

# **Genetische Determinanten von kompartimenteller Inkompatibilität in Genom/Plastom-Artbastarden**

**Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-  
Universität München**

**vorgelegt von Christian Schmitz-Linneweber  
aus Haltern am See / Westfalen**

**27. Juli 2002**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhold G. Herrmann**

**2. Gutachter: Prof. Dr. W. Stephan**

**Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2002**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Genom/Plastom-Wechselwirkungen	6
1.1.1	Symbiose und Koevolution als Grundlage für die Interdependenz pflanzlicher Organellen	6
1.1.2	Interspezifische Hybridisierungen enthüllen Kern/Plastom-Inkompatibilitäten	9
1.2	Cytoplasmatische Hybriden (Cybriden)	10
1.3	Das plastidäre Chromosom	13
1.3.1	Plastidäre Sequenzen als Marker für Makro- und Mikrodiversität	14
1.3.2	Theorie des Mechanismus und mögliche plastidäre Determinanten von Genom/Plastom-Inkompatibilität	15
1.4	Plastidäre Genexpression	18
1.4.1	Plastidäre Transkription	18
1.4.2	RNA-Spleißen	22
1.4.3	RNA-Edierung	24
1.5	Das Kerngenom von Tabak	32
1.6	Zielsetzung	34
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>36</b>
2.1	Material	36
2.1.1	Chemikalien	36
2.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	36
2.1.3	Filter und Membranen	37
2.1.4	Radiochemikalien	37
2.1.5	Vektoren	37
2.1.6	Bakterienstämme	37
2.1.5	Restriktionsendonukleasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme	38
2.1.8	Pflanzenmaterial	38
2.1.9	DNA- und RNA-Längenstandards sowie Protein-Molekulargewichts-Standards	38
2.1.10	Gewebekulturmedien	39
2.1.11	Oligonukleotide	40
2.2	Methoden	42
2.2.1	Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	42
2.2.1.1	Standardverfahren zur Plasmidpräparation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	42
2.2.1.2	Extraktion von DNA	42
2.2.1.3	Extraktion von RNA	43
2.2.1.4	Restriktionsverdauung und Klonierung	43
2.2.1.4.1	Umwandlung kohäsiver in glatte Enden von DNA-Fragmenten	43
2.2.1.4.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	44
2.2.1.4.3	Ligation	44
2.2.1.4.4	Klonierung von PCR-Produkten	44

---

2.2.1.5	DNA-Sequenzierung und Analyse.....	44
2.2.1.5.1	Automatische DNA-Sequenzierung nach Sanger <i>et al.</i> (1977).....	44
2.2.1.5.2	Sequenzanalyse.....	45
2.2.1.6	cDNA-Synthese.....	46
2.2.1.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
2.2.1.7.1	Test von <i>E. coli</i> -Kolonien.....	47
2.2.1.7.2	Analyse von Tabak-Geweberevertanten ("grüne Gewebeflecken").....	47
2.2.1.8	Elektrophorese- und Transfertechniken von Nukleinsäuren.....	47
2.2.1.8.1	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	47
2.2.1.8.2	Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten in Polyacrylamidgelen ..	48
2.2.1.8.3	DNA-Transfer (Southern-Transfer).....	48
2.2.1.8.4	RNA-Agarosegelelektrophorese.....	49
2.2.1.8.5	RNA-Transfer (Northern-Transfer).....	49
2.2.1.8.6	Radioaktive <i>in vitro</i> -Transkription.....	49
2.2.1.8.7	Hybridisierung von Northern- und Southernfiltern mit radioaktiv markierten Sonden.....	50
2.2.1.8.8	Herstellung von " <i>macroarray</i> "-Nylonfiltern.....	50
2.2.1.8.8.1	Überimpfung von PCR-Amplifikaten auf Nylonfilter.....	50
2.2.1.8.8.2	Radioaktive Endmarkierung von zellulärer Gesamt-RNA.....	51
2.2.1.8.8.3	Filterhybridisierung.....	51
2.2.2	Methoden zur Analyse von Proteinen.....	51
2.2.2.1	Extraktion von Gesamtprotein aus Blattgewebe.....	51
2.2.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.2.2.3	Protein-Transfer auf Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membranen und Immunodetektion von Proteinen.....	53
2.2.2.3.1	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westerntransfer) im Halbtrockenverfahren.....	53
2.2.2.3.2	Immunodetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	53
2.2.3	Isolierung von Plastiden.....	54
2.2.4	Transformationsverfahren.....	54
2.2.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch CaCl <sub>2</sub> und Hitzeschock.....	54
2.2.4.1.1	Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone.....	55
2.2.4.2	Plastidentransformation.....	56
2.2.4.2.1	Transformation von Plastiden in isolierten Blättern.....	56
2.2.4.2.1.1	Präzipitation des Plasmidvektors auf die Goldpartikel.....	56
2.2.4.2.1.2	Balistischer Transfer der beladenen Goldpartikel in das Pflanzenmaterial.....	57
2.2.4.2.1.3	Selektion transplastomischer Pflanzenlinien.....	58
2.2.4.2.1.4	Test auf homoplastomisch transformierte Linien.....	58
2.2.4.2.2	Transformation von Plastiden in Cybridenregeneraten.....	59
2.2.5	Mikroskopie.....	59
2.2.5.1	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	59

---

2.2.5.2	Elektronenmikroskopie .....	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
3.1	Genom/Plastom-Inkompatibilität in Tabak/ <i>Atropa</i> -Cybriden .....	61
3.1.1	Sequenzierung des Plastidenchromosoms der Tollkirsche ( <i>Atropa belladonna</i> )....	61
3.1.2	Sequenzvergleich der Plastidenchromosomen von Tabak und <i>Atropa</i> .....	63
3.1.2.1	Vergleich kodierender Regionen .....	65
3.1.2.1.1	Insertionen/Deletionen (Indels) in kodierenden Regionen .....	65
3.1.2.1.2	Veränderungen in der Kodierung als Folge von Punktmutationen .....	68
3.1.2.1.3	Analyse von offenen Leserahmen unbekannter Funktion.....	72
3.1.2.1.4	Der RNA-Editotyp von <i>Atropa</i> im Vergleich zu dem von Tabak.....	77
3.1.2.1.5	Unterschiede in Intronen .....	79
3.1.2.2	Vergleich intergenischer Regionen .....	81
3.1.2.2.1	Promotoren.....	82
3.1.2.2.2	Für die Translation relevante Sequenzelemente .....	84
3.1.2.2.3	Prozessierungsstellen im 5'- und 3'-UTR plastidärer Transkripte.....	85
3.1.2.2.3.1	3'-UTR .....	86
3.1.2.2.3.2	5'-UTRs .....	88
3.1.2.2.4	Replikationsursprünge.....	89
3.2	Molekularbiologische Analyse der <i>Atropa belladonna</i> - ( <i>Nicotiana tabacum</i> )-Cybride .....	90
3.2.1	Strukturanalyse cybrider Plastiden im Vergleich mit den Chloroplasten der Eltern.....	90
3.2.2	Expressionsanalysen der Ab(Nt)-Cybride im Vergleich zum Tabak-WT .....	93
3.2.3	Western-Analysen plastidärer Proteine: Komponenten von Multiproteinkomplexen der Thylakoidmembran sind in der Albino-Cybride stark reduziert .....	93
3.2.4	"Macroarray"-Analysen plastidärer Transkripte.....	96
3.2.5	Northern-Analysen plastidärer Transkriptakkumulation .....	98
3.2.6	RNA-Spleißen.....	102
3.2.7	Analyse von RNA-Edierung an artspezifischen Stellen im heterologen Kernhintergrund der Ab(Nt)- bzw. Nt(Ab)-Cybriden .....	104
3.2.8	Transformation der Cybride.....	108
3.2.8.1	Transformation mit <i>aadA</i> als selektivem Marker an einer neutralen Insertionsstelle.....	108
3.2.8.2	Spektinomycin blockiert die Regeneration von Cybridenkalli .....	108
3.2.8.3	Vektorkonstruktion.....	109
3.2.8.4	Transformation .....	111
3.2.8.5	Transformation von Regeneraten ohne Selektion.....	111
3.2.8.6	Transformation mit <i>Atropa</i> -Edierungsstellen.....	114
3.2.9	Analyse "revertanter" grüner Punkte .....	115
3.2.9.1	UV-Mikroskopie und Ultrastruktur grüner Gewebeflecken .....	115
3.2.9.2	PCR-Analysen grüner Gewebeflecken.....	117

3.2.9.2.1	PCR von grünen Gewebeflecken zum Nachweis der Rekombination der <i>Atropa-rpoC2</i> -Sequenz in das Plastidenchromosom der Ab(Nt)-Cybride ...	117
3.2.9.2.2	PCR von grünen Gewebeflecken zum Nachweis des Austausches von artspezifischen Edierungsstellen.....	119
3.2.9.3	Regenerationsanalyse grüner Gewebeflecken .....	122
3.3	Spleißabhängiges, heterologes Edieren in Tabakplastiden .....	123
3.3.1	Konstruktion des Transformationsvektors .....	124
3.3.2	Integration der <i>ndhA</i> -1-Edierungsstelle aus Spinat in das Tabak-Plastidenchromosom und Isolierung von Transformanten.....	126
3.3.3	Prozessierung des exprimierten Transgens: Die Spinatedierungsstelle wird heterolog ediert, aber nur in intronfreien Transkripten .....	129
3.3.4	Expression des Transgens: Die eingebrachten Konstrukte pDIE und pCEE werden gleichstark exprimiert.....	130
3.4	Heterologes Edieren als Folge der Allotetraploidie von <i>N. tabacum</i> .....	131
3.4.1	<i>N. tomentosiformis</i> besitzt wie Spinat die Edierungsstelle <i>ndhA</i> -1 und prozessiert sie effizient.....	131
3.4.2	Warum in bisherigen Experimenten kein heterologes Edieren nachgewiesen werden konnte .....	133
3.4.3	Heterologes Edieren transplastomischer CEE-Pflanzen hat keinen Einfluss auf andere endogene Edierungsstellen.....	133
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>134</b>
4.1	Der Vergleich der Plastidenchromosomen von <i>Atropa belladonna</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> als Modell zum Studium von plastidärer Mikrodiversität .....	134
4.1.1	Hohe Konservierung regulatorischer Sequenzelemente.....	135
4.1.2	Einige Unterschiede in Intronen betreffen Sequenzelemente, die für das Spleißen von Bedeutung sind .....	137
4.1.3	Unterschiede in kodierenden Regionen sind selten und betreffen fast ausschließlich evolutiv variable Bereiche.....	137
4.1.4	Kodonsubstitutionen in höchstkonservierten Bereichen werden durch RNA-Edierung in Tabak entschärft.....	138
4.1.5	Artspezifische Edierung als Motor der Speziation.....	139
4.2	Die Prozessierung der <i>ndhA</i> -mRNA ist zeitlich streng reguliert.....	143
4.3	Unterschiede in RNA-Editotypen und RNA-Polymerasegenen als Determinanten von Genom/Pastom-Inkompatibilität in Ab(Nt)-Cybriden.....	145
4.3.1	Die Ab(Nt)-Cybride ist weder eine globale Translations- noch eine Importmutante, zeigt aber Defekte in der Proteinakkumulation .....	145
4.3.2	Störungen in der Interaktion von Sigmafaktoren mit dem Apoenzym der PEP in Ab(Nt)-Cybriden?.....	146
4.3.3	Trotz verschiedener Unterschiede in funktionell wichtigen Intronodomänen werden die betroffenen Transkripte in der Ab(Nt)-Cybride gespleißt.....	148
4.3.4	RNA-Edierungsdefekte in Cybriden als Teil von Kern/Plastom-Inkompatibilität ...	149

4.4	Heterologes RNA-Edieren in Cybriden und transplastomischen Pflanzen oder: Wie evolutionär stabil sind Edierungsfaktoren? .....	152
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>156</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>158</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>159</b>

# 1 Einleitung

Das charakteristische Organell der Pflanzenzelle ist die Plastide, die wie das Mitochondrium ein eigenes Genom, das Plastom, besitzt. Plastiden treten in Vielzellern, ausgehend von undifferenzierten Proplastiden, in unterschiedlichsten morphologischen Ausprägungen auf, unter anderem als Chromoplasten, Amyloplasten, Etioplasten, Elaioplasten oder Chloroplasten. Chloroplasten sind der Ort der Photosynthese, dem zentralen Prozeß für das photoautotrophe Wachstum, bei dem Lichtenergie in ATP und Redoxäquivalente (NADPH) an den Komplexen der Thylakoidmembran umgesetzt wird. Daneben finden in den Plastiden zahlreiche Reaktionen des Primär- und Sekundärstoffwechsels statt, die für die Pflanzenzelle insgesamt essentiell sind. Auf Grund dieser metabolischen Verschränkung von Cytoplasma und Plastide stellt sich die Frage nach der Einbettung des Organells in die Regelkreise und Signaltransduktionsketten der Pflanzenzelle (Herrmann 1997). Zudem ist nach wie vor offen, auf welche Weise die Information der Subgenome der Pflanzenzelle abgerufen wird, ein Vorgang, der ein hohes Maß an Koordination verlangt. Ein genetisch gesteuerter Informationsaustausch zwischen den drei Organellen Kern, Plastide und Mitochondrium muß dabei angenommen werden, ohne daß seine materielle Basis bekannt wäre.

## 1.1 Genom/Plastom-Wechselwirkungen

Pflanzliche Zellen tragen Erbinformation in drei durch Membranen voneinander getrennten Reaktionsräumen, dem Kern-Cytoplasma, dem Mitochondrium und der Plastide. Die drei Subgenome sind dabei nicht etwa diskrete evolutionäre Einheiten, sondern bilden einen gemeinsamen Angriffspunkt für jegliche selektive Kraft, d.h. Mutationen in nur einem Subgenom können sich auf das gesamte System auswirken (z.B. Herrmann und Possingham 1980; Hedtke *et al.* 1999; Whitney *et al.* 1999; Rodermeil 2001, Lam *et al.* 2001). Diese wechselseitige Abhängigkeit erklärt sich aus der Geschichte der eukaryotischen Pflanzenzelle, die laut Endosymbiosetheorie ursprünglich ein Zellaggregat war (Margulis 1971a und b).

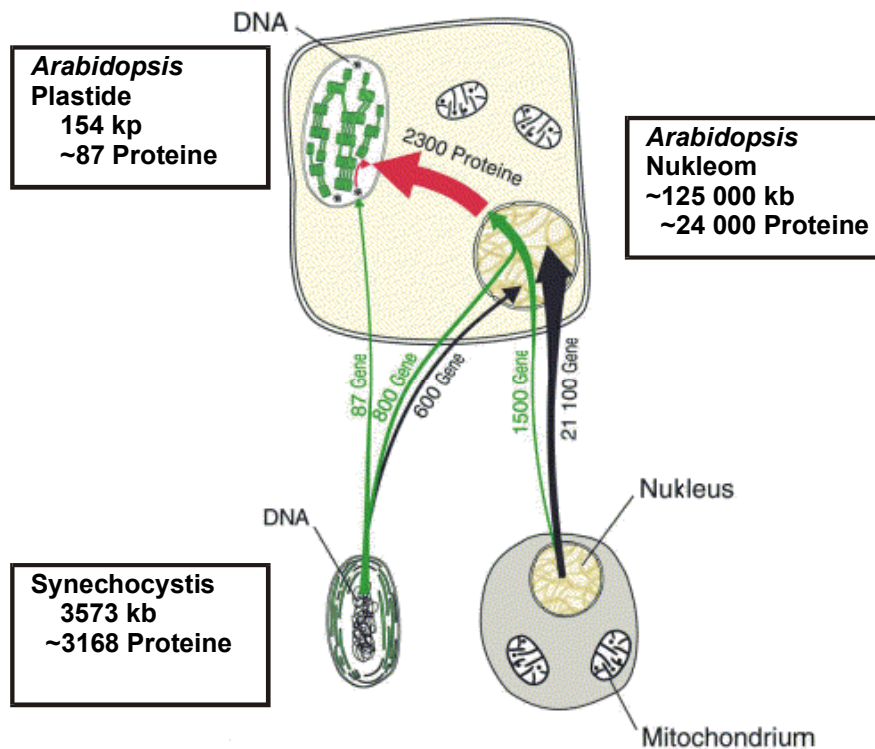
### 1.1.1 Symbiose und Koevolution als Grundlage für die Interdependenz pflanzlicher Organellen

Auf Grund von morphologischen und molekularen Vergleichen von rezenten Cyanobakterien und Chloroplasten geht man heute davon aus, daß eine



Endosymbiose einer eukaryotischen Zelle, die bereits einen mitochondrialen Vorläufer besaß, mit einem photosynthesekompetenten Bakterium vom Typ der heutigen Cyanobakterien zu dem heute dominierenden Reich von Organismen, den Pflanzen führte (McFadden 1999). Dieses Aggregat aus phylogenetisch und funktionell unterschiedlichen Zellen existierte zunächst sehr wahrscheinlich als Verbindung zweier autonomer Partner, änderte aber in der Folge seinen Charakter entscheidend. Haupttriebkraft dieser Umwandlung einer ehemals selbstständigen prokaryotischen Zelle zum heutigen Organell Plastide war eine massive Umstrukturierung genetischer Information, in die auch Kern und Mitochondrium miteinbezogen waren. Der photosynthetische Endosymbiont verlor einen Großteil seiner Erbsubstanz, die zum einen völlig aus dem System verschwand, zum anderen aber in nicht unbeträchtlichem Ausmaß in den Kern transferiert wurde (Herrmann 1997; Martin und Herrmann 1998). Auf diese Weise gelangten eine große Zahl von Genen in den Kern, die für das Funktionieren der Plastide, insbesondere der Photosynthese, unerlässlich waren (Martin *et al.* 1998). Die Produkte dieser Gene werden posttranslational in das Organell importiert und sind oftmals Bestandteile von Multiproteinkomplexen, wie beispielsweise dem Ribosom, den Komplexen des photosynthetischen Elektronentransportes, der Clp-Protease, oder des Enzymes der Kohlendioxidfixierung, der RuBisCO. Offensichtlich sind die Genome und infolgedessen die Proteome der einzelnen Kompartimente chimär. Dies läßt sich z.B. an Hand der vollständig sequenzierten Subgenome von *Arabidopsis thaliana* belegen (Abb. 1). In diesem System sind über *in silico*-Analysen der annotierten, für Proteine kodierenden Gene Vorhersagen für die Anteile an „cyanobakterieller“ Erbinformation im Kern gemacht worden (Martin und Herrmann 1998; Abdallah *et al.* 2000). Danach sind ein nicht unerheblicher Anteil dieser Gene in den Kern transferiert worden, wovon nur ein Teil für Proteine kodiert, die in das Organell zurückimportiert werden (etwa 800 von 1400 transferierten; Abb. 1). Dazu kommen noch Gene des mitochondrialen Vorläufers, die ein ähnliches Schicksal wie die plastidären erlitten und zum Mischcharakter der Kern-cytoplasmatischen und der Organellen-Proteome beigetragen haben.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß alle wichtigen metabolischen oder die Genexpression betreffenden Prozesse in der Plastide nur im Zusammenspiel mit nukleären Komponenten vollzogen werden können (Herrmann *et al.* 1992). Dies erfordert, daß nukleäre und plastidäre Erbinformation koordiniert exprimiert wird



**Abbildung 1: Evolution des plastidären Proteoms:** Gezeigt sind der Transfer von Genen innerhalb des Systems Pflanzenzelle seit dem ursprünglichen Endosymbioseereignis. Unten rechts: eukaryotische, bereits Mitochondrien besitzende Wirtszelle (Pfeile: Weg der Gene des ancestralen Cyanobakteriums und der Wirtszelle in die rezente Plastide [grün] bzw. den rezenten Zellkern [schwarz], bzw. von Proteinen des Zellkerns in die Plastide [rot]) Die Beschriftungen der Pfeile geben die geschätzte Zahl an transferierten Genen an. Diese Schätzungen basieren auf computergestützten Analysen von Homologien und des intrazellulären Zielorts der proteinkodierenden, annotierten Gene bzw. ihrer Produkte im *Arabidopsis thaliana*-Genom (verändert nach Abdallah *et al.* 2000).

(Rodermel *et al.* 1988; Goldschmidt-Clermont 1998; Brown *et al.* 2001). In mehrzelligen Organismen besteht zudem noch der Bedarf nach einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Genexpression. So stellen die diversen gewebeabhängigen Plastidenmetamorphosen sehr verschiedene Anforderungen an die Umsetzung sowohl plastidärer als auch nukleärer Erbinformation (z.B. Lawrence *et al.* 1997). Beispielsweise wird in Chloroplasten die Genexpression des Photosyntheseapparates angeschaltet, während in Leuko- oder Chromoplasten die Expression dieser Gene eine geringere Rolle spielt (Gamble und Mullet 1989; Isono *et al.* 1997a). Außerdem müssen Expressionsvorgänge von Genen photosynthetischer Funktion lichtabhängig in beiden Kompartimenten koordiniert werden, und dies oft gemäß einer strengen Stöchiometrie der durch sie kodierten Peptiduntereinheiten (Sasaki *et al.* 1985). Letztlich sind die Subgenome der Pflanzenzelle also in vielerlei Hinsicht voneinander abhängige und artspezifisch aufeinander eingespielte Partner, was in Anbetracht

einer Milliarden Jahre währenden Koevolution nicht allzu verwunderlich ist. Dies hat zur Folge, daß trotz einer morphologischen Gleichförmigkeit von Chloroplasten der Austausch dieser Organellen zwischen Arten oft problematisch oder sogar unmöglich ist.

### **1.1.2 Interspezifische Hybridisierungen enthüllen Kern/Plastom-Inkompatibilitäten**

Schon kurz nach der Entdeckung nicht-mendelnder Vererbungsvorgänge (Baur 1909) wurde erkannt, daß bei Kreuzungsexperimenten verschiedener *Oenothera*-Arten bereits die erste Filialgeneration Defekte in der Plastidenentwicklung zeigt, meist ein Ausbleichen von Blattgewebe (Renner 1934). Innerhalb dieses Formenkreises konnten nach umfassenden Kreuzungsexperimenten aus der Vertäglichkeit bestimmter Genom/Plastom-Kombinationen Plastomstammbäume entwickelt werden, die den zum Teil erheblichen morphologischen und physiologischen Auswirkungen von Genom/Plastom-Artbastarden Rechnung trugen, ohne auf molekulare Daten zurückgreifen zu können (Stubbe, 1959). Erst wesentlich später konnte festgestellt werden, daß die genetischen Unterschiede der Plastiden eine Entsprechung in den Restriktionsmustern der jeweiligen plastidären DNA (englisch: "deoxyribo-nucleic-acid") finden (Herrmann 1977; Herrmann und Possingham, 1980; Gordon *et al.* 1981; 1982). Schließlich zeigte die gelelektrophoretische Auftrennung von Thylakoidmembranproteinen verschiedener Artbastarde das Auftreten varianter Polypeptide mit kern- bzw plastomabhängigen Erbgängen (Herrmann *et al.* 1980), ein erster Hinweis auf molekulare Unterschiede im Zuge der Ausprägung von Inkompatibilität.

Neben Artbastarden in *Oenothera* sind auch Hybriden anderer Gattungen im Hinblick auf Kern/Plastom-Inkompatibilität untersucht worden (zusammengefasst in Kirk und Tilney-Bassett 1978), unter anderem bei *Trifolium* (Pandey *et al.* 1987, Przywara *et al.* 1989), *Pelargonium* (Metzlaff *et al.* 1982, Pohlheim 1986), *Impatiens* (Arisumi 1985) und *Zantedeschia* (Yao *et al.* 1994; 2000). Ähnlich wie in *Oenothera* zeigten diese zwischenartlichen Kreuzungen Bastardbleiche und Wachstumsverzögerungen. Bei genauerer Analyse der Plastiden stellte sich heraus, daß das innere Membransystem schwere Schäden aufwies oder sogar insgesamt fehlte (Przywara *et al.* 1989, Glick und Sears 1994; Yao *et al.* 2000). Im Fall von

*Zantedeschia* konnte genetisch gezeigt werden, daß Inkompatibilität auf der Kernseite ein polygenisches Phänomen ist (Yao *et al.* 2000). Die Determinanten sind jedoch nicht bekannt.

