuklease Xrn4 in

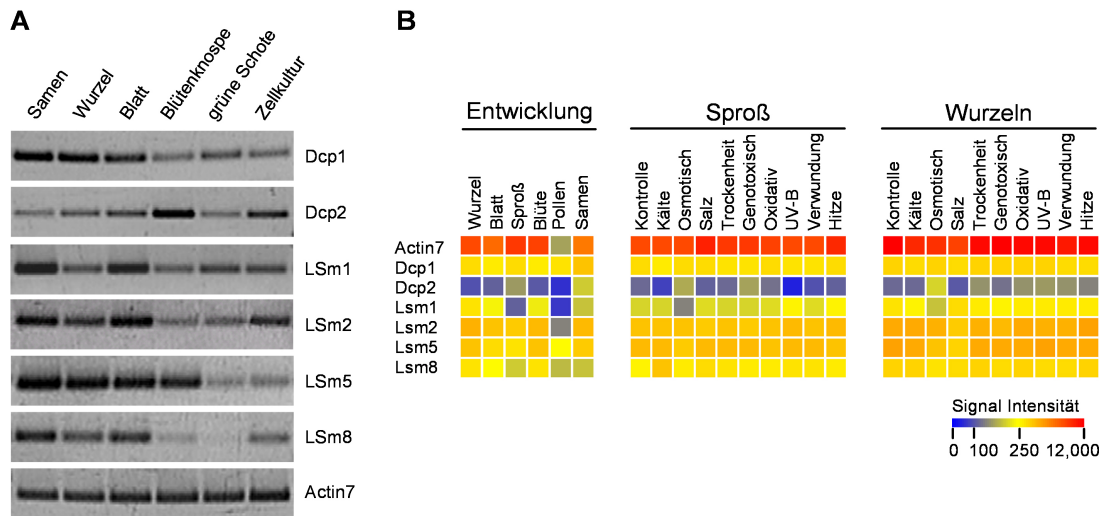


Abbildung 3.4: Expressionsanalyse in Geweben von *Arabidopsis thaliana*. (A) Die für die identifizierten Proteine kodierenden mRNAs wurden über RT-PCR Analyse mit Sequenz-spezifischen Primern durchgeführt. Die Gesamt RNA wurde aus Samen, Wurzel, Blatt, Blütenknospe, grüne Schote und Zellkultur isoliert. Die mRNA wurde unter der Verwendung von Aktin 7 spezifischen Primern standardisiert. Die Kontamination mit genomischer DNA wurde durch Verwendung von Intron-überspannenden Primern ausgeschlossen (Material und Methoden 2.1). (B) Darstellung ausgewählter Microarray Expressionsprofile der AtGenExpress Entwicklungs- und abiotischen Stress-Serie als „heat maps“. Die Farblegende für die Signalintensitäten ist rechts unten angegeben.

Zwiebel Epidermiszellen deuteten bereits eine ähnlich Lokalisation in Pflanzen an (Kastenmayer und Green, 1998). Um die Frage zu beantworten, ob sich homologe zelluläre Strukturen in Pflanzen finden lassen, wurde die Lokalisation der neu identifizierten Proteine als GFP-Fusionsproteine (green fluorescent protein) in Tabak Mesophyll Protoplasten fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.5 A).

3.3.1 Subzelluläre Lokalisation von GFP-Dcp1 und GFP-Xrn4

Bei der Untersuchung von GFP-Dcp1 wurden sehr schnelle Veränderungen in der Lokalisation beobachtet. Das GFP-Dcp1 lag im Zytoplasma verteilt vor und war teilweise in

kleinen Aggregaten zu erkennen (3.5 A). Allerdings konnten nach ca. 60 Sekunden eine schnelle Akkumulation des Proteins in zytoplasmatischen Foci beobachtet werden (Abb. 3.5 B). Der Prozess war innerhalb von 3-10 Sekunden abgeschlossen und die Lokalisation änderte sich anschließend nicht mehr. Identische Beobachtungen konnten auch bei der Untersuchung der Exoribonuklease Xrn4 gemacht werden (Abb. 3.5 A). Um zu überprüfen, ob Dcp1 und Xrn4 in den gleichen Strukturen lokalisiert sind, wurden RFP-Dcp1 (red fluorescent protein) mit GFP-Xrn4 koexprimiert. Es konnte eine Kolokalisation der Proteine beobachtet werden (3.5 C). Dies deutet an, dass die Proteine an identischen Prozessen beteiligt sind.

Da die Proteine zu Beginn eine Verteilung im Zytoplasma zeigten, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Strukturen um Artefakte handelt, die aus der Überexpression der Proteine resultieren. Die Veränderungen beruhen also auf intrinsischen Eigenschaften der Proteine. Das hoch dynamische Verhalten von Dcp1 sowie die Kolokalisation mit der Exoribonuklease wurde auch in Hefe beobachtet, und diese Fakten deuten an, dass das homologe Protein in *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurde und diese Strukturen sehr wahrscheinlich die pflanzlichen P-bodies darstellen. Auch die Größe der Strukturen sowie deren Verteilung ist vergleichbar mit den P-bodies der Säugerzellen. Möglicherweise wurde die Akkumulation durch anoxische Bedingungen (Stress) unter dem Deckgläschen hervorgerufen, da ohne Deckgläschen dieser Effekt nicht zu beobachten war (Daten nicht dargestellt) (siehe Abschnitt 3.10). Die hohe dynamische Veränderung könnte durch Veränderungen im mRNA-Metabolismus unter diesen Bedingungen hervorgerufen worden sein. Verantwortlich dafür könnte sowohl ein erhöhter mRNA-Zufluss in diese Strukturen als auch eine verringerte Abbaurate sein.

3.3.2 Subzelluläre Lokalisation von GFP-Dcp2

Das Decapping Protein Dcp2 wurde ebenfalls in zytoplasmatischen Foci erwartet. Allerdings konnte überraschenderweise keine Akkumulation in zytoplasmatischen Struk-

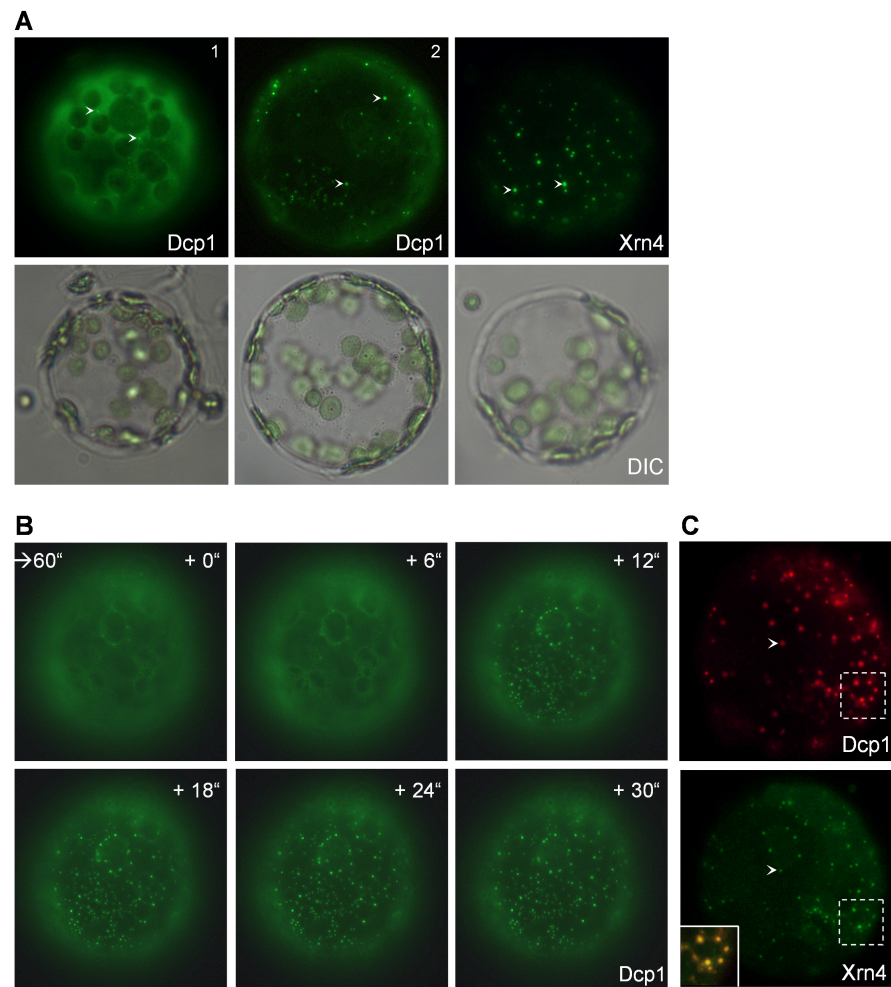


Abbildung 3.5: Subzelluläre Lokalisation von Dcp1 und Xrn4 in Tabak Mesophyll Protoplasten über Fluoreszenzmikroskopie. (A) Lokalisation von GFP-Dcp1 (zwei Beispiele 1/ 2) und GFP-Xrn4 (nur Lokalisation in Aggregaten dargestellt). Die Unversehrtheit der Protoplasten wurde über Durchlicht (DIC = differential interference contrast) kontrolliert. (B) Dynamik von GFP-Dcp1. Die Akkumulation von GFP-Dcp1 wurde 60 Sekunden nach Beobachtung unter dem Mikroskop zu den rechts oben angegebenen Zeiten aufgenommen. 70 % der transformierten Protoplasten zeigten dieses Verhalten. (C) Kolokalisation von RFP-Dcp1 und GFP-Xrn4. Pfeile zeigen kleine zyttoplasmatische Aggregate an. Weitere Beispiele siehe Abb. Anhang A. Maßstab = 10 μm .

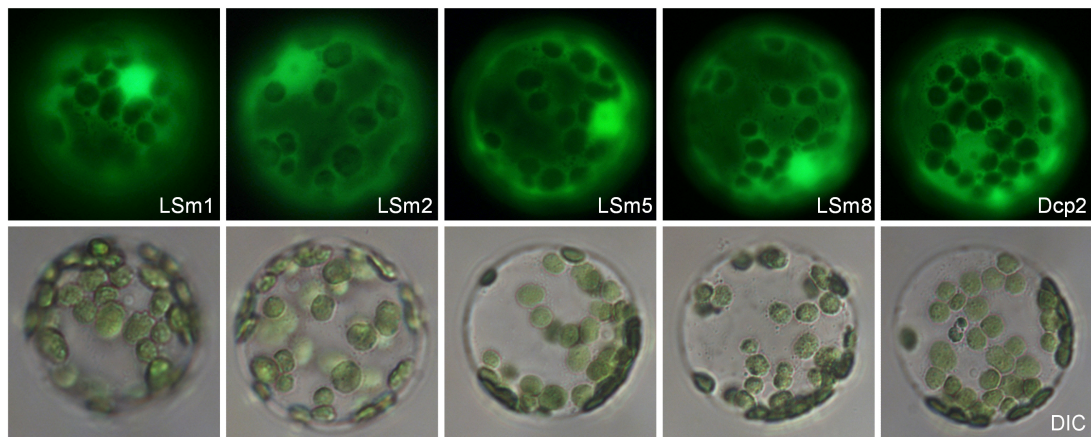


Abbildung 3.6: Subzelluläre Lokalisation der Lsm Proteine und Dcp2 in Tabak Mesophyll Protoplasten über Fluoreszenzmikroskopie. Die GFP markierten Proteine LSm1, LSm2, LSm5, LSm8 und Dcp2 wurden in Tabak Mesophyll Protoplasten exprimiert. Die untere Reihe zeigt die Protoplasten im Durchlicht (DIC). Weitere Beispiele siehe Abb. Anhang A. Maßstab = 10 μm .

turen beobachtet werden (Abb 3.6). Das GFP-Dcp2 lag ausschließlich verteilt im Zellkern sowie dem Zytoplasma vor. Auch eine lange Inkubation der Tabak Mesophyll Protoplasten unter dem Deckgläschen führte zu keiner Veränderung in der Lokalisation. Eine nukleäre Lokalisation wurde bereits für HsDcp2 beschrieben (van Dijk et al., 2002). Ebenfalls wurde auch in Hefe und Säugerzellen beobachtet, dass nicht alle mRNA-Abbau Proteine im gleichen Ausmaß in den P-bodies lokalisieren (Cougot et al., 2004).

3.3.3 Subzelluläre Lokalisation von GFP-LSms

Aufgrund der hohen Konservierung der LSm-Proteine war zu erwarten, dass das LSm1 Protein als Komponente des putativen LSm1-7 Komplexes nur im Zytoplasma zu finden ist, wohingegen das LSm8 als Komponente des LSm2-8 Komplexes nur im Zellkern lokalisiert ist, wie es in Hefe und Säugerzellen gezeigt wurde (Ingelfinger et al., 2002; Sheth und Parker, 2003). Die Proteine LSm2 und LSm5 sind dagegen in beiden Kom-

partimenten zu erwarten. Während die disperse nukleo-zytoplasmatische Lokalisation für LSm2 und LSm5 den Erwartungen entsprach, war die Lokalisation von LSm1 und LSm8 unerwartet (Abb. 3.6). LSm1 und LSm8 zeigten ebenfalls eine disperse nukleo-zytoplasmatische Verteilung.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die teilweise unerwarteten Lokalisationen der LSms beziehungsweise des Dcp2 und die Abwesenheit von zytoplasmatischen Strukturen zu erklären. Ein Einfluss des GFP-Tag kann ausgeschlossen werden, da identische Lokalisationen mit verschiedenen Tags (3HA, Strep) beobachtet wurden (Daten nicht dargestellt). Da die Proteine Untereinheiten größerer Komplexe darstellen, ist es möglich, dass weitere Proteine im richtigen stöchiometrischen Verhältnis für den Einbau in intakte Komplexe benötigt werden, wie bereits in Hefe für die LSm Komplexe gezeigt werden konnte. Ebenfalls konnte für HsDcp2 gezeigt werden, dass die Koexpression von Hedls (human enhancer of Decapping) für den Einbau in den Decappingkomplex nötig ist (Fenger-Grøn et al., 2006). Somit wäre es möglich, dass die hier beobachtete Lokalisation lediglich die Lokalisation des freien Proteins zeigt. Ein weiterer Grund für die Abwesenheit von zytoplasmatischen Akkumulationen könnte sein, dass die Proteine nur transient in den Strukturen lokalisiert sind (siehe Abschnitt 3.5).

3.4 Interaktionsanalyse der mRNA-Abbau Proteine

Der mRNA-Abbau ist ein komplexer Prozess, der mit der Überführung der mRNA in ein nicht-translatierten Zustand beginnt und schließlich zum Abbau der mRNA führt. Dabei findet eine Vielzahl von charakteristischen Protein-Protein Wechselwirkungen statt, wie durch Untersuchungen in Hefe und Säugerzellen gezeigt wurde, die die mRNP-Reorganisation hervorrufen. Um zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit identifizierten Proteine miteinander interagieren, und um somit Hinweise auf eine Beteiligung in identischen zellulären Prozessen zu bekommen, wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid Analyse (H2H) durchgeführt. Die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse ist eine Methode, um Interaktionen

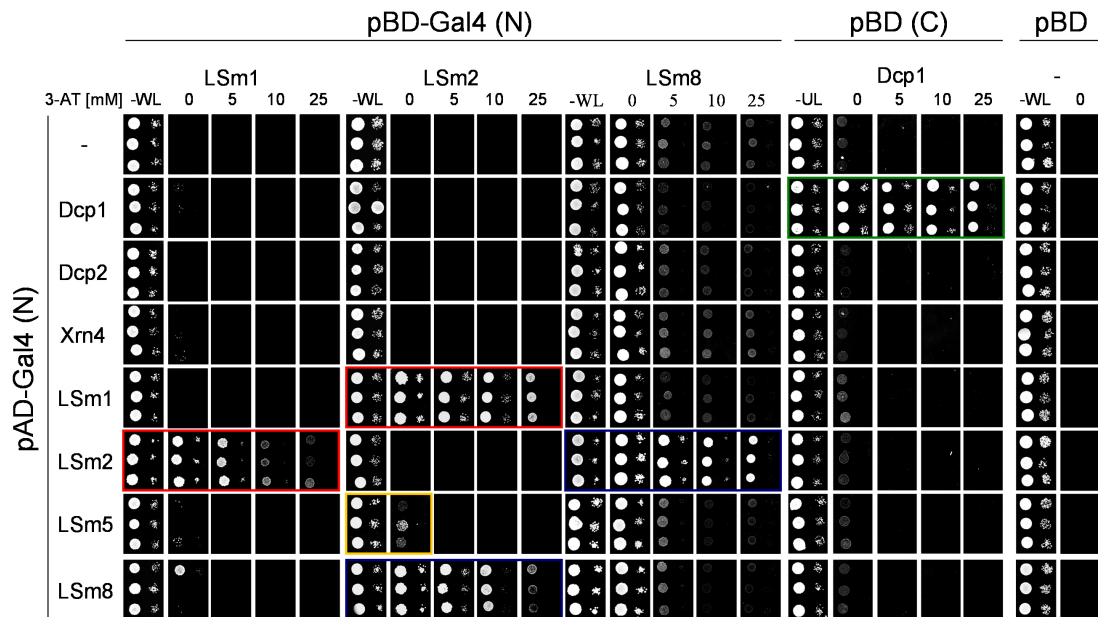


Abbildung 3.7: Protein-Protein Interaktionsanalyse mittels Hefe-Zwei-Hybrid Methode. Die angegebenen N-terminal getaggten AD- und BD Fusionproteine (N) wurden in allen Kombinationen miteinander auf Interaktion getestet. Aufgrund von hoher Selbstaktivität wurde für Dcp1 die DNA-Bindedomäne an den C-Terminus (C) fusioniert. Kombinationen mit BD-Dcp2, -Xrn4, -LSm1, -LSm5 ergaben keine Interaktionen (nicht dargestellt). Die Stärke der Interaktion wird durch Wachstum auf Medium mit ansteigender Konzentration des Histidin Synthese Inhibitor 3-Amino Triazol (3-AT) angezeigt. Jedes Fusionsprotein wurde mit der Aktivator-domäne (AD) beziehungsweise Bindedomäne (BD) getestet (nur für BD (N) gezeigt). Farbige Boxen markieren Proteinkombinationen, bei denen Interaktionen beobachtet werden konnten.

zwischen Proteinen nachzuweisen, die über eine Dimer-Oberfläche der Proteine zustande kommen. Die getesteten Proteine wurden in verschiedenen Kombinationen sowohl als Gal4-AD beziehungsweise Gal4-BD Fusionsproteine getestet. Im folgenden wird zur Vereinfachung auf die Nennung der fusionierten Domänen (AD / BD) verzichtet.

Bei der Analyse der Proteine konnte eine Interaktion zwischen LSm1-LSm2 und LSm2-LSm8 beobachtet werden (Abb. 3.7; rote Boxen beziehungsweise blaue Boxen). Weiterhin wurde eine sehr schwache Interaktion von LSm2 und LSm5 detektiert (gelbe Box). Die Interaktionen von LSm1-LSm2 und LSm2-LSm8 konnten auch über Hefe-

Zwei-Hybrid Screenings mit den homologen LSm Proteinen aus Hefe und Säugerzellen beobachtet werden (Fromont-Racine et al., 2000; Lehner und Sanderson, 2004). Diese Ergebnisse deuten an, dass ähnlich Komplexe in *Arabidopsis thaliana* existieren, und weisen auf eine Rolle in identischen Prozessen der Zelle hin. Die LSm2-LSm5 Interaktion wurde allerdings bisher nicht in anderen Organismen beobachtet. Da diese Interaktion nur sehr schwach war und nur in einer Orientierung beobachtet wurde, könnte es sich auch um eine unspezifische Interaktion handeln. Bei der H2H Analyse von Dcp1 wurde die DNA-Bindedomäne an den C-Terminus fusioniert, da das Protein eine hohe Selbstaktivität aufwies, wie es bereits für Hs Dcp1 beobachtet werden konnte (Lehner und Sanderson, 2002). Interessanterweise konnte eine Selbstinteraktion des Dcp1 beobachtet werden (grüne Box). Eine solche Selbstinteraktion wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Da das Dcp1 innerhalb der N-terminalen Domäne sehr ähnlich zu den Homologen Dcp1 ist (Abb. 3.1), ist diese Eigenschaft auf die C-terminale Domäne zurückzuführen.

Für Dcp1 wurde weiterhin eine Interaktion mit Dcp2 erwartet. Allerdings konnte diese nicht beobachtet werden. Ebenfalls konnten keine Interaktionen mit Xrn4 identifiziert werden (nur teilweise dargestellt). Eine triviale Erklärung hierfür ist, dass die Interaktionen zwischen den Proteinen zu schwach sind, um sie zu detektieren, oder die Proteine sind teilweise nicht stark genug oder überhaupt nicht exprimiert. Jedoch konnte aufgrund fehlender Antikörper die Expression dieser Proteine nicht analysiert werden.

3.5 Interaktionsanalyse der mRNA-Abbau Proteine im pflanzlichen Expressionssystem

Wie bereits erwähnt, kann das Hefe-Zwei-Hybrid System die Wechselwirkungen von Proteinen nur wiedergeben, wenn diese über eine Dimer-Oberfläche der Proteine zustande kommt. Wird für die Interaktionen das Zusammenspiel mehrerer Faktoren benötigt, wie

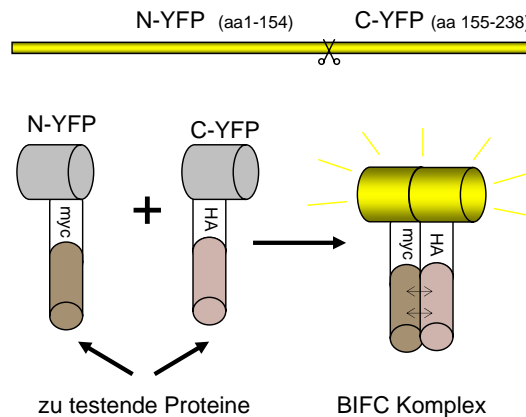


Abbildung 3.8: Prinzip der BIFC Interaktionsanalyse. Für die BIFC Analyse wird das YFP assymetrisch geteilt und mit zu testenden Proteinen fusioniert. Die Expression kann über die eingefügten Tags (myc/Ha) nachgewiesen werden. Die beiden Teile des YFP benötigen die Interaktion zweier Proteine, die mit den jeweiligen YFP Fragmenten fusioniert sind. Die Interaktion und der Ort wo die Interaktion stattfindet kann mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

zum Beispiel Assemblierung auf mRNA oder weitere Proteine, braucht man das native Zellsystem. Zu diesem Zweck wurden die Möglichkeiten der Bimolecular fluorescence complementation analysis (BIFC oder auch Split YFP) genutzt. Diese zeigt nicht nur Interaktionen im natürlichen System, sondern auch die subzelluläre Lokalisation der Proteinkomplexe (Abb. 3.8).