Der Artbastardisierung als Mittel zur Untersuchung von Inkompatibilität sind insgesamt enge Grenzen gesetzt, da die Kreuzbarkeit der Elternpflanzen eher selten gegeben ist. Einen Ausweg bietet die Cybridentechnik, die unter Umgehung sexueller Vorgänge Neukombinationen von artfremden Organellen auch aus weiteren Verwandtschaftskreisen ermöglicht.

## **1.2 Cytoplasmatische Hybriden (Cybriden)**

Der Vorgang der cytoplasmatischen Hybridisierung (Cybridisierung) bezeichnet eine künstliche Neukombination eines Kerngenoms mit Genomen von Mitochondrien und/oder Chloroplasten. In der klassischen Genetik wurden die Genome beider Organellen oft mit dem Begriff "Cytoplasma" bezeichnet. Cybriden sind auch von nicht-pflanzlichen Vielzellern bekannt. Beispielsweise wurden amitochondriaten Zellen des Menschen Mitochondrien verschiedener anderer Primaten eingepflanzt. Diese Cybriden zeigten erniedrigte Respirationsraten, abhängig von der phylogenetischen Distanz des verwendeten Mitochondriendonors (Kenyon und Moraes 1997). Dies unterstreicht die Allgemeingültigkeit von interorganellärer Coevolution. Im folgenden sollen nur plastidäre Cybriden (Medgyesy 1994) behandelt werden.

Etwa 75% der Pflanzenarten vererben ihre Plastiden uniparental (Hagemann 1992, Birky 1995; 2001). Dies ermöglicht, Cybridisierung über fortgesetzte Rückkreuzung des Plastidendonors mit dem Kerndonor zu erzielen (sog. Substitutionslinien), allerdings mit den bereits erwähnten Problemen bei sexuell inkompatiblen Arten. Anders verhält es sich bei der Cybridisierung über PEG-vermittelte Protoplastenfusion, die den direkten Cytoplasmatransfer auch zwischen nichtkreuzbaren Arten erlaubt. Dazu werden Protoplasten des Plastidendonors  $\gamma$ - oder Röntgenstrahlung ausgesetzt, um das meist diploide oder tetraploide Kerngenom vollständig zu inaktivieren, während das weitaus redundantere Plastom funktional bleibt (Menczel *et al.* 1982). Alternativ kann das Cytoplasma einer Art über (kernfreie) Mikroplasten in den Protoplasten einer anderen Art eingebracht werden,

so daß die Bestrahlung vermieden wird. Die bestrahlten Protoplasten/unbestrahlten Mikroplasten werden anschließend mit den Protoplasten des Kerndonors in der Gegenwart von PEG fusioniert. Rekombination zwischen den Plastidenchromosomen der beiden Fusionspartner findet dabei normalerweise nicht statt. Nur über einen starken Selektionsdruck gelang es bisher, eine solche Rekombination zu erzwingen (Medgyesy *et al.* 1985, Thanh und Medgyesy 1989). Im Gegensatz dazu fusionieren und rekombinieren Mitochondrien, bzw. deren Genome, sehr häufig (z.B. Nagy *et al.* 1981; Galun *et al.* 1982; Perl *et al.* 1991). Nach Fusion der Protoplasten wird auf eine Neukombination von Plastiden und Kernen selektioniert. Dazu verwendet man plastiden- und kernkodierte Antibiotikaresistenzen (Medgyesy *et al.* 1982; Cséplö *et al.* 1984) oder alternativ als Kerndonor eine plastidäre Albinomutante (Glimelius und Bonnet 1981; Medgyesy *et al.* 1985). Aus den Fusionsprodukten werden dann nur solche Kalli erfolgreich regenerieren, die die gewünschten Resistenzen besitzen und/oder autotroph zu wachsen in der Lage sind.

Unter Verwendung dieser oder einer ähnlichen Methodik gelang die Cybridisierung beispielsweise innerhalb der Gattungen *Nicotiana* (z.B. Belliard *et al.* 1978, Aviv *et al.* 1980, Menczel *et al.* 1982) und *Solanum* (Gressel *et al.* 1984). Viele dieser Cybriden ähneln stark dem Kerndonor oder sind gar nicht von ihm unterscheidbar (Medgyesy *et al.* 1982). Allerdings treten durchaus auch neue, aberrante Phänotypen auf, die von der Normogenese der Elternpflanzen abweichen. Die Defekte können subtil sein, wie beispielsweise ein verändertes Muster an Chlorophyll-bindenden Proteinen (Babiychuk *et al.* 1995), oder aber auch deutlicher sichtbar, wie ein allgemeines Ausbleichen der Pflanze (Menczel *et al.* 1986). Derartige Defekte in Cybriden, die offensichtlich von der jeweiligen Kombination von Organellen abhängen, werden unter dem Begriff der kompartimentellen genetischen Inkompatibilität zusammengefasst (Stubbe 1989) und sind schon länger von interspezifischen Kreuzungen bekannt (siehe Abschnitt 1.1). Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß die taxonomische Distanz der Eltern positiv mit der Schwere der Defekte in den Hybriden (Yao und Cohen 2000) und auch den Cybriden (Perl *et al.* 1991) korreliert. Dementsprechend sind intergenerische Cybriden, wie erstmals bei Brassicaceen beschrieben (Pelletier *et al.* 1984), oftmals wesentlich schwerer in ihrer Entwicklung betroffen als intragenerische (Übersicht bei Medgyesy 1994).

Ein besonderer Fall liegt bei Cybriden der Tollkirsche (*Atropa belladonna*) und des Tabaks (*Nicotiana tabacum*) vor, die im Labor von Prof. Y. Gleba (Kiew, Ukraine) ebenfalls mit der PEG-Methode, jedoch ohne die Einwirkung hochenergetischer Strahlung zustande kamen (Kushnir *et al.* 1987, 1991). Dabei basierte die Produktion der *Atropa(Nicotiana)* [kurz Ab(Nt); Plastidendonor immer in der Klammer]-Cybride auf selektierbaren plastidären, bzw. nukleären Resistenzen, während für die reverse *Nicotiana(Atropa)* [Nt(Ab)]-Kombination mit nichtphotosynthetischen (Tabak) bzw. nicht-teilungsfähigen (*Atropa*) Protoplasten und Selektion auf proliferierende grüne Kalli gearbeitet wurde (Experimente 1 und 2 in Tab. 1). Während die Kombination von Tabakkernen mit *Atropa* Plastiden [Nt(Ab)] zu autotrophen Pflanzen führt,

**Tabelle 1: Protoplastenfusionsexperimente zur Erstellung von *Atropa/Nicotiana*-Cybriden<sup>1</sup>**

Experiment	Verwendete Pflanzenlinie	Organellenkombination der Eltern	Relevante Phänotypen	Organellenkombination der Cybride	Phänotyp der Cybride	
1	<i>A. belladonna</i> Ab5 + <i>N. tabacum</i> SR-1	Ab(Ab) + Nt(Nt)	grün, Km <sup>r</sup> , St <sup>s</sup> + grün, Km <sup>s</sup> , Str <sup>r</sup>	→	Ab(Nt)	weiß, Km <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>
2	<i>N. tabacum</i> DSR + <i>A. belladonna</i> L WT	Nt(Nt) + Ab(Ab)	weiß + grün	→	Nt(Ab)	grün
3	<i>N. tabacum</i> A15 + Ab(Nt)-Cybride	Nt(Nt) + Ab(Nt)	weiß + weiß	→	Nt(Nt)	grün
4	Ab(Nt)-Cybride + Nt(Ab)-Cybride	Ab(Nt) + Nt(Ab)	weiß + grün	→	Ab(Ab)	grün

Km = Kanamycin; St = Streptomycin; r = resistent; s = sensitiv

<sup>1</sup> nach Kushnir *et al.* (1991)

die nur kleinere Defekte im Abbau von Proteinen der photosynthetischen Antennen (Kushnir *et al.* 1987, Babiychuk *et al.* 1995) und eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber Starklichtstreß zeigen (Peter *et al.* 1999), ist die reverse Kombination von Kern und Plastiden hochgradig inkompatibel: Ab(Nt)-Cybriden sind Chlorophylldefizient und somit obligat heterotroph. Die Pflanzen sind albinotisch und zeigen die typischen Merkmale des Kerndonors *Atropa*, wie Anthocyanakkumulation im Stengel und haarlose Blätter. Der Chromosomensatz ist mit  $2n = 72$  identisch mit dem von *Atropa* und auch die Morphologie der Chromosomen, sowie alle untersuchten Isozyme sind vom *Atropa*-Typ (Kushnir *et al.* 1991). Die Restriktionsmuster der beiden Plastidenchromsomen unterscheiden sich deutlich (Kushnir *et al.* 1991), so

daß über Restriktionsanalysen nachgewiesen werden konnte, daß keine Plastidenchromosomen von Tabak in diesen Pflanzen vorhanden sind, es sich also um eine echte Cybride handelt. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß nach dem Transfer der albinotischen Plastiden aus der Ab(Nt)-Cybride in einen Tabak-Kernhintergrund wieder eine Ergrünung erfolgte (Experiment 3 in Tab. 1). Der beobachtete Defekt in der Cybride beruht also tatsächlich auf einem gestörten Zusammenspiel der Tabakplastiden mit dem Kern von *Atropa* und ist nicht ein plastidenautonomer, irreversibler Schaden.

Analoge Untersuchungen der Genome wurden auch mit der Nt(Ab)-Cybride durchgeführt. Sie zeigten, daß auch dieses Material eine reine Neukombination elterlicher Organellen ist (Kushnir *et al.* 1987). Die *Atropa*-Plastide dieser Cybride kann ebenso wie die Plastide der Nt(Ab)-Cybride in ihren ursprünglichen Kernhintergrund zurückgebracht werden (Experiment 4 in Tab.1)

Kern/Plastom-Inkompatibilität zwischen diesen beiden Arten hat offenbar eine direktionale Komponente, da es entscheidend für die Ausbildung des Phänotyps ist, welcher Elter die Plastide und welcher den Kern stellt. Offenbar sind die Kerngenome der beiden Arten in unterschiedlicher Weise befähigt, die Unterschiede in den plastidären Chromosomen zu tolerieren. Es stellt sich die Frage, was die genetischen Determinanten von Inkompatibilität im allgemeinen, und im Fall der *Atropa/Nicotiana*-Cybriden im besonderen auf der Ebene der Plastide als auch auf der des Kerns sind. Da die Kerngenome beider Arten bisher wenig untersucht wurden und so gut wie gar keine Sequenzinformation vorliegt, ist es zunächst einfacher, sich dem Phänomen Inkompatibilität von der plastidären Seite, also vom wesentlich kleineren Genom zu nähern.

### **1.3 Das plastidäre Chromosom**

Im Anschluß an die Publikation der vollständigen Nukleotidsequenz des Plastidenchromosoms von Tabak (Shinozaki *et al.* 1986) und des Lebermooses *Marchantia* (Ogihara *et al.* 1986) sind eine Reihe weiterer Totalsequenzen plastidärer Chromosomen aus verschiedensten taxonomischen Gruppen des Pflanzenreichs veröffentlicht worden (zusammengefaßt auf [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/plastids\\_tax.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/plastids_tax.html)). Plastidenchromosomen liegen hochredundant vor, mit ungefähr 100 Kopien pro Chloroplast einer Mesophyllzelle und bis zu 10.000

Kopien pro Zelle insgesamt. Es handelt sich dabei um ringförmige DNA-Moleküle, die bei den Gefäßpflanzen je nach Art 120-160 kB groß sind und untereinander große Homologien aufweisen (Palmer 1991, Sugiura 1995). Charakteristisch ist eine ausgedehnte invertierte Repetition (*inverted repeat A* und *B*; IR<sub>A</sub> und IR<sub>B</sub>), die zwei nicht wiederholte Bereiche (*large* und *small single copy region*; LSC und SSC) voneinander trennt.

Plastidäre Chromosomen höherer Pflanzen tragen nur eine vergleichsweise geringe Anzahl an Genen (100 - 140), die funktionell hauptsächlich der Dekodierung des Chromosoms (Gene für RNA-Polymerasen, tRNAs, rRNAs, ribosomale Proteine) und der Photosynthese (Gene für die Reaktionszentren der Photosysteme I und II, Proteine des Elektronentransportes, ATP-Synthase) zuzuordnen sind. Daneben gibt es eine Reihe offener Leserahmen (*open reading frames*; ORFs und *hypothetical chloroplast reading frames*; *ycofs*), die möglicherweise für Polypeptide kodieren, deren Genprodukte jedoch bisher nicht identifiziert worden sind (Sugiura 1992). Nichtkodierende Bereiche stellen nur einen geringen Anteil der Gesamtsequenz, die Gene folgen einander unmittelbar oder überlappen in Einzelfällen sogar, so daß die intergenischen Sequenzabschnitte kurz sind oder fehlen (Shinozaki *et al.* 1986). Trotzdem ist der nichtkodierende Bereich des Chromosoms von enormer Wichtigkeit für die Umsetzung genischer Information, liegen doch hier viele Sequenzabschnitte, die für die Regulation der Genexpression von Bedeutung sind. So finden sich hier Promotoren für die Transkription (Allison 2000), Elemente im 5' und 3' untranslatierten Bereich (UTR), die für die Stabilität der RNAs wichtig sind, Erkennungsstellen für endonukleolytische Spaltungen der Primärtranskripte (Monde *et al.* 2000b) und translationsmodulierende Elemente (Zerges 2000).

Keiner der aufgeführten Prozesse kommt ohne die Beteiligung von nukleär kodierten Faktoren aus, die spezifisch plastidäre Sequenzelemente erkennen. Diese Sequenzen stellen deshalb Bindeglieder in der Kern/Plastiden-Interaktion dar, die mitbeteiligt an kompartimenteller Inkompatibilität in Hybriden und Cybriden sein können.

### **1.3.1 Plastidäre Sequenzen als Marker für Makro- und Mikrodiversität**

Sequenzvergleiche plastidärer Chromosomen haben gezeigt, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit alle Plastiden monophyletischen Ursprungs sind und sich von



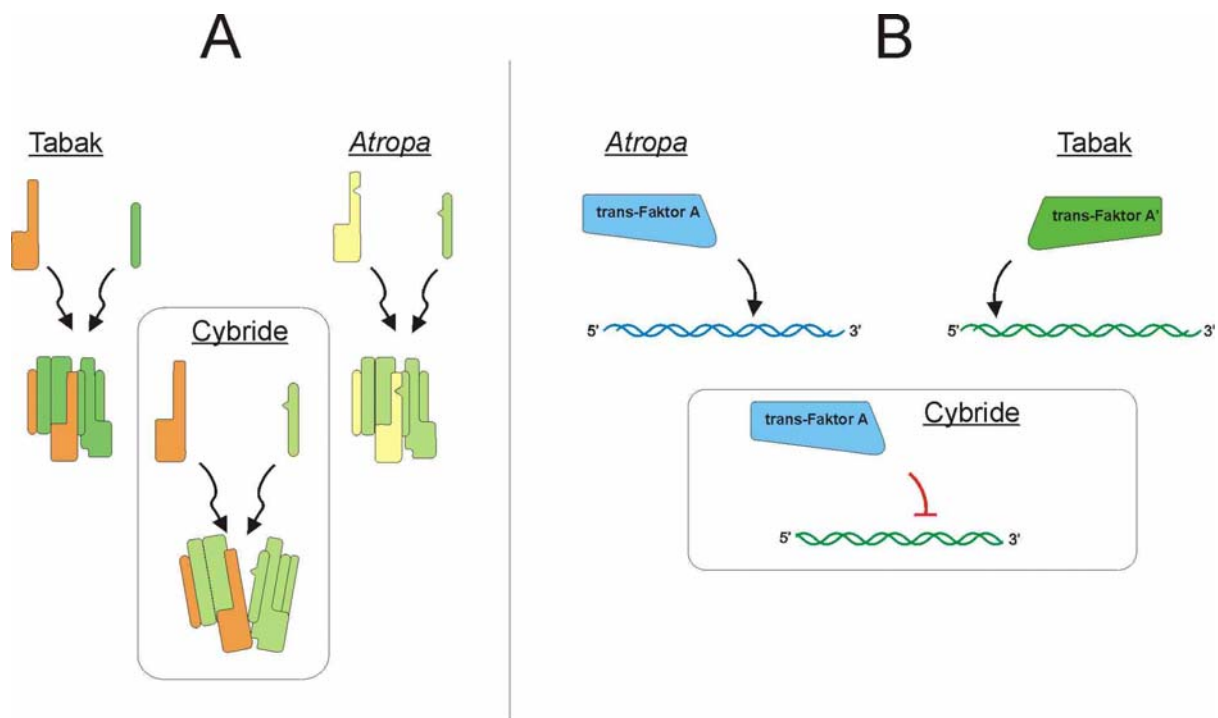
prokaryotischen Vorläufern herleiten (Martin *et al.* 1998; Bhattacharya und Medlin 1998; Gray 1999). Außerdem haben Vergleiche der Struktur plastidärer Chromosomen und der Sequenz konservierter Gene geholfen, den Ursprung der Landpflanzen genauer einzugrenzen (Turmel *et al.* 1999, Lemieux *et al.* 2000). Auch für die Auflösung engerer phyletischer Gruppen eignen sich plastidäre Sequenzen, beispielsweise die der rasch evolvierenden Gene *matK* (z.B. Mort *et al.* 2001, Soltis *et al.* 2001) und *ndhF* (z.B. Givnish *et al.* 2000). Andererseits fehlen Vergleiche ganzer Plastidenchromosomen in engen Formenkreisen beinahe völlig. Einzig die Sequenzen dreier Poaceen, von Reis (*Oryza sativa*), Mais (*Zea mais*) und Weizen (*Triticum aestivum*) sind vergleichend analysiert worden (Maier *et al.* 1995, Ogihara *et al.* 2001), wobei in diesen Arbeiten divergente Sequenzabschnitte eher im Hinblick auf mechanistische Fragen als auf Fragen der Mikrodiversität hin untersucht worden sind. Im Zusammenhang mit Kern/Plastom-Inkompatibilitäten ist es jedoch von elementarer Bedeutung, Unterschiede im Bereich von nah verwandten Arten oder sogar von Unterarten zu bestimmen, und deren Einfluß auf intrazelluläre Interaktionen zu klären. Voraussetzung für ein derartiges Vorgehen sind umfassende Sequenzdaten von solchen nahe verwandten Arten, die in hybriden oder cybriden Situationen Inkompatibilitäten zeigen.

### **1.3.2 Theorie des Mechanismus und mögliche plastidäre Determinanten von Genom/Plastom-Inkompatibilität**

Kern/Plastom-Inkompatibilität ist primär genetisch definiert worden, ohne daß bisher mechanistische Aspekte aufgeklärt wären (Stubbe 1989). Theoretisch können jedoch zwei wesentliche Formen von Interaktion unterschieden werden, die in inkompatiblen Situationen eine Rolle spielen: Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen.

Protein-Protein-Wechselwirkungen von kern- und plastomkodierten Untereinheiten finden beispielsweise immer dann statt, wenn genetisch chimäre, plastidäre Multiproteinkomplexe assembliert werden müssen. Akkumulieren nun nach der Trennung der phyletischen Linien zweier Arten Unterschiede in den interagierenden Peptiden, so kann das potentiell zu Fehlern im Zusammenbau und damit zur Beeinträchtigung oder sogar zum Verlust eines Multiproteinkomplexes führen (Abb. 2A). So besitzt eine aus plastidär kodierten Untereinheiten der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) und nukleär kodierten Untereinheiten von Tabak

zusammengesetzte RuBisCo im Vergleich zu den WT-Enzymkomplexen eine viermal geringere CO<sub>2</sub>-Umsatzrate (Kanevski *et al.* 1999).



**Abbildung 2: Zwei Modelle zum Mechanismus von Kern/Plastom-Inkompatibilität. (A)** Inkompatibilität als Folge von gestörten Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ein hypothetischer plastidärer Multiproteinkomplex wird aus plastidären (grün, hellgrün) und nukleären (orange, gelb) Untereinheiten assembliert. Die Divergenz der Untereinheiten ist durch Unterschiede in Farbe und Form dargestellt. In der Cybride kommt es daher zu Assemblierungsfehlern. **(B)** Inkompatibilität als Folge von gestörten Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen. Kernkodierte Transfaktoren binden spezifisch an plastidäre Nukleinsäuren (schwarze Pfeile). Der Divergenz in den Transfaktoren und den Zielsequenzen ist durch die Farbgebung Rechnung getragen. In der Cybride ist die Bindung der Kernfaktoren an die Plastidennukleinsäure gestört.

Auf der anderen Seite bilden Interaktionen von nukleär kodierten Peptiden und plastidären Nukleinsäuren - sowohl RNA- als auch DNA-Spezies - ebenfalls eine wichtige Schnittfläche im Zusammenspiel von Kern und Plastide (Abb. 2B). Beispielsweise müssen unterschiedliche Sequenzelemente einer RNA von nukleären Faktoren erkannt werden, um diese korrekt zu prozessieren (Rochaix 2001). Die Spezifität dieser Interaktionen ist oftmals sehr hoch, so daß in cybriden Situationen u.U. eine Erkennung der plastidären Sequenz durch die artfremde *trans*-Maschinerie nicht erfolgen kann. Für RNA-Edierung konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Erkennungssequenzen für nukleäre Faktoren einer Edierungsstelle der Schwarzkiefer, die nur in 4 von 30 Nukleotiden von der in Tabak abwich, nicht von der kernkodierten Edierungsmaschinerie von Tabak prozessiert wurde (Reed *et al.*,

2001).

Auch plastidäre DNA-Segmente wie z.B. Replikationsursprünge (Hornung *et al.* 1996, Kunnimalaiyaan und Nielsen 1997b) oder Promotoren, wie der sog. PC-Promotor des plastidären rRNA-Operons (Allison 2000) werden spezifisch von kernkodierten Faktoren erkannt. So wird das homologe DNA-Segment zum PC-Promotor aus Tabak von der Transkriptionsmaschinerie von *Arabidopsis thaliana* im transplastomischen Ansatz nicht erkannt, obwohl die Sequenzen aus den beiden Arten zu 85% identisch sind (Sriraman *et al.* 1998b).

Wie könnten Sequenzelemente plastidärer Chromosomen mit Relevanz für Kern/Plastom-Inkompatibilität aussehen? Drei wesentliche Anforderungen müssen erfüllt sein: (1) Zum einen sollten diese Elemente rasch evolvieren, oder zumindest so schnell, daß sich signifikante Unterschiede zwischen Arten, wenn nicht sogar zwischen Unterarten ergeben. (2) Zum anderen müssen Sequenzelemente betroffen sein, die Teil einer nukleo-plastidären Interaktion sind, sei es auf Nukleinsäure- oder auf Proteinebene. (3) Schließlich sollten diese Sequenzveränderungen von funktioneller Signifikanz sein, weil andernfalls keine phänotypische Ausprägung in hybriden oder cybriden Situationen zu erwarten ist.

Besonders kritisch für das reibungslose Funktionieren des Chloroplasten sind viele der plastidär kodierten Proteine und es ist bekannt, daß Defekte in diesen Proteinen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit des Organells führen können, nicht zuletzt, weil die Interaktion des betroffenen Proteins mit nukleären Komponenten gestört ist. Dies wurde beispielsweise für verschiedene Nullmutanten plastidär kodierter Untereinheiten von Thylakoidmembrankomplexen gezeigt, deren Fehlen zu einem Verlust von Teilen oder sogar des ganzen Komplexes führte (Ruf *et al.* 1997; Hager *et al.* 1999, Übersicht in Rochaix 1997). Der offensichtlichen funktionellen Signifikanz plastidärer Gene steht jedoch ihre meist sehr große evolutionäre Konservierung gegenüber (Palmer 1991), die es eher unwahrscheinlich macht, daß Unterschiede in engen Verwandtschaftskreisen auftreten und damit zu einer wesentlichen Ursache von Kern/Plastom-Inkompatibilität werden können.