Die BIFC Methode basiert auf der Wiederherstellung von zwei nicht-fluoreszierenden Fragmenten (N-terminaler Teil aa 1-154, N-terminaler Teil aa 155-238) des YFP (yellow fluorescent protein). Die Rekonstitution ist dabei von zwei interagierenden Proteinen abhängig, die mit den zwei Hälften des YFP fusioniert sind. Eine wichtige Eigenschaft dieser Methode ist, dass sie die Detektion von schwachen und transienten Interaktionen anzeigen kann, da der rekonstituierte Komplex besonders stabil ist (Hu et al., 2002; Walter et al., 2004).

Für die BIFC Analyse wurden die jeweiligen N-YFP beziehungsweise C-YFP getagg-

ten Fusionsproteine in allen möglichen Kombinationen paarweise in Tabak Mesophyll Protoplasten koexprimiert und das Ergebnis im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 3.9 und Tabelle 3.1). Für jedes Fusionsprotein gab es Kombinationen, die kein Signal ergaben. Diese dienen als Negativkontrollen. Die detektierten Interaktionen zwischen den getesteten Proteinen konnten in den meisten Fällen in beiden Orientierungen (zum Beispiel LSm1-LSm2 beziehungsweise LSm2-LSm1) beobachtet werden. Bei den Interaktionen wurden zwei verschiedene Muster beobachtet: Interaktionen in zytoplasmatischen Foci und Interaktionen mit disperser nukleo-zytoplasmatischer Lokalisation ohne Bildung von Foci.

3.5.1 Interaktionen in zytoplasmatischen Foci

Interaktionen in zytoplasmatischen Foci wurden hauptsächlich bei der Koexpression der getesteten Proteine mit Dcp1 detektiert (Abb. 3.9 blaue Box). Weiterhin konnte auch eine Interaktion von Dcp2 mit Xrn4 in Aggregaten detektiert werden sowie bei der Bildung von Dcp1 sowie Dcp2 Dimeren. Die Anzahl, Größe und Verteilung der Aggregate ist vergleichbar mit den Strukturen, die mit GFP-Dcp1 beziehungsweise mit GFP-Xrn4 (Abb. 3.5) beobachtet wurden, so dass es sich wahrscheinlich um identische Strukturen handelt. Die Interaktionen von Dcp2 beziehungsweise der LSms mit Dcp1 in zytoplasmatischen Strukturen stehen im Gegensatz zu den GFP-Lokalisationsstudien (Abb. 3.6). Da die Rekonstitution des Split YFP zur Stabilisierung transienter und schwacher Interaktionen führt, läßt dies den Schluss zu, dass die LSms als auch das Dcp2 transient in den zytoplasmatischen Strukturen lokalisieren und somit auch nur sehr transient mit Dcp1 interagieren.

3.5.2 Interaktionen im Nukleus und Zytoplasma

Interaktionen im Zytoplasma und Nukleus wurden bei zahlreichen LSm-LSm Kombinationen als auch zwischen den LSms mit Dcp2 beobachtet (Abb. 3.9 rote Box). Die

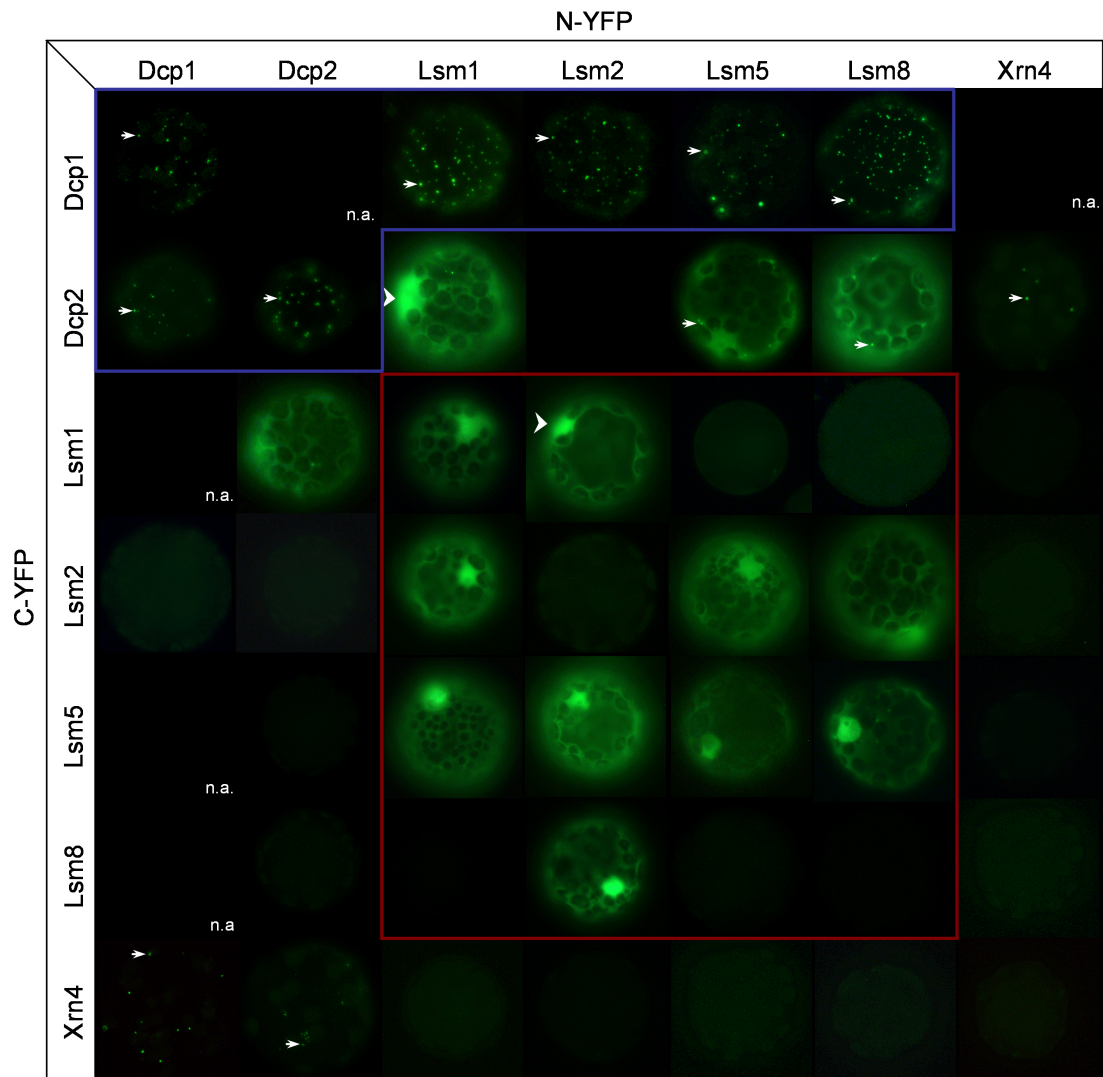


Abbildung 3.9: In vivo Protein-Protein Interaktionsanalyse mittels BIFC Methode in Tabak Mesophyll Protoplasten. Die jeweiligen zu testenden N-YFP und C-YFP markierten Proteine wurden paarweise untersucht. Koexpression der jeweiligen Fusionsproteine mit N-YFP beziehungsweise C-YFP ergab kein Signal (nicht dargestellt). Wenige Kombinationen resultierten in der Bildung von Artefakten (n.a. = nicht anwendbar). Pfeile zeigen die Bildung von zytoplasmatischen Foci an. Breite Pfeilköpfe zeigen exemplarisch den Nukleus. Weitere Informationen zu den Ergebnissen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Weitere Beispiele siehe Abb. Anhang B. Maßstab = 10 μm .

N-YFP	C-YFP	Signal	Lokalisation	N-YFP	C-YFP	Signal	Lokalisation
-	-	-		-	LSm1	-	
Dcp1	-	-		Dcp1	LSm1	-	n.a.
Dcp2	-	-		Dcp2	LSm1	+++	N/C
Xrn4	-	-		Xrn4	LSm1	-	
LSm1	-	-		LSm1	LSm1	+	N/C
LSm2	-	-		LSm2	LSm1	+++	N/C
LSm5	-	-		LSm5	LSm1	(+)	N/C
LSm8	-	-		LSm8	LSm1	(+)	N/C
-	Dcp1	-		-	LSm2	-	
Dcp1	Dcp1	++	F	Dcp1	LSm2	-	
Dcp2	Dcp1	-	n.a.	Dcp2	LSm2	-	
Xrn4	Dcp1	-	n.a.	Xrn4	LSm2	-	
LSm1	Dcp1	+++	F	LSm1	LSm2	+++	N/C
LSm2	Dcp1	+	F	LSm2	LSm2	-	
LSm5	Dcp1	++	F	LSm5	LSm2	+++	N/C
LSm8	Dcp1	+++	F	LSm8	LSm2	+++	N/C
-	Dcp2	-		-	LSm5	-	
Dcp1	Dcp2	++	F	Dcp1	LSm5	-	n.a.
Dcp2	Dcp2	+++	F	Dcp2	LSm5	(+)	N/C
Xrn4	Dcp2	+	F	Xrn4	LSm5	-	
LSm1	Dcp2	++	N/C	LSm1	LSm5	+	N/C
LSm2	Dcp2	-	-	LSm2	LSm5	++	N/C
LSm5	Dcp2	++	N/C	LSm5	LSm5	++	N/C
LSm8	Dcp2	+++	N/C	LSm8	LSm5	++	N/C
-	Xrn4	-		-	LSm8	-	
Dcp1	Xrn4	++	F	Dcp1	LSm8	-	n.a.
Dcp2	Xrn4	+	F	Dcp2	LSm8	(+)	N/C
Xrn4	Xrn4	-		Xrn4	LSm8	-	
LSm1	Xrn4	-		LSm1	LSm8	-	
LSm2	Xrn4	-		LSm2	LSm8	+++	N/C
LSm5	Xrn4	-		LSm5	LSm8	(+)	N/C
LSm8	Xrn4	-		LSm8	LSm8	(+)	N/C
N nukleär				F zytoplasmatische Foci			
C zytoplasmatisch				n.a. nicht anwendbar			
+ Intensität des Fluoreszenzsignals				(+) selten detektiert <1%			

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der BIFC Analyse

disperse nukleo-zytoplasmatische Lokalisation der Interaktionen mit LSM1 beziehungsweise LSM8 bestätigen die Ergebnisse der GFP-Lokalisations Analyse (Abb. 3.6). Interessanterweise konnte auch eine Interaktion von LSM8 mit Dcp2 beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in *Arabidopsis thaliana* das LSM8 und LSM1 nicht auf unterschiedliche Kompartimente beschränkt sind und wahrscheinlich alternative LSM Komplexe gebildet werden können. Innerhalb des Nukleus konnten auch keine Akkumulationen in Foci beobachtet werden, wie man es zum Beispiel häufig für Transkriptionsfaktoren und die Splicing Maschinerie findet.

3.5.3 Das Interaktom

Die über H2H detektierten Interaktionen konnten mit der BIFC Methode verifiziert werden. Es wurden jedoch auch zusätzliche Interaktionen detektiert (Abb. 3.10). Da sich die Methoden grundlegend unterscheiden, stehen die Beobachtungen nicht im Widerspruch (siehe Abschnitt 3.4 und 3.5). Viele der beobachteten Interaktionen stimmen auch mit Interaktionsstudien in anderen Organismen überein (Fromont-Racine et al., 2000; He und Parker, 2000; Lehner und Sanderson, 2004). Allerdings gibt es Studien der mRNA-Abbau Proteine mit dem BIFC System bisher nur für Pflanzen. Lediglich für Dcp1 und Dcp2 wurden in Säugerzellen eine Interaktion über FRET Analysen in zytoplasmatischen Foci in vivo beobachtet (Cougot et al., 2004). Es kann ausgeschlossen werden, dass die Interaktionen durch Kolo-kalisation der Proteine hervorgerufen wurde. So kann zum Beispiel sowohl Dcp2 als auch LSM2 in Aggregaten beobachtet werden (siehe Interaktion LSM2-Dcp1 und Dcp1-Dcp2), wohingegen die Kombination LSM2-Dcp2 kein Signal ergab. Zusammenfassend weisen die Beobachtungen auf eine Teilnahme der Proteine in identischen Prozessen hin. Besonders die Interaktionen in zytoplasmatischen Aggregaten deckt sich mit der Annahme, dass diese Proteine am mRNA-Abbau teilnehmen und sich in P-body-ähnlichen Strukturen befinden.

Es ist möglich, dass diese Interaktionen und deren Lokalisationen einen bestimmten

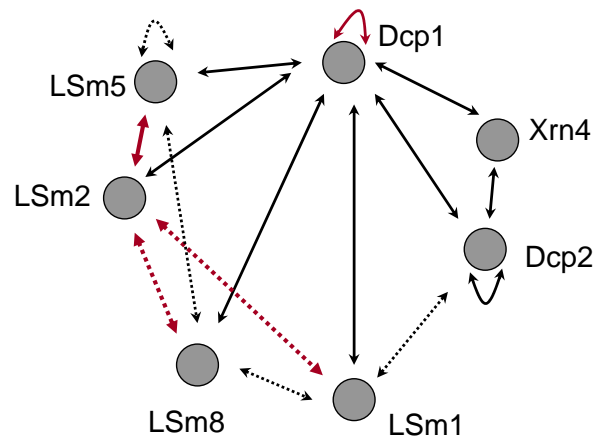


Abbildung 3.10: Übersicht der detektierten Protein-Protein Interaktionen. Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionen = rote Pfeile und BIFC Interaktionen = schwarze Pfeile. Dabei sind gestrichelte Pfeile = Interaktionen mit disperser nukleo-zytoplasmatischer Verteilung und durchgängige Pfeile = Interaktionen in zytoplasmatischen Foci.

Status der mRNA-Abbaumaschinerie anzeigen. Die ausserhalb der Strukturen stattfindenden Interaktionen könnten möglicherweise Interaktionen anzeigen, die in frühen Teilschritten des mRNA-Abbaus stattfinden, wie zum Beispiel der Überführung der mRNA von einem translationskompetenten in einen translations-inkompetenten Zustand. Dagegen könnten die Interaktionen in den Foci auf späte Schritte des mRNA-Abbaus hinweisen.

3.6 Gewinnung eines Antikörpers gegen At Dcp1

Die Bildung von dynamischen zytoplasmatischen Strukturen, in denen 5'-3' mRNA-Abbau Proteine kolokalisieren und interagieren, weisen auf P-body-ähnliche Strukturen in Pflanzen hin. Um diese Interpretation zu bestätigen, sollten die endogenen Strukturen identifiziert und auf charakteristische Eigenschaften untersucht werden. Dabei ist das Dcp1 Protein eine zentrale Komponente, die als Marker dienen kann (Abb. 3.5). Zur Detektion des endogenen Dcp1 wurde ein polyklonaler Antikörper aus Meerschweinchen

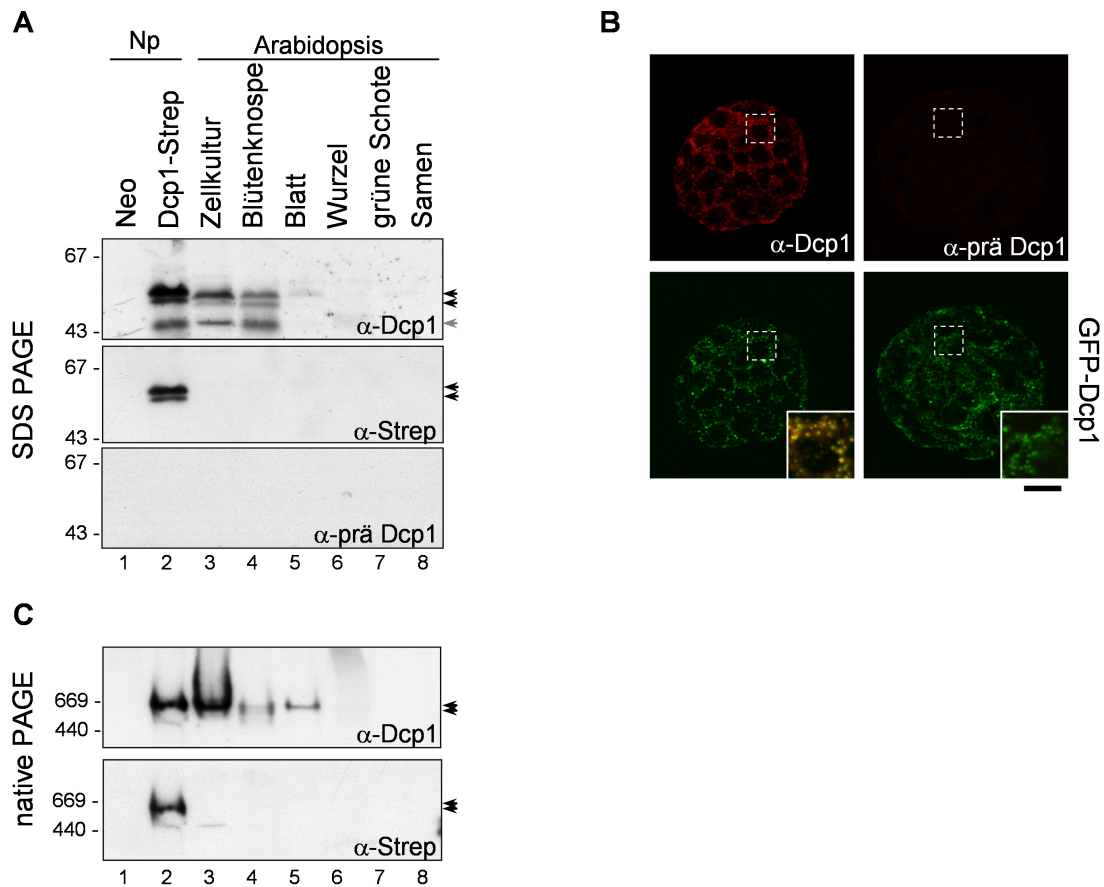


Abbildung 3.11: Charakterisierung des Antikörpers gegen AtDcp1. (A und C) Die angegebenen Proteinextrakte wurden über denaturierender PAGE und nativer PAGE mit den angegebenen Antikörpern analysiert. α -prä Dcp1 = Dcp1-prä-Immunsereum. Der Molekulargewicht Größenstandard (in kDa) ist links angegeben. (A) Die Dcp1 Antikörper Spezifität wurde mit Gesamtzell-Extrakten (je 30 TSD Protoplasten) von transformierten Tabak Mesophyll Protoplasten (NP) bestätigt. Neomycintransferase (Spur 1), Dcp1-Strep (Spur 2). Das endogene Dcp1 Expressionslevel wurde mit jeweils $20\mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt der angegebenen Geweben sowie Zellkultur analysiert (Spur 3-8). Dcp1-Strep (42 kDa), Dcp1 (41 kDa). (B) Kontrolle der Dcp1 Antikörper Spezifität für Immunfluoreszenzanalysen durch Detektion von GFP-Dcp1 in Tabak Mesophyll Protoplasten. Maßstab = $10\mu\text{m}$.

gegen affinitäts-aufgereinigtes GST-Dcp1 hergestellt (siehe Abschnitt 2.1.6).

Um die Spezifität des Dcp1 Antikörpers zu testen, wurden Proteinextrakte aus ver-

schiedenen Geweben sowie Zellkulturprotoplasten von *Arabidopsis thaliana* für eine Western Analyse gewonnen (Abb. 3.11 A). Als Kontrollen dienten Extrakte aus Tabakprotoplasten, die Dcp1-Strep (Positivkontrolle) beziehungsweise Neomycinphosphotransferase (Negativkontrolle) exprimierten. Mit dem Antikörper konnte sowohl eine Doppelbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 45-50 kDa (schwarze Pfeile), die auch mit dem Strep Antikörper bei Dcp1-Strep detektierbar war, und eine dritte Bande bei 43 kDa (grauer Pfeil) für Dcp1-Strep nachgewiesen werden. Diese Banden wurden auch in Zellkultur, Blütenknospen und Blättern, aber nicht in Wurzel, grünen Schoten und Samen detektiert. Mit der Negativkontrolle sowie mit Prä-Immunsereum konnte keine Kreuzreaktivität des Antikörpers beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Spezifität des Dcp1 Antikörpers. Ob es sich bei den verschiedenen Banden um modifiziertes Dcp1 oder um Abbauprodukte handelt, konnte jedoch nicht geklärt werden. Allerdings wurden ähnliche Beobachtungen mit Dcp1 aus anderen Organismen gemacht, für das ebenfalls zwei Banden detektiert wurden (Beelmann et al., 1996; La Grandeur, 1998; von Dijk et al., 2002). Die Spezifität des Antikörpers für Immunfluoreszenzanalysen wurde durch die Detektion von GFP-Dcp1 bestätigt, während mit Prä-Immunsereum kein Signal detektiert wurde (Abb. 3.11 B).

3.7 Analyse von Dcp1 und Dcp2 Komplexen

Über die BIFC Analyse konnten zahlreiche Interaktionen zwischen Dcp1 und den anderen getesteten Proteinen identifiziert werden. Um zu überprüfen, ob Dcp1 in einem Proteinkomplex zu finden ist, wurden die Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana* sowie Dcp1-Strep mit Hilfe eines nativen Gels analysiert. Bei der Detektion des endogenen Dcp1 konnte ein großer Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 600 kDa in den gleichen Geweben wie bereits bei der Expressionsanalyse sowie für Dcp1-Strep detektiert werden (Abb. 3.11 C).

Um zu testen, ob Dcp2 auch in diesem Komplex zu finden ist, wurde Dcp2-Strep in

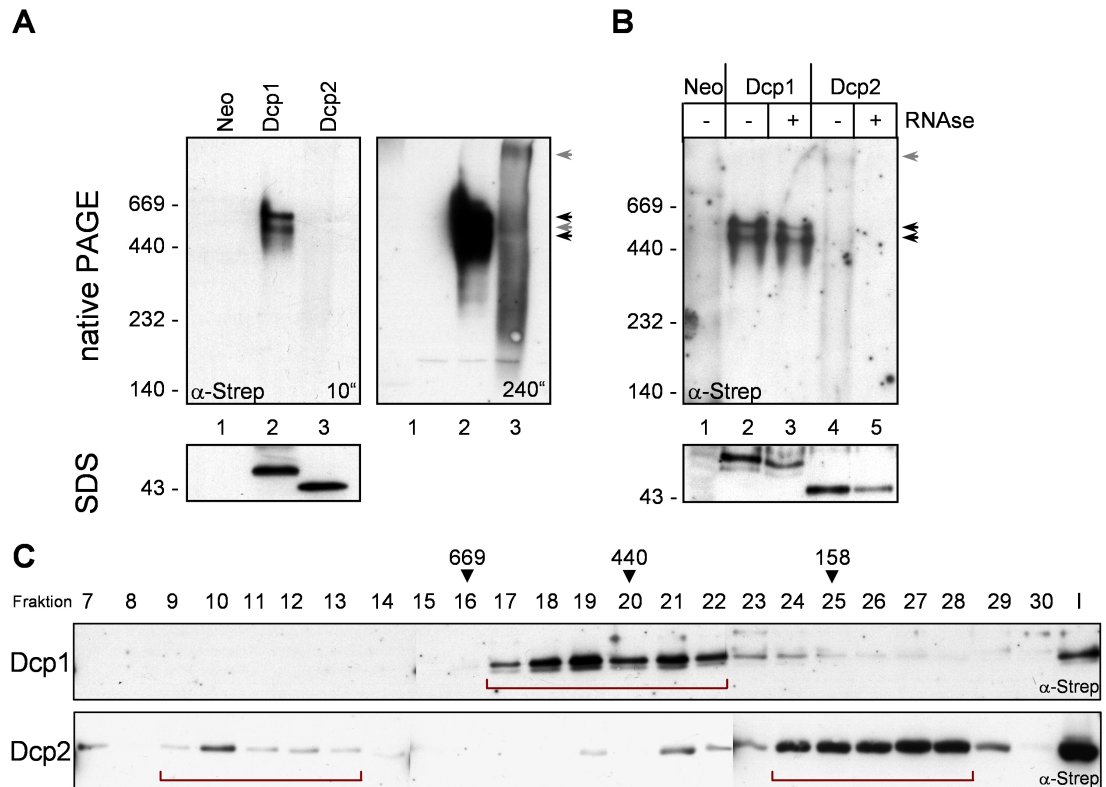


Abbildung 3.12: Analyse von Dcp1 und Dcp2 Komplexen. Native Extrakte von Tabak Mesophyll Protoplasten, die Dcp1-Strep beziehungsweise Dcp2-Strep exprimierten wurden zur Analyse der Dcp1 und Dcp2 Komplexe verwendet. (A) Native PAGE. Die Belichtungszeit ist rechts unten angegeben. (B) Native PAGE vor und nach RNase Behandlung. (C) HPLC Analyse. Angegebene Größen geben das Laufverhalten von den Markerproteinen an: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa). I = Input; Dcp1-Strep (41 kDa); Dcp2-Strep (43 kDa); schwarze Pfeile = Dcp1 Komplexe, graue Pfeile = Dcp2 Komplexe.