Intergenische Regionen hingegen evolvieren schneller als die kodierenden Bereiche des plastidären Chromosoms (Shimada und Sugiura 1991; Gielly und Taberlet 1994; Maier *et al.* 1995). Allerdings sind die bisher beschriebenen funktional bedeutsamen Elemente, die sich innerhalb dieser Region befinden, wiederum recht gut konserviert (Christopher *et al.* 1992; Manen *et al.* 1994). Detaillierte Sequenzinformation plastidärer Chromosomen nahe verwandter Arten sollte Hinweise liefern, welche Regionen des Chromosoms als Determinanten genetischer Kern/Plastom-Inkompatibilität in Frage kommen.

#### **1.4 Plastidäre Genexpression**

Der genetische Apparat der Plastiden muß nicht nur Gene zur Biogenese des Chloroplasten, und hier vor allem der photosynthetischen Membranen, aktivieren, sondern ist auch ein wichtiges Instrument, um während der Entwicklung der Plastide und ihrer verschiedenen Formen (Proplastiden, Etioplasten, Elaioplasten, Chromoplasten, Amyloplasten u.a.) differenziell und als Antwort auf externe Faktoren, wie beispielsweise veränderte Lichtverhältnisse, die Abundanz spezifischer Genprodukte zu modulieren (Herrmann 1996). Als Teil ihres prokaryotischen Erbes sind Gene des plastidären Chromosoms in eine polycistronische Operonstruktur eingebettet, die nach der Transkription eine Vielzahl von Reifungsschritten nötig macht, um eine mature RNA bereitzustellen. So müssen viele Primärtranskripte intern geschnitten, extern zurechtgestutzt, gespleißt und ediert werden. Exzellente Übersichtsartikel zu verschiedenen Aspekten plastidärer Genexpression sind erschienen (Barkan und Goldschmidt-Clermont 2000, Allison 2000, Monde *et al.* 2000b, Zerges 2000, Bock 2000). Die folgenden Kapitel stellen einen Versuch dar, die für die vorliegende Arbeit relevanten Mechanismen plastidärer Genexpression kurz zusammenzufassen. Dabei wird auf Tabak als Versuchspflanze im besonderen eingegangen, da ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit den Vergleich von *Atropa* und Tabak betrifft, und Tabak auf Grund der Transformierbarkeit seiner Chloroplasten (Svab *et al.* 1990, Golds *et al.* 1993; Svab und Maliga 1993, O'Neill *et al.* 1993; Koop *et al.* 1996) als, zumindest das Plastidengenom betreffend, bestuntersuchte höhere Pflanze gelten kann.

##### **1.4.1 Plastidäre Transkription**

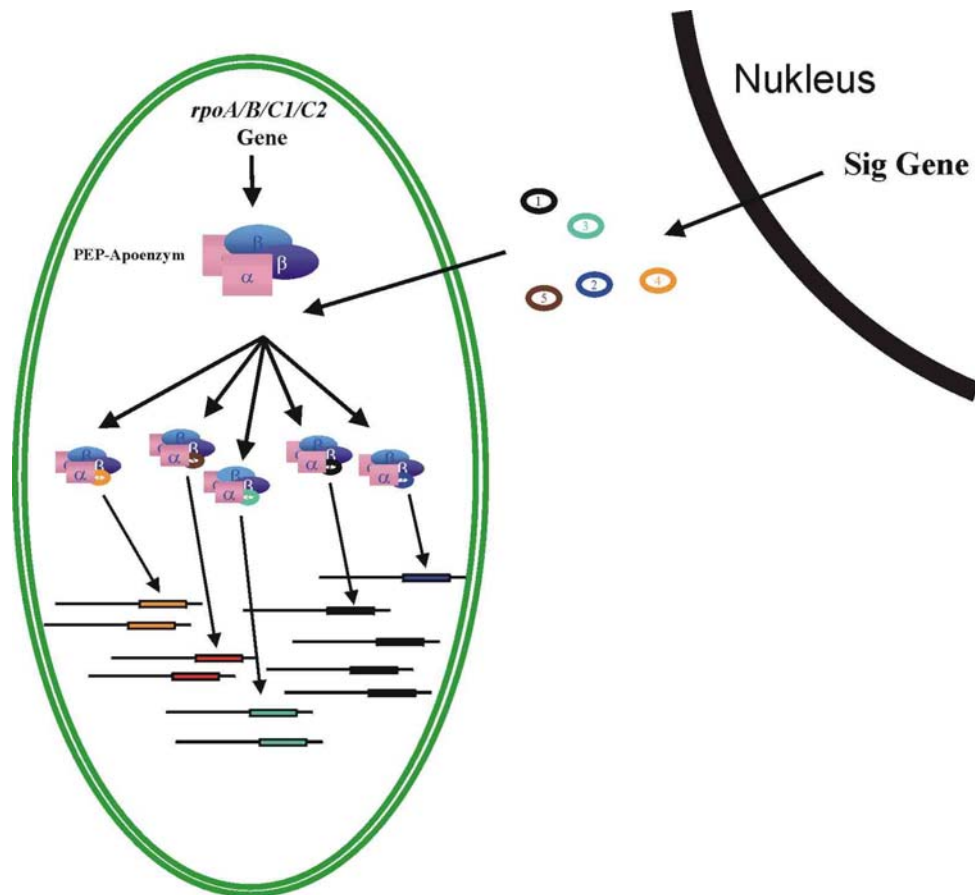
Die Transkription plastidärer Gene wird von mindestens drei RNA-Polymerasen getragen, zwei davon sind nukleär, die dritte ist plastidär kodiert. Eine

der nukleär kodierten RNA-Polymerasen (NEP für *nuclear encoded RNA polymerase*) ist verwandt mit gleichartigen Enzymen, die man in Bakteriophagen gefunden hat. Sie bilden eine kleine Genfamilie und bestehen wie das Phagenenzym jeweils nur aus einer Untereinheit (Weihe und Börner 1999) und werden durch die Gene *rpoT;2* und *rpoT;3* kodiert, wobei das Genprodukt von *rpoT;3* ausschließlich in den Chloroplasten, das von *rpoT;2* jedoch sowohl in Plastiden als auch in Mitochondrien importiert wird (Hedtke *et al.* 2000). Ein weiteres NEP-Enzym (*rpoT;1*) wird allein in die Mitochondrien importiert. Die dritte plastidär lokalisierte, ebenfalls nukleär kodierte RNA-Polymerase, transkribiert das 16S-rRNA Operon (Bligny *et al.* 2000). Das zugehörige Gen ist bisher nicht isoliert worden.

Im Gegensatz zu den kernkodierten ist das plastidär kodierte Enzym (PEP für *plastid encoded RNA polymerase*) eine typisch prokaryotische Hinterlassenschaft und ist als solches aus fünf Untereinheiten gemäß der Stöchiometrie  $\alpha_2\beta\beta'$  zusammengesetzt, die von den Genen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* kodiert werden (Igloi und Kössel 1992). Dieses Enzym besitzt, ganz wie sein eubakterielles Gegenstück, alleine nicht die Fähigkeit, korrekt an einem geeigneten Promotor Transkription zu initiieren, sondern benötigt dazu zumindest einen weiteren, sogenannten Sigmafaktor, um das aktive Holoenzym zu konstituieren. In der Tat sind mehrere Sigmafaktoren im vollständig sequenzierten Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* gefunden worden (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000), müssen also posttranslational in die Plastide importiert werden. Eubakterielle Sigmafaktoren interagieren mit den Kernuntereinheiten der RNA-Polymerase an unterschiedlichsten Stellen, wovon der wichtigste Anheftungspunkt auf der  $\beta'$ -Untereinheit liegt (Arthur und Burgess 1998; Arthur *et al.* 2000), deren homologe Region in Plastiden auf der  $\beta''$ -Untereinheit zu finden ist (Igloi und Kössel 1992). Die Interaktion ist mehrstufig und hat Rückwirkungen auf die DNA-Bindeigenschaften des Sigmafaktors (Young *et al.* 2001; Gruber *et al.* 2001).

Die einzige bisher beschriebene Null-Mutante eines plastidären Sigmafaktors (*sig2*) zeigt Defekte in der Transkription bestimmter Gene, die stark an die selektive Abhängigkeit prokaryotischer Operonen von Sigmafaktoren erinnern (Kanamura *et al.* 2001). Wie in Bakterien scheint jeder plastidäre Sigmafaktor nur eine Untergruppe aller Sigma-abhängigen Promotoren zu aktivieren, da in *sig2*-Mutanten nur ein Teil

der PEP-gesteuerten Transkriptionseinheiten ausfällt, nämlich gewisse tRNA-Gene, während andere Operons nicht betroffen sind (Kanamura *et al.* 2001). Möglicherweise spielt hier die Promotorstruktur bei der Interaktion mit unterschiedlichen Sigmafaktoren eine spezifitätvermittelnde Rolle (Abb. 3).



**Abbildung 3: Modell der PEP-abhängigen Transkription in Chloroplasten. Während die Peptide des Apoenzym im plastidären Chromosom kodiert werden (*rpoA* = Untereinheit  $\alpha$ , *rpoB* = Untereinheit  $\beta$ , *rpoC1* = Untereinheit  $\beta'$ , *rpoC2* = Untereinheit  $\beta''$ , Untereinheiten  $\beta'$  und  $\beta''$  sind in Prokaryoten auf einem Peptid vereint:  $\beta^3$ ), sind Sigmafaktoren (hier als 1 - 5 dargestellt) kernkodiert und werden posttranslational in den Chloroplasten (grün) importiert. Dort assemblieren sie mit den übrigen Untereinheiten zum Holoenzym. Es wurde vermutet, daß verschiedene Sigmafaktoren wie im prokaryotischen System verschiedene Promotoren (durch farbige Boxen dargestellt) erkennen.**

PEP-Promotoren entsprechen dem prokaryotischen Typus, besitzen also “-10“ (Pribnow- oder TATA-Box) und “-35“-Elemente. Allerdings ist der namensgebende Abstand dieser Elemente vom Transkriptionsstart in Plastiden weitestgehend aufgelöst und bisweilen fehlt diesen Promotoren eine typische “-35“ Box sogar völlig (Allison 2000). NEP-Promotoren sind ganz anders aufgebaut, mit einem zentralen YAT-Motiv, das wenige Bp stromauf der Transkriptionsinitiationsstelle liegt (Liere und Maliga 1999). Im Plastidenchromosom des Tabaks sind insgesamt 29

Transkriptionsstartpunkte beschrieben worden, wovon 16 zur Klasse der PEP- und 13 zur Klasse der NEP-Promotoren gehören. PEP-Promotoren finden sich vor den Genen *rbcl* (Orozco *et al.* 1990), *psbA* (Sugita und Sugiura 1984), *rpl32* (Vera *et al.* 1992), *psaA* (Meng *et al.* 1988), *rrn16* (Vera und Sugiura 1995), *trnG-UCC*, *psbK* (Meng *et al.* 1991), *psbD*, *psbC* (Yao *et al.* 1989), *clpP*, *atpH*, *atpI* (Hajdukiewicz *et al.* 1997; Miyagi *et al.* 1998), *atpE* (Kapoor *et al.* 1994), *trnE* (Ohme *et al.* 1985) und *atpB* (Kapoor *et al.* 1997). NEP-Promotoren sind stromaufwärts der Gene *rrn16* (Kapoor *et al.* 1997; Allison *et al.* 1996), *rpl32* (Vera *et al.* 1996), *atpB*, *accD*, *ycf2*, *ycf1*, *rps2*, *rpoB*, *rps16* (Hajdukiewicz *et al.* 1997), *atpI* (Miyagi *et al.* 1998) und *clpP* (Sriraman *et al.* 1998a) identifiziert worden.

Da zur Aktivierung beider Promotortypen nukleäre Faktoren nötig sind, stellen sie potentielle Kandidaten für Determinanten von Kern/Plastom-Inkompatibilität dar. Die physiologische Bedeutung des NEP/PEP-Systems ist bisher nicht geklärt. In Analogie zur Situation der Mitochondrien, in denen eine PEP fehlt, und die NEP allein transkriptionsaktiv ist, könnte man vermuten, dass sich die Plastide als jüngeres Organell in einer Art evolutionärem Übergangszustand zu einem rein NEP-getriebenen System befindet. Dies wird durch Sequenzarbeiten am Chondriom eines ursprünglichen Flagellaten (*Reclinomonas americana*) unterstützt, welches noch eine PEP kodiert, also wohl für den ursprünglichen Zustand eukaryotischer Mitochondriengenome stehen kann (Lang *et al.* 1997). An anderer Stelle ist hingegen die Vermutung geäußert worden, daß dieses duale Transkriptionssystem durchaus seinen Zweck hat und nicht allein "historisch" bedingt ist: Hajdukiewicz *et al.* (1997) fanden nach Deaktivierung der PEP in Tabak, daß in diesem Material hauptsächlich Transkripte von Genen des genetischen Apparates akkumulieren. Das aus diesen Daten abgeleitete Modell postuliert, daß die NEP in meristematischem Gewebe, also in Proplastiden, die Voraussetzungen für den Aufbau des genetischen Apparates, insbesondere der PEP, liefert, so daß die später im ergrünenden Chloroplasten von der PEP produzierten Transkripte rasch weiterverarbeitet, sprich translatiert werden können (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Diesem spekulativen Modell steht allerdings entgegen, daß es gelungen ist, ebenfalls basierend auf PEP-defizienten Pflanzen (De Santis-Maciossek *et al.* 1999), unter Zuhilfenahme von *run-on* Transkripten und *macroarrays* zu zeigen, daß die NEP sowohl als auch die PEP alle Gene des Plastidenchromosoms transkribiert (Krause *et al.* 2000), daß aber anscheinend

transkriptabhängige Abbauraten die Abundanz von NEP- im Vergleich zu PEP-Transkripten im stationären Zustand entscheidend beeinflussen können (Legen *et al.* im Druck). Dies hat zur Folge, daß in Northern-Analysen PEP-defizienten Materials für viele Gene keine Transkripte detektiert werden konnten (Hajduckiewicz *et al.* 1997).

#### 1.4.2 RNA-Spleißen

Eine Reihe plastidärer Gene sind durch nichtkodierende Bereiche unterbrochen, sogenannte Intronen, die posttranskriptional entfernt werden. Im Plastidenchromosom des Tabaks finden sich 21 Intronen in 18 Genen, die man an Hand ihrer Sekundärstruktur weiter unterscheidet. Nur eines der Tabakintronen, das in *trnL(UUA)*, gehört demnach zur Gruppe I, einer Klasse von Intronen, die man sonst überwiegend in Prokaryoten findet, während alle anderen plastidären Intronen der Gruppe II zugeordnet werden. Diesen Typ Intron, der nach seiner Feinstruktur in weitere Unterklassen eingeteilt ist (Gruppe IIA und IIB), findet man fast ausschließlich in Mitochondrien und Chloroplasten (Michel und Ferat 1995; Barkan und Goldschmidt-Clermond 2000).

Das Spleißen selbst ist ein zweischrittiger Prozeß, der durch eine Trans-Esterifizierung an der 5'-Spleißseite eingeleitet wird. Das resultierende Intermediat, ein 2'-5' verzweigtes Molekül, das Lariat genannt wird, findet man auch als Zwischenstufe des nukleären Spleißens. Deshalb und auf Grund anderer struktureller Ähnlichkeiten gelten Gruppe II-Intronen als potentielle Vorläufer für nukleäre Intronen (Bonen und Vogel, 2001). Besonders wichtige Sequenz- und Strukturelemente der Gruppe II-Intronen sind die Exonbindestellen 1 und 2 (EBS *exon binding site*), sowie die Domänen V und VI der sechs konservierten Introndomänen (Learn *et al.* 1992; Michel und Ferat 1995). EBS 1 und EBS 2, beide in Domäne I gelegen, interagieren über Watson-Crick-Basenpaarungen mit den letzten ca. 12 Basen des 5'-Exons, um eine korrekte Auswahl der 5'-Spleißstelle zu gewährleisten (Michel und Jaquier 1987). Domäne VI formt eine Stammschleifenstruktur, die nahe der 3'-Spleißstelle einen Adenosinrest im Stamm ungepaart läßt. Über die 2'-OH-Gruppe dieses Adenosins erfolgt der nukleophile Angriff auf die 5'-Spleißstelle und die anschließende Zyklisierung zum Lariat (Michel und Ferat 1995).

Spleißen von Gruppe II-Intronen ist ein autokatalytischer Vorgang, der *in vitro*



auch schon für plastidäre Intronen nachvollzogen worden ist (Rochaix 1996). *In vivo* jedoch sind Gruppe II-Intronen abhängig von Spleißfaktoren, von denen die meisten kernkodiert zu sein scheinen. So sind für das *psaA*-Gen von *Chlamydomonas reinhardtii* 14 nucleäre Loci identifiziert, die an Spleißvorgängen beteiligt sind (Goldschmidt-Clermond *et al.* 1990). *psaA* ist eines der wenigen plastidären Gene, die in *trans* gespleißt werden, deren Exonen also Teile verschiedener Operonen sind, wie z. B. auch das *rps12*-Gen von Tabak. Zudem ist ein Teil des Introns, *tscA* genannt, in *trans* kodiert (Goldschmidt-Clermond *et al.* 1991), so daß die große Zahl der beteiligten Loci möglicherweise die Komplexität gerade dieses *trans*-Spleißprozesses widerspiegelt, während *cis*-gespleißte Intronen weniger Faktoren bedürfen. Die Auflösung der Intronstruktur in eigenständige RNAs, wie z.B. *tscA*, ist eventuell ein weiteres Indiz für die Verwandtschaft zu nukleären Intronen, die ja von U-reichen snRNAs gespleißt werden (Bonen und Vogel 2001).

Von den für plastidäres Spleißen benötigten nukleären Faktoren, sind in höheren Pflanzen bisher nur zwei (in *Zea mays*) kloniert worden, *crs1* und *crs2* (Jenkins *et al.* 1997; Jenkins und Barkan 2001, Till *et al.* 2001). Die von diesen Genen kodierten Proteine sind am Spleißen von *atpF* (*crs1*) oder am Spleißen aller Gruppe IIB-Intronen (*crs2*) beteiligt und in RNA-Proteinkomplexen des Stromas enthalten, in denen man auch das/die Zielintronen nachweisen kann (Jenkins und Barkan 2001, Till *et al.* 2001).

Neben der Notwendigkeit nukleärer Spleißfaktoren gibt es auch Hinweise für eine Beteiligung von plastidären *trans*-Faktoren. So sind die ribosomenfreien Plastiden der Gerste-, bzw. der Maismutanten *albostrians* und *iojap* nicht in der Lage, verschiedene Intronen der Gruppe IIA zu spleißen (Hess *et al.* 1994; Hübschmann *et al.* 1996; Jenkins *et al.* 1997). Es scheint, daß diese Intronen ein plastidär kodiertes Peptid benötigen. Tatsächlich wurde im Plastidengenom innerhalb des *trnK*(UUU) Introns ein Leserahmen gefunden, der mitochondrialen Maturasen ähnelt, also Genen, die für das Spleißen in Mitochondrien essentiell sind (Neuhaus und Link 1987, Hess *et al.* 1994; Liere und Link, 1995). Ein direkter Nachweis der Beteiligung des Produkts dieses Maturase-ähnlichen Leserahmens am Spleißen fehlt jedoch bisher.

Es bleibt festzuhalten, daß unterschiedliche Gruppen von Intronen von unterschiedlichen Spleißfaktoren erkannt und prozessiert werden, daß also RNA-Struktur und *trans*-Faktoren aufeinander abgestimmt sind. Die Tatsache, daß ein Spinat-Intron nicht in *Chlamydomonas reinhardtii* gespleißt wird, legt nahe, daß Spleißvorgänge spezies-spezifische Charakteristika aufweisen (Deshpande *et al.* 1995). Intronen als Ziel nukleärer Spleißfaktoren können daher potentiell ebenfalls an der Ausbildung von Kern/Plastom-Inkompatibilitäten beteiligt sein.

### 1.4.3 RNA-Edierung

RNA-Edierung ist ein weitverbreitetes Phänomen, das zur Veränderung von Transkripten an definierten Positionen führt. RNA-Edierung wurde bisher nicht in Prokaryoten und einigen niederen Eukaryoten gefunden, erscheint aber sonst im Kerngenom der untersuchten höheren Eukaryoten und ist auch in deren Organellen anzutreffen (Tab. 2; Gott und Emeson 2000). Die Edierungssysteme in Chloroplasten und Mitochondrien zeigen deutliche Ähnlichkeiten und scheinen, ähnlich den NEP-Polymerasen, mechanistisch und evolutionär miteinander verwandt zu sein (Maier *et al.* 1996). In beiden Organellen führt Edierung zur posttranskriptionellen Veränderung von einzelnen Pyrimidinbasen. Dabei sind C-zu-U-Konversionen der dominierende Typus von Edierung in Mitochondrien (Covello und Gray 1989; Gualberto *et al.* 1989; Hiesel *et al.* 1989) und Chloroplasten (Hoch *et al.* 1991; Kudla *et al.* 1992). Zumeist sind die erste oder zweite Base eines Kodons betroffen, so daß während der Translation eine andere Aminosäure in das entstehende Peptid eingebaut wird als auf DNA-Ebene kodiert ist. Die in Folge von Edierung entstandenen Basenkonversionen stellen vornehmlich Basentriplets wieder her, die an der jeweiligen Position im Pflanzenreich hochkonservierte, und vor allem auch funktionell bedeutsame Aminosäuren kodieren. Findet keine Edierung statt, so hat der Einbau der genomisch kodierten Aminosäure in der Regel fatale Folgen für die Funktion des Peptides. So führt der Einbau des Serinkodons 26 ins *psbF*-Gen von Tabak, das in Spinat zu Phenylalanin ediert wird, zu einem mutanten Phänotyp, weil Tabak nicht in der Lage ist, dieses Kodon zu edieren (Bock *et al.* 1994). Ähnlich entscheidend für die Funktion von Cytochrom *b<sub>6</sub>* des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes der Thylakoidmembran ist eine Prolin-zu-Leucin-Konversion durch Edierung. Die Nichtedierung dieser Stelle verhindert den Zusammenbau des Gesamtkomplexes (Zito *et al.* 1997). Auch die *accD*-mRNA der Erbse muß ediert werden, um die enzymatische Aktivität der durch sie kodierten Acetyl-CoA Carboxylase zu

gewährleisten (Sasaki *et al.* 2001). Schließlich ist für die Edierung des *ndhD*-Startkodons von Tabak *in vitro* gezeigt worden, daß nur die edierte mRNA, also mit AUG-Startkodon, translatiert werden kann (Hirose und Sugiura 1997).