Tabak Mesophyll Protoplasten exprimiert (Abb. 3.12 A). Außer zwei schwachen Banden (graue Pfeile) konnte nur ein Signal detektiert werden, das über die gesamte Spur verteilt war. Da es sich bei Dcp2 um ein putatives RNA-Bindeprotein handelt, könnte dieses Laufverhalten durch die Bindung an mRNA mit unterschiedlicher Größe hervorgerufen werden. In Übereinstimmung mit dieser Interpretation führte eine RNase Behandlung der Proteinextrakte zu einem Verlust des Dcp2-Strep Signals auf dem nativen Gel, aber nicht beim Nachweis nach SDS-PAGE (Abb. 3.12 B). Das fehlende Dcp2-Strep Signal auf dem nativen Gel nach der RNase Behandlung läßt sich durch die physikalischen Eigenschaften von Dcp2-Strep erklären. Während das Dcp2-Strep in Komplex mit RNA eine negative Nettoladung besitzt, hat es alleine einen basischen isoelektrischen Punkt ($P_i = 7,92$) und kann nicht in der verwendeten nativen PAGE elektrophoretisch getrennt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Dcp2 in Komplex mit RNA vorliegt. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss auf die Dcp1 Komplexe beobachtet werden. Die Beobachtungen zeigen, dass der größte Teil des Dcp1 und Dcp2 sich nicht in einem Komplex befinden, allerdings könnte auch für diese Untersuchung die Koexpression weiterer Proteine notwendig sein, wie es bereits in Abschnitt 3.3.2 erwähnt wurde.

Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurden die Proteine über eine HPLC Analyse untersucht (Abb. 3.12 C). Bei dieser Methode ist die Trennung der Komplexe unabhängig von der Ladung. Auch hier zeigte sich, dass die Proteine in unterschiedlichen Komplexen (rote Markierungen) zu finden sind. Für Dcp2-Strep konnten zwei Komplexe unterschiedlicher Größe beobachtet werden. Die beobachtete Verteilung von Dcp1 stimmt mit Gelfiltrationsanalysen von Extrakten von Säugerzellen überein, wohingegen Daten für Dcp2 bisher nicht veröffentlicht wurden (Fenger-Grøn et al., 2005).

3.8 Subzelluläre Lokalisation von endogenem Dcp1

Um zu untersuchen ob die vermuteten P-body-ähnliche Strukturen in *Arabidopsis thaliana* durch den Antikörper gegen Dcp1 nachgewiesen werden können, wurden Mesophyll

Protoplasten, Zellkultur Protoplasten und Wurzelspitzen (Rindenparenchymzellen) vier Tage alter Keimlinge verwendet (Abb. 3.13 A). In allen untersuchten Zelltypen konnte Dcp1 detektiert werden. Bei den Keimlingen konnte das Dcp1 lediglich in den Wurzelspitzen detektiert werden, da mit der verwendeten Detektionsmethode der Antikörper nicht in das übrige Gewebe eindringen konnte (Abb. 3.13 B). In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von Dcp1 im Wurzelgewebe ausschließlich in den Rindenparenchymzellen untersucht.

Bei der Lokalisationsanalyse des Dcp1 in Mesophyll Protoplasten, Zellkultur Protoplasten Rindenparenchymzellen wurde das Protein ausschließlich im Zytoplasma detektiert. Es konnte aber häufig eine Lokalisation in sehr kleinen zytoplasmatischen Foci beobachtet werden (Pfeile). Im Wurzelgewebe war die Foci Bildung deutlich geringer ausgeprägt. Um die inhomogene Verteilung von Dcp1 zu verdeutlichen, wurde endogenes eIF2 α als ein gleichmäßig im Zytoplasma verteiltes Protein in Mesophyll Protoplasten detektiert (Abb. 3.13 C). Als Negativkontrolle wurde das Prä-Immuneserum von Dcp1 verwendet, mit dem kein Signal detektiert wurde (Abb. 3.13 A). Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Foci ubiquitär gebildet werden. Dies ist auch zu erwarten, da der mRNA-Abbau ein konstitutiver Prozess in der Zelle ist.

Um Erkenntnisse über die Ultrastruktur der zytoplasmatischen Strukturen zu erhalten und um auszuschließen, dass das Dcp1 in Organellen der Zelle lokalisiert, wurde versucht, das Dcp1 in verschiedenen Geweben (Zellkultur, Mesophyll Protoplasten, Wurzelgewebe) von *Arabidopsis thaliana* über Immunogold-Detektionen in Immuneinbettungen nachzuweisen. Es konnten jedoch keine Strukturen detektiert werden. Es wurde weiterhin versucht, die Aggregate in verschiedenen Geweben unter Stressbedingungen sowie unter Verwendung einer mRNA-Abbaumutante (siehe folgende Abschnitte 3.9 und 3.10) zu detektieren, in der diese Strukturen besonders groß sind. Allerdings war die Bindungsaffinität des Antikörpers für diese Analysen nicht ausreichend, um Strukturen nachzuweisen (Daten nicht dargestellt).

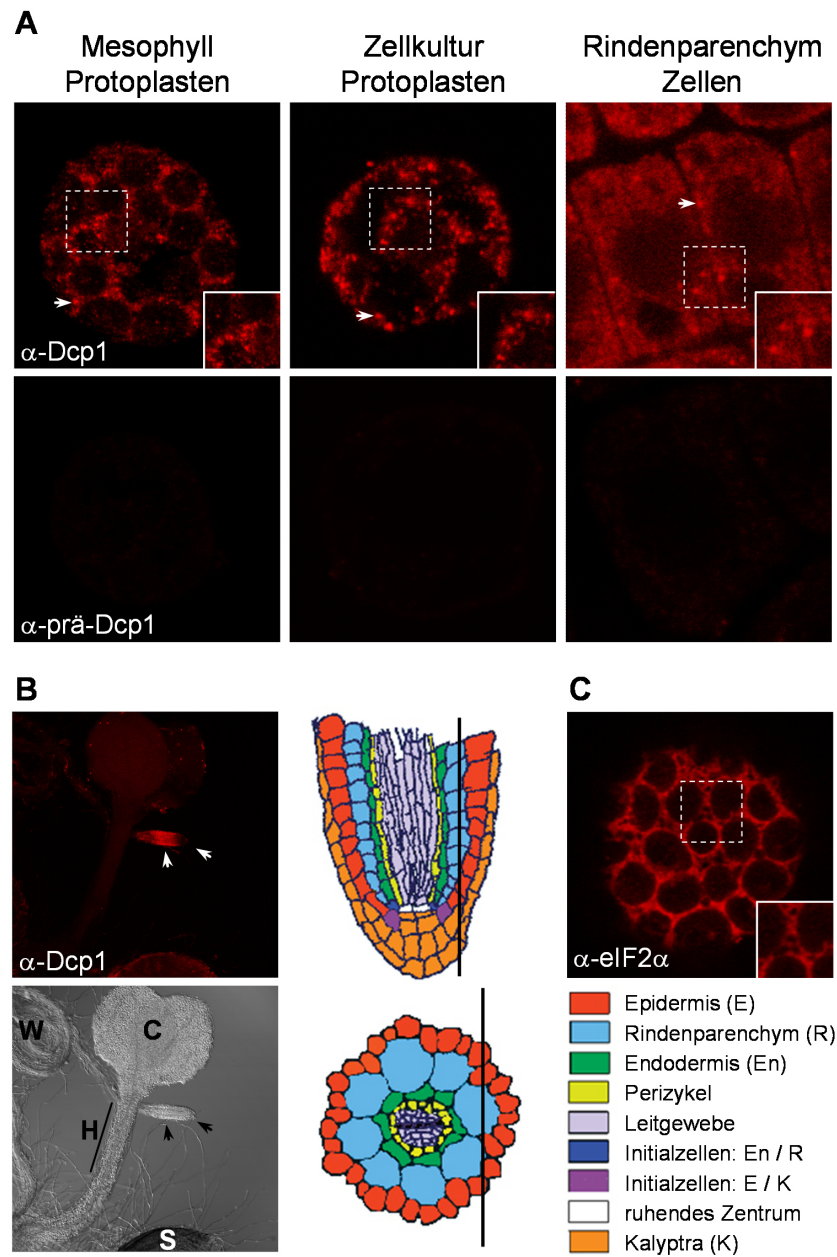


Abbildung 3.13: Intrazelluläre Lokalisation von endogenem Dcp1 in *Arabidopsis thaliana*. (A) Dcp1 wurde in Mesophyll und Zellkultur Protoplasten sowie in Rindenparenchymzellen der Wurzelspitze von vier Tage alten Keimlingen nachgewiesen. Pfeile markieren Akkumulationen von Dcp1. Das Präimmunserum (α -prä-Dcp1) diente als Negativkontrolle. (B) Übersicht der Dcp1 Detektion in vier Tage alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. Der Nachweis erfolgte mit der verwendeten Methode nur in den Wurzelspitzen (Pfeile). Die in der schematischen Darstellung (modifiziert nach Malamy et al., 1997) eines Längsschnitts (oben) sowie eines Querschnitts (unten) der Primärwurzel angegebene Linie, zeigt die Ebene an, in denen die Lokalisation von Dcp1 untersucht wurde. C = Cotyledonen; S = Samen; H = Hypocotyl; W = Wurzel (C) Als Kontrolle für eine zytoplasmatische Verteilung wurde eIF2 α detektiert.

Aus diesem Grund wurde Dcp1-Strep in Tabak Mesophyll Protoplasten detektiert, dessen Lokalisation identisch zu GFP-Dcp1 war (Abb. 3.5 und Daten nicht dargestellt). Mit dem Strep-Antikörper konnten elektronendichte zytoplasmatische und globuläre Strukturen detektiert werden (Abb. 3.14 A). Die Strukturen waren auch mit dem Dcp1 Antikörper nachweisbar (Daten nicht dargestellt). Mit Kenntnis der Strukturen konnten diese schließlich auch eindeutig in Ultrastruktur Analysen identifiziert werden (Abb. 3.14 B). Die Strukturen waren frei von Ribosomen und nicht von Membranen umschlossen. Anhand der Ergebnisse läßt sich ausschließen, dass das Dcp1 in Organellen lokalisiert ist.

Dieses Befunde zeigen, dass die vermeintlichen P-bodies bis jetzt nur durch Überexpression des Dcp1 detektierbar sind. Die beobachteten Strukturen zeigen jedoch keine Ähnlichkeit zu den in Säugerzellen identifizierten P-bodies (Eystathioy et al., 2002). Es gilt jedoch zu beachten, dass nicht bekannt ist, ob Dcp1-Strep eine ähnlich Dynamik wie das GFP-Dcp1 (Abb. 3.5 B) aufweist. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um Strukturen handelt, die durch die Überexpression hervorgerufen werden. Allerdings ist es überraschend, dass die Strukturen nicht im endogenen Gewebe zu finden sind. Zwar war der Grund hierfür die zu geringe Bindungsaffinität des Antikörpers, jedoch zeigten die in Abbildung 3.13 aufgeführten Lokalisationsstudien, dass die Strukturen sehr groß und ubiquitär vorhanden sind. Auch die elektronenmikroskopischen Analysen der P-bodies in Säugerzellen zeigten, dass die Strukturen gut kontrastierbar sind (Eystathioy et al., 2002). Aus diesen Gründen sollten sie sogar ohne Antikörper Detektion identifizierbar sein. Allerdings konnten in dieser Arbeit beziehungsweise auch in zahlreichen vorhergehenden Arbeiten die Strukturen auch nicht in Ultrastrukturanalysen in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen gefunden werden. In zukünftigen Analysen sollte ein neuer Antikörper und möglicherweise eine modifizierte Kontrastierungsmethode zum Einsatz kommen. Erst dann lassen sich abschließend eindeutige Schlüsse über die Ultrastruktur ziehen.

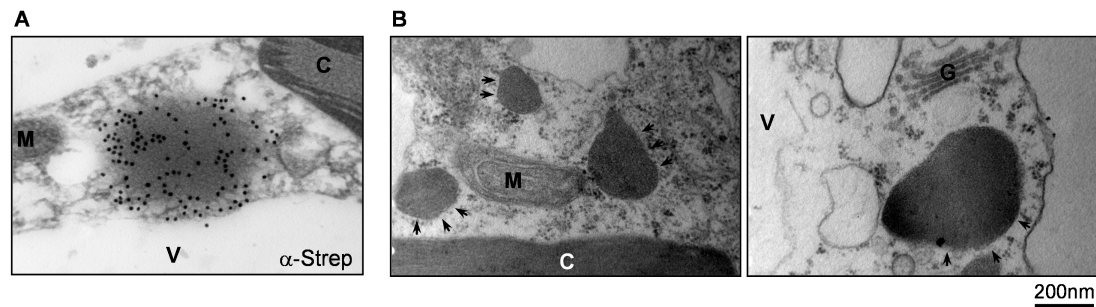


Abbildung 3.14: Elektronenmikroskopische Analyse von Dcp1-Strep in Tabak Mesophyll Protoplasten. (A) Immunogold Detektion von Dcp1-Strep mit Strep Antikörper und mit 18 nm Gold-Partikel gekoppelten sekundären Antikörpern. (B) Ultrastrukturanalyse von Dcp1-Strep. Die identifizierten Dcp1 Strukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. C - Chloroplast, M - Mitochondrium, G - Golgi Apparat, V - Vakuole.

3.9 Dcp1-Foci sind P-bodies

Nach den vorliegenden Erkenntnissen aus Hefe und Säugerzellen sind P-bodies sehr dynamische hochmolekulare Strukturen, die bei geringen Störungen im mRNA-Abbau schnell ihre Größe verändern (Sheth und Parker, 2003; Teixeira et al., 2005). Eine solche Störung findet man in der *xrn4-5* Mutante von *Arabidopsis thaliana*, mit einem knock-out der Exoribonuklease Xrn4 durch eine T-DNA-Insertion (Kastenmayer und Green, 1998; Souret et al., 2004). Um den entscheidenden Hinweis zu erhalten, ob die endogenen Dcp1 Foci die P-bodies der Pflanzen darstellen, wurde diese Mutante in weitere Analysen miteinbezogen. Wie erwartet konnte eine starke Vergrößerung der Aggregate in *xrn4-5* Mesophyll Protoplasten beobachtet werden (Abb. 3.15; vergleiche 1 und 2). Da in der *xrn4-5* Linie eine Akkumulation von diversen Transkripten beobachtet werden konnte (Souret et al., 2004), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die vergrößerten zytoplasmatischen Strukturen auf akkumulierte, für den Abbau bestimmte mRNA zurückzuführen ist.

Diese Beobachtungen weisen auch darauf hin, dass die Strukturen vom Verhältnis aus

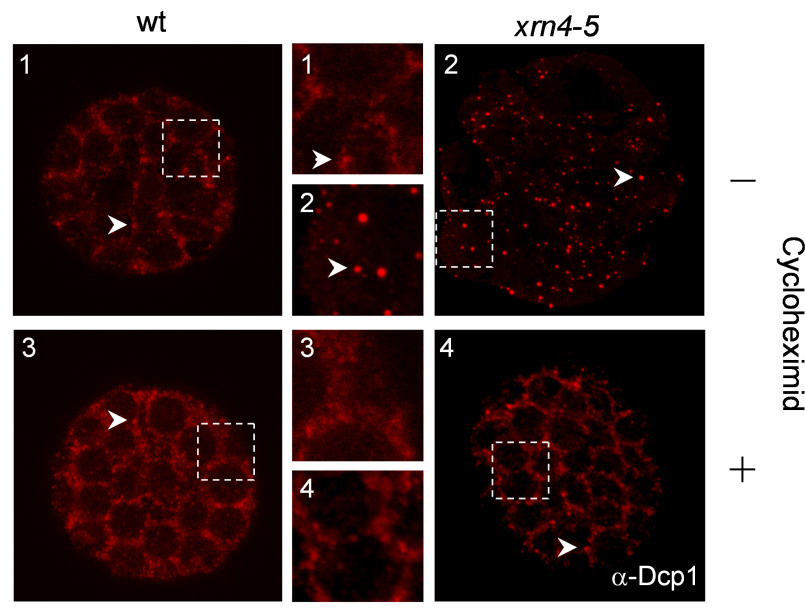


Abbildung 3.15: Intrazelluläre Lokalisation von endogenem Dcp1 nach Cycloheximidbehandlung in Wildtyp und *xrn4-5* *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasten. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit Cycloheximid (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit Wasser behandelt. Pfeile zeigen Dcp1 Foci an. Maßstab = 10 μm .

Zufluss von mRNA und deren Abbau abhängig sind. Um diese Interpretation zu bekräftigen, wurden die Protoplasten mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt, der die Translokationsreaktion an den Ribosomen blockt und die mRNA in Polysomen stabilisiert. Somit reduziert sich die Menge an freier mRNA und sollte zur Reduktion der Größe der Dcp1 Foci führen, wenn es sich dabei um aktive mRNA-Abbauzentren handelt. Im Gegensatz dazu sollten sich die Strukturen vergrößern, wenn es sich dabei nur um Speicherorte von mRNA-Abbau Proteinen handelt. Während die Behandlung der Wildtyp Protoplasten zu keiner erkennbaren Veränderung führte, da die Strukturen bereits unter Kontrollbedingungen sehr klein sind (Abb. 3.15; vergleiche 1 und 3), konnte bei den *xrn4-5* Protoplasten eine deutliche Reduktion der Anzahl und Größe der Dcp1 Foci beobachtet werden (Abb. 3.15; vergleiche 2 und 4). Die Beobachtungen zeigen, wie auch schon in Abb. 3.5 gezeigt, dass die Dcp1 Strukturen dynamisch sind

und deren Größe direkt vom Status der Translationsmaschinerie abhängt. Dies zeigt, dass die Strukturen nicht-translatierte mRNA für die Assemblierung benötigen. Die Beobachtungen mit der *xrn4-5* Linie sowie die Ergebnisse der Cycloheximid Behandlung decken sich mit Beobachtungen in Hefe und Säugerzellen (Sheth und Parker, 2003; Cougot et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Dies zeigt, dass die pflanzlichen Dcp1-haltigen Strukturen große Ähnlichkeit zu den P-bodies aufweisen. Sie werden im folgenden auch so bezeichnet.

3.10 P-bodies reagieren auf Stress

Die bei der Lokalisationsanalyse von GFP-Dcp1 beobachtete Akkumulation lieferte erste Hinweise, dass die Bildung der P-bodies durch Stress beeinflusst wird (Abb. 3.5). Um den Einfluss von Stress näher zu untersuchen, wurden die P-bodies in Wurzelgewebe von vier Tage alten Wildtyp und *xrn4-5* Keimlingen unter anoxischen Bedingungen und Hitzestress untersucht. Die anoxischen Bedingungen für vier Tage führten zu einem deutlich reduzierten Wachstum in beiden Linien (Daten nicht dargestellt).

Unter Kontrollbedingungen konnten im Wildtyp nur selten P-bodies beobachtet werden, wohingegen diese in der *xrn4-5* Mutante deutlich erkennbar waren (Abb. 3.16; vergleiche A und B). Unter anoxischen Bedingungen dagegen konnten auch P-bodies im Wildtyp beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wies die Mutante deutlich größere P-bodies auf (Abb. 3.16; vergleiche C und D). Da durch anoxische Bedingungen unter anderem der mRNA-Abbau verlangsamt und die Translation von Haushalts mRNA verringert wird, muß man eine Vergrößerung der P-bodies erwarten.

Ähnliche Auswirkungen auf die Translation hat Hitzestress, der zur Deassemblierung von Polyribosomen und zur Reduktion der Translation von nicht-Hitzeschock mRNA führt (Storti et al., 1980; Lin et al., 1984). Wie erwartet konnte mit dieser Stressqualität bereits im Wildtyp eine P-body Bildung beobachtet werden, überraschenderweise aber nicht in Zellen der *xrn4-5* Mutante (Abb. 3.16 vergleiche E und F). Diese Beobachtung

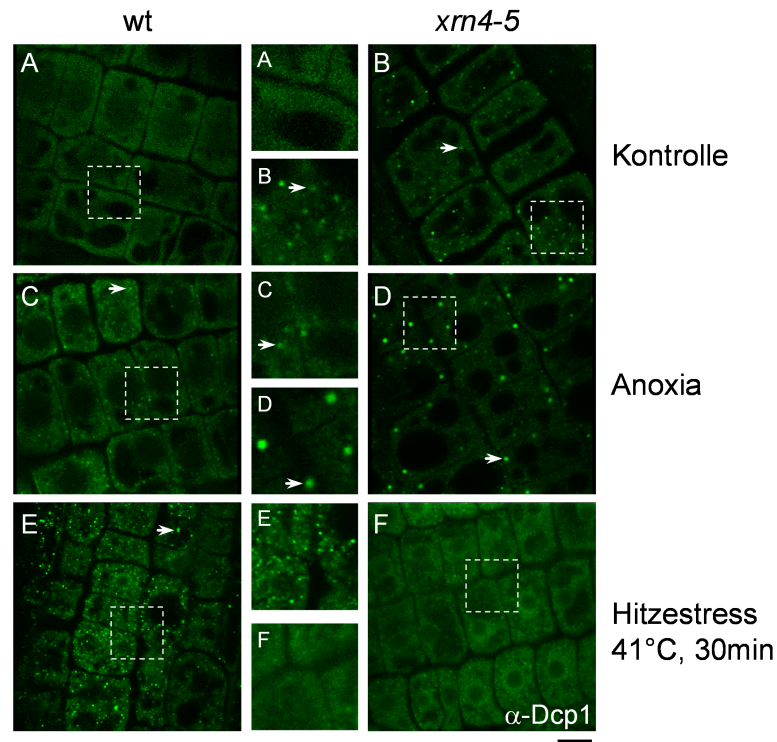


Abbildung 3.16: P-bodies werden durch Stress beeinflusst. Wildtyp und *xrn4-5* Keimlinge wurden unter Kontrollbedingungen oder anoxischen Bedingungen für vier Tage angezogen. Für die Hitzestressbehandlung wurden unter Kontrollbedingungen angezogene Keimlinge für 30 Minuten bei 41°C gestresst. P-bodies wurden durch Detektion von Dcp1 in Rindenparenchymzellen analysiert. Pfeile = P-bodies. Maßstab = 7,5 μm .

ist nur schwer zu erklären, jedoch deuten die Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von Xrn4 für die P-body Bildung unter Hitzestress hin.