**Tabelle 2: Auswahl von Edierungstypen**

<b>Taxon*</b>	<b>Kompartiment</b>	<b>Edierungstyp</b>	<b>Betroffene RNAs</b>
<b>Kinetoplastide Protozoen (Trypanosoma, Leishmania)</b>	Kinetoplastide	<b>U Insertionen/Deletionen</b>	mRNAs
<b>Viren (Mumps, Masern, HIV, Ebola)</b>	Wirtscytoplasma	<b>G oder A Insertionen</b>	mRNAs
<b>Schleimpilze (Physarum)</b>	Mitochondrium	<b>Nukleotidinsertionen C zu U</b>	mRNAs, tRNAs, rRNAs
<b>Pflanzen (Moose, Farne, Gymno-, Angiospermen)</b>	Mitochondrium Plastide	<b>C zu U U zu C</b>	mRNAs, tRNAs mRNAs
<b>Mollusken (Schnecken)</b>	Mitochondrium	<b>A zu I</b>	tRNAs
<b>Insekten (Drosophila)</b>	Nukleus	<b>A zu I</b>	tRNAs
<b>Plazentalier (Mensch, Maus)</b>	Nukleus	<b>C zu U A zu I</b>	mRNAs
<b>Marsupialier (Opossum)</b>	Mitochondrium	<b>C zu U</b>	tRNAs

\*nach Gott und Emeson (2000)

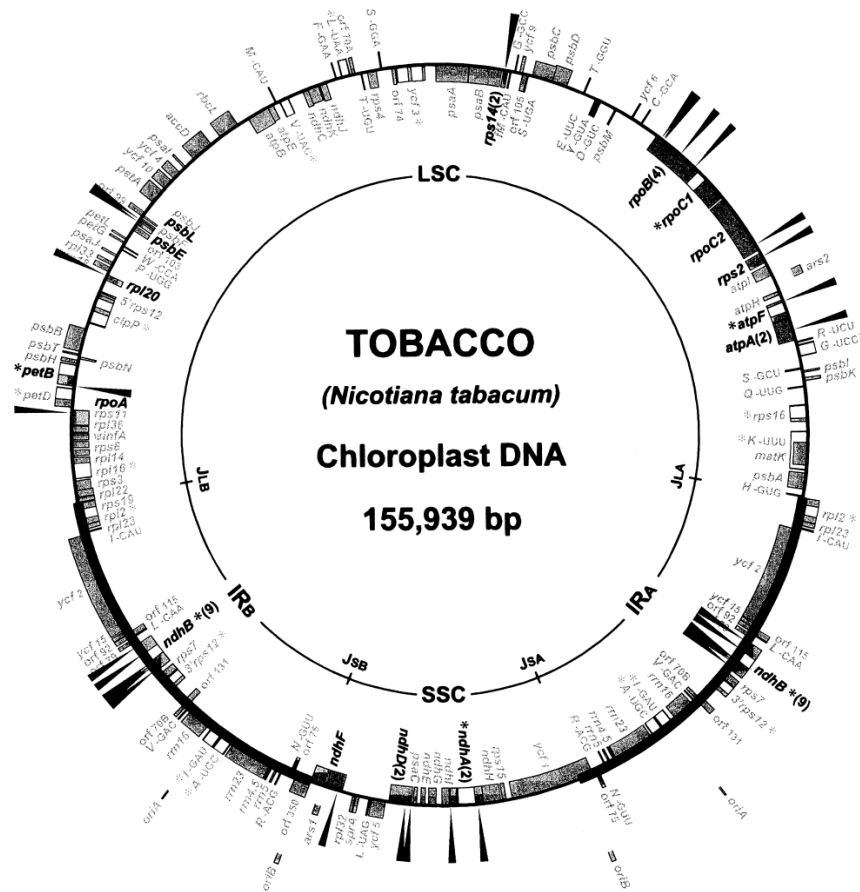
In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß, obwohl Edierung überwiegend interne Kodonen betrifft, doch in seltenen Fällen auch Startkodonen und Stoppkodonen betroffen sind (Hoch *et al.* 1991; Kudla *et al.* 1992, Neckermann *et al.* 1994; Wakasugi *et al.* 1996). Diese Edierungsereignisse sind natürlich von immenser Bedeutung für die Translation der mRNA und die Identität des Proteins überhaupt, da sich ohne das Konsensus-Start-, respektive Stoppkodon der N- bzw. C-Terminus des kodierten Peptids erheblich verändern kann.

Den beschriebenen, für die Proteinfunktion überaus wichtigen Edierungstellen

stehen allerdings auch Edierungsereignisse gegenüber, deren Einfluß auf das fertiggestellte Protein fragwürdig oder zumindest unklar ist. So gibt es Beispiele für die dritte Kodonposition betreffendes, sogenanntes stilles Edieren (Hirose *et al.* 1996) und für Edierung von nicht-kodierenden Bereichen, genauer im 5'-UTR von plastidären RNAs (Kudla und Bock 1999; Drescher *et al.* 2002). Außerdem ist eine Edierungsstelle im *rpoB*-Gen von Mais bekannt, die in den verwandten Arten Reis (*Oryza sativa*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) auch präsent ist, jedoch nicht prozessiert wird (Zeltz *et al.* 1996; Corneille *et al.*, 2000; Tab. 3). Offensichtlich ist das in Mais durch Edierung erzeugte Leucinkodon nicht essentiell für das Funktionieren des *rpoB*-Genproduktes.

Nur wenige Pflanzenarten sind bisher auf die Gesamtheit ihrer plastidären Edierungsstellen, den sogenannten Editotyp, hin untersucht worden. Der erste Editotyp kam durch den Vergleich aller konservierten Leserahmen von Mais mit den homologen Leserahmen von *Marchantia polymorpha* zustande (Maier *et al.* 1995). *M. polymorpha* ist ein Lebermoos, bei dem bisher keine Edierungskapazität festgestellt werden konnte. Zwischen Mais und *Marchantia* unterschiedliche Kodonen, die potentiell durch Edierung in Mais an die *Marchantia*-Sequenz angeglichen werden können, wurden auf cDNA-Ebene sequenziert. Auf diese Weise wurden 26 Edierungsstellen entdeckt (Maier *et al.* 1995, Tillich *et al.* 2001). Eine ähnlich angelegte Strategie wurde von Hirose *et al.* (1999) für Tabak und von Wakasugi *et al.* (1996) für *Pinus thunbergii* durchgeführt. Hier wurden 31 respektive 26 Edierungsstellen gefunden (Abb. 4). Basierend auf diesen Editotypen wurde auch nach Edierungsstellen in den Plastidenchromosomen von Reis und von *Arabidopsis* gesucht (Corneille *et al.* 2000; Lutz und Maliga 2001). Die auf diese Weise durchgeführte Suche vernachlässigt jedoch solche Stellen, die weder in Reis noch in Tabak vorkommen, also *Arabidopsis*- bzw. Reis-spezifisch sind, so daß die abgeleiteten Zahlen von 21 Stellen in Reis und 19 Stellen in *Arabidopsis* nur Minimalzahlen darstellen können.

Die Untersuchungen zum Editotyp verschiedener Pflanzen sind vor allem von einem evolutionären Standpunkt aus aufschlußreich, zeigen sie doch, daß sich Editotypen sehr deutlich unterscheiden können. So finden sich zwischen den beiden Gräsern Reis und Mais immerhin 8 Unterschiede und zwischen der Monokotyledone Mais und der Dikotyledone Tabak sind überhaupt nur noch 7 Stellen konserviert



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Tabakplastidenchromosoms mit eingezeichneten Edierungsstellen (Pfeile, weitere Symbole erläutert in Abb. 5). Nach Tzudzuki *et al.* (2001).**

(Corneille *et al.* 2000; Tzudzuki *et al.* 2001). Dies demonstriert, wie rasch Edierungsstellen evolvieren und wird bestätigt durch Arbeiten, die sich auf nur wenige Gene beschränkt, dafür aber um so mehr Arten in die Untersuchung miteinbezogen haben. So konnte gezeigt werden, daß sich Pflanzenarten verschiedenster phylogenetischer Linien sehr deutlich im Edierungsmuster des *ndhB*-Transkripts unterscheiden (Freyer *et al.* 1995; 1997). Ähnliche Beobachtungen wurden für die Edierung der *rpoB*- und *ndhA*-Transkripte gemacht (Zeltz *et al.* 1993, Legen *et al.* 2000). Selbst innerhalb der Poaceen divergiert das Edierungsmuster zwischen einzelnen Arten und im Vergleich von Mono- und Dikotyledonen finden sich mehr unterschiedliche als gemeinsame Edierungsstellen. Zwei Beispiele für die rasche Evolution von Edierungsstellen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Schließlich belegte eine detaillierte Analyse einer Reihe von mitochondrialen und plastidären Transkripten, daß Edierungsstellen genauso schnell evolvieren wie synonyme Kodonpositionen (Shields und Wolfe 1997). Danach wären

Edierungsstellen selektionsneutral und befänden sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen Entstehung per Mutation und Entfernung über Prozesse wie Genkonversion oder reverser Transkription und Rekombination edierter Transkripte (Covello und Gray 1993; Shields und Wolfe 1997).

**Tabelle 3: Divergenz im Edierungsmuster der Gene *ndhA* und *rpoB***

Gen	Stelle	Kodon	AS Austausch		<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Oryza sativa</i>
			von	zu					
<i>ndhA</i>	1	UC <b>G</b>	S	L			+	+	
	2	UC <b>A</b>	S	L	+	+			
	3	UC <b>A</b>	S	L			+	+	+
	4	UC <b>A</b>	S	L			+	+	+
	5	UC <b>C</b>	S	F		+	+	+	+
<i>rpoB</i>	1	UC <b>U</b>	S	F	+	+			
	2	UC <b>R</b>	S	L		+	+	+	+
	3	UC <b>A</b>	S	L	+	+	+	+	+
	4	UC <b>R</b>	S	L			+	+	+
	5	CC <b>G</b>	P	L			-	+	-
	6	UC <b>U</b>	S	F		+			

+ C-Rest vorhanden und auf RNA-Ebene ediert; - C-Rest vorhanden, aber nicht ediert; ediertes C fett und groß hervorgehoben

Der selektiven Neutralität von Edierung widersprechen allerdings einige wenige Untersuchungen, in denen Edierung als ein Mittel zur Regulation von Genexpression beschrieben wird. So wurde vermutet, daß die vom Entwicklungszustand der Plastiden abhängige partielle Edierung des *rpoA*-Transkripts zwei unterschiedliche Isoformen des kodierten Peptids mit unterschiedlicher physiologischer Relevanz in Plastiden zur Folge haben könnte (Hirose *et al.* 1999). Derartige Proteinisoformen als Folge partieller Edierung sind tatsächlich von Maismitochondrien bekannt (Lu *et al.* 1996) und erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß ein Edierungsereignis im *ndhB*-Transkript an die photosynthetische Aktivität des Organells gekoppelt ist (Karcher und Bock 2001). Möglicherweise werden unterschiedliche Isoformen dieses Proteins in photosynthetischem und nicht-photosynthetischem Gewebe, wie beispielsweise der Wurzel, gebraucht (Karcher und Bock 2001). Die Edierung derselben Stelle zeigt im Übrigen auch eine Abhängigkeit von plastidärer Translation, ohne daß dabei geklärt wäre, ob Ribosomen direkt oder indirekt über ein Translationsprodukt die Edierung beeinflussen (Karcher und Bock 1998).

Schließlich sei betont, daß grundsätzlich deutlich zwischen der selektiven Neutralität einer Stelle und der Bedeutung des Kodons für die Fitness der Pflanze unterschieden werden muß. Zwar mag es mit den oben erwähnten Ausnahmen in den meisten Fällen unerheblich sein, ob eine Pflanze ein bestimmtes Kodon durch Edierung erst erzeugen muss, oder ob dieses Kodon bereits auf DNA-Ebene vorhanden ist; dies sagt jedoch nichts über die Bedeutung des Kodons für die Funktion des Genproduktes aus. Im Einzelfall muß daher aus der Konservierung eines edierten Kodons und eventuell vorhandener struktureller Daten zur kodierten Aminosäure entschieden werden, ob Edierung einer Stelle von funktioneller Bedeutung ist oder nicht.

Möglicherweise hat die Edierung in einzelnen Fällen nicht nur Einfluß auf die Kodierung, sondern auch auf die Struktur einer RNA. So ist auf Grund von Computersimulationen vermutet worden, daß die Edierung im Mais *ndhG*-5'-UTR einen Einfluß auf eine die Translation unterstützende Stammschleifenstruktur der RNA hat (Drescher *et al.* 2002). In Gerste fanden del Campo *et al.* (2000), daß eine Edierungsstelle 12 Bp stromabwärts des Introns in ungespleißten Transkripten nicht ediert zu werden scheint, während andere Edierungsstellen im *ndhA*- und in anderen Genen desselben Primärtranskriptes auch im ungespleißten Zustand der mRNA ediert werden. Basierend auf computergenerierten Sekundärstrukturmodellen vermuteten die Autoren, daß die Edierung an dieser Stelle nur nach dem Spleißen erfolgen kann, da der resultierende U-Rest mit der Ausbildung der korrekten Intronstruktur interferieren würde. Dies wird unterstützt durch Klonierungsexperimente von RT-PCR Produkten ungespleißter Transkripte, die niemals ediert waren (Maier und Fuchs, persönliche Mitteilung). Die Korrelation von Edierung und Spleißen an dieser Stelle ist insofern überraschend, als daß Edierung in anderen intronhaltigen Transkripten wie dem des *petB*- und *ycf3*-Gens völlig unabhängig vom Spleißen ist (Freyer *et al.* 1993; Hirose *et al.* 1994; Ruf *et al.* 1994). Die „spleißabhängige“ Stelle in *ndhA* ist also von besonderer Bedeutung, weil es sich hierbei um das einzige Beispiel von Interdependenz der Edierung mit einem anderen RNA-Reifungsschritt in Plastiden handelt und zum anderen diese Stelle paradigmatisch für die Rolle von Edierung rein auf Nukleinsäureebene, losgelöst von der Kodierung sein könnte. Untersuchungen zur Edierung dieser *ndhA*-Stelle bilden daher einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Der Mechanismus der RNA-Edierung inklusive der beteiligten Faktoren liegt nach wie vor im Dunkeln. Biochemische Analysen in Pflanzenmitochondrien und Chloroplasten weisen auf eine stellenspezifische Cytosinde- oder transaminierung hin (Yu und Schuster 1995; Hirose und Sugiura 2001; Fuchs *et al.* 2001). Die unmittelbare Sequenzumgebung der bekannten Edierungsstellen zeigt keine konservierten Primär- oder Sekundärstruktur motive. Die *cis*-Determinanten für Edierung sind für einzelne Stellen *in vivo* und auch *in vitro* charakterisiert worden. So konnte für das erst durch Edierung entstehende AUG-Startkodon der *psbL*-mRNA in Tabak über einen transplastomischen Ansatz gezeigt werden, daß 22 Basen (-16 bis +5 relativ zur Edierungsstelle) hinreichend für Edierung sind (Chaudhuri *et al.* 1995; Chaudhuri und Maliga 1996). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Parallelstudie, in der gezeigt werden konnte, daß die essentiellen Elemente für die Edierung der Tabak-*ndhB*-Stelle IV sich in einem Bereich von -12 bis +2 befinden (Bock *et al.* 1996; Bock *et al.* 1997). Wie stringent die Erkennung der *cis*-Sequenzen ist, zeigte sich auch bei einer Stelle des Mais *rpoB* Gens. Eine einzelne Punktmutation 5' zu dieser Stelle blockierte die Edierung nahezu vollständig (Reed *et al.* 2001). Außerdem gibt es Hinweise, daß auch der Abstand des 5'-*cis*-Elements zur Edierungsstelle von Bedeutung ist (Hermann und Bock 1996). Die Erkennungselemente der Edierung befinden sich also 5' zur Stelle, möglicherweise durch einen wenige Nukleotide langen Abstandhalter von dieser getrennt. Diese *in vivo* gewonnenen Ergebnisse wurden vor kurzem über ein *in vitro*-Edierungssystem bestätigt (Hirose und Sugiura 2001).

Die *in trans* wirkenden Edierungsfaktoren sind aller Wahrscheinlichkeit nach im Zellkern kodiert, da es auf dem Plastidenchromsom so gut wie keine freie Kodierungskapazitäten mehr gibt und auch für die meisten hypothetischen Leserahmen (*ycf*) mittlerweile andere Funktionen charakterisiert wurden (z.B. Hager *et al.* 2000; Ruf *et al.* 2001; Swiatek *et al.* 2001). Direkte Hinweise zum Kodierungsort wurden über die Einbringung einer spinatspezifischen Stelle im *psbF* von Tabakplastiden und die anschließende Fusion mutanter Tabakprotoplasten mit WT Spinatprotoplasten gewonnen (Bock und Koop 1997). Obwohl Tabak nicht in der Lage ist, diese Stelle zu edieren, konnte in den Fusionsprodukten aus Tabak- und Spinatprotoplasten Edierung nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß Spinat im Gegensatz zu Tabak den/die nötigen Transfaktoren für die *psbF*-Stelle besitzt, was



wiederum nahelegt, daß jede Edierungsstelle ihren spezifischen Faktor besitzt, und daß die Faktoren nicht in der Plastide kodiert sind. Dementsprechend konnte auch eine in Tabakplastiden exprimierte maisspezifische Stelle im *rpoB*-Gen nicht prozessiert werden (Reed und Hanson 1997). Insgesamt gelang es bisher nicht, Edierung von Stellen nachzuweisen, die heterolog exprimiert wurden, also in einem plastidären Rezipienten, der die fremde Stelle eben nicht besaß. Daraus wurde geschlossen, daß Edierungsstelle und in *trans* kodierter Spezifitätsfaktor eine evolutionäre Einheit bilden (Bock 2000). Man würde daher vermuten, daß ein Gen für einen Edierungsfaktor rasch aus dem Kerngenom verschwindet, wenn die korrespondierende Stelle im Genom verloren geht.

Evidenz für die Stellenspezifität der Transfaktoren kommt von Experimenten, in denen eine endogene Stelle über Plastidentransformation an einer anderen chromosomalen Position überexprimiert wurde. Bei einer derartigen ektopischen Expression von Transgenen in Tabak, die die Stellen *psbL*, *ndhD* oder *rpoB* enthielten, kam es zu einer starken Reduktion der Edierung der endogenen homologen Stelle, jedoch keiner sonstigen untersuchten Stelle (Chaudhuri *et al.* 1995; Reed und Hanson 1997). Die Interpretation dieses Befundes war, daß die hohe Abundanz des vom Transgen stammenden Transkripts einen Faktor titriert, der auf Grund des Überangebotes an Zielsequenz die tabakendogenen Transkripte nicht mehr vollständig prozessieren konnte. Daß andere Edierungsstellen nicht betroffen waren, unterstützt die Annahme, daß *trans*-Faktoren streng stellenspezifisch sind. Dabei wirkt das C der Edierungsstelle selbst nicht als Erkennungsmerkmal der *cis*-Sequenz, da sowohl unedierte, als auch bereits edierte Transgene den Spezifitätsfaktor titrieren können (Reed *et al.* 2001).

Eine erhöhte Transkription und damit eine verstärkte Akkumulation eines Transkriptes kann nicht nur durch ein überexprimiertes Transgen, sondern auch durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur erzielt werden. So sind von 20°C auf 37°C gebrachte Maispflanzen 5 bis 10-mal transkriptionsaktiver als Kontrollpflanzen. Da gleichzeitig eine Verringerung der Edierung in ausgewählten Transkripten (*rps14* und *rpl20*) auftrat, wurde vermutet, daß hier, ähnlich wie im transgenen Ansatz, ein Überangebot an Matritze den Edierungsfaktor titriert hat (Nakajima und Mulligan 2001). Offensichtlich sind die Mengen an vorhandenem

Spezifitätsfaktor recht genau auf die Menge an Ziel-RNA abgestimmt.

Neben Evidenz zur Stellen- und Speziesspezifität gibt es seit kurzem auch direktere Hinweise auf die Natur der *trans*-Faktoren (Hirose und Sugiura, 2001). Aus anderen RNA-Edierungssystemen wie in Trypanosomen, bzw. Säugern war bekannt, daß Transfaktoren sowohl als kurze *guide*-RNAs (Estevez und Simpson 1999) als auch rein proteinogen (Chester *et al.* 2000) auftreten. Über ein *in vitro*-Edierungssystem konnte gezeigt werden, daß es sich bei den gesuchten plastidären Faktoren wohl nicht um RNAs handelt, da eine Behandlung des edierungsaktiven Extraktes mit *Micrococcus*-Nuclease keine Reduktion der Aktivität dieses Extraktes ergab (Hirose und Sugiura 2001). Auch Versuche, potentielle *guide*-RNAs mittels UV-Strahlung oder chemischen Agenzien mit dem Template zu vernetzen, schlugen fehl (Hirose und Sugiura 2001). Statt dessen gelang es, ein 25 kDa-Protein über UV-Vernetzungsexperimente zu detektieren, das an die *psbL-cis*-Sequenz bindet und nur von spezifischen, nicht jedoch unspezifischen Kompetitor-RNAs verdrängt werden kann. Ein zweites 31-kDa Protein bindet dagegen im *in vitro*-System an mehrere zu edierende RNAs. Seine Immunopräzipitation bringt die Edierungsaktivität des Extraktes zum Erliegen, so daß man schließen muss, daß dieses Protein ein genereller Edierungsfaktor ist (Hirose und Sugiura 2001).

Die Suche nach den *trans*-Faktoren ist sicher eine der drängendsten Aufgaben dieses Forschungsfeldes.

## 1.5 Das Kerngenom von Tabak

Tabak ist das Produkt einer Allopolyploidisierung, die etwa vor 6 Millionen Jahren stattgefunden hat (Okamura und Goldberg 1985). Der weibliche diploide Elter dieser Hybridisierung war ein Vorläufer des heutigen Waldtabaks (*Nicotiana sylvestris*, Olmstead und Palmer 1991; Bland *et al.* 1995), der auf Grund der uniparentalen Vererbung von Plastiden in der Gattung *Nicotiana* (Birky 1995) auch der Donor der Plastiden war. Auf der männlichen Seite ist eine ebenfalls diploide Art, die *N. tomentosiformis* nahe steht, der wahrscheinlichste zweite Partner dieser Verbindung (Kenton *et al.* 1993; Parokony und Kenton 1995; Lim *et al.* 2000b). Obwohl die heutige Chromosomenstruktur keine einfache Verdopplung der väterlichen und mütterlichen Erbgutsätze darstellt, sondern seit der Tetraploidisierung verschiedene Translokationen für eine Umorganisation der

Chromosomen gesorgt haben, sind die beiden elterlichen Sätze über *in situ* Hybridisierungstechniken deutlich zu unterscheiden (Parokony und Kenton 1995; Lim *et al.* 2000b).

Tatsächlich ist das Schicksal der parental Genome nach Allopolyploidisierung in verschiedenen Organismen recht genau untersucht worden (zusammengefasst in Comai 2000; Wendel 2000; Eckardt 2001). Dabei war von besonderem Interesse, was mit den durch die Polyploidisierung in überflüssiger Duplikation vorhandenen Genen geschehen ist. In Tabak gibt es recht viele Loci, bei denen beide parentale Kopien beibehalten wurden, wie z.B. bei Mitgliedern der  $\beta$  1-3-Glukanase-Genfamilie. In diesem Fall rekombinierten die beiden Sätze von parental Genen, so daß die Tabakglukanase-Sequenzen eine Mischung der elterlichen Sequenzen darstellen (Sperisen *et al.* 1991). Andere Genduplikate sind ohne irgendwelche Veränderungen beibehalten worden, wie die der Nitratreduktase (Vaucheret *et al.* 1989), des NEP-Enzyms (Hedtke *et al.* 2002) oder solche, die für Untereinheiten des Photosystems I kodieren (Obokata *et al.* 1993). Dazu gibt es Genpaare, die sich zwar nicht wesentlich in ihren Sequenzen verändert haben, deren Expressionsmuster sich jedoch deutlich unterscheidet, wie Endochitinasegene (van Buuren *et al.* 1992).

Einen wichtigen Einfluß auf die Entwicklung des Kerngenoms nach der Allotetraploidisierung haben auch die Organellen (Soltis und Soltis 1995). Untersuchungen an natürlichen und synthetischen Allotetraploiden der Gattung *Brassica* haben gezeigt, daß das nukleäre Genom dieser Pflanzen näher mit dem Elter verwandt ist, der die Quelle des Cytoplasmas war (Song *et al.* 1993; 1995). Parentales, und besonders paternales Erbgut kann innerhalb weniger Generation nach der Polyploidisierung verloren gehen oder stillgelegt werden (z.B. Gastony, 1991; Guo *et al.* 1996; Liu *et al.* 1998; Galitski *et al.* 1999; Lim *et al.* 2000a). Nur in seltenen Fällen setzt sich das väterliche auf Kosten des mütterlichen Erbgutes durch, wie für rDNA in Tabak gezeigt, die über Genkonversion fast ausschließlich vom paternalen, also *N. tomentosiformis*-Typ, ist (Borisjuk *et al.* 1997; Volkov *et al.* 1999; Lim *et al.* 2000b).