Um nähere Informationen über die Kinetik der P-body Bildung unter Hitzestress zu erhalten, wurden Wildtyp Keimlinge einem konstantem Hitzestress beziehungsweise einem kurzen Hitzestress von 15 Minuten ausgesetzt (Abb. 3.17). Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die Bildung der P-bodies unter konstantem Hitzestress deutlich stärker ausgeprägt ist. In beiden Fällen war die Bildung der P-bodies nach 30 Minuten am Maximum und es konnte schließlich keine weitere Veränderung beobachtet werden.

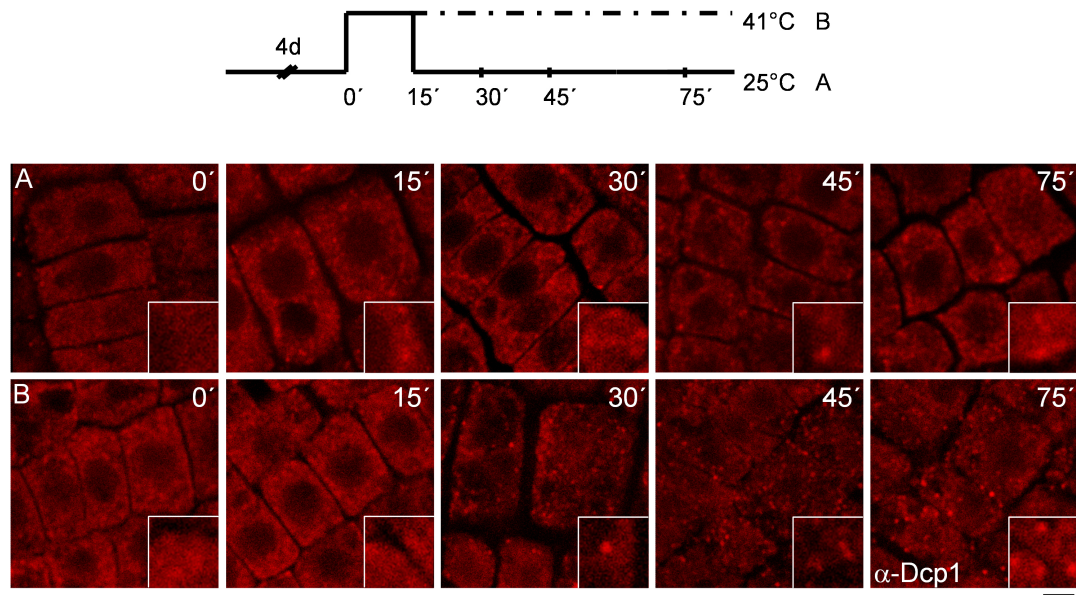


Abbildung 3.17: Kinetik der P-body Entstehung unter Hitzestress. Wildtyp Keimlinge wurden dem angegebenen Hitzestressregime unterzogen und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Zur Untersuchung der P-bodies wurde Dcp1 in Rindenparenchymzellen detektiert. Maßstab = 7,5 μm .

3.11 P-bodies, RNA Stressgranula und Hitzestressgranula

Die Hitzestressantwort der Pflanzen ist vor allem durch die massive Synthese von Hitzestressproteinen charakterisiert, die zur Bildung von sogenannten Hitzestressgranula (HSG) im Zytoplasma führen (Nover et al., 1983, 1989). Diese großen zytoplasmatischen Chaperonkomplexen (40 nm Partikel), dienen der Speicherung und Rückfaltung denaturierter Proteine. In Zusammenarbeit mit Dr. M. Fauth konnten weiterhin bei Untersuchungen von *Lycopersicon peruvianum* Zellkulturen sowie *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana plumbaginifolia* nach einer kurzen Stressphase zytoplasmatische Strukturen identifiziert werden, die analog zu den Stress Granula (siehe Abschnitt 1.8) der Säugerzellen sind, und mRNA-Speicherkompartimente darstellen, die als RNA-Stressgranula (RSG) bezeichnet werden. In diesen Strukturen konnte ebenfalls wie in den SG der Säugerzellen Translationsinitiationsfaktoren und poly A mRNA detektiert werden,

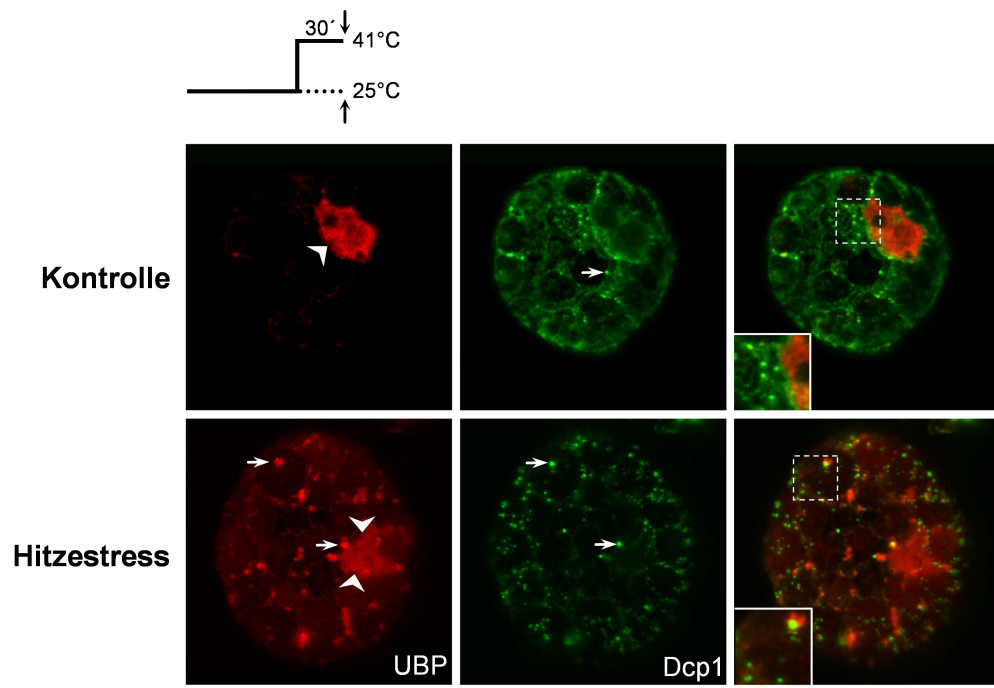


Abbildung 3.18: Kolokalisationsanalyse von Markerproteinen der P-bodies und RNA Stressgranula in Tabak Mesophyll Protoplasten. Die Bildung der PB (GFP-Dcp1) und RSG (UBP-Strep, α -Strep) wurde durch das angegebene Hitze stress regime induziert. Pfeile = P-bodies beziehungsweise RSG; breite Pfeilköpfe = Nucleus. Maßstab = 10 μ m.

sowie zwei RNA-Bindeproteine (Ubp1 und Rbp47) (Lambermon et al. 2000; Lorkovic et al., 2000), die Homologe von TIA-1 sind. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob es sich bei den HSGs, RSGs und PB um identische Strukturen handelt, oder ob sie verschiedene Kompartimente sind, die aber in einer direkten Verbindung zueinander stehen.

Um mögliche Beziehungen der PB zu den HSG und RSG direkt zu untersuchen, wurden Kolokalisationsstudien mit Markern für die jeweiligen Strukturen durchgeführt. Für die Kolokalisationsanalyse der RSG und PB wurde UBP-Strep (RSG) mit GFP-Dcp1 (PB) in Tabakprotoplasten koexprimiert. Um die Bildung der RNA Stressgranula zu induzieren wurden die Tabakprotoplasten für 30 Minuten bei 41°C inkubiert. In Übereinstimmung mit der Funktion in der mRNA-Reifung ist UBP-Strep unter Kontrollbe-

dingungen im Nukleus lokalisiert, wohingegen die P-bodies im Zytoplasma beobachtet werden können (Abb. 3.18). Im Gegensatz dazu akkumuliert UBP-Strep unter Stressbedingungen in zytoplasmatischen RSG, die sich deutlich in Form, Größe und Lokalisation von den P-bodies unterscheiden. Allerdings konnte in einigen Fällen eine räumliche Nähe beobachtet werden. Dies deutet auf eine funktionelle Beziehung der Strukturen hin. Zusammen zeigen diese Beobachtungen, dass es sich bei den RSG und PB um unterschiedliche Mikrokompimente handelt und die Bildung der PB unabhängig von der Bildung der RSG ist.

Die HSG benötigen für ihre Bildung die Neusynthese von Hsp und treten somit später in der Hitzestressantwort auf. Für die Untersuchung der Beziehung zwischen PB mit HSG wurde die Hsp Synthese durch eine Prä-Induktion mit einem kurzen Hitzestress (15 min, 41°C) induziert. Um die Bildung der HSG zu verstärken, wurden die Tabakprotoplasten nach einer Erholungsphase von drei Stunden nochmals für zwei Stunden (2 h, 41°C) einer Hitzestressbehandlung unterzogen. Für die Detektion der HSG diente endogenes Hsp17 CI als Marker. Unter Kontrollbedingungen war Hsp17 CI nicht detektierbar, jedoch konnten die P-bodies beobachtet werden. Unter Stressbedingungen konnte Hsp17 CI in wenigen, großen zytoplasmatischen Aggregaten detektiert werden (Abb. 3.19 A). Allerdings konnte keine Kolo-kalisation mit PB oder eine deutliche räumliche Nähe der Strukturen beobachtet werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass es sich um voneinander unabhängige Strukturen handelt, die scheinbar nicht miteinander in Wechselwirkung treten.

Um auszuschließen, dass es sich bei den HSG und RSG um identische Strukturen handelt, wurde auch eine Kolo-kalisation von Markerproteinen dieser beiden Strukturen durchgeführt (Abb. 3.19 B). Die Kolo-kalisationsanalyse zeigt, dass es sich bei den HSG und RSG um unterschiedliche Mikrokompimente handelt. Interessanterweise konnten auch hierbei häufig eine räumliche Nähe der Strukturen festgestellt werden.

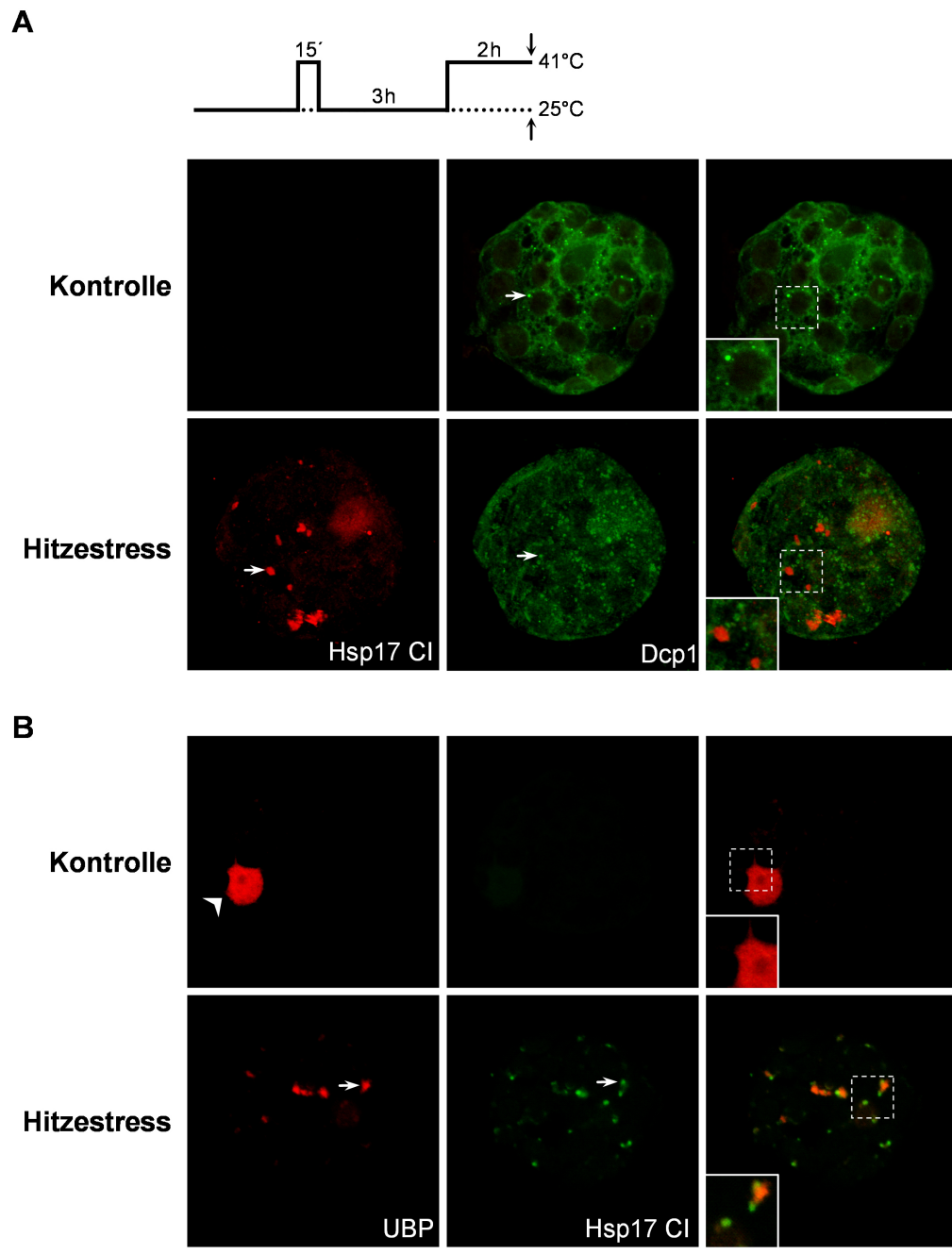


Abbildung 3.19: Kolokalisationsanalyse von Markerproteinen der P-bodies und RNA Stressgranula beziehungsweise Hitzestressgranula in Tabak Mesophyll Protoplasten. Die Bildung der PB (GFP-Dcp1), RSG (UBP-Ha, α -Ha) beziehungsweise HSG (Hsp17 CI, α -Hsp17 CI) wurde durch das angegebene Hitzestressregime induziert. (A) Kolokalisation von PB und HSG. (B) Kolokalisation von RSG und HSG. Pfeile = P-bodies, RSG, HSG; breite Pfeilköpfe = Nukleus. Maßstab = 10 μ m.

Zusammen zeigen diese Befunde erstmals, dass während der Hitzestressantwort die zellulären Prozesse wie mRNA-Abbau, mRNA-Speicherung und Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase auf einzelne Mikrokompartimente beschränkt sind, die jedoch teilweise in einer räumlichen und möglicherweise auch funktionellen Beziehung zueinander stehen. Vorallem deutet die Bildung der P-bodies unter Hitzestress auf eine wichtige Rolle des mRNA-Abbaus unter diesen Bedingungen hin.

4 Diskussion

Durch Studien in Hefe und Säugerzellen wurden zwei Haupt mRNA-Abbauwege identifiziert. Beide Wege sind innerhalb der Eukaryonten stark konserviert. Das auffallendste Charakteristikum des 5'-3' mRNA Abbau ist die Akkumulation der am Abbau beteiligten Proteine in zytoplasmatischen processing bodies (P-bodies). Erste Hinweise auf eine Konservierung der entsprechenden mRNA-Abbau Mechanismen in Pflanzen lieferte die Analyse der 5'-3' Exoribonukleasen Xrn2-4 (Kastenmayer et al., 1998; Souret et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden im Genom von *Arabidopsis thaliana* Genom Gene identifiziert, die für Dcp1, Dcp2 und den LSms kodieren (Abb. 3.1, 3.2, 3.3). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen haben gezeigt, dass es sich bei den identifizierten Proteinen, neben der Exoribonuklease Xrn4, um Komponenten des 5'-3' mRNA-Abbaus handelt, die in zytoplasmatischen Strukturen lokalisieren. Diese Strukturen konnten schließlich durch weitere Charakterisierung als pflanzliche P-bodies identifiziert werden:

1. Lokalisations Studien zeigen, dass die Proteine in hochdynamischen zytoplasmatischen Foci zu finden sind, wobei im Fall von Dcp2 und den LSM Proteinen die Strukturbindung nur transient ist (Abb. 3.5, 3.9). Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen entsprechender Studien in Hefen und Säugerzellen überein (Sheth und Parker, 2003; van Dijk et al., 2002; Ingelfinger et al., 2002; Lykke-Andersen, 2002; Cougot et al., 2004, Bashkirov et al., 1997; Eystathioy et al., 2002).
2. Zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen zwischen den untersuchten Proteinen

wurden identifiziert (Abb. 3.7, 3.9). Die meisten der beobachteten Interaktionen sind identisch mit den Interaktionen der homologen Proteine aus Hefe und Säugerzellen (He und Parker, 2000; Fromont-Racine et al., 2004; Lehner und Sanderson, 2004). Es handelt sich offensichtlich um konservierte Komponenten bei allen Eukaryonten.

3. Die Befunde der BIFC-Analyse fasst die beiden vorausgegangenen Ergebnisse zusammen. Die Interaktionen zwischen den untersuchten Proteinen fanden hauptsächlich in zytoplasmatischen Foci statt (Abb. 3.9).

Das komplexe Interaktionsnetzwerk zwischen den untersuchten Proteinen liefert einen eindeutigen Hinweis auf eine Beteiligung dieser Proteine in gemeinsamen zellulären Prozessen. Besonders die Akkumulation und Interaktion der Proteine in zytoplasmatischen Foci sowie die Gegenwart der 5'-3' Exoribonuklease zeigen eindeutige Analogien zu den P-bodies der Hefen und Säugerzellen. Diese Interpretation wird vor allem durch die Publikation von Xu et al. (2006) bekräftigt. Die Autoren konnten zeigen, dass die Decapping Aktivität in *Arabidopsis thaliana* von einem Komplex aus Dcp2, Dcp1 und Varicose (Homolog von Hedls) durchgeführt wird. Dabei ist Dcp2 und dessen Nudix Domäne verantwortlich für die enzymatische Aktivität, wohingegen Dcp1 und Varicose mit dem Dcp2 interagieren und die Decapping Reaktion verstärken und möglicherweise für die Assemblierung des Komplexes verantwortlich sind (Xu et al., 2006). In der Arbeit von Xu et al. (2006) konnte auch eine Kolokalisation von Dcp1 und Dcp2 in Foci beobachtet werden. Dieser Nachweis war in der vorliegenden Arbeit nur unter Verwendung des BIFC Systems möglich, das transiente Interaktionen stabilisiert. Diese Unterschiede sollten nicht überbewertet werden, weil unterschiedliche Expressionssysteme (hier Tabakprotoplasten; dort Blätter, die über Vakuuminfiltration mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert wurden) verwendet wurden.

4.1 Nachweis von endogenem Dcp1 in *Arabidopsis thaliana*

Unter Verwendung des Dcp1 Antikörper, der die Detektion der endogenen P-bodies in *Arabidopsis thaliana* ermöglichte, konnten zum ersten Mal Hinweise auf eine Funktion dieser Strukturen am mRNA-Abbau erbracht werden. So zeigte die Detektion von Dcp1 in der *xrn4-5* Mutante stark vergrößerte P-bodies (Abb. 3.15). Da Xrn4 die einzige bekannte zytoplasmatische 5'-3' Exoribonuklease von *Arabidopsis thaliana* ist, ist die Vergrößerung der P-bodies auf eine Akkumulation von mRNA zurückzuführen, die für den mRNA-Abbau bestimmt waren (Kastenmayer et al., 1998; Souret et al., 2004). Zwar lässt sich nicht zweifelsfrei ausschließen, dass diese Mutation sich lediglich auf die Lokalisation von Dcp1 auswirkt, jedoch haben Lokalisationsstudien in Hefemutanten gezeigt, dass alle P-body Komponenten (zum Beispiel Dcp1, Dcp2, Xrn4, Dhh1) als Marker für den Zustand der P-bodies dienen können (Sheth and Parker, 2003). Weiterhin stimmen diese Beobachtungen mit Analysen von 5'-3' mRNA-Abbau Mutanten in Hefe überein, die zeigten, dass die Blockierung der Decappingreaktion oder nachfolgender Schritte zur Vergrößerung der P-bodies aufgrund der Akkumulation von mRNA-Abbauintermediaten führen (Sheth and Parker, 2003).

Zwei Beobachtungen zeigen, dass die Größe der pflanzlichen P-bodies, wie in Hefe und Säugerzellen, von untranslatierter mRNA abhängig ist. So führte die Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid, der mRNA in den Polysomen stabilisiert und somit die Decappingreaktion blockiert oder verlangsamt (Beermann und Parker, 1994), zur deutlichen Reduktion der Anzahl und Größe der P-bodies (Abb. 3.15). Eine Blockierung des mRNA-Abbaus durch die Behandlung mit Cycloheximid konnte auch in Pflanzen beobachtet werden. Die Behandlung mit Cycloheximid führte zur Akkumulation von mRNA mit intakter Kappenstruktur (Xu et al., 2006). Im Gegensatz zu Cycloheximid führte der Einfluss von Stress zu einer massiven Freisetzung von mRNA aus dem Polysomenverband und zur Vergrößerung der P-bodies (Abb. 3.15, 3.16, 3.5). Diese Beobachtungen zeigen auch, dass die Größe der P-bodies vom Verhältnis aus

mRNA-Zufluss und mRNA-Abbau abhängig ist. Das heisst, dass alle Bedingungen, die die Translationskapazität einer Zelle verringern und somit die Menge an freier und untranslatierter mRNA erhöhen, oder Bedingungen, die eine Reduktion oder Blockierung des mRNA-Abbaus zur Folge haben, zu einer Vergrößerung der P-bodies führen (Abb. 4.1).

4.2 Das Interaktionsnetzwerk

Die Verwendung der BIFC Analyse ermöglichte, detaillierte Informationen über das Interaktionsnetzwerk der untersuchten Proteine und den Ort der Interaktionen zu erhalten (Abbildung 3.7, 3.9, 3.10). Die meisten der beobachteten Interaktionen entsprachen denen aus anderen Organismen bekannten Interaktionen. Es wurden nur wenige neue Interaktionen detektiert. Es könnte sein, dass sich innerhalb der Pflanzen neue Proteininteraktionen während der Evolution entwickelt haben. Allerdings ist aufgrund der zu geringen Stringenz der Methode nicht auszuschließen, dass einige der Interaktionen keine direkten Protein-Protein Interaktionen darstellen, sondern durch Vermittlung einer weiteren Komponente wie mRNA oder einem anderen Protein ermöglicht wurde (siehe Abschnitt 3.5).

Besonders interessant waren die Lokalisationen, die bei den jeweiligen Interaktionen der Proteine beobachtet werden konnten. Diese Interaktionen waren entweder mit einer dispersen nukleo-zytoplasmatischen Verteilung oder mit P-bodies verbunden. Es gab keine Interaktion, die beide Lokalisationen zeigte. Besonders interessant sind die Lokalisationen der Interaktionen zwischen LSms und Dcp2, die nur außerhalb der P-bodies stattfanden. Da diese Proteine aber auch in P-bodies lokalisiert waren, wie durch die Interaktion mit Dcp1 zu sehen war, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass bestimmte Interaktionen zwischen Proteinen an einen bestimmten Status der mRNA-Abbaumaschinerie gebunden sind (Abb. 4.2). Möglicherweise zeigen die Interaktionen von LSms mit Dcp2 einen frühen Schritt bei der Überführung der mRNA von dem

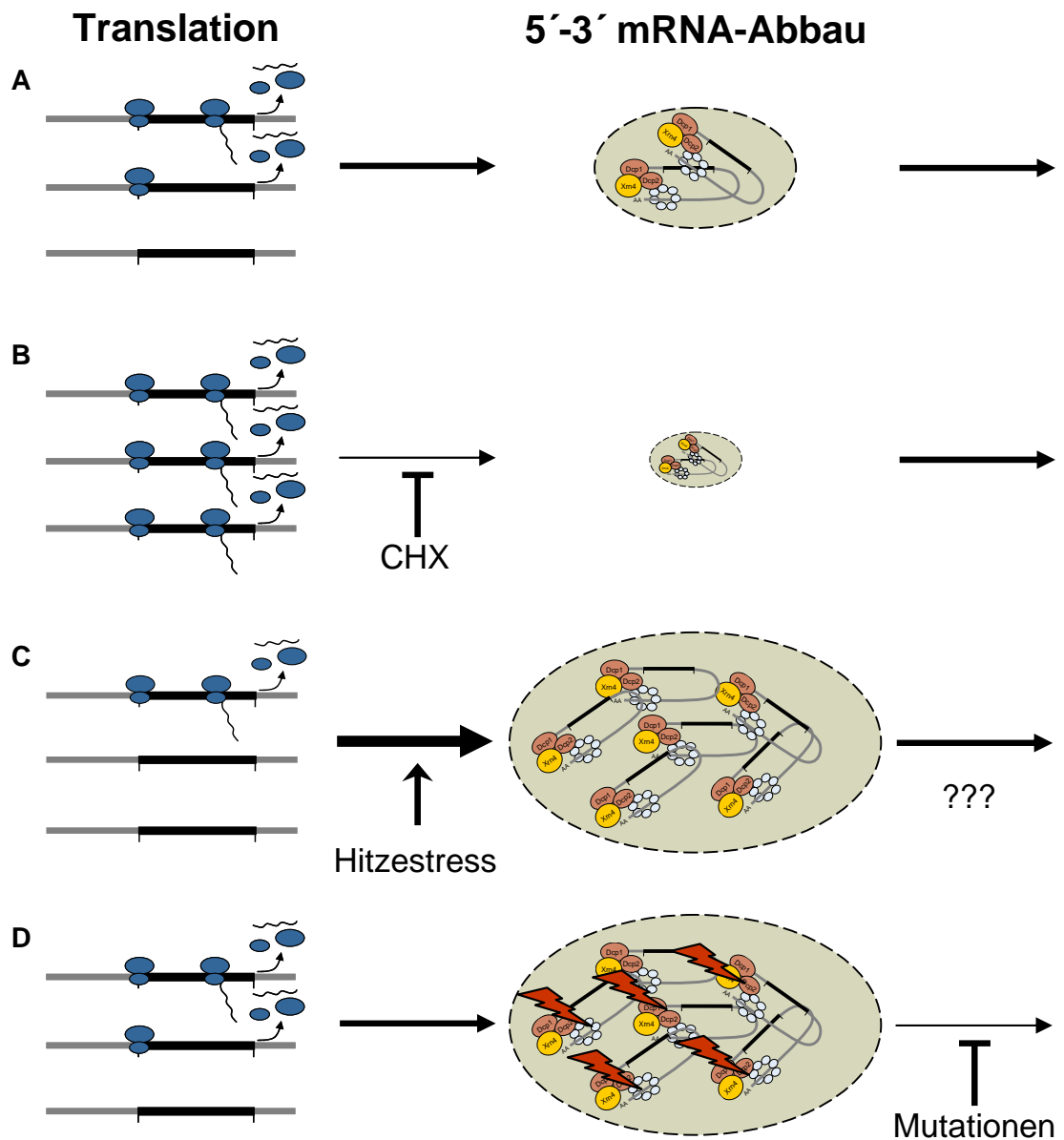


Abbildung 4.1: Einfluss der Translations- und Abbauraten auf die Größe der P-bodies. (A) Unter normalen Bedingungen steht der Influx von mRNA zu den P-bodies und der Efflux aus den P-bodies im Gleichgewicht. (B) Bedingungen, die den Influx in die P-bodies reduzieren (z.B. Cycloheximid) führen zur Verminderung der Größe und Anzahl der P-bodies. Die P-bodies werden dagegen größer, wenn (C) die Translationskapazität in der Zelle verringert ist (z.B. während Hitze stress) oder (D) die Abbauraten herabgesetzt ist (Mutation eines am Abbau beteiligten Proteins).

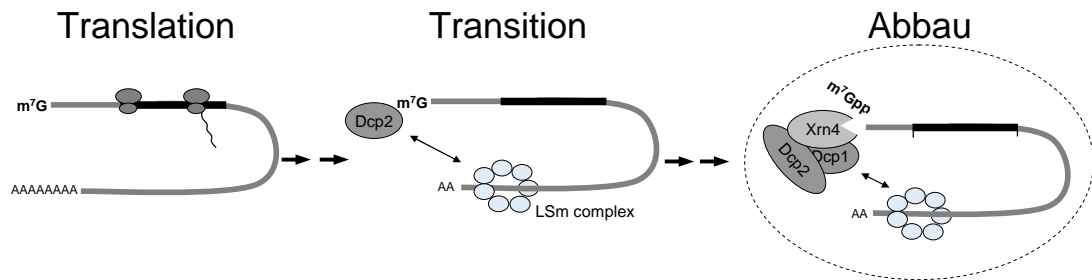


Abbildung 4.2: Modell der mittels BIFC beobachteten Protein-Protein Interaktionen. Bestimmte Interaktionen zwischen den Proteinen könnten an einen bestimmten Status der mRNA-Abbaumaschinerie gebunden sein.

translatierten Zustand in den nicht-translatierten Zustand. In Übereinstimmung mit dieser Interpretation konnte in Hefe gezeigt werden, dass der Lsm1-7 Komplex an frühen Prozessen des mRNA-Abbaus beteiligt ist (Tharun und Parker, 2001). Dagegen stellen die Interaktionen in den P-bodies sehr wahrscheinlich einen der letzten Schritte des mRNA Abbaus dar. Besonders die Interaktion des Dcp1 mit dem Dcp2, die nur in P-bodies auftrat, deutet darauf hin, dass sich der vollständige Decappingkomplex erst in den P-bodies bildet. Diese Untersuchungen müssen allerdings noch mit Co-Immunopräzipitationsstudien komplementiert werden, bei denen gleichzeitig der Status der mRNA analysiert wird.

4.3 Vorteile der mRNA-Prozessierung in P-bodies

Die Kompartimentierung von zellulären Prozessen beziehungsweise Reaktionen ist eine generelle Strategie, die in jedem Organismus zu finden ist. Beispiele dafür sind der Einschluß von funktionell verbundenen Enzymen in der gleichen Membran oder der Einschluß in Organellen. Der Vorteil davon ist die Konzentrierung von Molekülen, die miteinander in Wechselwirkung treten, und somit die Diffusionsgeschwindigkeiten nicht mehr Geschwindigkeit bestimmend sind. Trotz der prinzipiellen Vorteile der Kompartimentierung ist es wahrscheinlich, dass weitere Vorteile mit der Strukturbindung des

mRNA-Abbaus in P-bodies verbunden sind. Mehrere Möglichkeiten sind dabei denkbar. Zum einen könnte die Kompartimentierung dafür sorgen, dass die Abbaumaschinerie von den funktionellen mRNAs ferngehalten wird. Somit könnte ein vorzeitiger Abbau von mRNA verhindert werden. Dieser Schutzmechanismus könnte auch noch dadurch unterstützt werden, dass die Abbauenzyme erst aktiv werden können, wenn sie sich in den P-bodies assembliert haben. Weiterhin bietet die Regulation des mRNA Zuflusses zu den P-bodies eine weitere Möglichkeit, den Abbau, neben der Regulation der eigentlichen enzymatischen Schritte, zu kontrollieren.

4.4 Assemblierung der P-bodies

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Größe und Anzahl der P-bodies im wesentlichen von untranslatierter mRNA abhängt. Dabei stellt sich die Frage, ob es sich bei den P-bodies um dynamische und konstitutiv vorhandene Kompartimente handelt, die lediglich durch die Blockade des mRNA-Abbaus oder durch Störung des mRNA-Metabolismus sichtbar werden, oder ob sie *de novo* gebildet werden. Diese Frage konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. Aufgrund der sehr hohen Dynamik lässt sich jedoch ausschließen, dass die P-body Bildung eine Neusynthese von Proteinen erfordert. Es wäre denkbar, dass die Aggregation der mRNAs von speziellen Proteinen vermittelt wird, die mehrere RNA-Bindedomänen besitzen und somit die mRNAs zusammenhalten. Alternativ könnte die P-body Bildung durch spezielle mRNA-Bindeproteine hervorgerufen werden, die anschließend über Protein-Protein-Wechselwirkungen die mRNAs zusammenhalten. Dieser zweite Mechanismus konnte zum Beispiel für die Bildung der Stress Granula in Säugerzellen beobachtet werden. Die Bildung der Stress Granula ist dabei abhängig von dem mRNA-Bindeprotein TIA-1. Das Protein besitzt neben drei RNA-Bindedomänen eine Glutaminreiche Prion-artige Domäne, die für die Selbstaggregation des Proteins und damit für die Stress Granula Bildung verantwortlich ist (Kedersha et al. 2000; Gilks et al. 2004).

Eine weiterhin offene Frage ist, ob die Bildung der P-bodies notwendig für den 5'-3' mRNA-Abbau ist, oder ob der Abbau auch ohne beziehungsweise außerhalb der P-bodies stattfinden kann. Erste Hinweise dazu stammen aus Experimenten mit Säugerzellen, bei denen die Bildung von P-bodies durch die Verarmung von GW182 (Hedls/Varicose), einem essentiellen Protein für die Assemblierung des Dcp1/2 Komplexes und Bildung der P-bodies, verhindert wurde und anschließend die RNAi Aktivität untersucht wurde. Es zeigte sich, dass der Verlust der P-bodies auch zum Ausfall des RNAi vermittelten mRNA-Abbaus führte (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005).

4.5 Rolle des 5'-3' mRNA-Abbaus in Pflanzen

In Eukaryonten wird mRNA entweder über 5'-3' mRNA-Abbau oder 3'-5' mRNA-Abbau (Exosom-vermittelter Abbau) abgebaut. Untersuchungen in Hefe deuten an, dass der 5'-3' mRNA-Abbau den Hauptweg darstellt (Cao und Parker, 2001; Jacobs Anderson und Parker, 1998; Muhrad et al., 1995). Diese Interpretation deckt sich auch mit der Beobachtung, dass Hefe *xrn1* Mutanten vielfältige Defekte wie zum Beispiel Reduktion der Sporen Lebensfähigkeit, Abbruch der Meiose und verlangsamtes Wachstum aufweisen (Larimer und Stevens, 1990). Für die Xrn1 Exoribonuklease aus *Caenorhabditis elegans* konnte ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Embryos nachgewiesen werden (Newbury und Woolard, 2004).

Mittlerweile wurden auch in mehreren Studien Mutanten der 5'-3' Exoribonuklease Xrn4 von *Arabidopsis thaliana* isoliert (Gazzani et al., 2004; Souret et al., 2004; Olmedo et al., 2006; Potuschak et al., 2006). Interessanterweise konnten bei diesen Studien keine auffälligen Phänotypen beobachtet werden. Das stimmt aber nur bedingt. Unsere vorläufigen Untersuchungen zeigen, dass schwerwiegende Defekte beim Wachstum auftreten, wenn man die *xrn4-5* Mutante auf MS-Medium anzieht (Abb. 4.3). Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei um einen pleiotropen Effekt, der wahrscheinlich durch eine Akkumulation von bestimmten Transkripten unter diesen speziellen Bedin-

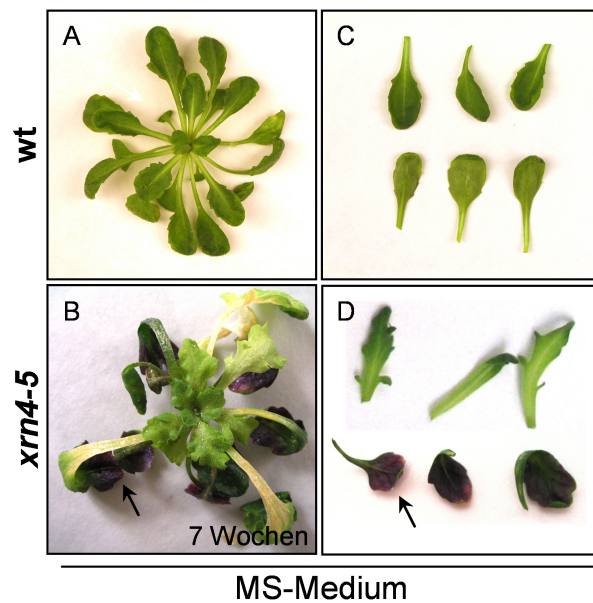


Abbildung 4.3: Phänotyp der *xrn4-5* Linie im Vergleich zum Wildtyp beim Wachstum auf MS-Medium. Die *xrn4-5* Mutante war deutlich langsamer im Wachstum und hatte auffällig missgebildete Blätter mit häufiger Akkumulation von Anthocyanen (Pfeile). (A-B) Phänotypen nach sieben Wochen unter Kurztagbedingungen. (C-D) Blatt Phänotypen: obere Reihe = Blattoberseite, untere Reihe = Blattunterseite.

gungen hervorgerufen wurde, die entsprechend eine Störung von essentiellen Prozessen in der Zelle zur Folge haben.

Die Abwesenheit von auffälligen Phänotypen unter normalen Bedingungen korreliert mit den Ergebnissen von Microarray Analysen der Xrn4 Mutanten. So konnte kein massiver Effekt auf die Transkriptlevel beobachtet werden (Souret et al., 2004). Somit würde sich auch erklären, weshalb der Verlust des Xrn4 nicht lethal ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass in *Arabidopsis thaliana* der Abbau der mRNAs teilweise durch die nukleär lokalisierten Exoribonukleasen Xrn2,3 oder auch dem Exosom ersetzt werden kann.

Neue Erkenntnisse bezüglich der Fragestellung nach der Rolle des 5'-3' mRNA-Abbaus konnten nun durch die Analyse der Decapping Mutanten (*dcp1*, *dc2*, *vcs*) erhalten

werden (Xu et al., 2006). Diese Mutanten wiesen alle schwerwiegende Defekte in der postembryonalen Entwicklung auf, die schließlich lethal waren. Die Autoren berichten über fehlgebildete Blattadern und Kotyledonen, verkürzte Wurzeln und Hypokotyle. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wiesen auch in dieser Arbeit erstellte RNAi Knock-down Linien von Dcp2 Fehlbildungen der Blätter und Zwergwuchs auf (Ganßmann, 2006; Diplomarbeit). Diese schwerwiegenden Defekte liefern nun eindeutige Hinweise, dass der 5'-3' mRNA-Abbau eine essentielle physiologische Funktion in *Arabidopsis thaliana* besitzt. Es wäre wichtig zu überprüfen, wie sich diese Mutationen auf die P-body Bildung auswirken.

4.6 Substrate der P-bodies

Die in der *xrn4-5* Mutante vergrößerten P-bodies wurden vermutlich durch die Akkumulation von mRNA hervorgerufen, die für den Abbau bestimmt waren. Diese Beobachtungen führen zu der Frage, ob sich mRNA-Abbauintermediate in diesen Strukturen nachweisen lassen. Dies ist bisher nur in Hefe durch die Insertion von poly G Abschnitten in Reporter mRNAs gelungen. Diese blockieren die 5'-3' Exoribonuklease durch die Bildung von Sekundärstrukturen und ermöglichen so die Beobachtung von Abbauintermediaten (Sheth and Parker, 2003). Dieses ist bisher bei anderen Eukaryonten nicht gelungen, da sie möglicherweise eine zusätzliche Helikase Aktivität besitzen, die die Prozessierung dieser mRNAs durch die Exoribonuklease trotz der poly G Abschnitte ermöglichen (Kastenmayer et al., 2000). In Pflanzen konnte bisher auch keine natürliche Akkumulation von Abbauintermediaten beobachtet werden (Abler and Green, 1996). Allerdings könnte diese Problematik umgangen werden, wenn man die *xrn4-5* Mutante für solche Analysen verwendet. Über Microarray Analysen konnten Transkripte identifiziert werden, die Substrate des Xrn4 darstellen und in dieser Mutante akkumulieren. Versuche, diese Substrate in den P-bodies mit Hilfe des MS2-Systems nachzuweisen, sind jedoch bisher fehlgeschlagen.

Es ist anzunehmen, dass neben dem normalen 5'-3' mRNA-Abbau auch spezielle mRNA-Abbaumechanismen in den P-bodies stattfinden. So konnten über Microarray Analysen der *xrn4-5* Mutante unter den akkumulierten mRNAs einige durch miRNA regulierte mRNAs identifiziert werden. Möglicherweise ist Xrn4 für den Abbau des 3' Schneideprodukts, das aus dem miRNA vermittelten Schneiden resultiert, verantwortlich, während das 5' Ende durch das Exosom abgebaut werden kann (Abb. 1.2). Damit deutet sich an, dass die Vergrößerung der P-bodies auch durch die Akkumulation von mRNA, die durch miRNA-vermittelten Abbau abgebaut werden, hervorgerufen wurde. In Übereinstimmung mit dieser Interpretation wurden in P-bodies der Säugerzellen Komponenten des RISC Komplex nachgewiesen (Liu et al., 2005; Sen und Blau, 2005; Pillai et al., 2005).

In Hefen und Säugerzellen konnte auch der Abbau fehlerhafter mRNA (nonsense-mediated decay, NMD) in den P-bodies nachgewiesen werden. Zum einen konnte die fehlerhafte mRNA als auch Komponenten dieses Mechanismus wie zum Beispiel UPF1-3 in den P-bodies nachgewiesen werden (Unterholzner und Izaurralde, 2004; Fukuhara et al., 2005; Sheth und Parker, 2006). Aufgrund der Ähnlichkeiten zu den P-bodies aus Hefe und Säugerzellen ist auch zu erwarten, dass zukünftig solche mRNA Prozesse in den pflanzlichen P-bodies identifiziert werden.

4.7 P-bodies und ihre Rolle unter Stressbedingungen

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Stress zu einer Vergrößerung der P-bodies führt. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der P-bodies während der Stressantwort hin (Abb. 3.5, 3.17, 3.16). In Hefe konnte ebenfalls unter verschiedenen Stressbedingungen wie osmotischer Stress, UV-Licht und Glucose Mangel eine Vergrößerung der P-bodies beobachtet werden (Teixeira et al., 2005). Zwar wurde kein Effekt unter Hitzestress beobachtet, jedoch ist dabei anzumerken, dass der gewählte Hitzestress von 37°C für Hefe als milder Hitzestress angesehen werden kann, da zum Beispiel unter

dieser Temperatur auch kein Einfluss auf andere zelluläre Prozesse wie Splicing und Export beobachtet werden kann, wie sie typischerweise unter Stressbedingungen in Hefe beobachtet werden. In Säugerzellen konnte eine vermehrte Bildung von P-bodies unter oxidativem Stress beobachtet werden, jedoch war die P-body Bildung unter Hitzestress weniger stark ausgeprägt (Kedersha et al., 2005). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Stressantwort der Pflanzen, aufgrund ihrer sessilen Lebensweise, deutlich stärker ausgeprägt ist als bei anderen Eukaryonten. Dies wird bereits deutlich anhand der ungewöhnlich großen Anzahl an Transkriptionsfaktoren und Hitzestressproteinen (Nover et al., 2001). Auch die Bildung von Hitzestressgranula (HSG) während der Hitzestressantwort, die einzigartig für Pflanzen ist, unterstützen diese These (Nover et al., 1983, 1989).

Bisher ist jedoch noch unklar, ob die vergrößerten P-bodies auch mit einer erhöhten Abbaurate gleichzusetzen sind, da die Größe der P-bodies sowohl vom mRNA Zufluss als auch der mRNA-Abbaurate abhängt (Abb. 4.2). Es ist denkbar, dass die mRNAs während der Stressphase vorerst in den P-bodies gespeichert werden und erst in der Erholungsphase abgebaut werden. Kürzlich konnte zum Beispiel für die P-bodies der Hefen gezeigt werden, dass mRNA auch temporär in den P-bodies gespeichert und der Translation wieder zugeführt werden können (Bregues et al., 2005). Auch die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der Anzahl und Größe der P-bodies in der *xrn4-5* Mutante nach der Cycloheximid Behandlung könnte eine Speicherfunktion der P-bodies andeuten (Abb. 3.15). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die akkumulierten mRNAs durch eine andere Exonuklease wie beispielsweise dem Exosom abgebaut wurden. Erste Hinweise auf eine Speicherfunktion der P-bodies von Säugerzellen konnten durch die Studien der CAT-1 mRNA (cationic aminoacid-transporter) erhalten werden. Diese mRNA wird unter normalen Bedingungen durch den Einfluss von einer miRNA in einem nicht-translatiertem Zustand in den P-bodies gespeichert und wird erst unter Stressbedingungen freigesetzt (Bhattacharyya et al., 2006).

Auch wenn das Schicksal der mRNAs in den P-bodies unter Stress noch nicht geklärt wurde, ist davon auszugehen, dass die Akkumulation von mRNAs in P-bodies die Zelle dabei unterstützt, sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Zum einen könnte die Überführung der mRNA in einen nicht-translatierten Zustand zur bevorzugten Translation von neu synthetisierter mRNA wie zum Beispiel Hitzestressproteine, aufgrund der reduzierten Konkurrenz um Translationsfaktoren, führen. Weiterhin würde der selektive Abbau von Transkripten zur Umprogrammierung der Genexpression beitragen, um sich an die veränderten Bedingungen anzupassen.