Das unterschiedliche Los parental Gene nach einer Allotetraploidisierung

reflektiert wahrscheinlich interne Vorgaben und Einschränkungen des neuen Genoms. Eine dieser Einschränkungen ist die Notwendigkeit, das nukleäre mit dem cytoplasmatischen Genom zu harmonisieren, eine von ihrer Komplexität nicht zu unterschätzende Aufgabe, ist doch hochgerechnet worden, daß 20 - 25% aller nukleären Gene eine Funktion in Bezug auf die Organellen erfüllen oder sogar in diese importiert werden (Herrmann 1997; Martin und Hermann 1998; Abdallah *et al.* 2000; The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000; Rujan und Martin 2001). So ist es durchaus vorstellbar, daß aus einer solchen Fülle von Genen in einer allotetraploiden Situation bei gleichzeitiger uniparentaler Vererbung der Organellen einige paternale Allele nicht mit dem maternalen Cytoplasma harmonisieren, oder daß durch die erhöhte Anzahl von Genen derselben Funktion Dosisprobleme auftreten. In Cybriden, die ihr Kerngenom von Tabak erhalten haben, muß die allotetraploide Natur des Kerngenoms in die Analyse miteinbezogen werden.

## **1.6 Zielsetzung**

Die faszinierende Tatsache, daß eukaryotische Zellen chimär sind, daß also ihr Erbgut zu einem beträchtlichen Anteil Information prokaryotischen Ursprungs enthält, wirft eine Reihe von Fragen auf (Herrmann 1997). Von besonderer Wichtigkeit erscheint dabei zu klären, wie prokaryotische Information und somit prokaryotische Eigenschaften und Möglichkeiten in die genetisch kompartimentierte Zelle integriert wurden. Der Verlust der Autonomie war anscheinend ein geringer Preis für alle beteiligten Organismen im Vergleich zu dem enormen Fitnessgewinn als Folge der Aquisition so potenter Mechanismen wie der Respiration und der Photosynthese.

Wie funktioniert also die Integration genetischer Potentiale der ursprünglichen drei Zellen mit dem heutigen Zellkern und den Organellen auf molekularer Ebene; wie interagieren die Subgenome der eukaryotischen, hier insbesondere der pflanzlichen Zelle? Um diese Interaktion zu untersuchen, bietet sich das Studium von Situationen an, in denen diese Wechselwirkung gestört ist. Cybriden stellen in dieser Hinsicht ein geeignetes Untersuchungsobjekt dar, weil sie zur Aufdeckung der Determinanten und Mechanismen von Kern/Plastom-Inkompatibilitäten dienen können.

Der offensichtliche Defekt in der Chloroplastenentwicklung der albinotischen

Ab(Nt)-Cybride sollte in dieser Arbeit mit molekularbiologischen und cytologischen Methoden untersucht werden. So sollte die Sequenzierung des Plastidenchromosoms von *Atropa* Aufschluss über die Unterschiede und somit möglichen plastidären Determinanten von Inkompatibilität liefern. Auf der anderen Seite sollten Untersuchungen der Expression des Tabakplastidenchromosoms im Kernhintergrund von *Atropa* zusammen mit ultrastrukturellen Analysen den Defekt weiter eingrenzen. Im Laufe der experimentellen Analysen stellte sich dann heraus, daß RNA-Edierung an Kern/Plastom-Inkompatibilität ursächlich beteiligt sein kann. Folgerichtig rückten Untersuchungen zu diesem molekularen Prozess in den Mittelpunkt dieser Arbeit, nicht zuletzt auch, weil RNA-Edierung rasch evolviert, weil sie auf Transfaktoren aus dem Kern angewiesen ist, und weil die durch sie verursachten Sequenzveränderungen von funktioneller Relevanz sind, also die drei Grundvoraussetzungen für eine Determinante von Inkompatibilität erfüllt sind (siehe Abschnitt 1.3.2).

Mit Hilfe der aus den molekularen Untersuchungen gewonnen Informationen sollte abschließend versucht werden, die weiße Cybride durch Plastidentransformation zu komplementieren.

In einer parallelen Versuchsreihe stand der Mechanismus und die Evolution plastidärer RNA-Edierung selbst im Mittelpunkt der Experimente. Über einen transgenen Ansatz sollte untersucht werden, in welcher kinetischen Beziehung die Edierung einer intronnahen Stelle des *ndhA*-Transkripts zum Spleißen derselben RNA steht. Dies sollte zum einen zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit RNA-Edierung mit anderen RNA-Reifungsschritten vernetzt sein kann und zum anderen helfen, die Evolution von Edierung im Vergleich zum Spleißen zu verstehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen.

Reagenz	Hersteller
Agarose (Seakem LE)	Biozym, Oldendorf
Ampicillin	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Na <sub>2</sub> -EDTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin	Sigma, München
Phenol/Chloroform, pH 6,7	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
NAA (1-Naphtylenessigsäure)	Sigma, München
BAP (6-Benzylaminopurin)	Sigma, München
Kinetin (6-Furfurylaminopurin)	Sigma, München
IAA (β-Indolylessigsäure)	Sigma, München
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Applichem, Darmstadt
MES (2-Morpholinoethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-Morpholinopropansulfon-säure)	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma, München
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Cumarinsäure	Sigma, München
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Lösungen und Puffer wurden ausnahmslos nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt.

20 x SSC
3,0 M NaCl
0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat
pH 7,0

**10 x TBE**

1,34 M Tris-HCl, pH 8,8  
 0,44 M Borsäure  
 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA

**ChurchHyb**

7% SDS  
 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2  
 1 mM EDTA

**DEAE-Elutionspuffer (NET-Puffer)**

1 M NaCl  
 0,5 mM EDTA  
 25 mM Tris-HCl, pH 8,0

**Waschpuffer für die Hybridisierung**

2 x SSC bis 0,2 x SSC  
 0,1% (w/v) SDS

**2.1.3 Filter und Membranen**

DE81-Membran	Whatman, Bruchsal
DEAE-Membran NA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond N	Amersham Pharmacia, Freiburg
Bio Trace NT 0,45 µm	PALL, Dreieich
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel

**2.1.4 Radiochemikalien**

[α-<sup>32</sup>P]-UTP (10mCi/ml; ~400Ci/mmol); Amersham Pharmacia, Freiburg

[γ-<sup>32</sup>P]-ATP (10mCi/ml; ~3000Ci/mmol); Amersham Pharmacia, Freiburg

**2.1.5 Vektoren**

pBluescript II SK (-) Amp<sup>r</sup>, lacZ'; f1ori; PT7; PT3; Stratagene, Heidelberg

**2.1.6 Bakterienstämme**

*E. coli* XL1-Blue MRF': D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1  
 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ DM15 Tn5 (Kanr)]; Stratagene, Heidelberg

### 2.1.7 Restriktionsendonukleasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen, wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), oder MBI Fermentas (Litauen) bezogen.

Enzym	Konzentration	Hersteller
Alkalische Phosphatase	1000 E/ml	Boehringer, Mannheim
DNase I	10 E/ml	Boehringer, Mannheim
Klenow-Polymerase	2000 E/ml	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	10 mg/ml	Promega, Mannheim
RNase A	5 mg/ml	Promega, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	5000 E/ml	Qiagen, Hilden
T4 DNA-Ligase	1000 E/ml	MBI Fermentas, Litauen
T7 RNA-Polymerase	50000 E/ml	NEB, Frankfurt
Reverse Transkriptase Superscript II	200 E/ml	GibCo, Eggenstein

### 2.1.8 Pflanzenmaterial

*Nicotiana tabacum* L.cv. Petit Havana

*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana; plastidäre Mutante: Disruption des Gens *rpoA* (De Santis-Maciossek *et al.* 1999)

*Atropa belladonna*: Linie Ab5; nukleäre Kanamycinresistenz (Kushnir *et al.* 1991)

*Atropa belladonna* (*Nicotiana tabacum*) Cybride Abw3: Nukleäre Linie Ab5 (Kushnir *et al.* 1991)

*Nicotiana tabacum* (*Atropa belladonna*) Cybride: Nukleäre Linie A-15 (Kushnir *et al.* 1987)

### 2.1.9 DNA- und RNA-Längenstandards sowie Protein-Molekulargewichts-Standards

DNA-Längenstandards wurden durch halbstündige Hydrolyse von genomischer DNA des Phagen Lambda (MBI Fermentas, Litauen) mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* selbst hergestellt (EK 100 ng/μl). Ein weiterer Längenstandard, die sog. 100 Bp-Leiter, wurde aus einer Mischung von 5 PCR-Produkten definierter Länge (100 Bp, 200 Bp, 300 Bp, 480 Bp und 600 Bp) hergestellt. Zusätzlich wurde eine vorgefertigte 1KB DNA-Leiter benutzt (GibCo BRL, Eggenheim).

Als RNA-Standard wurde eine 0,24 – 9,5 kB RNA Leiter (GibCo BRL, Eggenheim) verwendet. Zur Abschätzung der molekularen Masse von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen wurde ein vorgefärbter Standard verwendet, der „Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“ (BioRAD, München).



### 2.1.10 Gewebekulturmedien

Tabak-Wildtypsamen, sowie Samen von *Atropa* Ab5 wurden mit 2% Natriumhypochlorit sterilisiert und auf B5 Medium angezogen. Die  $\Delta rpoA$ -Pflanzen wurden über Stecklinge auf VBW Medium propagiert, ebenso die Cybride. Die Regeneration der Cybride erfolgte auf RMOP59 Medium, das ebenso wie das VBW Medium auf der Vorschrift von Murashige und Skoog (1962) basiert.

<b>Makrosalze</b>		
<b>Salz</b>	<b>B5 [mg/l]</b>	<b>MS [mg/l]</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		1650
KNO <sub>3</sub>	2500	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150	440
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	
EDTA Fe(III) Na-Salz	40	40

<b>Mikrosalze</b>		
<b>Salz</b>	<b>B5 [mg/l]</b>	<b>MS [mg/l]</b>
KJ	0,75	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	6,2
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10	22,3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025

<b>Vitamine und Kohlenstoffquelle</b>		
<b>Vitamin/ Zucker</b>	<b>B5 mg/l]</b>	<b>MS [mg/l]</b>
Inosit	100	100
Pyridoxin-HCl	1	0,5
Thiamin-HCl	10	0,1
Glycin		0,2
Nicotinsäure	1	0,5
Saccharose	30 000	30 000

VBW: Basierend auf den MS-Salzen enthält dieses Medium noch die Pflanzenhormone IAA (2mg/l) und Kinetin (0.2mg/l)

RMOP: Basierend auf den MS-Salzen enthält dieses Medium noch die Pflanzenhormone NAA (0,1 mg/l) und BAP (1,0 mg/l).

RMOP59: Basierend auf den MS-Salzen enthält dieses Medium noch die Pflanzenhormone NAA (0,01 mg/l) und BAP (0,5 mg/l).

### 2.1.11 Oligonukleotide

Die Ableitung von Oligonukleotiden erfolgte aus bekannten Sequenzen. Oligonukleotide wurden von verschiedenen Anbietern (Metabion GmbH, Martinsried; MWG-Biotech, Ebersberg) bezogen. Sie wurden in sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gelöst (Stammlösung mit 100 pmol/μl) und auf eine Endkonzentration von ca. 10 pmol/μl in der Arbeitslösung verdünnt.

Nachfolgend aufgelistet sind die Oligonukleotide, die zur Analyse der Tabak- und *Atropa*-Edierungsstellen verwendet wurden. Die Nomenklatur der Edierungsstellen folgt der nach Hirose *et al.* (1999), soweit nicht anders im Text vermerkt.

Edierungsstelle	Oligonukleotid	Sequenz (5' -> 3')
rpoA	AT7rpoA ArpoA	GTAATACGACTCACTATAGGGATTCAAAGGTCCAACAATGT GGATTACAAATAGAGAGAAAT
rpoB-1;2;3	rpoBfor rpoBrev3	AGGATTTTGTAGGTTTCATTG AGGATAGCAAACATTCTCTAA
rpoB-4	rpoBfor2 rpoCb5	TCTTTTAGCAGGTAATGGAG CTGCATTTTCATATTTCCGT
rpoB-5	rpoBfor3 rpoCb4	GGGTTATTGATGTGAGGTGG GGTCAAATACCCATGGATT
rpoC1	rpoB3'for AT7rpoC1	CTCGTTTCGAGAACTACGATC GTAATACGACTCACTATAGGGCAGTATACTAGGCCTTCTAA
rpoC2	ArpoC2 AT7rpoC2	AGCTAAGCCTTATTTGGCCAC GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGCTTCAGATATGAAACTTTG
rps2	Arps2 AT7rps2	GTCATGGTACTAGGAAATGG GTAATACGACTCACTATAGGGATTGAGGATATGGCGTCAT
rps14	Ecorps14for Ecorps14rev	TTCCAGAATTCAGGAATTCACCATTATGGC TTCCAGAATTCCAAAGTCTCGATAGTTAGC
rpl20	rpl20rev3 Arpl20	ATTTAAATTATTCTGGTGG GGGATATATAGCTCGGAGAC
atpA	EcoatpAfor EcoatpArev	TTCCAGAATTCACATTACAATACCTTGGTCC TTCCAGAATTCCTTCCAAAAGCGTGAATGC
atpF	AatpF AT7atpF	TTCGTTTTCTTTGGCCACTG GTAATACGACTCACTATAGGGCTAATGGTACGTAATGTAAGTCT
psbE	ApsbE AT7psbE	AAGCACAGGAGAACGTTTCGT GATAATACGACTCACTATAGGGATCTACTAAATTCATCGAGTT
psbL	ApsbF AT7psbL	GCCCTAATGACTATAGATCG GATAATACGACTCACTATAGGGTCTTAATTGAAGAAATAATTGGA
petB	petBSallrev ApetB	TTTTTCGTCGACCTATAAAGGCCAGAAATAC ATATGATTGGTTCGAAGAACC
ndhA-1;2	ndhAfor HindTomndhAex2rev	ACAGGAGATACTCGTTTATT CTTTCCAAAGCTTCACACTCGGCTAGAGAA
ndhA-3	ndhA3'rev ndhA3'for	CTTGTTTGAGACAAGTCGTG TTTTTGTTTCATTCCTATTGC
ndhB-1;2	P13 ndhBfor2	TATACATTTGTGTATTGATA TCATGATCTGGCATGTACAG
ndhB-3;4;5;6;7;8	nb11 P12	TTCATGCTTGTTTGAGTAATAGC GGTCTAATGAGGCTACTATG
ndhB-9	ndhBrev2 AndhB	CTAAAAAGGCTATCCTGAGC GTCGTTGCTTTTCTTTCTG
ndhD-1	ndhDstart5' ndhDMitterev	GGTCCAAGTGTATCTTGTG CTAAAGTAGTGATAAATCCTG
ndhD-2	iz AndhD	AGGAATTAATTCTAACTCCC ACGAATTAATTTCTTGGTT
ndhD-3;4	EcondhDfor EcondhDrev	TTCCAGAATTCCTTAATGGGAGTTTTGGGTC TTCCAGAATTCGAATTAATCCATACGCTCC
ndhD-5	ndhDrev Zagreb6	CTCCATTAAGTCCCCTGTGCG GAATTTTATTAATAAATGGGAGCG
ndhF	313for ST7ndhF	ACACAGCCCAACCAATTCCC GATAATACGACTCACTATAGGG

Nachfolgend aufgelistet sind die Oligonukleotide, die zur Herstellung von radioaktiv markierten, einzelsträngigen Antisens-RNA-Sonden verwendet wurden. Jeweils ein Oligonukleotid eines jeden Paares trägt eine T7-Promotorsequenz, die zur *in vitro*-Transkription mittels T7-RNA-Polymerase dienen kann.

Zielgen	Oligonukleotid	Sequenz (5' -> 3')
atpA	atpHF6	CGTATATGAGCCTCTTCAA
	AT7atpA	GTAATACGACTCACTATAGGGAAATTACATTAGTAGGAATA
atpB	AatpB	GGCTATAGCTATGAGTGCTA
	AT7atpB	GATAATACGACTCACTATAGGGCAAACCACTCTCATACGAGC
ycf2	#10	CTATCAGATTAGGAAGGGC
	AT7ycf2.2.3'	GATAATACGACTCACTATAGGGGGTCCGGATAAAGACCAAAG
petL	ApetL	TTAGCGGCTTAACTATAAC
	AT7petL	GATAATACGACTCACTATAGGGAATCTCAATGACAATGAACA
ycf3	Aycf3	TGCCTAGATCACGGATAAAT
	AT7ycf3	GATAATACGACTCACTATAGGGCTTCGGATTGAGCCGACATCC
ndhB	AndhB	GTCGTTGCTTTTCTTTCTG
	AT7ndhB	TAATACGACTCACTATAGGGAATATAGGCCTGCCTGC
atpE	AatpE	GACCTTAAATCTTAGTGTACT
	AT7atpE	GATAATACGACTCACTATAGGGTTTGTGAGCTTCTTGTGGAT
psaA	HpsaAfor2	GATCCTAAAGAGATACCACTT
	AT7psaA	CTAATACGACTCACTATAGGGCCCCCAAGTTAACTGGTACT
psbA	ApsbA	TTACTTGGCGTAGCTTGTTACA
	AT7psbA	GTAATACGACTCACTATAGGGCTAGCATATTGGAAGATCAAT
ycf10	ycf10for	GGCAAAAAAGAAAGCATTCA
	ycf10R2T7	GATAATACGACTCACTATAGGGTAGATATTTGTCGAGAAG
ycf4	Aycf4	GCGATCAGAACATATATGGAT
	ycf4RT7	GATAATACGACTCACTATAGGGAGGAATATGCGACGATT
matK	K6	TTAGGGCATCCCATTAGTAAA
	T7matK	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGGCCAGATCATTGATACAAAA
ndhA	ndhAfor	ACAGGAGATACTCGTTTATT
	AT7ndhA	GATAATACGACTCACTATAGGGACGAGGTGTCAATAATAGA
psbL/J	ApsbL	TACGACACAATCAAACCCGA
	AT7psbJ	GATAATACGACTCACTATAGGGTACTAGAGGGATGAACCCAAT
aadA	aadAli	GAAGCGTTATCGCCGAAG
	aadAT7	GATAATACGACTCACTATAGGGGAACCGGATCAAAGAGTTCC

Nachfolgend aufgelistet sind die Oligonukleotide, die zur Analyse von Spleißvorgängen benutzt wurden.

Intron	Oligonukleotid	Sequenz (5' -> 3')
ycf3 2. Intron	ycf3ex2for	AATGGAGAACATACGAAAGC
	P29	CGGGATCTTCTTTTATTCTGA
atpF	AatpF	TTCGTTTCTTTGGGCCACTG
	AT7atpF	GTAATACGACTCACTATAGGGCTAATGGTACGTAATGTAACCTC
rps16	Hrps16for	CGATGTGGTAGAAAAGC
	AT7rps16	GATAATACGACTCACTATAGGGGGGATCGAACATCAATTGCAACG
trnK-(UUU)	trnKex2rev	GGTTGCTAACTCAATGGTA
	trnKex1for	GGTTGCTAACTCAATGGTA
clpP 1. Intron	clpPrev2	CAAATTCGCCCTGTTTGTG
	clpPex2rev	GTGCGACCAGATGTCCATAC
2. Intron	clppx1for	GATGCATCTTGGGTTGACGTA
	AT7clpP	GATAATACGACTCACTATAGGGCGTGAGGGAATGCTAGGACGTT
rpl2	rpl2ex2rev	CTATGTTATGTAGGGCCGTG
	rpl2	AACCATAGAATACGACCC
trnV-(UAC)	AT7trnV	GATAATACGACTCACTATAGGGTATAGGGCTATACGGACTCGA
	AtrnV	GCCTAAGGGCTATAGCTCA
trnL-(UAA)	AT7trnL	GTAATACGACTCACTATAGGGATAGAGGGACTTGAACCCT
	AtrnL	GGGATATGGCGAAATCGGTA

Sonstige Oligonukleotide:

Oligonukleotid	Sequenz (5' -> 3')
ycf15 for	CTACTGCTGAAACATGGAAG
ycf15 rev	TAGACACCTGTTGGCATTCC
HndhAex1for	CTTTCCAAAGCTTTCCTTTTTAGGTGGTCTACG
HndhAex2rev	CTTTCCAAAGCTTCAATCTCTCGCATTCTG
HndhAinfor	CTTTCCAAAGCTTTTTGATTGGTCTAATTCAGG
mundhAfor	TATCTAACAGTTCAAGTACAGTTGATATAG
mundhArev	CTATATCAACTGTACTTGAECTATTAGATA
P1	AAAGCAAATTTCTATATCTCGC
P2	GGACAAGAAGAAGATCGCTTGG
P3	CTTCAGGCCGCCATCCACTG
P4	CTGTTCTTATTTTACCGGAGG
AbrpoC2for	GGCAAAAATTCAACAATCTC
AbrpoC2rev	GGATCTTTTTTAATTGAGTC

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Standardverfahren zur Plasmidpräparation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die benutzte Standardpräparation von Plasmiden beruhte auf der Methode von Birnboim und Doly (1979) und wurde nach einem modifizierten Protokoll (Ausubel *et al.*, 1987), inklusive der Verdauung der RNA mittels RNase A, durchgeführt. Wurden größere Mengen Plasmid-DNA extrahiert oder wurde besonders reine DNA zur Sequenzierung benötigt, so wurde die Plasmid-Präparation mit DNA-bindenden Säulen von Qiagen (Hilden) eingesetzt. Die Isolierung beruht auf der Anleitung von Birnboim und Doly (1979), kombiniert mit Säulen, die mit Anionenaustauscher-Harz gefüllt sind, an die die DNA spezifisch bindet. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die DNA-Präparation aus dem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.1.8.1) erfolgte durch die Bindung an eine Ionenaustauschermembran (DEAE-Zellulose) und anschließende Elution im Hochsalz-Puffer (NET-Puffer) bei 65°C für 4 - 12 h. Das Eluat wurde phenolisch extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Das Sediment wurde in dest. Wasser gelöst.

#### 2.2.1.2 Extraktion von DNA

Zur Anwendung kam ein modifiziertes Protokoll nach Doyle und Doyle (1990).

Ca. 100 mg Pflanzenmaterial wurden mit dem Pistill zunächst in flüssigem Stickstoff zerstoßen und anschließend kurz bevor der Stickstoff verdunstet war, zu einem feinen Pulver zerrieben. Dann wurden 400 µl CTAB-Lösung zugeben, es wurde erneut gemörsert und die Suspension 30 Min. bei 50 - 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1). Nach der Phasentrennung per Zentrifugation (3000 x g) wurde der Überstand mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Eine erneute Zentrifugation lieferte einen Überstand, aus dem die Nucleinsäuren mit Isopropanol präzipitiert, und darauf in dest. Wasser rückgelöst wurden. Eine Verdauung der mitisolierten RNA mittels RNase A (5 µg/ml) schloß das Protokoll ab.

---

**CTAB-Puffer:**

---

---

2% N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)  
1,4 M NaCl  
20 mM EDTA  
100 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1% PVP 40 (Polyvinylpyrrolidon)  
100 mM β-Mercaptoethanol (immer frisch dazu gegeben)

---

### 2.2.1.3 Extraktion von RNA

RNA wurde mittels Trizol (GibCo, BRL, Eggenstein) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert.

### 2.2.1.4 Restriktionsverdauung und Klonierung

Für die Klonierung eines bereits in einem Plasmid vorliegenden Fragments wurden 300 ng Zielvektor sowie 2 - 4 µg Plasmid, welches den zu klonierenden DNA-Bereich trug, mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten.