4.8 P-bodies, RSGs und HSGs

Der Einfluß von Stress führt zur Störung vieler zellulärer Prozesse, insbesondere von solchen, bei denen makromolekulare Komplexe, die besonders empfindlich gegenüber Stresseinflüssen sind, beteiligt sind. Besonders auf mRNA Ebene finden in allen Eukaryonten eine Reihe von Veränderungen statt, so dass es zu einer bevorzugten Translation von Stressprotein-kodierenden mRNAs kommt. Das Schicksal der nicht translatierten Haushalts mRNAs konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Zwei Möglichkeiten sind denkbar: 1) Die mRNAs werden direkt dem Abbau zugeführt. 2) Die mRNAs werden in einer nicht-translatierten Form bis zu einer Erholungsphase gespeichert. Dann können sie wieder der Translation oder dem mRNA-Abbau zugeführt werden. Sehr wahrscheinlich ist jedoch, dass beide Möglichkeiten zutreffen und für verschiedene mRNAs individuell reguliert werden.

In bisherigen Modellen wurde angenommen, dass die HSGs unter Stressbedingungen, neben ihrer Funktion in der Regulation der Proteinhomöostase, auch eine zentrale Rolle im mRNA-Metabolismus spielen und möglicherweise identisch mit den Stress Granula der Säugerzellen sind. Durch die in dieser Arbeit (in Zusammenarbeit mit Dr. M. Fauth) durchgeführten Kolokalisationsanalysen von Markerproteinen der HSG, RSG und P-bodies konnte nun erstmals gezeigt werden, dass die zellulären Prozesse mRNA-

Abbau, mRNA-Speicherung und Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase auf einzelne zyttoplasmatische Kompartimente beschränkt sind, und diese voneinander unabhängig sind (Abb. 3.18, 3.19).

Die Kolokalisationsstudien der P-bodies und der HSGs zeigten keine direkte Verbindung beziehungsweise räumliche Nähe der Kompartimente zueinander (Abb. 4.4). Dies deutet darauf hin, dass kein direkter Austausch von Komponenten zwischen diesen Kompartimenten stattfindet. Jedoch ist es möglich, dass zu anderen Zeiten der Stressantwort funktionelle Verbindungen vorhanden sind. Im Gegensatz zu den HSGs konnte im Falle der RSGs häufig eine räumliche Nähe zu den P-bodies beobachtet werden. Echtzeit Untersuchungen von Stress Granula und P-bodies in Säugerzellen konnten sogar teilweise eine Fusionierung dieser Strukturen zeigen (Wilczynska et al., 2004; Kedersha et al., 2005). Es ist möglich, dass den RNA Stressgranula neben der mRNA-Speicherung eine Funktion in der Sortierung von mRNAs zukommt, und dass diese mitentscheiden, ob eine mRNA dem Abbau zugeführt oder gespeichert wird (Abb. 4.4). Die Interaktion der P-bodies mit den RNA Stressgranula könnte den Austausch von mRNAs und bestimmten Proteinen ermöglichen. So konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass die 5'-3' Exoribonuklease und der Initiationsfaktor eIF4E innerhalb dieser Strukturen ausgetauscht wird (Kedersha et al., 2005). Da jedoch viele P-bodies detektiert wurden, die sich nicht in räumlicher Nähe zu den RSG befanden, ist anzunehmen, dass während der Stressantwort ein Teil der Haushalts mRNA direkt dem Abbau zugeführt wird.

Die Vergrößerung der P-bodies unter Hitzestress und die Interaktion mit RNA Stressgranula ist ein neuer und besonders interessanter Aspekt der pflanzlichen Hitzestressantwort. In zukünftigen Untersuchungen sollte über Echtzeitanalysen die Beziehung dieser Kompartimente näher charakterisiert werden. Solche Analysen könnten dabei helfen, die komplexe Hitzestressantwort und das Schicksal der mRNA unter Stressbedingungen zu klären.

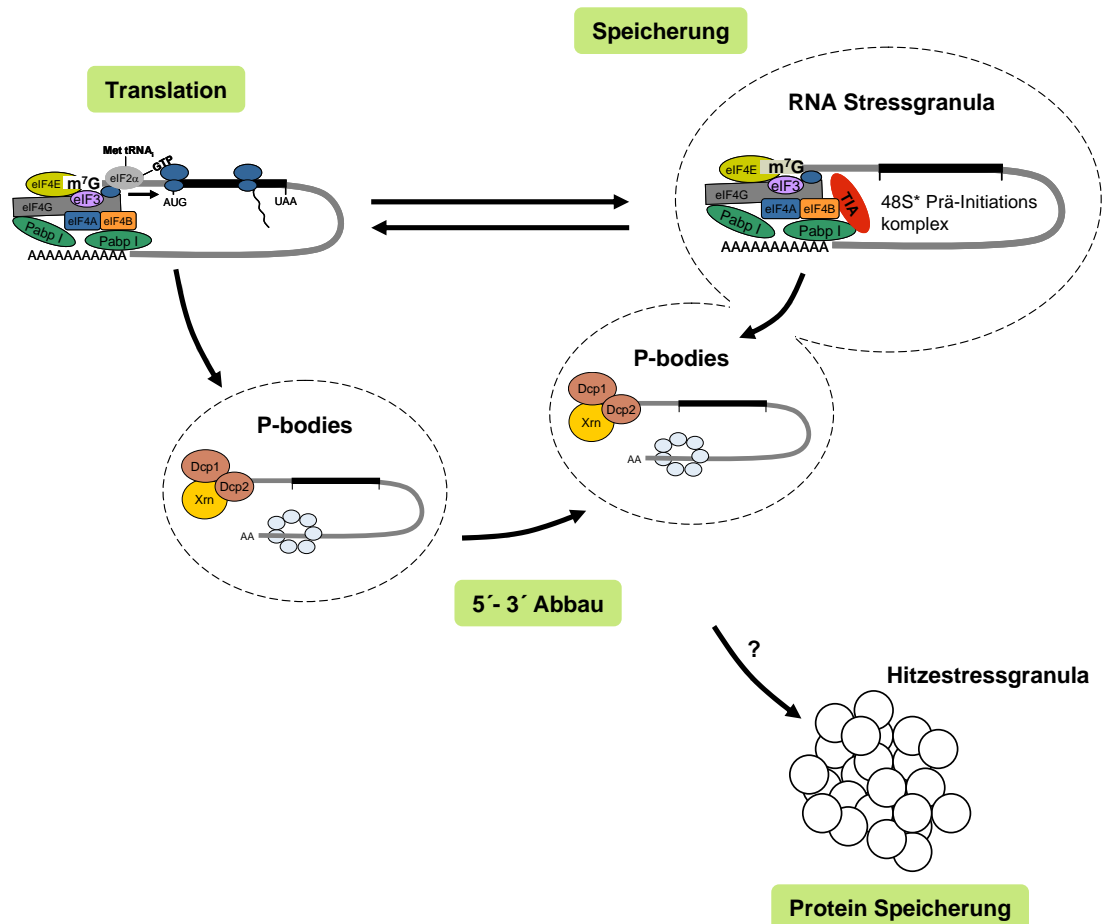


Abbildung 4.4: Modell für das Schicksal von mRNA unter Stressbedingungen. Während einer Stressphase wird mRNA in RNA Stressgranula gespeichert oder direkt dem 5'-3' mRNA-Abbau (P-bodies) zugeführt. Die in den RSG gespeicherte mRNA kann anschließend wieder in die Polysomenverband eingebunden werden oder durch die Fusion mit P-bodies dem mRNA-Abbau zugeführt werden. Die HSGs, die für die Speicherung und Renaturierung von Proteinen verantwortlich sind, stehen nicht in räumlicher Nähe mit den RNA-haltigen Kompartimenten und scheinen nicht direkt am mRNA-Metabolismus beteiligt zu sein.

5 Zusammenfassung

Die Regulation der Genexpression ist essentiell für Organismen, um sich an ständig ändernde Umweltbedingungen anzupassen. Besonders unter Stressbedingungen kommt es in Eukaryonten zur Umprogrammierung der Genexpression. Dabei werden bevorzugt mRNAs, die für Stressproteine kodieren, translatiert, während es zum Auslaufen der Polysomen auf der Haushalts mRNA kommt. Das Schicksal der Haushalts mRNA konnte jedoch noch nicht ausreichend geklärt werden. Bisherige Studien in Säugerzellen und Pflanzen haben gezeigt, dass unter Stressbedingungen ein Großteil der poly A mRNA in Form von 48 S* Prä-Initiationskomplexen in RNA Stressgranula gespeichert werden. In Pflanzen bilden sich ausserdem Hitzestressgranula, die an der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase beteiligt sind. Allerdings konnte bei Pflanzen noch nicht geklärt werden, welche Rolle dem mRNA-Abbau unter solchen Bedingungen zukommt. Der mRNA-Abbau in Pflanzen ist bisher nur sehr wenig charakterisiert. Die meisten Erkenntnisse stammen aus Studien mit Hefen und Säugerzellen. Dabei konnten zwei mRNA-Hauptabbauwege identifiziert werden: der Exosomale 3'-5' mRNA-Abbau und der 5'-3' mRNA-Abbau. Lokalisationsstudien der mRNA-Abbauproteine haben gezeigt, dass diese in zytoplasmatischen Processing bodies (P-bodies) konzentriert sind und Orte des 5'-3' mRNA-Abbaus darstellen.

Der mRNA-Abbau in Pflanzen ist bisher nur sehr wenig charakterisiert. Die meisten Erkenntnisse stammen aus Studien mit Hefen und Säugerzellen. Dabei konnten zwei mRNA-Hauptabbauwege identifiziert werden: der Exosomale 3'-5' mRNA-Abbau und der 5'-3' mRNA-Abbau. Beide Abbauwege werden durch die Deadenylierung der mRNA

initiiert. Beim 5'-3' mRNA-Abbau wird die Kappenstruktur der mRNA anschließend durch einen Decappingkomplex bestehend aus Dcp1 und Dcp2 entfernt und danach das Transkript durch die 5'-3' Exoribonuklease Xrn abgebaut. Die Decappingreaktion ist ein kritischer Schritt des mRNA-Abbaus und wird durch zahlreiche Proteine, wie zum Beispiel dem LSM1-7 Komplex, reguliert. Lokalisationsstudien der mRNA-Abbauproteine haben gezeigt, dass diese in zytoplasmatischen Processing bodies (P-bodies) konzentriert sind und Orte des 5'-3' mRNA-Abbaus darstellen. Studien in Hefe zeigten, dass die P-bodies hochdynamisch sind und eine wichtige Rolle unter Stressbedingungen einnehmen. Diese Entdeckung führte zu der Frage, ob die P-bodies auch in Pflanzen konserviert sind, und ob sie möglicherweise funktionell mit den unter Stress gebildeten RNA Stressgranula und Hitzestressgranula verbunden sind.

Das komplette sequenzierte Genom von *Arabidopsis thaliana* eignete sich zur Identifikation von mRNA-Abbauproteine kodierender Gene. Unter Verwendung von Aminosäuresequenzen bereits bekannter mRNA-Abbauproteine aus Hefe und Säugerzellen konnten Homologe identifiziert werden. Die anschließende Charakterisierung dieser Proteine zeigte, dass diese Proteine Komponenten des 5'-3' mRNA-Abbaus darstellen, die in zytoplasmatischen Strukturen lokalisieren. Diese Strukturen konnten schließlich durch weitere Charakterisierung als pflanzliche P-bodies identifiziert werden:

1. Über die Analyse des Genoms konnten Homologe für die Decappingproteine Dcp1 und Dcp2 sowie für die Proteine LSM1,2,5,8 als Untereinheiten des LSM1-7 Komplexes identifiziert werden. Für jedes Abbauprotein konnte jeweils nur ein Gen identifiziert werden. Die Sequenzvergleiche der Proteine mit Homologen aus Hefe, Säugerzellen sowie mit translatierten Sequenzen von pflanzlichen EST-Sequenzen zeigten, dass die für die jeweilige Funktion der Proteine essentiellen Domänen in Pflanzen konserviert sind.
2. RT-PCR Analysen und die Auswertung der Microarray Daten des AtGenexpress Projektes zeigten, dass die Gene konstitutiv exprimiert werden und das Express-

ionsmuster auch unter Stressbedingungen nicht signifikant verändert ist.

3. Lokalisationsstudien der mRNA-Abbau Proteine mit Hilfe von GFP-Markierungen in Tabak Mesophyll Protoplasten zeigten, dass die Proteine in hochdynamischen zytoplasmatischen Foci zu finden sind, die auch die 5'-3'Exoribonuklease Xrn4 enthalten. Diese Foci konnten durch weitere Analysen als pflanzliche P-bodies identifiziert werden. Im Fall von Dcp2 und den LSM Proteinen wurde gezeigt, dass die Strukturbindung nur transient stattfindet.
4. Über Hefe-Zwei-Hybrid Analysen konnten Protein-Protein-Interaktionen zwischen den untersuchten Proteinen identifiziert werden. Unter Einsatz der Bimolecular fluorescence complementation analysis, einer Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen im natürlichen System, sowie auch die subzelluläre Lokalisation der Proteinkomplexe, konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen zwischen den untersuchten Proteinen hauptsächlich in P-bodies stattfanden.

Aufbauend auf diesen Befunden wurde ein Antikörper gegen Dcp1 als Marker erstellt, der erstmals die Detektion der endogenen Strukturen in *Arabidopsis thaliana* ermöglichte. Die weitere Charakterisierung dieser Strukturen über Immunfluoreszenzanalysen bestätigten, dass diese P-bodies sind. Es konnte gezeigt werden, dass die pflanzlichen P-bodies ähnliche Eigenschaften wie die P-bodies anderer Organismen besitzen. Sie sind hochdynamisch und benötigen untranslatierte mRNA für die Assemblierung. Die Größe und Anzahl der P-bodies hängt dabei vom Verhältniss des Zuflusses von mRNA und der mRNA-Abbaurrate ab:

1. In der *xrn4-5* Mutante, bei der die Exoribonuklease Xrn4 durch eine T-DNA-Insertion ausgeschaltet ist, sind die P-bodies stark vergrößert. Die Vergrößerung ist auf die Akkumulation von mRNA zurückzuführen, die für den Abbau bestimmt waren.

2. Die Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid, der mRNAs in den Polysomen stabilisiert, ist die Größe und Anzahl der P-bodies stark reduziert und zeigt die Abhängigkeit vom Influx untranslatierter mRNA.
3. Stressbedingungen, die eine massive Freisetzung von mRNA aus dem Polysomenverband zur Folge haben, führten zu einer starken Vergrößerung der P-bodies.

Die Beobachtung, dass die P-bodies besonders unter Hitzestress vergrößert sind deutet auf eine wichtige Rolle der P-bodies während der Stressantwort hin und führte zu der Frage nach der Beziehung der P-bodies zu RNA Stressgranula sowie zu Hitzestressgranula. Durch Kolokalisationsanalysen mit Markern der RNA Stressgranula, der Hitzestressgranula und der P-bodies konnte erstmals gezeigt werden, dass es sich um voneinander unabhängige Mikrokompimente handelt, und dass unter Stressbedingungen die zellulären Prozesse mRNA-Abbau, mRNA-Speicherung und Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase auf einzelne Mikrokompimente beschränkt sind.

1. Die Bildung von P-bodies konnte unter Kontrollbedingungen beobachtet werden, unter denen die RNA Stressgranula nicht gebildet wurden. Unter Stressbedingungen konnten sowohl P-bodies als auch RNA Stressgranula detektiert werden. Es konnte häufig eine räumliche Nähe beobachtet werden. Dies deutet auf einen Austausch von Komponenten zwischen diesen Strukturen hin.
2. P-bodies konnten ohne die Bildung von Hitzestressgranula detektiert werden. Unter Hitzestressbedingungen konnten zwischen Hitzestressgranula und P-bodies keine räumliche Nähe festgestellt werden.
3. Kolokalisationsanalysen der RNA Stressgranula und Hitzestressgranula zeigten, dass diese Strukturen nicht identisch sind, aber häufig sehr nahe zusammen liegen.

Die Identifizierung und Charakterisierung der pflanzlichen P-bodies und deren Komponenten bildet eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen. Vor allem die massive

Bildung von P-bodies unter Stressbedingungen und die Interaktion der P-bodies mit RNA Stressgranula zeigen neue Aspekte der pflanzlichen Hitzestressantwort auf, die es in zukünftigen Untersuchungen zu klären gilt.

Literaturverzeichnis

1. **Abler, M.L. and Green, P.J.** (1996). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **32**, 63-78.
2. **Albert, T.K., Lemaire, M., van Berkum, N.L., Gentz, R., Collart, M., Timmers, H.T.M.** (2000). Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res.* **28**, 809-817.
3. **Amrani, N., Sachs, M.S., Jacobson, A.** (2006). Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 415-25.
4. **Anderson, J.S.J., Parker, R.P.** (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**, 1497-1506.
5. **Anderson, P. and Kedersha, N.** (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**, 803-808.
6. **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, NY
7. **Bashkirov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.M. and Heyer, W.D.** (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J. Cell Biol.* **136**, 761-773.
8. **Beelman, C.A. and Parker, R.** (1994). Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. *J. Biol. Chem.* **13**, 9687-9692.
9. **Beelman, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., La Grandeur, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M. and Parker, R.** (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **382**, 642-646.
10. **Bessman, M.J., Frick, D.N. and O'Handley, S.F.** (1996). The MutT proteins or 'Nudix' hydrolases, a family of versatile, widely distributed, 'housecleaning' enzymes. *J. Biol. Chem.* **271**, 25059-25062.

11. **Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W.** (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **6**, 1111-1124.
12. **Boeck, R., Lapeyre, B., Brown, C.E. and Sachs, A.B.** (1998). Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast *spb8-2* mutant. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5062-5072.
13. **Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M. and Séraphin, B.** (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* **19**, 1661-1671.
14. **Bregues, M., D. Teixeira and Parker, R.** (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486-489.
15. **Butler, J.S.** (2002). The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol.* **12**, 90-96.
16. **Cao, D. and Parker, R.** (2003). Computational modeling and experimental analysis of non-sense-mediated decay in yeast. *Cell* **113**, 533-545.
17. **Caponigro, G. and R. Parker.** (1996). Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **60**, 233-249.
18. **Chekanova J.A., Dutko, J.A., Mian, I.S. and Belostotsky, D.A.** (2002). *Arabidopsis thaliana* exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3'-5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res.* **30**, 695-700.
19. **Chekanova J.A., Shaw, R.J., Wills, M.A. and Belostotsky, D.A.** (2000). Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* rescues 5.8S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast *ski6* mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 33158-33166.
20. **Chen, Q., Osteryoung, K., Vierling, E.** (1994). A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes in vivo and in Organelle. *J Biol Chem.* **269**, 13216-13223.
21. **Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., van Erp, H. and Green, P.J.** (2004). AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **328**, 95-102
22. **Chomczynski, P., Mackey, K.** (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Bio-techniques*. **19**, 942-945.
23. **Cooper, M., Johnston, L.H. and Beggs, J.D.** (1995). Identification and characterization of Uss1p (Sdb23p): a novel U6 snRNA-associated protein with significant similarity to core proteins of small nuclear ribonucleoproteins. *EMBO J.* **14**, 2066-2075

24. **Cougot, N., Babajko, S. and Seraphin, B.** (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA degradation in human cells. *J. Cell Biol.* **165**, 31-40.
25. **Decker C. J., Parker R.** (1993) A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* **7**, 1632-1643.
26. **Dunckley, T. and Parker, R.** (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* **18**, 5411-5422.
27. **Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., Sharp, P.A.** (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 457-467.
28. **Eystathioy, T., E.K. Chan, S.A. Tenenbaum, J.D. Keene, K. Griffith and M.J. Fritzler.** (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 1338-1351.
29. **Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild B, Lykke-Andersen, J.** (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell.* **6**, 905-915.
30. **Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerio, A.L., Parker, R., Dietz, H.C.** (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science.* **295**, 2258-2261.
31. **Fromont-Racine, M., Mayes, A.E., Brunet-Simon, A., Rain, J.-C., Colley, A., Dix, I., Decourty, L., Joly, N., Ricard, F., Beggs, J.D. and Legrain, P.** (2000). Genome-wide protein interaction screens reveal functional networks involving Sm-like proteins. *Yeast* **17**, 95-110.
32. **Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., and Conti, E.** (2005). SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell* **17**, 537-547.
33. **Gallie, D.R.** (2002). Protein-protein interactions required during translation. *Plant Mol Biol.* **6**, 949-970.
34. **Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. and Sablowski, R.** (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* **306**, 1046-1048.
35. **Gietz, R. D., and Woods, R. A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/ single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**, 87-96.
36. **Gietz, R.D. and Sugino, A.** (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534.

37. **Gil, P., Liu, Y., Orbovic, V., Verkamp, E., Poff, K.L. and Green, P.J.** (1994). Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **104**, 777-784.
38. **Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L.M. Dember and P. Anderson.** (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5383-5398.
39. **Hatfield, L., Beelman, C.A., Stevens, A., Parker, R.** (1996). Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5830-5838.
40. **He, W. and Parker, R.** (2000). Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 346-350.
41. **Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsey, S., Tollervey, D.** (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* **13**, 2452-2463.
42. **Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V.A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H., Lührmann, R.** (1995). snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J.* **14**, 2076-2088.
43. **Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**, 788-798.
44. **Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lührmann, R. and Achsel, T.** (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* **8**, 1489-1501.
45. **Jacobs Anderson, J.S., Parker, R.** (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**, 1497-1506.
46. **Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M. J., Chan, E.K.** (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1167-1174.
47. **James, P., Halladay, J. and Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
48. **Johnson, A.W., Kolodner, R.D.** (1995). Synthetic lethality of *sep1* (*xrn1*) *ski2* and *sep1* (*xrn1*) *ski3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of killer virus and suggests a general role for these genes in translation control. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2719-2727.

49. **Kastenmayer, J.P. and Green, P.J.** (2000). Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis thaliana*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**, 13985-13990.
50. **Kastenmayer, J.P., van Hoof, A., Johnson, M., Green, P.J.** (1998). Plant Molecular Biology. Raikhel N, Last R, Morelli G, LaShavo F., editors. Berlin, Springer, 125-133.
51. **Kedersha, N. and Anderson, P.** (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. Biochem. Soc. Trans. **30**, 963-969.
52. **Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. Fritzler, D. Scheuner, R. Kaufman, D.E. Golan and P. Anderson.** (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. J. Cell Biol. **169**, 871-884.
53. **Kedersha, N., M.R. Cho, W. Li, P.W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D.E. Golan and P. Anderson.** (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. J. Cell Biol. **151**, 1257-1268.
54. **Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I.J. Miller, J. Stahl and P. Anderson.** (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. Mol. Biol. Cell. **13**, 195-210.
55. **Kedersha, N.L., M. Gupta, W. Li, I. Miller and P. Anderson.** (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2a to the assembly of mammalian stress granules. J. Cell Biol. **147**, 1431-1441.
56. **Kenna, M., Stevens, A., McCannon, M., Douglas, M.G.** (1993). An essential yeast gene with homology to the exonuclease-encoding XRN1/ KEM1 gene also encodes a protein with exoribonuclease activity. Mol. Cell Biol. **13**, 341-350.
57. **Khanna, R. and Kiledjian, M.** (2004). Poly(A)-binding-protein-mediated regulation of hDcp2 decapping in vitro. EMBO J. **23**, 1968-1976.
58. **Kim, V.N.** (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **6**, 376-385.
59. **Kimball, S.R., R.L. Horetsky, D. Ron, L.S. Jefferson and H.P. Harding.** (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **284**, 273-284.
60. **Kirschner, M., Winkelhaus, S., Thierfelder, J., Nover, L.** (2000). Transient expression and heat stress induced aggregation of endogenous and heterologous small heat stress proteins in tobacco protoplasts. Plant J. **24**, 397-412.

61. **Kofuji S, Sakuno T, Takahashi S, Araki Y, Doi Y, Hoshino S, Katada T.** (2006). The decapping enzyme Dcp1 participates in translation termination through its interaction with the release factor eRF3 in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 547-553.
62. **Kosik, K.S. and Krichevskyn A.M.** (2002). The message and the messenger: delivering RNA in neurons. *Sci. STKE.* **126**, 16.
63. **Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **2**, 150-163.
64. **La Grandeur T., Parker R.** (1999). The cis acting sequences responsible for the differential decay of the unstable MFA2 and stable PGK1 transcripts in yeast include the context of the translational start codon. *RNA* **5**, 420-433.
65. **La Grandeur T.E. and Parker, R.** (1998). Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.* **17**, 1487-1496.
66. **Lambermon, M.H.L., Simpson, G.G., Kirk, D, Wieczorek, D.A., Hemmings-Mieszcak, M., Klahre, U., Filipowicz, W.** (2000). UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear. pre-mRNA maturation. *EMBO J.* **19**, 1638-1649.
67. **Larimer, F.W., Stevens, A.** (1990). Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'-3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene.* **95**, 85-90.
68. **Lax, S.R., Lauer, S.J., Browning, K.S., Ravel J.M.** (1986). Purification and properties of protein synthesis initiation and elongation factors from wheat germ. *Methods Enzymol.* **118**, 109-128.
69. **Leatherman, J.L. and T.A. Jongens.** (2003). Transcriptional silencing and translational control: key features of early germline development. *Bioessays.* **25**, 326-335.
70. **Lehner, B. and Sanderson, C.M.** (2004). A protein interaction framework for human mRNA degradation. *Genome Res.* **14**, 1315-1323.
71. **Lin, C.-Y., Roberts, J.K. and Key, J.L.** (1984). Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol.* **74**, 152-160.
72. **Lin, M.D., Fan, S.J., Hsu, W.S., Chou, T.B.** (2006). *Drosophila* decapping protein 1, dDcp1, is a component of the oskar mRNA complex and directs its posterior localization in the oocyte. *Dev. Cell.* **5**, 601-13.
73. **Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J. and Parker, R.** (2005). Micro-RNA dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719-723.

74. **Lorkovic, Z.J., Wieczorek Kirk, D.A., Klahre, U., Hemmings-Mieszczak, M., Filipowicz, W.** (2000). RBP45 and RBP47, two oligouridylate-specific hnRNP-like proteins interacting with poly(A)+ RNA in nuclei of plant cells. *RNA* **6**, 1610-1624.
75. **Lowell J. E., Rudner D. Z., Sachs A. B.** (1992). 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev.* **6**, 2088-2099.
76. **Lyck, R., Harmening, U., Höhfeld, I., Treuter, E., Scharf, K.D. and Nover, L.** (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* **202**, 117-125.
77. **Lykke-Andersen, J.** (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 8114-8121.
78. **Malamy, J.E. and P.N. Benfey.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
79. **Meyer, S., Temme, C., Wahle, E.** (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.* **4**, 197-216.
80. **Muhrad D., Decker C. J., Parker R.** (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* **8**, 855-866.
81. **Muhrad D., Decker C. J., Parker R.** (1995). Turnover mechanism of the stable yeast PGK1 mRNA. *Mol Cell Biol.* **15**, 2145-2156.
82. **Muhrad, D. and Parker, R.** (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* **370**, 578-581.
83. **Newbury, S. and Woollard, A.** (2004). The 5'-3' exoribonuclease xrn-1 is essential for ventral epithelial enclosure during *C. elegans* embryogenesis. *RNA* **10**, 59-65.
84. **Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.D.** (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones.* **6**, 177-189.
85. **Nover, L., Scharf, K-D. and Neumann, D.** (1983). Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell Biol.* **3**, 1648-1655.
86. **Nover, L., Scharf, K-D. and Neumann, D.** (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **9**, 1298-1308.

87. **Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B.D., Nourizadeh, S.D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P., Ecker, J.R.** (2006). ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'-3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 13286-13293. in press.
88. **Peltz, S.W., Donahue, J.L. and Jacobson, A.** (1992). A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5778-5784.
89. **Petfalski, E., Dandekar, T., Henry, Y., Tollervey, D.** (1998). Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1181-1189.
90. **Petracek, M.E., Dickey, L.F., Huber, S.C. and Thompson, W.F.** (1997). Light-regulated changes in abundance and polyribosome association of ferredoxin mRNA are dependent on photosynthesis. *Plant Cell* **9**, 2291-2300.
91. **Piccirillo C., Khanna R., Kiledjian M.** (2003). Functional characterization of the mammalian RNA decapping enzyme hDcp2. *RNA* **9**, 1138-1147.
92. **Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W.** (2005). Inhibition of translational initiation by Let -7 microRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-1576.
93. **Poole, T. L, Stevens A.** (1997). Structural modifications of RNA influence the 5' exoribonucleolytic hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 799-805.
94. **Port, M., Tripp, J., Zielinski, D., Weber, C., Heerklotz, D., Winkelhaus, S., Bublak, D. and Scharf, K.-D.** (2004). Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol.* **135**, 1457-1470.
95. **Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D., Genschik, P.** (2006). The Exoribonuclease XRN4 Is a Component of the Ethylene Response Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**, 3047-3057. in press.
96. **Ramirez, C.V., Vilela, C., Berthelot, K. and McCarthy, J.E.** (2002). Modulation of eukaryotic mRNA stability via the cap-binding translation complex eIF4F. *J. Mol. Biol.* **318**, 951-962.
97. **Renfranz, P.J., Beckerle, M.C. Doing,** (2002). (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14** 1, 88-103.

98. **Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A. and Belostotsky, D.A.** (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA* **10**, 1200-1214.
99. **Sachs A. B., Deardorff J. A.** (1992). Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* **70**, 961-973.
100. **Sachs, A. B., Davis, R. W. and Kornberg, R. D.** (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3268-3276.
101. **Sakuno, T., Araki, Y., Ohya, Y., Kofuji, S., Takahashi, S., Hoshino, S. and Katada, T.** (2004). Decapping reaction of mRNA requires Dcp1 in fission yeast: its characterization in different species from yeast to human. *J. Biochem.* **136**, 805-812.
102. **Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S., Séraphin, B.** (1999). Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.* **18**, 3451-3462.
103. **Sambrook, J., Russel, D.W.** (2001). *Molecular cloning - a laboratory manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
104. **Schisa, J.A., Pitt, J.N. and Priess, J.R.** (2001). Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* **128**, 1287-1298.
105. **Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet.* **37**, 501-506.
106. **Schwartz D. C., Parker, R.** (1999). Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5247-5256.
107. **Schwartz D., Parker R.** (2000a). Interaction of mRNA translation and mRNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Translational control of gene expression.* 807-825.
108. **Schwartz, D.C. and Parker, R.** (2000). mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7933-7942.
109. **Sen, G.L. and Blau, H.M.** (2005). Argonaute2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 633-636.
110. **Séraphin, B.** (1995). Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.* **14**, 2089-2098.

111. **Shaner, N.C., Steinbach, P.A. and Tsien, R.Y.** (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*. **2** (12) 905-909.
112. **She, M., Decker, C.J., Sundramurthy, K., Liu, Y., Chen, N., Parker R. and Song H.** (2004). Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 249-256.
113. **Sheth, U. and Parker, R.** (2003). Decapping and degradation of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808.
114. **Sheth, U. and Parker, R.** (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* **6**, 1095-1109.
115. **Sheu, J.J., Yu, T.S., Tong, W.F. and Yu, S.M.** (1996). Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice α -amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *J. Biol. Chem.* **271**, 26998-27004.
116. **Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. and Green, P.J.** (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell* **15**, 173-183.
117. **Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D. C., Kiledjian, M. and Parker, R.** (2003). Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA* **9**, 231-238.
118. **Stevens, A., Hsu, C.L., Isham, K.R., Larimer, F.W.** (1991). Fragments of the internal transcribed spacer 1 of pre-rRNA accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* lacking 5'-3' exoribonuclease1. *J. Bacteriol.* **21**, 7024-7028.
119. **Storti, R.V., Scott, M.P., Rich, A., Pardue, M.L.** (1980). Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell* **22**, 825-834.
120. **Tan, E.M.** (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151.
121. **Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M. and Parker R.** (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**, 371-382.
122. **Temme, C., Zaessinger, S., Simonelig, M., Wahle, E.** (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J.* **23**, 2862-2871.
123. **Tharun, S. and Parker, R.** (1999). Analysis of mutations in the yeast mRNA decapping enzyme. *Genetics* **151**, 1273-1285.

124. **Tharun, S. and Parker, R.** (2001). Targeting an mRNA for decapping: Displacement of translation factors and association of the Lsm1-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell* **8**, 1075-1083.
125. **Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D. and Parker, R.** (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and degradation. *Nature* **404**, 515-518.
126. **Tharun, S., Sachs, A.** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168-7177.
127. **Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.
128. **Töpfer, R., Schell, J., Steinbiss, H.H.** (1988). Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 8725.
129. **Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., Parker, R.** (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **21**, 1427-1436.
130. **Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., Parker, R.** (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**, 377-386.
131. **Unterholzner, L., and Izaurralde, E.** (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* **16**, 587-596.
132. **van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E. and Seraphin, B.** (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* **21**, 6915-6924.
133. **van Hoof A., Parker R.** (1999). The exosome: a proteasome for RNA?. *Cell.* **99**, 347-350.
134. **van Hoof, A. and Green, P.J.** (1996). Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. *Plant J.* **10**, 415-424.
135. **van Hoof, A. and Parker, R.** (2002). Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr. Biol.* **12**, 285-287.
136. **Vilela, C., Linz, B., Velasco, Ramirez, C., Rodrigues-Pousada, C. and McCarthy, J.E.G.** (1999). Posttermination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *EMBO J.* **18**, 3139-3152.

137. **Vilela, C., Velasco, C., Ptushkina, M., McCarthy, J.E.** (2000). The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO J.* **19**, 4372-4382.
138. **Villa, T., Ceradini, F., Presutti, C., Bozzoni, I.** (2000). Processing of the intron-encoded U18 small nucleolar RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* relies on both exo- and endonucleolytic activities. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3376-3383.
139. **Walter, M., Chaban, C., Schutze, K.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**, 428-438.
140. **Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A. and Kiledjian, M.** (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12663-12668.
141. **Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F. and Weil, D.** (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* **118**, 981-992.
142. **Wilkie, G.S., Dickson, K.S., Gray, N.K.** (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 182-8.
143. **Wilusz C. J., Wormington M., Peltz S.W.** (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 237-246.
144. **Xu, J., Yang, J.Y., Niu, Q.W., Chua, N.H.** (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE Form a Decapping Complex Required for Postembryonic Development. *Plant Cell.* in press.
145. **Yu, J.H., Yang, W.H., Gulick, T.O.D., Bloch, K.D. and Bloch, D.B.** (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* **11**, 1795-1802.

A Lokalisationsanalyse

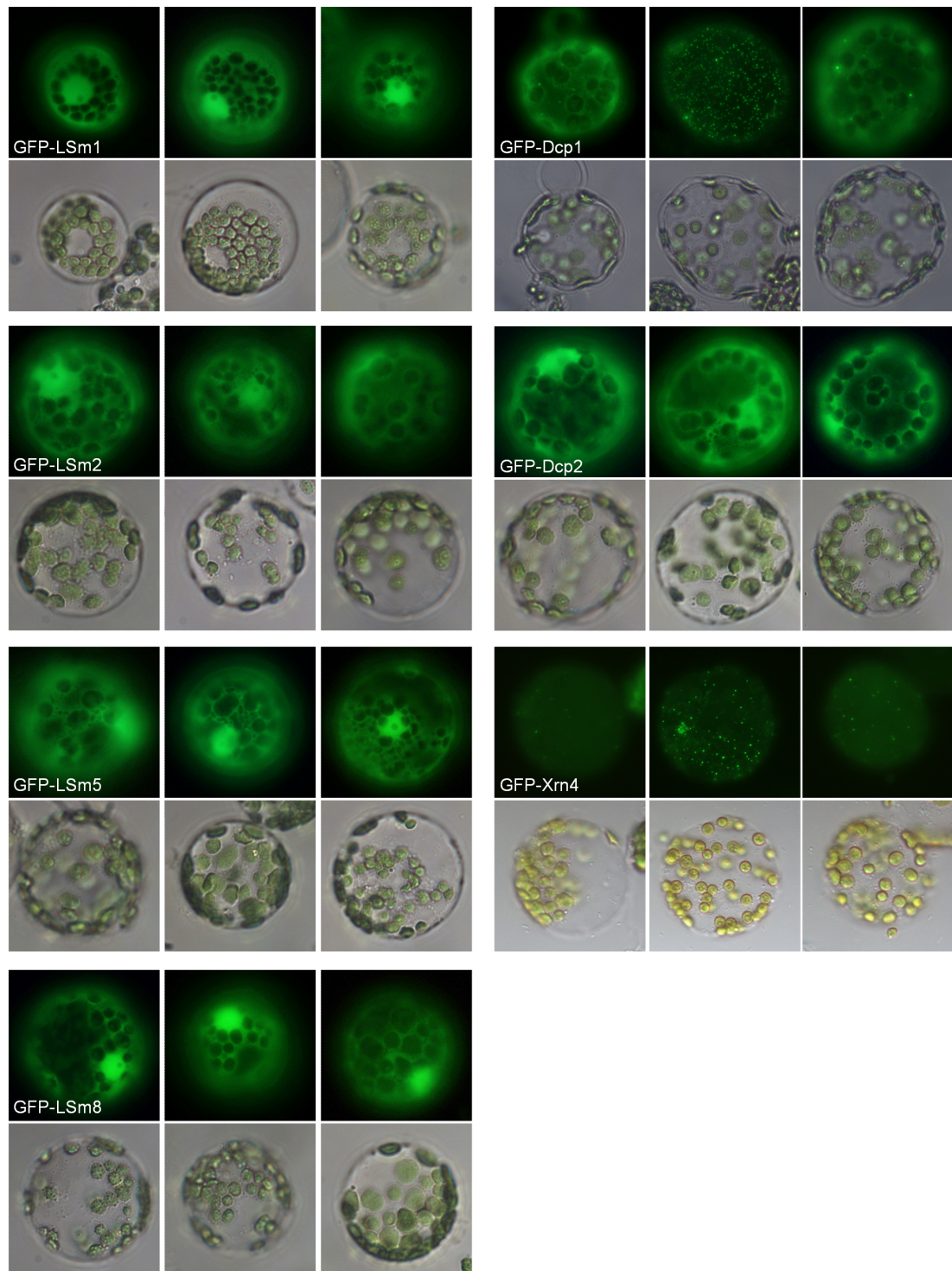


Abbildung A.1: Subzelluläre Lokalisation von GFP markierten mRNA-Abbau Proteinen in Tabak Mesophyll Protoplasten. Siehe auch Abb. 3.5 und Abb. 3.6.