#### 2.2.1.4.1 Umwandlung kohäsiver in glatte Enden von DNA-Fragmenten

Falls für die Klonierung erforderlich, wurden kohäsive in glatte Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I umgewandelt, mit dessen 3'->5'-Exonukleaseaktivität überhängende 3'-Enden entfernt werden konnten (5 E bei 37°C für 30 min), während die 5'->3'-Polymeraseaktivität des Enzyms zum Auffüllen überhängender 5'-Enden genutzt wurde (15 Min. bei 30°C unter Zugabe von jeweils 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP).

#### **2.2.1.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Zur Unterbindung einer Autoligation von linearisierter Vektor-DNA wurden Vektoren vor einer Ligation mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert. Dies erfolgte im Restriktionsansatz des Vektors durch Zugabe von 1 E Alkalische Phosphatase ca. 1 h vor Ende der Verdauung bei 37 °C. Die Phosphatase wurde anschließend über phenolische Extraktion entfernt.

#### **2.2.1.4.3 Ligation**

Wie oben beschrieben wurden der vorbehandelte Vektor und die zu klonierenden DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.1.8.1), anschließend aus der Agarose aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.1.1) und für die Ligation eingesetzt. Die Ligation von DNA erfolgte für 12 - 14 h bei 14°C in 5 - 10 µl Gesamtvolumen mit 1 E T4-Ligase (Gibco BRL, Eggenstein) in einem speziellen Ligationspuffer (15% Ficoll 400 (w/v), 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol, 1,2 mM ATP).

#### **2.2.1.4.4 Klonierung von PCR-Produkten**

Zwei Strategien wurden für die Klonierung von PCR-Produkten verfolgt: Entweder wurden Schnittstellen über die Oligonukleotide in das Amplifikat eingeführt, die der Insertion in einen Vektor dienen konnten, oder es wurde der durch die Taq-Polymerase produzierte singuläre Adenosin-Überhang benutzt. Dazu wurde in den Bluescript SK II (-) Vektor über die Schnittstellen *Sma*I und *Pst*I ein 30 Bp langes doppelsträngiges Oligonukleotid kloniert (5'-AAGCTTCCCATGGGCGCCATGTC ATGAGTGG-3'), welches zwei *Xcm*I-Schnittstellen in tandem aufweist. Mit *Xcm*I geschnitten, fällt ein 17 Bp langes DNA Fragment aus dem Vektor, das über eine Gelaufreinigung entfernt wurde. Der zurückbleibende Vektor besitzt an seinen Enden jeweils einen 3'-Thymidin-Überhang, ist also gegengleich zu den Enden eines PCR-Produktes und kann effizient mit diesem ligiert werden.

#### **2.2.1.5 DNA-Sequenzierung und Analyse**

##### **2.2.1.5.1 Automatische DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977)**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg) basierend auf der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchsmethode unter Einbau von mit

Fluoreszenzfarbstoffen markierten Nukleotiden in einem zyklischen Sequenzierungsverfahren (Ju *et al.* 1995). Die Amplifikation der DNA erfolgte in 99 Zyklen, die aus Denaturierungsphase (95°C, 10 Sek.), Oligonukleotidanlagerung (46°C, 5 Sek.) und Elongationsphase (60°C, 4 Min.) bestanden. Die Reaktion wurde mit 3 Volumen EtOH gefällt, in 4 µl Formaldehydpuffer (Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgenommen und für 2 Min. bei 80°C denaturiert. Anschließend wurde 1 µl dieser Sequenzierreaktion in einem 4,5%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff in 1x TBE bei 40 mWatt auf einem automatischem ABI 377 Sequenzierer (Perkin Elmer, UK) aufgetrennt.

Zu sequenzierende PCR-Produkte wurden mit 1 Volumen NH<sub>4</sub>Ac und 6 Volumen Ethanol gefällt, um Oligonukleotide zu entfernen. Zur Sequenzierung wurden 20 ng pro 100 Bp Amplifikat eingesetzt. Zur Sequenzierung von Plasmiden wurden 500 - 1000 ng DNA eingesetzt.

#### **2.2.1.5.2 Sequenzanalyse**

Eine Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mithilfe des Programms Sequencher (Gene Codes Corporation, USA).

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche wurden über das World Wide Web am National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit dem BLAST-Algorithmus unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/> durchgeführt (Altschul *et al.* 1990, 1997). Multiple Sequenzvergleiche (engl. "Alignments") wurden im CLUSTAL-Modus (Jeanmougin *et al.* 1998) mit dem Bioedit Sequenzalignment Editor (North Carolina State University) erstellt.

Ein Gesamtvergleich der beiden Plastidenchromosomen von Tabak und *Atropa belladonna* wurde mit dem Programm MEGalign (Lasergene, USA) durchgeführt.

Die Analyse von Proteintertiärstrukturen erfolgte mit dem SWISS PDB viewer V3.7b2 (<http://www.expasy.ch/spdbv/>). Die PDB Nummer des betreffenden Proteins wird dabei im Text immer angegeben.

### 2.2.1.6 cDNA-Synthese

Zunächst erfolgte zur Hydrolyse der DNA eine Inkubation der Gesamt-RNA-Lösung mit 0,2 E/ $\mu$ l DNase I in 40mM Tris-HCl, pH 7,5, und 10 mM  $MgCl_2$  bei 37°C für 30 Min. Dieser Ansatz wurde zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 24 : 1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert, um die DNase restlos zu entfernen. Um diese RNA in cDNA umzuschreiben, werden 5 bis 10  $\mu$ g RNA in einem Volumen von 15  $\mu$ l mit 1  $\mu$ l Zufalls-Hexamer-Oligonukleotiden (0,1 mg/ml Boehringer, Mannheim) gemischt, der Ansatz 5 Min. bei 65°C denaturiert und auf RT abgekühlt. In einem zweiten Gefäß wurden pro Reaktion 8  $\mu$ l 5-fach konzentrierter Puffer (1st Strand Buffer, GibCo, Eggenstein), 4  $\mu$ l 100 mM DTT, 12  $\mu$ l 2 mM dNTP-Mischung und 1  $\mu$ l SuperscriptII Reverse Transkriptase (200 E/ $\mu$ l; GibCo, Eggenstein) zusammengegeben. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und in einem Gesamtvolumen von 40  $\mu$ l für 2 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die RNA bei 65°C für 30 Min. in Gegenwart von 0,3 M NaOH und 10 mM EDTA hydrolysiert. Diese alkalische Lösung wurde dann mit 1M Tris-HCl, pH 7,5, neutralisiert und anschließend zur Fällung der cDNA mit Ethanol versetzt. Das mit 70%igem Ethanol gewaschene Sediment wurde in 30  $\mu$ l dest. Wasser aufgenommen und diente als Matrize für die PCR.

Zur Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen wurde ein Aliquot der DNase-verdauten RNA ebenfalls in einer PCR eingesetzt.

### 2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von genomischer oder von cDNA wurden ca. 5 ng DNA auf Eis in 50  $\mu$ l Endvolumen in Gegenwart von 0,2 mM dNTP-Mischung, je 2 mM Oligonukleotide (25 mM), 0,5 E/ $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden), 2,5 mM  $MgCl_2$  und einfach konzentrierter Amplifikationspuffer (Qiagen, Hilden) je Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert und dann sofort in den bereits auf 94°C vorgeheizten Block des „Thermocyclers“ gestellt (PCR-Express; Hybaid, Heidelberg), um unspezifische Reaktionen während der Vorheizphase zu unterbinden. Nach einer anfänglichen zweiminütigen Denaturierung bei 94°C,



schlossen sich je nach Oligonukleotidpaar 30 bis 35 Zyklen mit 20 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 55°C und "X" Sek. bei 72°C an. Die Inkubationszeit "X" der Kettenverlängerung bei 72°C richtete sich nach der Länge des Amplifikats (1 Min. je kB). Danach folgte noch einmal eine abschließende Kettenverlängerung für 5 min. bei 72°C; 3 µl der Reaktion wurden auf einem Agarosegel analysiert.

Zu jeder PCR wurde pro Oligonukleotidpaar eine Negativkontrolle (ohne Matrize) und eine Positivkontrolle (mit geeigneter DNA) vorgenommen.

#### **2.2.1.7.1 Test von *E. coli*-Kolonien**

Als Ligationskontrolle wurden routinemäßig Bakterienkolonien per PCR getestet. Dazu wurden Bakterienkolonien von LB-Platten (Abschnitt 2.2.4.1.1) gepickt und in 20 µl dest. Wasser aufgeschwemmt. Ein µl dieser Zellsuspension war hinreichend für eine Amplifikation nach dem modifiziertem Standardprotokoll (auf 5 Min. verlängerte Initialdenaturierung).

#### **2.2.1.7.2 Analyse von Tabak-Gewebesektoren ("grüne Gewebeflecke")**

Die nach der Transformation aus dem umgebenden Gewebe herausgeschnittenen grünen Bereiche (1 - 2 mm<sup>2</sup>) eigneten sich als Matrize ohne vorrausgehende DNA-Extraktion für PCR-Reaktionen. Dazu wurde das Gewebepartikel zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer gelben Einmalspitze zerdrückt. Nach Zugabe von 93 µl Wasser wurde kurz gevortext und das Volumen dann auf drei 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Auf Eis wurden die weiteren Reagenzien zugegeben, es wurde kurz gemischt und die Reaktion dann in einen auf 94°C vorgeheizten „Thermocycler“ gestellt. Auf diese Weise konnten bis zu drei Amplifikate von einem grünen Gewebeflecken gewonnen werden.

#### **2.2.1.8 Elektrophorese- und Transfertechniken von Nukleinsäuren**

##### **2.2.1.8.1 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die DNA Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in Agarosegelen mit 0,8 – 2,0% Agarose und einfach

konzentrierter TBE-Lsg als Laufpuffer bei ca. 3 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde zur Detektion der DNA-Fragmente mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht bei 302 nm mit einer Mitsubishi P66DE Videokamera (Mitsubishi Electronics, Hatfield UK) photographiert.

---

**5x DNA Probenpuffer**

---

50% Glycerin  
5x TBE  
0,4% Bromphenolblau

---

### **2.2.1.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten in Polyacrylamidgelen**

Kleine DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen zur Unterscheidung von Längenunterschieden im Bereich weniger Basenpaare wurden mit 10%igen Polyacrylamid-Gelen vertikal elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde eine Spannung von 250 V über einen Zeitraum von 6 h bei 4°C angelegt. Abschließend wurden die Gele 30 Min. in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) inkubiert, mit Wasser abgespült und zur Dokumentation photographiert.

### **2.2.1.8.3 DNA-Transfer (Southern-Transfer)**

Die zu hybridisierende DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.2.1.8.1). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und photographiert. Um die Transfereffizienz längerer Fragmente zu verbessern, wurde die DNA im Gel für 10 Min. in 0,2 N HCl partiell depurinisiert. Das Gel wurde dann zur Denaturierung der DNA in 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl für zweimal 20 Min. gewaschen. Die Neutralisierung erfolgte in 1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl. Die aufgetrennte DNA wurde anschließend in 5x SSC mittels eines Kapillartransfers nach Southern (1975) für ca. 15 h auf eine Nylonmembran (HybondN, Amersham Pharmacia) überführt (Sambrook *et al.* 1989). Nach dem Transfer wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stratagene, Heidelberg) von 0,4 J/cm<sup>2</sup> und anschließendes Backen bei 65°C für 15 Min. am Filter fixiert. Anschließend konnte die Membran direkt hybridisiert oder trocken bei RT gelagert werden.

#### 2.2.1.8.4 RNA-Agarosegelelektrophorese

4 µg gelöste RNA wurden mit 2,5 Vol Probenpuffer versetzt und bei 80°C für 5 Min. denaturiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte im Agarose-Formaldehyd-Gel (1% Agarose; 0,15 Volumen 37% Formaldehyd; einfach konzentrierter MOPS-Puffer) mit einfach konzentriertem MOPS-Puffer, 0,1 Vol. 37% Formaldehyd als Laufpuffer bei 3 V/cm.

<b>Probenpuffer</b>
3 Vol. Formamid
1 Vol. Formaldehyd
0,6 Vol. MOPS-Puffer
0,4% Bromphenolblau

<b>10x MOPS-Puffer</b>
200 mM Morpholinopropan-sulfonsäure, Natriumsalz (MOPS)
80 mM Na-Acetat
10 mM EDTA

#### 2.2.1.8.5 RNA-Transfer (Northern-Transfer)

Der Transfer von RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham-Pharmacia, Freiburg) erfolgte mit 5-fach konzentrierter SSC-Lösung nach demselben Aufbau wie unter Abschnitt 2.2.1.8.3 beschrieben. Die RNA wurde anschließend in einem "autocrosslinker" (Stratagene) bei 0,4 J/cm<sup>2</sup> am Filter fixiert und bei 65°C inkubiert. Zur Detektion der ribosomalen RNA, die als Nachweis zur gleichmäßigen Beladung des Filters mit RNA durchgeführt wurde, wurde der Filter für 30 Sek. in Methylenblaulösung (0,03% Methylenblau, 0,3 M Na-Acetat, pH 5,2) inkubiert. Anschließendes Waschen unter fließendem Wasser entfernt den Farbstoff von der Membran außer in Bereichen hoher RNA-Ladung. Der angefärbte Filter wurde photokopiert und/oder mit Hilfe eines Scanners ein digitales Bild erstellt.

#### 2.2.1.8.6 Radioaktive *in vitro*-Transkription

Zur Erstellung strangspezifischer Sonden für die Hybridisierung von Northern-, bzw. Southernmembranen wurden PCR-Produkte mit über die Oligonukleotide eingebrachten T7 Promotorsequenzen als Substrat benutzt. 200 ng eines solchen PCR-Produktes wurden mit 0,4 mM ATP/GTP/CTP, 5 mM DTT und 2,5 E/µl T7 RNA-Polymerase (NEB, Frankfurt) in Gegenwart von 30 µCi <sup>32</sup>P-UTP (800 Ci/mMol) bei 37°C für 2 h inkubiert. Dazu wurde der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet.

Zur Messung der Inkorporation von Radioaktivität in höhermolekulare RNA wurde von einer 1: 10 Verdünnung des Reaktionsansatzes je ein Aliquot auf zwei gleich große DE81-Filter (Whatman, Bruchsal) überführt. Nur einer der Filter wurde mit 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5, für dreimal 2 Min. gewaschen. Beide Filter wurden im Szintillationsmeßgerät (LS 3801, Beckmann-Coulter, Unterschleißheim) vermessen. Das Verhältnis der beiden Werte ergab die Einbaurrate, die meist im Bereich von 30 - 70% lag.

#### **2.2.1.8.7 Hybridisierung von Northern- und Southernfiltern mit radioaktiv markierten Sonden.**

Die Reaktionsprodukte der *in vitro*-Transkription wurden bei 90°C für 5 Min. denaturiert und zur Prähybridisierungslösung (Churchpuffer: 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7% SDS) gegeben. Die anschließende Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C durchgeführt. Ebenfalls bei 65°C wurden die Waschschrirte (je 20 Min.) mit absteigendem Salzgehalt, also steigender Stringenz von 0,2-fach bis 0.05-fach konzentrierter SSC-Lösung und jeweils 0.1% SDS-Lösung durchgeführt. Die Filter wurden anschließend in einen Folienschlauch eingeschweißt und in einer lichtdichten Kassette mit einem Expositionsschirm für einige Stunden bis Tage exponiert.

#### **2.2.1.8.8 Herstellung von "macroarray"-Nylonfiltern**

##### **2.2.1.8.8.1 Überimpfung von PCR-Amplifikaten auf Nylonfilter**

Amplifikationsprodukte wurden auf 7,8 x 11,9 cm, positiv geladene Nylonfilter (Hybond-N+, Amersham Pharmacia, Freiburg) mit einem 96-Nadelstempel (Nadeln von 0,4 mm), der an einem BioGrid Roboter fixiert war (BioRobotics, UK), überführt. Unter der Annahme, daß jede Nadel ungefähr 20 nl Flüssigkeit pro Berührung mit der Membran transferiert, wurde jedes Amplifikationsprodukt in drei verschiedenen Verdünnungen (6,25, 25 und 100 pg/µl) je zehnmal auf dieselbe Position überimpft, so daß letztlich 1,25, 5 oder 20 ng pro Probe auf verschiedene Positionen gelangten. Dazu wurde außerdem jede Probe in jeder Verdünnung als Duplikat auf den Filter überimpft, so daß letztlich 6 Punkte je PCR-Produkt erhalten wurden. Vor der Hybridisierung wurde die DNA mit der Membran unter UV-Licht kreuzvernetzt.

Weitere Kontrollen zur Effizienz der Überimpfung sind in Legen *et al.* (2002) diskutiert. Die hier zur Anwendung gekommenen Filter stammen aus derselben Präparation wie in dieser Publikation beschrieben.

#### **2.2.1.8.8.2 Radioaktive Endmarkierung von zellulärer Gesamt-RNA**

Die 5'-Enden von mit DNaseI behandelte RNA (6 µg) wurden mit 5 E T4-Polynukleotidkinase (PNK) in Gegenwart von 30 µCi [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP in einem Endvolumen von 20 µl gemäß den Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs, USA) markiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung gestoppt (65°C, 20 Min.) und die nicht-inkorporierten Nukleotide wurden mittels MicroSpin S-200 HR Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach dem Protokoll des Herstellers entfernt.

#### **2.2.1.8.8.3 Filterhybridisierung**

Die Filter wurden für 2 h bei 65°C in Churchpuffer (0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7% SDS) prähybridisiert, dann erfolgte die Zugabe der  $^{32}$ P-endmarkierten RNA. Hybridisiert wurde bei gleicher Temperatur über Nacht. Die Filter wurden anschließend für 10 Min. in zweifach konzentrierter SSC-Lsg, 0,1% SDS, 10 Min. in einfach konzentrierter SSC-Lsg, 0,1% SDS, 10 Min. in 0,5-fach konzentrierter SSC-Lsg, 0,1% SDS und zum Abschluss für 10 Min. in 0,2-fach konzentrierter SSC-Lsg, 0,1% SDS, immer bei 65°C, gewaschen und anschließend exponiert.

### **2.2.2 Methoden zur Analyse von Proteinen**

#### **2.2.2.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Blattgewebe**

Zur Extraktion der zellulären Proteine wurden zunächst 150 mg Blattmaterial in 1 ml eiskaltem Homogenisationspuffer im Mörser zerkleinert. Dieses Homogenat wurde bei -70°C gelagert und konnte ohne weitere Aufarbeitung in SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.2.2.2 ) eingesetzt werden.

Der relative Proteingehalt wurde über eine Verdünnungsreihe bestimmt, von der Aliquote auf ein Whatman-Papier pipettiert und dann bei 65°C getrocknet wurden. Danach wurde das Papier für 30 Sek. in Coomassie-Färbelösung gelegt und anschließend längere Zeit unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Aus dem Vergleich der Intensität der Anfärbung der verschiedenen Proben lässt sich die

Menge abschätzen, die man benötigt, um vergleichbare Mengen Protein bei einer SDS-PAGE aufzutragen.

---

#### Homogenisationspuffer

---

40mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 10% Saccharose  
 100 mM Tris-HCl, pH 7,2  
 5 mM EDTA  
 5 mM EGTA  
 2  $\mu$ g/ml Aprotinin  
 2 mM PMSF (wurde immer frisch zugesetzt)

---

#### 2.2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 Min. bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie bei Laemmli (1970) beschrieben. Hierzu wurden die Proben in einem 4%igen Sammelgel bei 24 mA konzentriert und in 12%igem Trenngel aufgetrennt. Die Gele wurden nachfolgend mit Coomassie Brilliant Blau R250 gefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

---

#### Sammelgel

---

0,125 M Tris-HCl, pH 6,8  
 4% Acrylamid  
 1% SDS  
 0,008 Vol. 10% APS  
 0,002 Vol TEMED

---



---

#### Trenngel:

---

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8  
 12% Acrylamid  
 1% SDS  
 0,005 Vol 10% APS  
 0,001 Vol TEMED

---



---

#### SDS-PAGE-Laufpuffer

---

25 mM Tris  
 0,2 M Glycin  
 0,1 % SDS

---



---

#### SDS Probenpuffer:

---

0,625 M Tris-HCl, pH 6,8  
 10% Glycerol  
 2% SDS  
 0,25% Bromphenolblau

---

---

**Coomassie-Färbelösung**

---

0,2% Coomassie Brilliant Blau R250  
10% Essigsäure  
50% Methanol  
1% Glycerol  
(Entfärbung mit 7% Essigsäure)

---

### **2.2.2.3 Protein-Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen und Immunodetektion von Proteinen**

#### **2.2.2.3.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot) im Halbtrockenverfahren**

Der Transfer der Proteine aus PAA-Gelen erfolgte auf eine PVDF-Membran (verändert nach Kyhse-Andersen, 1984). Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 Min. in Methanol, H<sub>2</sub>O bidest. und 10 Min. in Anodenpuffer II (25 mM Tris-HCl, pH 10,4; 10% (v/v) Methanol) geschwenkt. Es wurden 6 Lagen Whatman-3MM-Chromatographiepapier auf Gelgröße zugeschnitten und drei mit Kathodenpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 9,4, 40 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol), zwei mit Anodenpuffer I (0,3 mM Tris-HCl, pH 10,4, 10% (v/v) Methanol) und eine Lage mit Anodenpuffer II getränkt. Das Gel wurde nach der Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung der beim Transfer störenden Salze in Kathodenpuffer geschwenkt. In der Transferapparatur (Owl/Apogent, USA) wurden zwei Lagen *Whatman*-Papier (in Anodenpuffer I getränkt), eine Lage *Whatman*-Papier, die Membran (beides in Anodenpuffer II getränkt), das Gel und drei Lagen *Whatman*-Papier (in Kathodenpuffer getränkt), luftblasenfrei übereinandergelegt und die Spannung angelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) für 30 Min. bis zu 1 h.

Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Effizienz des Transfers mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Membran wurde luftgetrocknet, die Spur mit dem Protein-Standard abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung unterzogen.

#### **2.2.2.3.2 Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen**

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran dreimal 10 Min mit TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 137 mM NaCl) gewaschen. Anschließend wurde die Membran 30 Min. in Blockierungslösung (5% Trockenmilch in TBS, 0,5% Tween 20)

inkubiert. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wurde die Membran mit dem in TBS (3% Trockenmilch, 0,5% Tween 20) verdünnten Antikörper (1 : 1000) über Nacht inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS (0,5% Tween 20) entfernt. Als Sekundärantikörper wurden mit Peroxidase konjugierte anti-Kaninchen-Immunglobuline (SIGMA, Deisenhofen) verwendet. Die Membran wurde 1 h mit in TBS (0,5% Tween 20) verdünntem Sekundärantikörper (1:10000) inkubiert. Es folgten mehrere Waschschritte mit TBS (0,5% Tween 20).

Die Detektion erfolgte durch kurze Inkubation in einem 1 : 1-Gemisch aus einer Luminol- (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Cumarinsäure) und einer Wasserstoffperoxidlösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 0,02% Wasserstoffperoxid). Dazu wird die Membran in einer Folie mit dem Gemisch benetzt und mit einem Röntgenfilm exponiert.

### **2.2.3 Isolierung von Plastiden**

Die gesamte Extraktion erfolgt bei 4°C. Das Blattmaterial wurde in Extraktionspuffer (0,33 M Sorbit, 25 mM HEPES, 25 mM MES, 4 mM Na-Ascorbat, 1,2 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM EDTA, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM DTT, 0,2% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) PVP-10, pH 6,8) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) gefiltert und das Filtrat bei 4000 x g für 2 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem Puffer aufgenommen, der 0,33 M Sorbit und 50 mM HEPES/KOH, pH 7,6, enthielt. Diese Fraktion ist mit Plastiden angereichert und wurde auf einem diskontinuierlichen 40% - 80% Percollgradienten per Zentrifugation bei 15700 x g für 20 Min. weiter aufgetrennt. Die Bande direkt über der Interphase des Gradienten enthält die intakten Plastiden. Diese wurden abgenommen, gewaschen und in 0,33 M Sorbit, 50 mM HEPES/KOH, pH 7,6, resuspendiert. Die Extraktion der Plastiden-DNA erfolgte mit CTAB-Extraktionspuffer wie unter Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben.

### **2.2.4 Transformationsverfahren**

#### **2.2.4.1 Transformation von *E.coli* durch CaCl<sub>2</sub> und Hitzeschock**

Die Verfahren zur Herstellung kompetenter Zellen wurden modifiziert nach Kushner (1978) durchgeführt. Dazu wurden zunächst 100 ml-Kulturen in LB-Medium bis zu einer Extinktion bei 578 nm Wellenlänge von 0,4 auf dem Schüttler (Modell



Kühner; B.Braun, Melsungen) bei 190 UpM und 37 °C gezogen. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Nach der Ernte der Zellen durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 4000 x g wurde das Sediment in 80 ml TF 1-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten auf dem Eis gelassen. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (10 Min. bei 5000 x g) und der Überstand entfernt. Das Bakteriensediment wurde dann anschließend in 16 ml TF2-Puffer resuspendiert und in 100 µl Aliquoten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Bakterien wurden bei –70°C verwahrt.

Zur Transformation durch Hitzeschock wurden frisch aufgetaute kompetente Zellen zusammen mit dem zu transformierenden Plasmid (in maximal 10 µl Volumen) 45 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock durch 5-minütige Inkubation bei 42 °C, nach der sofort 300 µl LB-Medium zugegeben wurden. Die Zellen wurden zur Ausprägung ihrer durch die Transformation erworbenen Antibiotika-Resistenzen für 30 Min. bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein Selektivmedium ausplattiert.

Die erreichte Kompetenz der Zellen lag zwischen 100 und 150 Transformanten pro 10 ng Plasmid.

#### 2.2.4.1.1 Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Transformanten wurden auf LB-Platten mit IPTG und X-Gal unter Zusatz von Antibiotikum selektiert. Rekombinante Klone konnten durch Test auf  $\alpha$ -Komplementation identifiziert werden. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal zugrunde. Rekombinante Klone bilden demzufolge weiße Kolonien.

	TF 1	TF 2
K-Acetat	30mM	
MnCl <sub>2</sub>	50mM	
KCl	100mM	10mM
CaCl <sub>2</sub>	10mM	75mM
MOPS, pH 7,0		10mM
Glycerin (w/v)	15%	15%

---

**Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (Sambrook et al., 1989)**

---

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest.  
Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar  
zugesezt.

---

**2.2.4.2 Plastidentransformation****2.2.4.2.1.1 Transformation von Plastiden in isolierten Blättern (Svab et al. 1990)**

Die hier angewandte Technik beruht auf dem Verfahren von Svab und Maliga (1993). Danach werden Goldpartikel mit einem geeigneten Vektor beladen und über Hochdruck in die Plastiden eingeschossen. Das Rekombinationssystem der Plastide, welches Komponenten vom *recA*-Typ besitzt (Cerutti *et al.* 1992), integriert die Fremd-DNA in das Plastidenchromosom, wenn sie von homologen Sequenzen flankiert ist (Bock 2001). Über diese homologe Rekombination ist es daher möglich, den Integrationsort des Transgens genau zu bestimmen. Auf demselben Grundprinzip der ballistischen Transformation beruhende Techniken wurden erfolgreich auch für die Transformation von pflanzlichen und tierischen Zellkernen (Klein *et al.* 1988; Williamson *et al.* 1991) und Mitochondrien von Hefe und *Chlamydomonas reinhardtii* (Johnston *et al.* 1988; Randolph-Anderson *et al.* 1992) angewendet.

**2.2.4.2.1.2 Präzipitation des Plasmidvektors auf die Goldpartikel**

Von einer 60 µg/µl Goldpartikel-Stammlösung (Gold in Ethanol abs.; Kolloidgröße 0,6 µm) wurden 35 µl entnommen, was ausreichend für 12 Transformationsversuche war. Das Gold wurde abzentrifugiert (Tischzentrifuge 10 Sek. für 9500 x g), der Überstand entfernt, und das Sediment in 1 ml sterilem dest. Wasser gründlich resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (2 Min., 18000 x g) wurde auch der zweite Überstand verworfen.

Alle weiteren Arbeiten fanden im Eisbad und mit sterilisierten Lösungen statt. Das Goldsediment wurde in 25 µl Plasmid-DNA-Lösung (1,0 µg/µl) resuspendiert und mit 220 µl sterilem dest. Wasser, 250µl CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) und 50µl Spermidin (0,1 M) vermischt. Dieser Fällungsansatz wurde im Kühlraum an einem Vortex-Gerät (Vortex Genie 2; Bender und Hobein, Zürich) fixiert und für 20 Min. auf Stufe 4 geschüttelt,

um die Goldkörnchen in Suspension zu halten. Die Plasmid-DNA wurde über das Plasmid Midi Kit der Firma Quiagen (Hilden) aus Bakterien aufgereinigt.

Zur Reinigung der DNA-beladenen Goldpartikel wurden die Partikel sedimentiert (1 Min., 9500 x g) und zweimal mit 600 µl EtOH abs. gewaschen (jeweils Abtrennung des Überstandes durch Zentrifugation: 1 Min., 9500 x g). Abschließend wurde das Sediment in 72 µl Ethanol abs. aufgenommen.

#### **2.2.4.2.1.3 Ballistischer Transfer der beladenen Goldpartikel in das Pflanzenmaterial**

Das Blattmaterial wurde von 2 - 3 Wochen alten, in Gewebekultur auf B5 Medium angezogenen Tabakpflanzen 2 Tage vor dem Versuch geerntet. Nur gesunde, nicht zu alte Blätter von den oberen Wirteln wurden verwendet und auf RMOP-Platten gelegt. Beschossen wurde die abaxiale Blattseite.

Von der vorbereiteten Goldpartikelsuspension wurden 5.5 µl auf einen sog. "*macrocarrier*" überführt und getrocknet. Zur Beschleunigung der Goldpartikel wurde eine Partikelkanone vom Typ PDS-1000/He (Biorad, München) verwendet. Das Gerät wurde vor Benutzung oberflächensterilisiert (zum Aufbau siehe Maliga 1995) und mit einer Heliumdruckflasche verbunden, die auf 1100 psi eingestellt wurde. Die genaue Beschleunigung wurde mithilfe einer Plastikscheibe eingestellt, die bei einem definierten Überdruck reißt (*rupture disc*), hier bei 900 psi. Die Kammer, in der die Partikel beschleunigt werden und auf das Blattmaterial treffen, wurde vor dem Schuss über eine Vakuumpumpe evakuiert (-27 inches Quecksilbersäule).

Die weiteren Parameter für die Partikelkanonen wurden wie folgt gewählt:

Distanz <i>rupture disc</i> / <i>macrocarrier</i> :	8 – 10 mm
Distanz <i>macrocarrier</i> /Stoppnetz:	10 mm
Distanz Stoppnetz/Blatt:	ungefähr 7cm

Nach Auslösen des Schusses bricht das Gas die *rupture disc*. Die Druckwelle beschleunigt den *macrocarrier* mit den Partikeln, bis er auf das Stoppnetz trifft. Nur die Goldpartikel fliegen ungebremst weiter und dringen in das Blattgewebe ein.

#### 2.2.4.2.1.4 Selektion transplastomischer Pflanzenlinien

Plastidentransformanten wurden mit Hilfe eines chimären bakteriellen *aadA*-Gens selektiert (Koop *et al.* 1996). Das *aadA*-Gen kodiert für eine Aminoglycosid-3'-adenylyltransferase, welche manche Aminoglycosid-Antibiotika, wie Spektinomycin oder Streptomycin, inaktiviert. Diese Klasse von Antibiotika bindet an die 30S-Untereinheit der bakteriellen und plastidären Ribosomen, stört dadurch die Interaktion der 30S-Untereinheit mit der mRNA und hemmt letztlich die Proteinbiosynthese. Die Expression des bakteriellen *aadA*-Gens wird von einem modifizierten Promotor des plastidären rRNA-Operons, einer synthetischen Shine-Dalgarno-Sequenz und der 3'-Region des *rbcl*-Gens aus *Chlamydomonas reinhardtii* gesteuert (Koop *et al.* 1996).

Die Petrischalen mit den beschossenen Blättern wurden 2 Tage bei 25°C in einem 8/16 h hell/dunkel-Zyklus bei einer Beleuchtungsstärke von 0,5-1Wm<sup>-2</sup> inkubiert. Danach wurden die Blätter in etwa 3 x 3 mm große Stücke geschnitten und auf RMOP-Platten mit 500 µg/ml Spektinomycin gelegt. Die Platte wurde mit Parafilm (American Natl. Can., USA) versiegelt. Nach 3 Wochen wurden die Blattstückchen, die mittlerweile stark aufgeschwollen sind, halbiert und auf frisches Medium überführt. Nach 4 - 6 Wochen Selektion war das spektinomycinsensitive Gewebe ausgebleichen. Resistente Zellen hingegen regenerieren grüne Kalli, später Sprosse.

#### 2.2.4.2.1.5 Test auf homoplastomisch transformierte Linien

Tabak-Chloroplasten enthalten ca. 100 Kopien ihres Plastoms; eine Tabakmesophyllzelle enthält ca. 100 Plastiden. Um eine Zelle zu transformieren, müssen also ca. 10000 Plastiden-DNA-Moleküle verändert werden. Man geht davon aus, daß mit der ballistischen Transformation zunächst nur ein Plastidenchromosom durch homologe Rekombination transformiert wird (Bock 2001). Erst unter anhaltenden Selektionsbedingungen werden die Wildtyp-Kopien dann in mehreren Regenerationsrunden durch die transformierte ptDNA ersetzt (Svab *et al.* 1990). Dazu wurden die primären Transformanten früh (nach ca. 2 - 3 Wochen) in kleine Stücke zerschnitten und wieder auf RMOP+Spek. ausgelegt, so daß während der Regeneration transformierte Plastiden bevorzugt vor Wildtypplastiden segregieren können. Mit der Sprossgeneration verfährt man ebenso und wiederholt diesen Ansatz so lange, bis die primäre heteroplastomische Transformante nur noch transformierte ptDNA enthält, d.h. homoplastomisch geworden ist. Dies muss durch

RFLP-Analysen, PCR-Experimente oder Pulsfeldgelelektrophorese (Swiatek *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht) überprüft werden.

#### **2.2.4.2.1.6 Transformation von Plastiden in Cybridenregeneraten**

Zur Transformation von albinotischem Gewebe der Ab [Nt] Cybriden wurden nicht vereinzelt Blätter, sondern ganze junge Pflänzchen verwendet. Diese wurden durch Regeneration von zerschnittenen und auf RMOP59 inkubierten Blättern gewonnen. Nach etwa 6 - 8 Wochen Regenerationszeit platziert man 25 - 30 solcher Pflanzen im Zentrum einer RMOP59-Petrischale, allerdings nicht aufrecht, sondern auf der Länge des Stängels ruhend. Die Pflanzen müssen schwach in das Medium gedrückt werden, damit sie nicht durch die Heliumdruckwelle während der Transformation von der Petrischale geschleudert werden. Die Pflanzen sollten im Idealfall 0,5 – 1,0 cm groß sein und gerade das erste Paar Blätter zeigen.

Für 30 regenerierte Pflanzen optimaler Größe müssen etwa 8 - 10 Petrischalen mit Blattstückchen vorbereitet werden, da die Regeneration wesentlich ineffizienter als für den Tabak-Wildtyp ist.

Die Parameter der Partikelkanone waren identisch mit denen zur Transformation von Wildtypblättern, nur daß der Abstand vom Stoppnetz zum Blatt auf ca. 9 cm erhöht wurde. Nach der Transformation wurden die Pflanzen nach einer 2-tägigen Inkubation in der Gewebekulturkammer einzeln auf Gläser mit VBW-Medium gesetzt. Nach ca. 2 Monaten zeigen sich grüne Flecken auf dem weißen Gewebehintergrund, die entweder mikroskopisch untersucht oder ausgeschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

### **2.2.5 Mikroskopie**

#### **2.2.5.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie**

Um Unterschiede in der Morphologie von Wildtyp- und Cybridenplastiden zu untersuchen, wurden Blattquerschnitte mit einer Rasierklinge unter dem Binokular angefertigt. In Wasser aufgeschwemmt, wurden die Schnitte mit einem Lichtmikroskop (Axioplan; Zeiss, Jena) unter Verwendung eines Neofluar 40x/0,75 oder Plan Aplanochromat 63x/1,40 (Ölimmersion) Objektivs (beide Zeiss, Jena) untersucht.

Zur Analyse der Autofluoreszenz von Plastiden wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO als Strahlenquelle benutzt mit einem vorgeschalteten Filter der Anregungswellenlänge 493 nm. Farbaufnahmen wurden mit einem Ektachrom T320 Professional Diafilm (Kodak, Stuttgart) gemacht.

### **2.2.5.2 Elektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopischen Abbildungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. G. Wanner (LMU München) angefertigt.

Kleine Blattstücke wurden unmittelbar nach der Ernte des Materials mit 2,5% Glutardialdehyd in 75 mM Natriumcacodylat, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0, für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Material mehrmals im gleichen Puffer gewaschen und für 1 h in 1% Osmiumtetroxid bei RT nachfixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in dest. Wasser wurden die Gewebestückchen für 1 h mit 1% Uranylacetat in 20% Aceton gefärbt. Die Dehydrierung erfolgte in einem Acetongradienten. Schließlich wurden die Blattstückchen infiltriert und in einem niedrig-viskosen Harz nach Spurr eingebettet (1969).

Nach der Polymerisation des Harzes wurden Ultradünnschnitte (50 – 70 nm) mit einer Diamantenklinge angefertigt und auf collodionummantelte Kupfergitter aufgebracht. Diese Schnitte wurden mit wässrigem Bleicitrat (100 mM, pH 13,0) nachkontrastiert.

Alle Aufnahmen wurden mit einem EM 912 Elektronenmikroskop durchgeführt (LEO, Oberkochen).

Zur Elektronenmikroskopie von sog. grünen Gewebeflecken wurde unter dem Binokular ein Sektor aus dem grünen Gewebe herausgeschnitten, um so eine Schnittfläche für die eigentlichen Ultradünnschnitte zu definieren.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genom/Plastom-Inkompatibilität in Tabak/*Atropa* Cybriden

Determinanten für Kern/Plastom-Inkompatibilität sind aller Wahrscheinlichkeit nach sowohl auf dem plastidären als auch auf nukleären Chromosomen zu finden. Da weder für den Tabak- noch den *Atropa*-Kern Sequenzdaten zugänglich sind, wurde in dieser Arbeit das wesentlich kleinere plastidäre Genom von *Atropa* sequenziert und mit dem bereits bekannten aus Tabak (Shinozaki *et al.* 1986) verglichen. Die dort gefundenen Unterschiede wurden in Bezug auf ihre Bedeutung für den Defekt in Tabak/*Atropa*-Cybriden untersucht.

##### 3.1.1 Sequenzierung des Plastidenchromosoms der Tollkirsche (*Atropa belladonna*)

Grundlage für die Sequenzierung des zirkulären Plastidenchromosoms von *Atropa belladonna* war eine Klonbank plastidärer DNA-Fragmente in pBS SK II(-), die von Ralph Regel und Du Tung Gia im Labor hergestellt wurde (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Sequenzierung des Plastidenchromosoms aus *Atropa belladonna*: Klonbank in pBluescript SK II(-)**

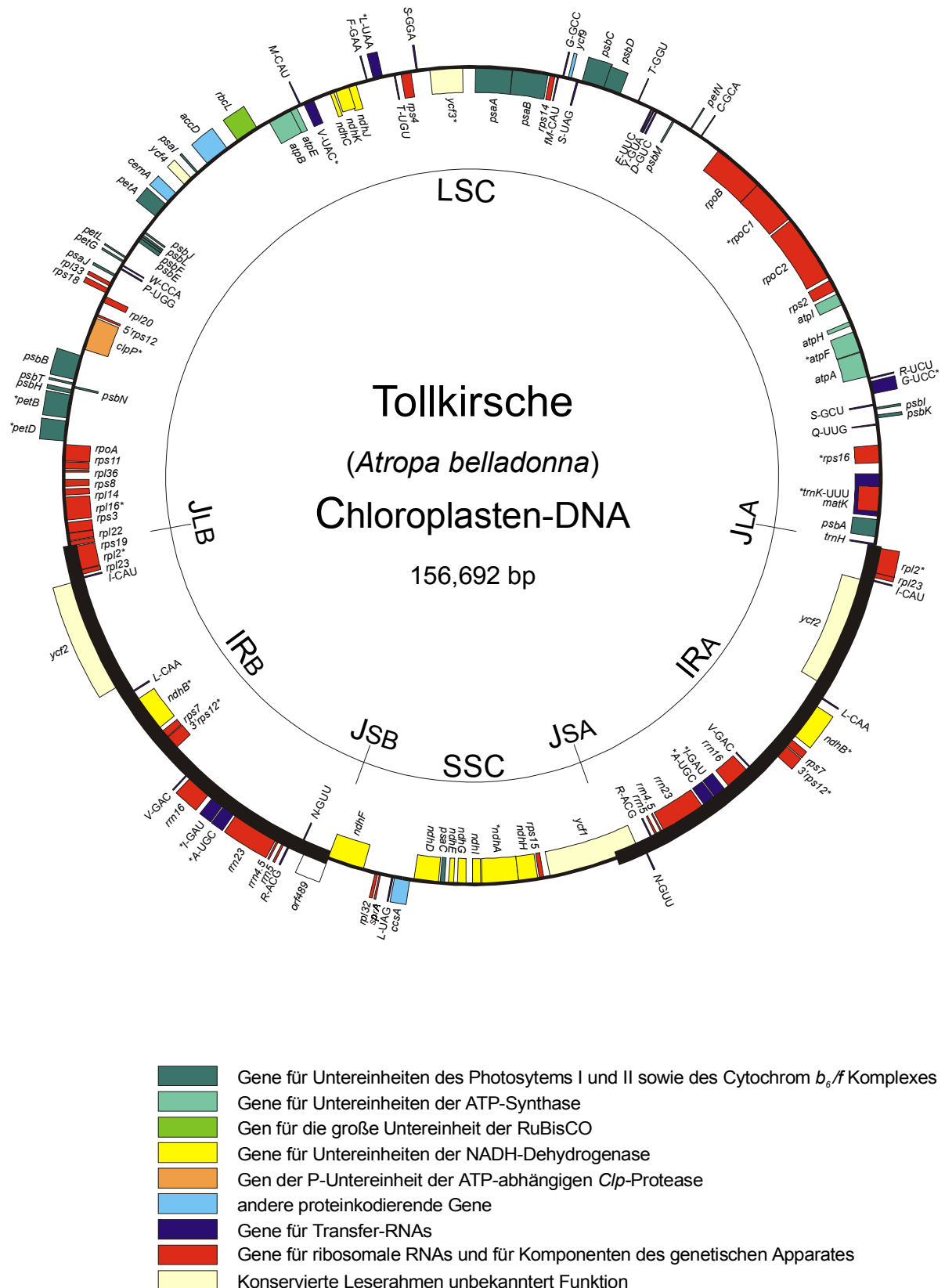
<b><i>Bam</i>HI-Klone</b>	<b>Position*</b>	<b><i>Kpn</i>I-Klone</b>	<b>Position*</b>
pBAbB29	5665-9551	pBAbK13	11829-16240
pBAbB60	9718-18716	pBAbK14	17135-21265
pBAbB36	36219-40677	pBAbK46	21266-33944
pBAbB48	74364-84058	pBAbK21	33945-40224
pBAbB40	84059-89040	pBAbK2	40225-51771
		pBAbK6	51772-58237
		pBAbK33	61742-76779

<b><i>Pst</i>I-Klone</b>	<b>Position*</b>	<b><i>Apa</i>I-Klone</b>	<b>Position*</b>
pBAbP7	57980-61994	pBAbA248	104841-108792
pBAbP12	77389-83542	pBAbA265	113128-123028
pBAbP17	88007-95624	pBAbA163	123028-127441
pBAbP16	95625-100366		

\* angegeben ist die Position in der Gesamtsequenz des *Atropa*-Plastidenchromosoms (Acc. Nr. AJ 316582)





**Abbildung 5: Struktur und Genorganisation des *Atropa belladonna*-Plastidenchromosoms.** Große und kleine Einzelkopienregion (LSC; SSC) sind durch eine invertierte Repetition (IR<sub>A</sub> und IR<sub>B</sub>, fett hervorgehoben) getrennt. Gene mit Introns sind durch einen Stern markiert. Gene im Innern des Kreises werden im Uhrzeigersinn transkribiert, Gene außerhalb des Kreises entgegen dem Uhrzeigersinn. ORF489 im IR<sub>B</sub> flankierend zur IR<sub>B</sub>/SSC-Grenze ist eine verkürzte Form von *ycf1*.

Die Sequenzen dieser Klone decken exakt 86,2% des Chromosoms ab und bildeten das Gerüst für die Etablierung der Gesamtsequenz. Lücken zwischen den Klonen wurden anhand der Sequenzierung überlappender PCR-Produkte geschlossen. Klonübergänge wurden ebenfalls anhand von PCR-Produkten überprüft. Als Matrize für die PCR-Reaktionen diente aus isolierten Plastiden gewonnene DNA. Insgesamt wurden 546 Einzelsequenzen mit 308709 Bp assembliert.

Das plastidäre Chromosom von *Atropa belladonna* bildet ein zirkuläres DNA-Molekül von 156692 Bp Länge mit einem G + C Gehalt von 37,6%. Eine invertierte Repetition (IR; 25907 Bp), die u.a. das rRNA-Operon enthält, trennt eine kleine und eine große nicht-repitive Region (SSC; *small single copy*; 18008 Bp und LSC; *large single copy*; 86870 Bp; siehe Abb. 5). Die annotierte Gesamtsequenz wurde unter der Akzessionsnummer AJ 316582 in der EMBL-Datenbank deponiert.

### 3.1.2 Sequenzvergleich der Plastidenchromosomen von Tabak und *Atropa*

Die Sequenzidentität der Plastidenchromosomen von Tabak und *Atropa* ist mit 96,2% Identität größer als die irgendeines anderen, bisher sequenzierten Paares plastidärer Chromosomen, was auf Grund der engen Verwandtschaft der beiden Arten zu erklären ist (Abb. 6). Tabak und *Atropa* sind Mitglieder der Familie Solanaceae, gehören dort allerdings zu verschiedenen Unterfamilien, den Solanoideae (*Atropa*) und Cestroideae (*Nicotiana*).

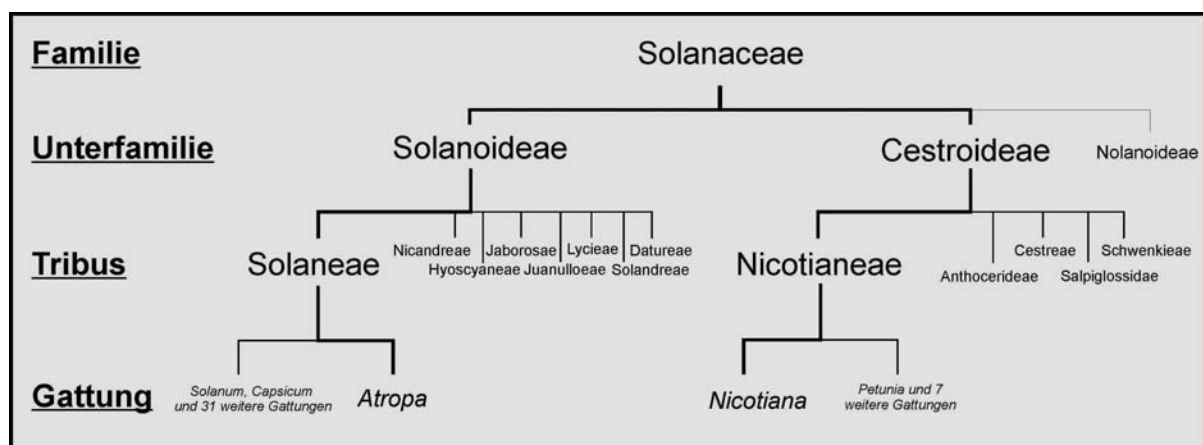


Abbildung 6: Taxonomische Einordnung der Gattungen *Atropa* und *Nicotiana* in die Familie Solanaceae (D'Arcy 1979, 1991).