B Split YFP Analyse

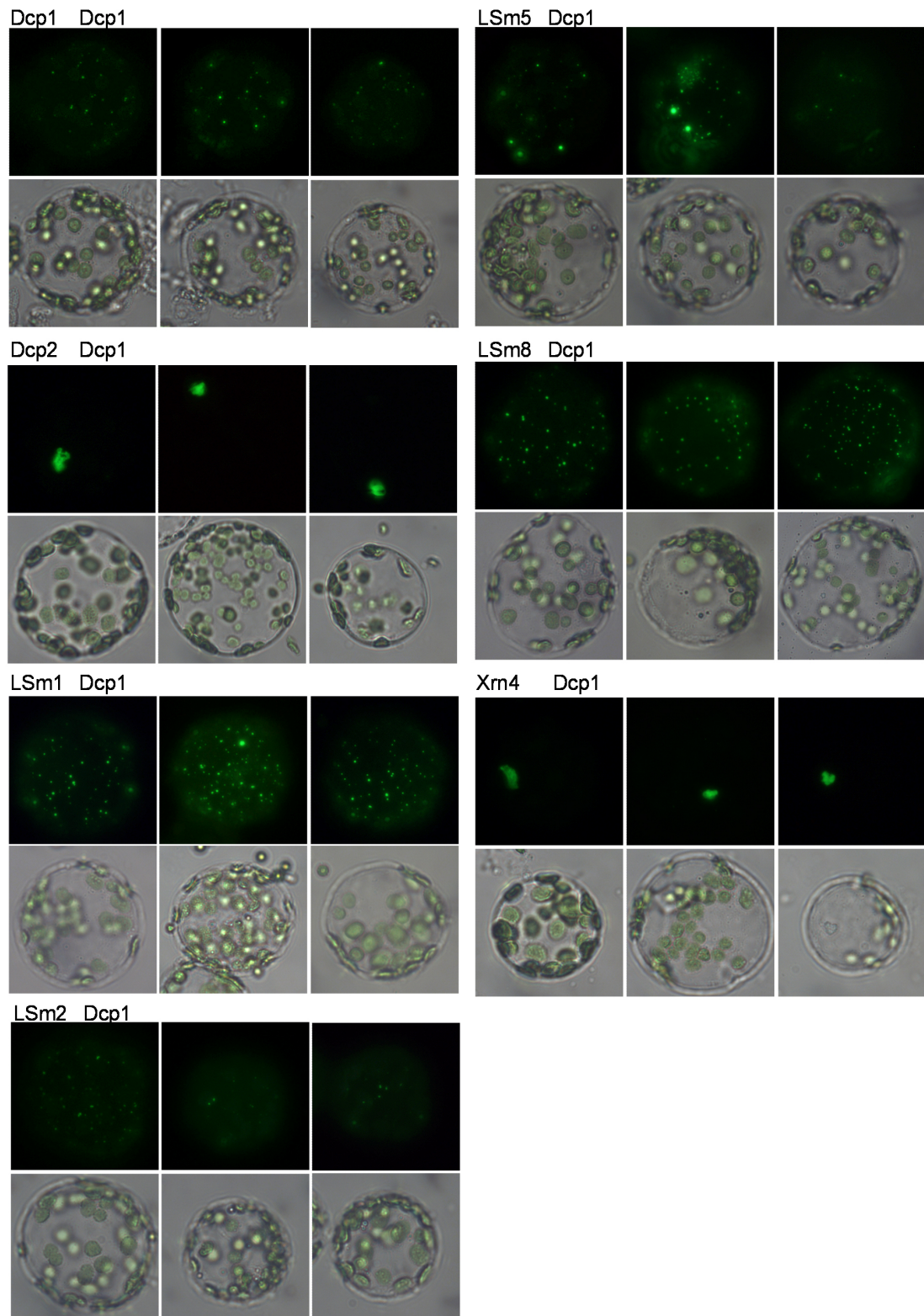


Abbildung B.1: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

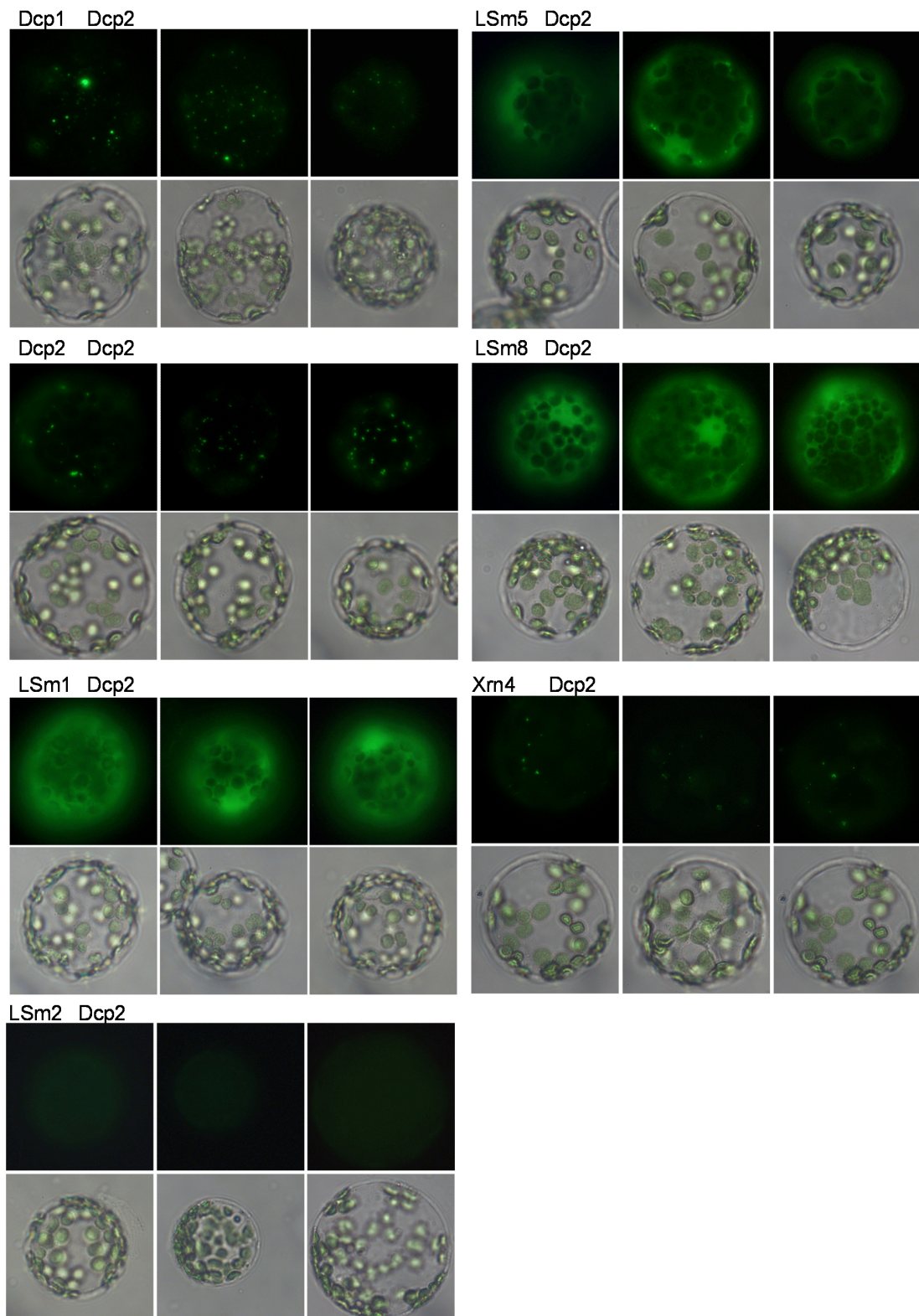


Abbildung B.2: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

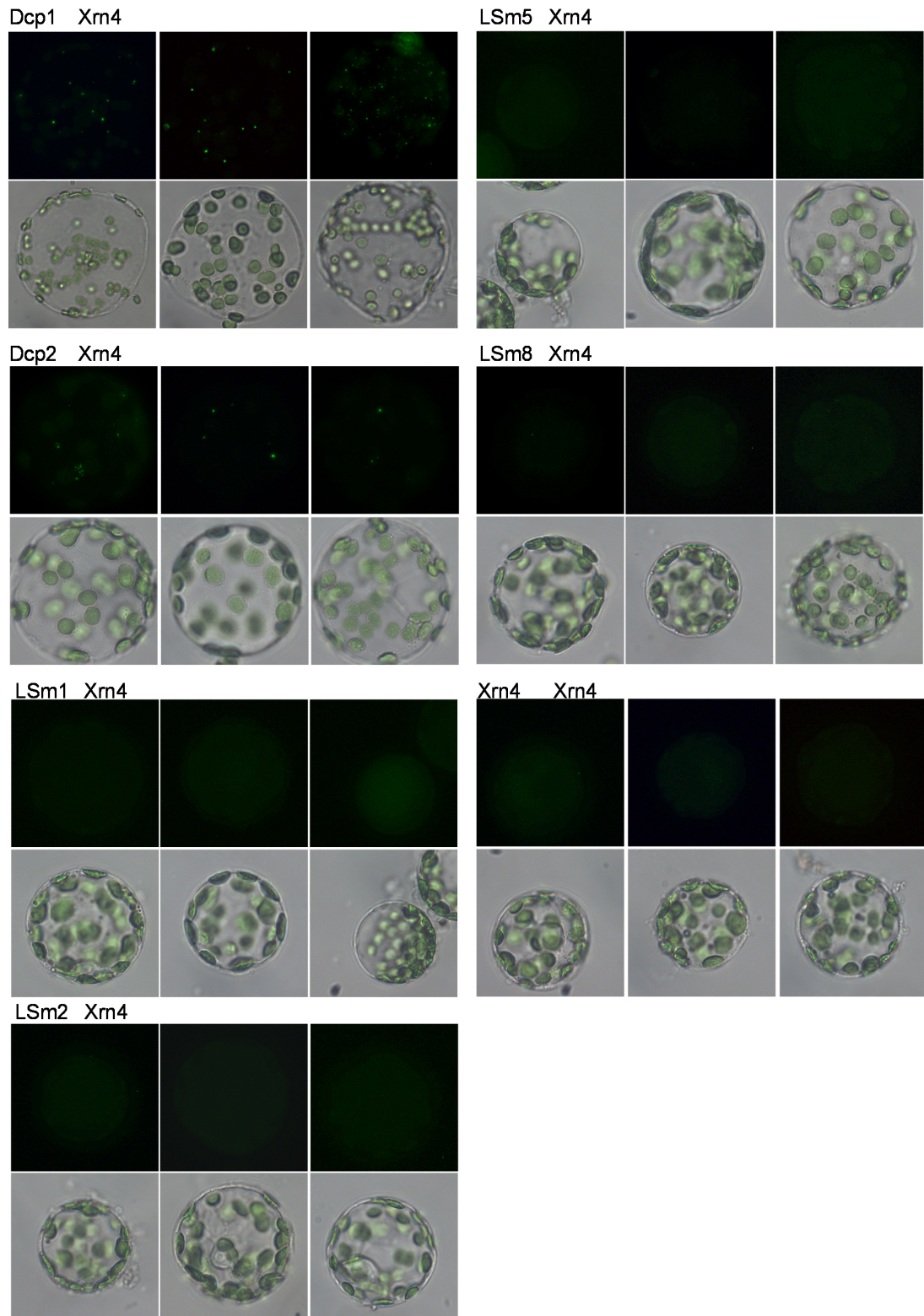


Abbildung B.3: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

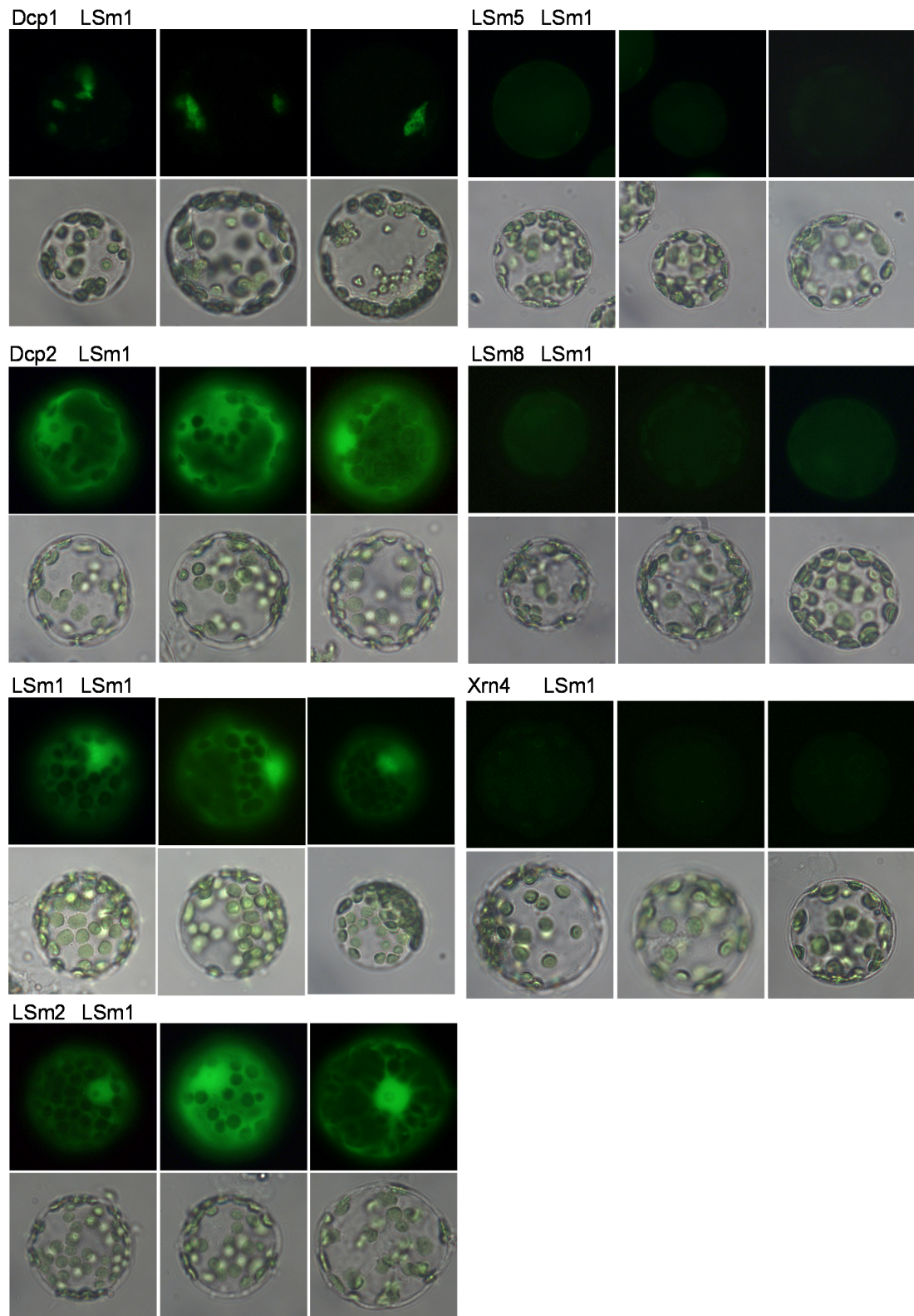


Abbildung B.4: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

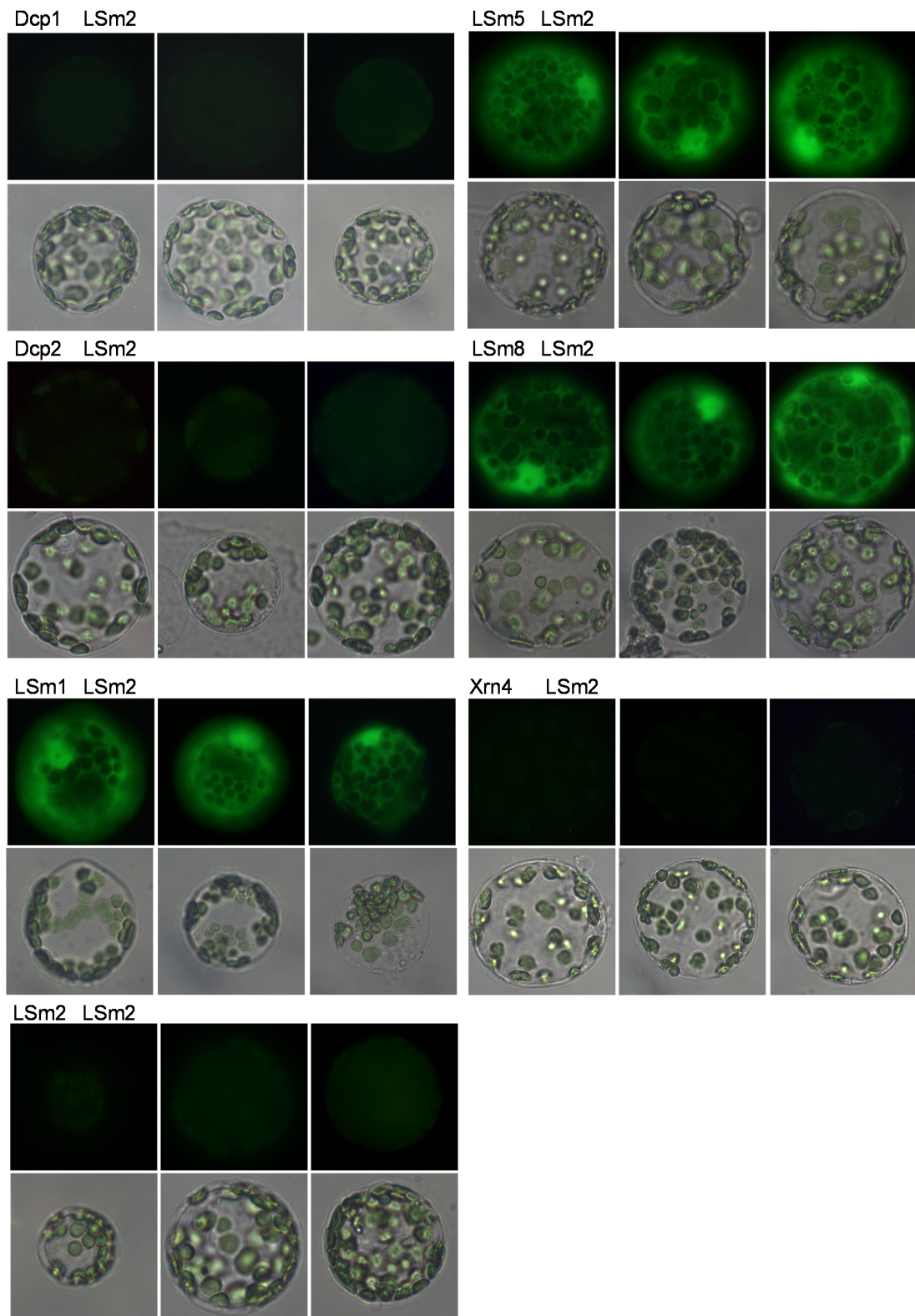


Abbildung B.5: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

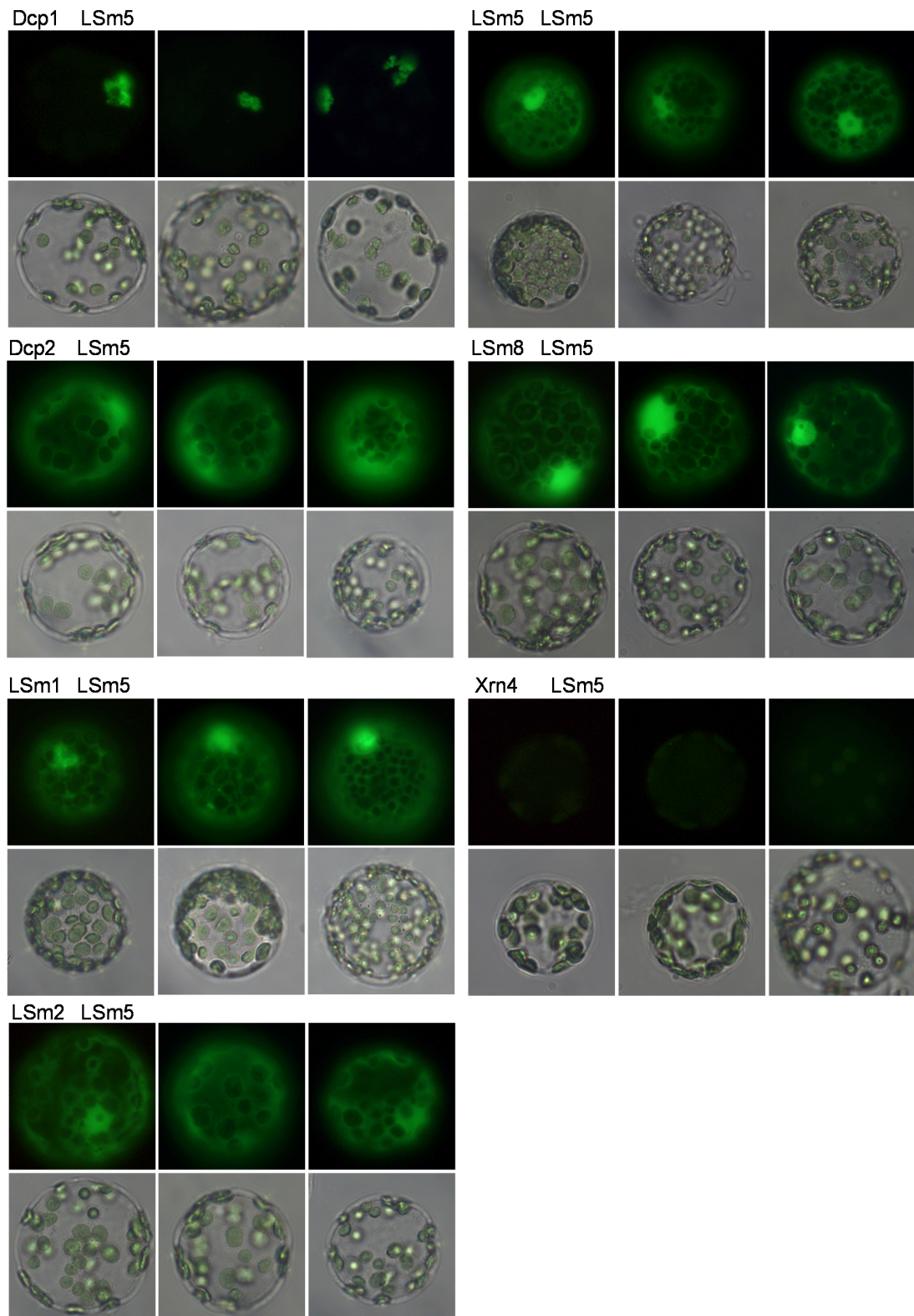


Abbildung B.6: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

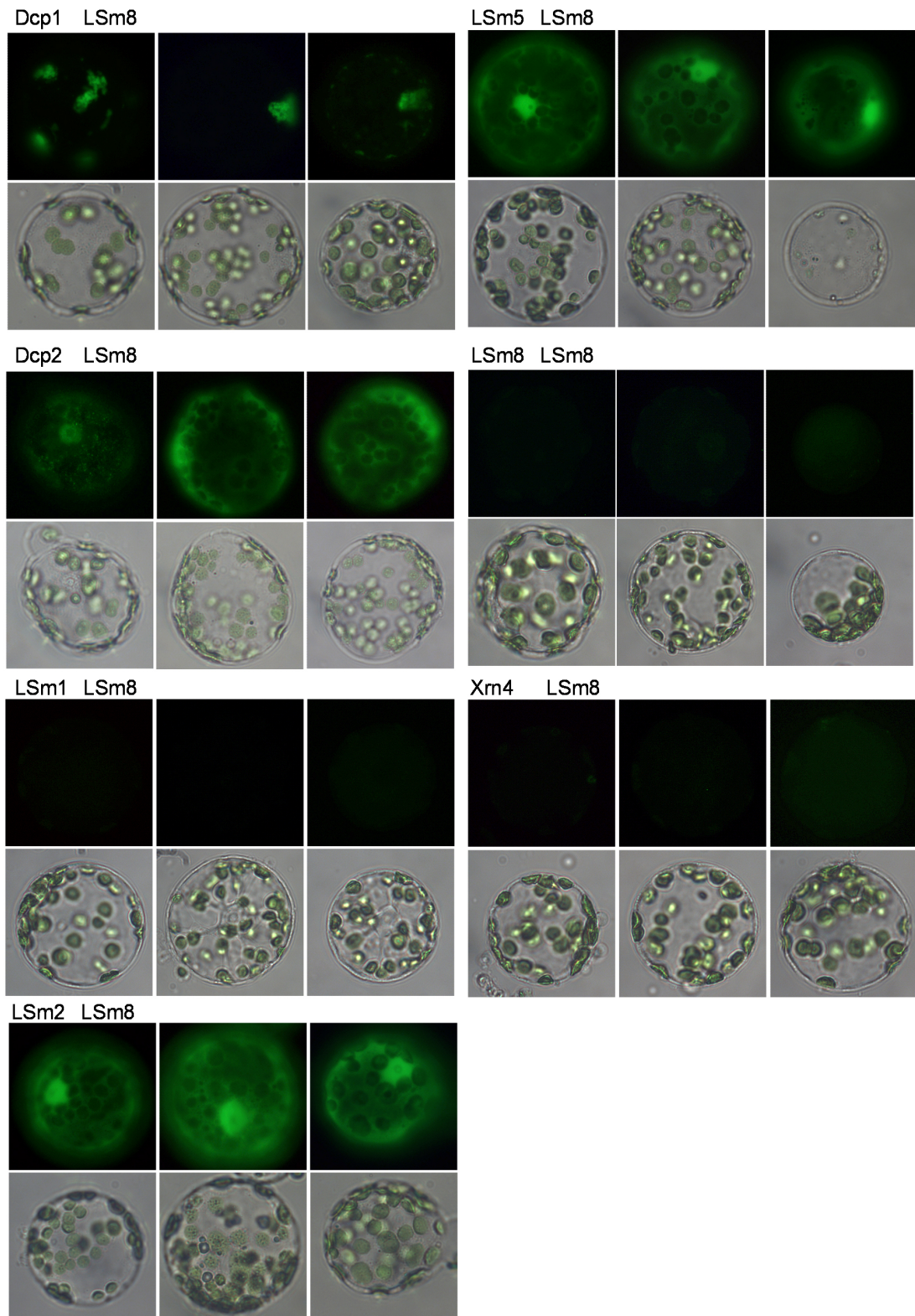


Abbildung B.7: Split YFP Analyse in Tabak Mesophyll Protoplasten. Erstes Protein = N-YFP; Zweites Protein = C-YFP. Siehe auch Abb. 3.9 und Tabelle 3.1.

Publikationen

1. **Weber, C. and Fauth, M.** (2007). Identification and characterisation of P-bodies in *Arabidopsis thaliana*. in preparation.
2. **Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S. Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., von Koskull-Doring, P.** (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**, 471-487.
3. **Port, M., Tripp, J., Zielinski, D., Weber, C., Heerklotz, D., Winkelhaus, S., Bublak, D., and Scharf, K.D.** (2004). Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol.* **135**, 1457-1470.
4. **Siddique, M., Port, M., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., Calligaris, R., Winkelhaus, S., and Scharf, K.D.** (2003). Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress & Chaperones* **8**, 381-394.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Lutz Nover, der mir die Durchführung dieser Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und mich jederzeit in meiner wissenschaftlichen Entwicklung unterstützt und gefördert hat. Weiterhin danke ich Jun. Prof. Dr. Pascal von Koskull-Döring für die Übernahme des Zweitgutachtens und sein für diese Arbeit aufgebrachtes Engagement. Dr. Klaus-Dieter Scharf möchte ich, stellvertretend für die gesamte Arbeitsgruppe, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die kritischen fachlichen Diskussionen danken. Ein weiteres Dankeschön gebührt Daniela Bublak, Gisela Englich und Elke Kiehlmann für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Markus Fauth für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und den gemeinsamen Spaß im Laboralltag bedanken. Er stand mir stets nicht nur mit wissenschaftlichen Ratschlägen zur Seite und hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Unterstützt wurden die experimentellen Arbeiten durch die exzellente Arbeit von Angelika Tintschl-Körbitzer. Auch ihr ein herzliches Dankeschön! Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen, Diplomanden und Studenten, insbesondere bei Sachin Kotak, Matthias Ganßmann, Joanna Tripp und Sören Alsheimer, bedanken. Heinz Schewe danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei Problemen am Elektronenmikroskop und CLSM.

Ein besonderer Dank gebührt auch Prof. Dr. Roy Parker (University of Arizona), der mir die Möglichkeit gab, in seinem Labor Erfahrungen zu sammeln. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Pam Green und Dr. Fred Souret (University of Delaware) für die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Persönlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder, Familie Lacalli und ganz besonders bei meiner Freundin Tina bedanken, die mich stets während aller Höhen und Tiefen meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 1. Februar 2007

Christian Weber

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

Identifizierung und Charakterisierung der mRNA processing bodies von *Arabidopsis thaliana*.

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 1. Februar 2007

Christian Weber

Curriculum Vitae

CURRICULUM VITAE

ANGABEN ZUR PERSON

Name WEBER, CHRISTIAN
Anschrift Hermann-Küster Straße 41
65931 Frankfurt
Staatsangehörigkeit Deutsch
Geburtsdaten 18. Juli 1977 in Frankfurt am Main

STUDIUM

Juni 2002 – Dezember 2006 **Promotion**
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Botanisches Institut, Abteilung Molekulare Zellbiologie
bei Prof. Dr. L. Nover
Dissertationsthema: *Identifizierung und Charakterisierung der mRNA processing bodies von Arabidopsis thaliana*

Februar 2004 – Juni 2004 **Auslandsaufenthalt**
University of Arizona, Tucson, Arizona, USA
Department of Molecular & Cellular Biology
Kollaboration im Rahmen der Promotion; Erlernung molekularbiologischer Methoden zur Untersuchung von mRNA abbauenden Enzymen an *Saccharomyces cerevisiae*

September 2001 – Juni 2002 **Diplomarbeit**
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Botanisches Institut, Abteilung Molekulare Zellbiologie
bei Prof. Dr. L. Nover
Diplomarbeitsthema: *Ultrastrukturanalyse von Aggregaten pflanzlicher Hitzestressproteine in Säugetierzellkulturen*
Erworbene Qualifikation: Diplom-Biologe

Oktober 1997 – August 2001 **Studium der Biologie**
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Studienschwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie, Neurobiologie

SCHULAUSBILDUNG

August 1994 – Juli 1997 Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt am Main
Hauptfächer: Biologie, Chemie
Erworbene Qualifikation: Allgemeine Hochschulreife

August 1988 – Juli 1994 Leibniz-Gymnasium, Frankfurt am Main

August 1984 – Juli 1988 Liederbacher Grundschule, Liederbach am Taunus