Tabelle 5: Klassifikation aller Gene und Pseudogene des Plastidenchromosoms von *Atropa***Gene, die für RNAs kodieren****Gene für ribosomale RNAs***rrn23<sup>#</sup>, rrn16<sup>#</sup>, rrn5<sup>#</sup>, rrn4.5<sup>#</sup>***Gene für Transfer-RNAs***trnA(UGC)<sup>§#</sup>, trnC(GCA), trnD(GUC), trnE(UUC), trnF(GAA), trnG(GCC), trnG(UCC)<sup>§</sup>, trnH(GUG), trnI(CAU)<sup>#</sup>, trnI(GAU)<sup>§#</sup>, trnK(UUU)<sup>§</sup>, trnL(CAA)<sup>#</sup>, trnL(UAA)<sup>§</sup>, trnL(UAG), trnM(CAU), trnM(CAU), trnN(GUU)<sup>#</sup>, trnP(UGG), trnQ(UUG), trnR(ACG)<sup>#</sup>, trnR(UCU), trnS(GCU), trnS(GGA), trnS(UGA), trnT(GGU), trnT(UGU), trnV(GAC)<sup>#</sup>, trnV(UAC)<sup>§</sup>, trnW(CCA), trnY(GUA)***Andere Gene für RNAs***sprA***Gene, die für Polypeptide kodieren****Gene für ribosomale Peptide***rps2, rps3, rps4, rps7<sup>#</sup>, rps8, rps11, rps12<sup>§†</sup>, rps14, rps15, rps16<sup>§</sup>, rps18, rps19, rpl2<sup>§#</sup>, rpl14, rpl16<sup>§</sup>, rpl20, rpl22, rpl23<sup>#</sup>, rpl32, rpl33, rpl36***Gene für Untereinheiten des Transkriptionsapparates***rpoA, rpoB, rpoC1<sup>§</sup>, rpoC2***Gene für Untereinheiten des Photosyntheseapparates***rbcl**psaA, psaB, psaC, psal, psaJ**psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbl, psbj, psbk, psbl, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ (ycf9)**petA, petB<sup>§</sup>, petD<sup>§</sup>, petG, petL, petN (ycf6)**atpA, atpB, atpE, atpF<sup>§</sup>, atpH, atpI**ycf3<sup>§</sup>, ycf4, cemA (ycf10)***Gene für Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase***ndhA<sup>§</sup>, ndhB<sup>§#</sup>, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK***Andere proteinkodierende Gene***accD, clpP<sup>§</sup>, ccsA (ycf5)***Konservierte Leserahmen***ycf1, ycf2<sup>#</sup>, ycf14 (matK; partiell homolog zu Intronmaturasen)***Pseudogene***infA, ycf15<sup>#</sup>*

<sup>§</sup> Gen mit Intron; <sup>§</sup> Gen mit zwei Intronen; <sup>†</sup> *trans*-gespleißtes Gen; <sup>#</sup> Gen liegt als Folge der invertierten Repetition (IR) in zwei Kopien vor; Abkürzungen und Nomenklatur nach Stoebe *et al.* (1998)

### 3.1.2.1 Vergleich kodierender Regionen

Das Plastidenchromosom von *Atropa* kodiert, wie das von Tabak, für genau 113 Gene (Tabelle 5). Das Genrepertoire sowie die Gen- und Operonanordnung auf dem Chromosom sind identisch zwischen den beiden Arten. Auch die Besonderheiten von Tabak im Vergleich mit anderen publizierten plastidären Gesamtsequenzen (Sugiura 1995) sind in gleicher Weise in *Atropa* vorhanden. So gibt es in *Atropa* ein Homologes des Gens *sprA*, das eine RNA kodiert, die an der Reifung der 16S-rRNA beteiligt sein soll (Vera und Sugiura 1994; Sugita *et al.* 1997), und 94% Identität mit der entsprechenden Tabaksequenz besitzt. Zudem ist *infA*, welches in anderen Plastomen einen prokaryotischen Initiationsfaktor der Translation kodiert, in *Atropa* wie auch in Tabak ein Pseudogen ohne durchgehenden Leserahmen. Schließlich wurde in *Atropa* die von Tabak bekannte Überlappung der Gene *rpl22* und *rps3* gefunden, die beispielsweise in *Marchantia polymorpha* oder auch in Reis und Mais nicht vorhanden ist.

Im folgenden sollen Unterschiede in den kodierenden Bereichen der Plastidenchromosomen von *Atropa* und Tabak untersucht werden, die potentiell eine Rolle für die Kern/Plastom-Inkompatibilität haben können. Die Koevolution von Proteinen und ihren interagierenden Partnern ist aus anderen Systemen bekannt (Goh *et al.* 2000). Die Divergenz plastidärer Polypeptide im zwischenartlichen Vergleich kann potentiell die wechselseitige Adaption von nukleären und plastidären Proteinen aufheben (s. Abb. 2). Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Plastidenchromosomen in peptidkodierenden Genen finden sich hauptsächlich als Folge von Punktmutationen, die teilweise die Codierung einzelner Triplets verändern, seltener in Form von Deletionen/Insertionen (Indels) ganzer oder sogar mehrerer Kodonen vorkommen.

#### 3.1.2.1.1 Insertionen/Deletionen (Indels) in kodierenden Regionen

Insgesamt finden sich 11 Indels in 7 Peptid-kodierenden Genen von *Atropa* relativ zu Tabak. Sechs dieser Indels sind mit direkten Sequenzwiederholungen assoziiert (nicht gezeigt). (i) Im *Atropa-accD*-Gen, das für die  $\beta$ -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase kodiert (Sasaki *et al.* 1993), fehlen im Vergleich zu Tabak 8 hintereinander liegende Kodonen, die sich allerdings in einer Region niedriger Sequenzkonservierung in Landpflanzen befinden (Abb. 7A). In diesem Bereich treten

Deletionen auch in allen anderen untersuchten Arten auf, ausgenommen in *Arabidopsis thaliana*, was nahe legt, daß dieser Bereich wenig signifikant für die Funktion der Carboxylase ist. (ii) Eine ähnlich schwache Konservierung liegt für eine Region im *ccsA*-Gen vor, dessen Genprodukt am Zusammenbau des Photosystems I beteiligt ist (Xie und Merchant 1996; Abb. 7B). (iii) Das *rpoC2*-Gen ist eines der am raschesten evolvierenden Gene des plastidären Chromosoms überhaupt und Indels sowie Aminosäuresubstitutionen sind im zwischenartlichen Vergleich nicht selten (Cummings *et al.* 1994). So sind auch im *rpoC2*-Gen von *Atropa* drei aufeinanderfolgende Kodonen im Vergleich mit Tabak deletiert. In der gleichen Region finden sich ähnlich kurze Deletionen auch in *Arabidopsis*, *Spinacia*, *Zea* und anderen Pflanzen (Abb. 7C). Die funktionelle Bedeutung dieser Domäne ist nicht geklärt, obwohl bekannt ist, daß das *rpoC2*-Genprodukt in Prokaryoten diejenige Untereinheit der RNA Polymerase ist, deren Interaktion mit Sigmafaktoren essentiell für die Funktion des Enzyms ist (Arthur und Burgess 1998). (iv) Eine weitere Deletion in *Atropa* betrifft drei Basentriplets inklusive des Stoppkodons im *rps16*-Gen, was zu einer kurzen carboxyterminalen Extension führt, identisch mit der in Spinat. Grundsätzlich ist der Rps16 C-Terminus wenig konserviert und es ist bekannt, daß er nicht mit ribosomaler RNA oder anderen ribosomalen Proteinen in Kontakt tritt (Allard *et al.* 2000; Abb. 7D). (v,vi) Weitere Indels sind in den Leserahmen *ycf1* und *ycf2* vorhanden, von denen man weiß, daß sie essentiell für das Überleben der Pflanze sind, ohne daß man ihre Funktion jedoch kennen würde (Drescher *et al.* 2000). Im Gegensatz zu *ycf2* ist der Sequenzvergleich von *ycf1* geprägt von Indels und nur selten treten konservierte Bereiche auf (nicht gezeigt). Keine der 4 Deletionen in *Atropa* berührt eines dieser konservierten Elemente. Dazu fehlen alle in *Atropa* deletierten Kodonen von *ycf1* auch in *Arabidopsis*, so daß auch hier eine wesentliche Bedeutung für die Funktion des Proteins unwahrscheinlich erscheint. Auch für *ycf2* gilt, daß die gefundenen Indels, diesmal Insertionen von 3, respektive 8 Kodonen in *Atropa* relativ zu Tabak, nur außerhalb von konservierten Domänen des Proteins zu finden sind. Schließlich gibt es noch ein Paar durch 3 Bp getrennte Insertionen von 4 und 5 Bp Länge im *Atropa*-16S-rRNA Gen. Diese Region ist konserviert in Landpflanzen. Wenn jedoch Algen in den Sequenzvergleich miteinbezogen werden, ist festzustellen, daß exakt an dieser Stelle eine besonders hohe Varianz zwischen einzelnen Algenarten vorhanden ist (Abb. 7E). Außerdem sind in Untersuchungen zur Struktur der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Escherichia coli* keine Interaktionen dieser Region der 16S-rRNA mit ribosomalen Proteinen,

<b>A</b>		65	
	AccDNT	NRKV KNIHSWRNRD N--SSCS-NV DYLF	
	AccDAB	.... -	
	AccDAT	YDMD ..FYG.DE.S SYS..Y.N.. .L.V	
	AccDOE	-----	
	AccDLJ	TDMD .....NDIE --C.YN-.. ..V	
	AccDSO	.DPE .Q...S..SE S--.Y.-.. NH.V	
	AccDEV	KGRA Q..R.CGG.. --Y.Y-N.I I...	
	AccDPT	-----	
	AccDMP	-----	
<b>B</b>		196	
	CcsANT	--VLQ NTSF <b>F</b> SAKNY YRSQL	
	CcsAAB	--.E ..... - - - - - - - - - - - - - -	
	CcsAAT	ILLQ. .IN.SFSR.. ..Y..	
	CcsAOE	SN..L S...I.S... ..A..	
	CcsALJ	--.R K...S.YR.. ..Y.F	
	CcsASO	SNIV. .A.PSYVR.. .....	
	CcsAZM	-SA.K ....PVFP.. .KY..	
	CcsAOS	-SA.K S.F.PLFP.. .KY..	
	CcsAPT	KSD.. Y.VY..ST.. RKC..	
CcsAMP	LS-YK TQKV..FI.F RKW..		
<b>C</b>		957	
	RpoC2NT	NCS RMG <b>P</b> FKDVKY HSVIK	
	RpoC2AB	... ..- - - - - TL.. .....	
	RpoC2AT	..F .....NH..H .N..N	
	RpoC2OE	.WF .....N...S QN...	
	RpoC2LJ	..F Q.....NN... .NG..	
	RpoC2SO	..F .I....G... - - - P.	
	RpoC2ZM	... .I.L..NS.. - - - PN	
	RpoC2OS	... .I.F..NS.N - - - PN	
	RpoC2PT	DYF .IVL.N.S.C YDTGN	
RpoC2MP	.T. TAKF.EFN.N FKILN		
<b>D</b>		85	
	Rps16NT	EVFKEL RPNQS---	
	Rps16AB	..... .PKFN	
	Rps16AT	GI.T.- - - - - - - - - - - - - - - -	
	Rps16OE	G..T.F SL..MEVN	
	Rps16LJ	GF.MD. - - - - - - - - - - - - - -	
	Rps16SO	.....F .L..TKFN	
	Rps16ZM	.F..DK ERTL.---	
Rps16OS	.F...K ERTL.---		
<b>E</b>		73	
	RRN16NT	CATGCAAGTC GGACGGGAA~ ~~~GTG~~~~ ~~~~~~GT GTTTCAGTG GCGGACGGGT	
	RRN16AB	..... <b>A</b> CAC.G.AA <b>A</b> C C~~~~~. . . . .	
	RRN16AT	.....~ ~~~. . . . .	
	RRN16OE	.....~ ~~~. . . . .	
	RRN16LJ	.....~ ~~~. . . . .	
	RRN16SO	.....~ ~~~. . . . .	
	RRN16EV	.....~ ~~~. . . . .G. . . . .	
	RRN16ZM	.....A.....~ ~~~. . . . .A. . . . .	
	RRN16OS	.....A.....~ ~~~. . . . .A. . . . .	
	RRN16PT	.....~ ~~~. . . . .	
	RRN16MP	.T.....~ ~~~.GATCCT AGTG~~~~. . . . .	
	RRN16GT	.T...AA.~ ~~~~~~ ~GTTT~T. AAC.TT. . . . .	
	RRN16OSI	.T...A.~ ~~~~~~ ~GTTT~T. AAC.A. . . . .	
	RRN16PP	.A...AA.~ ~~~~~~ ~GTTTGTAAA AAC.TT. . . . .	
	RRN16CP	.A...AAG.T CGC~~~~~ ~~~~~~AA .A.CTT. . . . .	
RRN16EG	.T.A...AA.TT ACTAGCAATA ~~~~~~G TAA.TT. . . . .		
RRN16CV	.T...CATGC AA~.TTGGC TTGCCAGAT. .CGATG. . . . .		

Abbildung 7: Durch Indels in kodierenden Bereichen des *Atropa* bzw. Tabak-Plastidenchromosoms hervorgerufene Unterschiede in den entsprechenden Genprodukten. Ein Vergleich zu homologen Sequenzen anderer Pflanzen ist gezeigt. (A) Partieller Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Acetyl-CoA-Carboxylase (kodiert durch *accD*); (B) dito. für den Cytochrom c-Assemblierungsfaktor (kodiert durch *ccsA*); (C) für die  $\beta$  Untereinheit der PEP (kodiert durch *rpoC2*); (D) für ein Peptid der 30S ribosomalen Untereinheit (kodiert durch *rps16*) und (E) partieller Sequenzvergleich der 16S-rRNA. Fett = Amino/Nukleinsäurereste, die im Vergleich Tabak-*Atropa* deletiert/insertiert sind. Punkt = Übereinstimmung; Strich = Deletion; NT = *Nicotiana tabacum*; AB = *Atropa belladonna*; AT = *Arabidopsis thaliana*; OE = *Oenothera elata*; LJ = *Lotus japonicus*; SO = *Spinacia oleracea*; EV = *Epifagus virginiana*; ZM = *Zea mays*; OS = *Oryza sativa*; PT = *Pinus thunbergii*; MP = *Marchantia polymorpha*; GT = *Guillardia theta*; OSI = *Odontella sinensis*; PP = *Porphyra purpurea*; CP = *Cyanophora paradoxa*; EG = *Euglena gracilics*; CV = *Chlorella vulgaris*.

Initiationsfaktoren, tRNAs, mRNAs, Antibiotika oder sich selbst festgestellt worden (Mueller und Brimacombe 1997a und b). Bei der ansonsten hohen Konservierung des translationalen Apparates zwischen Prokaryoten und Plastiden (Zerges 2000) sind die *E. coli*-Daten ein recht verlässlicher Hinweis dafür, daß diese RNA-Domäne wohl keine entscheidende Rolle bei der Peptidsynthese spielt. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß alle Indels in *Atropa* relativ zu Tabak Regionen niedriger Sequenzkonservierung betreffen. Dies und die geringe Menge an Indels insgesamt deuten darauf hin, daß Indels eher weniger wichtig für die Ausbildung von kompartmenteller Inkompatibilität sind. Eine Ausnahme bildet das Indel in *rpoC2*, das ein konserviertes Kodon betrifft und zudem ein Gen, dessen Produkt eine unmittelbare Rolle in der Kern/Plastid-Interaktion spielt. Ein Einfluss auf den Phänotyp der Ab(Nt)-Cybride über eine inkorrekte Interaktion von Sigmafaktor und RpoC2 scheint daher möglich.

#### **3.1.2.1.2 Veränderungen in der Kodierung als Folge von Punktmutationen**

Wie Insertionen und Deletionen können auch Punktmutationen, die zur Umkodierung eines Basentriplets führen, die Funktion eines Proteins nachhaltig verändern (Du *et al.* 2000). Um die Wichtigkeit einzelner Aminosäuresubstitutionen im *Atropa*/Tabak-Vergleich einzuschätzen, wurden diese auf ihre Konservierung innerhalb der Landpflanzen untersucht, d.h. veränderte Positionen wurden in einem Sequenzvergleich von 10 Arten betrachtet (*Atropa belladonna*, *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea*, *Oenothera elata*, *Arabidopsis thaliana*, *Pinus thunbergii*; *Lotus japonicus*, *Zea mais*, *Oryza sativa*, *Marchantia polymorpha*; *ycf1* und *ycf2* sind nicht in Reis und Mais vorhanden, so daß hier ein Sequenzvergleich von nur 8 Arten durchgeführt wurde). Innerhalb dieser Sequenzvergleiche wurden Austausche, die konservierte und nichtkonservierte Positionen betrafen, unterschieden. Als konserviert wurden solche Aminosäurepositionen angesehen, die entweder in den 10 untersuchten Arten nicht variierten oder konservativ, also von Aminosäuren gleicher physiko-chemischer Eigenschaften, besetzt sind. Die restlichen Stellen wurden als nichtkonserviert betrachtet.

Es zeigte sich, daß die große Mehrzahl aller Austausche an nichtkonservierten Positionen vorliegen und/oder konservativ sind (97%). Allerdings betrafen 11 Austausche (d.h. 3%) in 9 Genen konservierte Positionen ohne konservativ zu sein (Tab. 6).

Tabelle 6: Liste aller auf Grund von Punktmutationen in plastidären Genen zwischen Tabak und *Atropa* hervorgegangenen Aminosäureaustausche

Gen	an nichtkonservierten Positionen	an konservierten Positionen	
		konservativ	nicht konservativ
<i>accD</i>	N-S 52;H-Q 105;N-S 138;R-L 140;S-N 172;A-T 199;V-I 200;R-K 208;P-A 279; <b>Y-H</b> 369;L-Q 473		
<i>atpA</i>	I-V 109;A-S 245; <b>L-P</b> 288		P-L 264 ed
<i>atpB</i>	P-L 20;I-V 77;E-D 83;E-K154		T-K 95; T-M 129
<i>atpE</i>	L-I 98;P-S 35		
<i>atpF</i>	G-E 72;S-T 90;R-S 170;S-A 171		
<i>atpH</i>		I-V 5	
<i>clpP</i>	E-G 38;V-I 39;D-N 40;D-E 62;V-I 78;I-V 94;S-G 131;F-Y 132		I-M 125
<i>matK</i>	R-I 39;K-Q 53;L-F 54;F-L 56;S-T 83;F-L 125; <b>Y-H</b> 128;F-Y 188;Q-K 209; <b>S-P</b> 239;F-L 266;M-I 298;L-I 358;A-E 382		C-F 313
<i>ndhA</i>	F-V 31;L-F 84;T-P 95;F-L 133;I-V 140; <b>L-S</b> 189; W-L 204;		
<i>ndhC</i>	L-F 26		
<i>ndhD</i>	S-L 57;N-D 72;V-I 107;C-A 153;L-V 185; <b>L-S</b> 293;L-V 411	L-I 117	S-L 200 ed; S-L 225 ed
<i>ndhF</i>	F-I 27;V-I 53;Y-S 217;D-N 222; <b>I-S</b> 226; K-Q 395;A-V 460;D-Q 463;N-K 482;C-Y 489;A-S 503;A-T 530;G-V 568;L-F 670;T-I 681;I-V 728;L-F 736;S-L 738;L-F 740	S-T 394; I-L 614	
<i>ndhG</i>		I-L 138	
<i>ndhH</i>	A-T 3;V-I 186		
<i>ndhK</i>	Y-D 22;T-A 72;A-V 230;Q-R 243;H-R 244		
<i>petA</i>	R-K 101;P-S 121;Q-K 156;D-E 234		
<i>petB</i>		V-I 143	
<i>psaB</i>	Y-S 206;E-D 413		Q-E 248
<i>psaJ</i>	G-V 20		
<i>psbC</i>	L-I 170		
<i>psbD</i>			
<i>psbE</i>			P-S 72 ed
<i>psbH</i>	A-S 12;R-G 13;K-R 15;K-R 16;G-A 18;L-V 19;G-D 21;L-V 45		
<i>rpoC1</i>	H-Y 580;S-Y 686		
<i>rpoB</i>	Q-R 489; <b>L-S</b> 809		
<i>rpoC2</i>	N-D 19;D-E 32;I-S 245;R-G 484;R-K 487; <b>F-S</b> 506;R-Q 511;D-G 532;A-T 553;V-I 636;L-I 648;V-L 742;R-I 751;N-K 761;L-F 793;A-E 794;I-L 924;A-S 949;D-T 957;V-L 958;K-D 966;S-C 986; H-R 997;V-I 1163;I-V 1170;K-R 1364;N-K 1374	L-I 1222	
<i>psbK</i>	F-Y 19		
<i>psbL</i>	N-S 10		
<i>psbT</i>	V-L 29		
<i>rpl2</i>	H-R 35;H-R 36		



<b>rpl14</b>		V-I 57	
<b>rpl16</b>	H-Y 22		
<b>rpl22</b>	N-D 28;I-V 57;D-N 119;E-K 124;Y-N 126;P-T 141;R-H 143	V-G 112	
<b>rpl32</b>	S-W 26;S-V 27		
<b>rpoA</b>	S-F 67;D-E 105;S-Y 115;H-Q 163;K-N 264;V-I 317;R-Q 319	L-I 88; I-V 95; I-V 108	
<b>rps3</b>	T-M 97;F-L 103;H-N 104;S-A 197		
<b>rps4</b>	N-T 28		
<b>rps8</b>	R-Q 52;K-N 54;K-R 69		
<b>rps12</b>	K-N 5		
<b>rps14</b>	R-K 3		<b>P-L 50 ed</b>
<b>rps15</b>	V-I 9;S-F 11;S-A 65		
<b>ycf1</b>	138		
<b>ycf2</b>	F-L 11;A-V 36;N-T 34; T-M 440; K-R 531;W-L 941; Y-N 996; D-Y 1059;H-P 1281; P-S 1278;D-A 1521;R-H 1552; D-G 1705; K-E 1713;A-S 1766;L-I 1819;N-K 2047;E-G 2136		
<b>ycf3</b>			<b>K-Q 13</b>
<b>ycf4</b>	P-T 54;I-V 58;L-I 648		
<b>ycf5</b>	K-N 93;V-G 125;Q-K 170;L-V 179;F-L 184;Q-E 191		
<b>ycf10</b>	F-L 68		
Gesamtzahl an Substitutionen / Anzahl Gene mit Substitutionen	337/39	12/9	11/9

Die Substitutionen sind gemäß ihrem Einfluss auf die Konservierung des jeweiligen Proteins klassifiziert (s. Text). Kodonsubstitutionen sind durch die Veränderung der durch sie bestimmten AS im Ein-Buchstaben-Kode, gefolgt durch die Position im Peptid angezeigt. Für das Gen *ycf1* ist nur die Gesamtzahl aller Substitutionen gezeigt. Kodonsubstitutionen, die durch RNA-Edierung auf Transkriptebene in Tabak "korrigiert" werden (Hirose *et al.* 1999), sind mit „ed“ markiert. Substitutionen, die potentiell durch Edierung in *Atropa* „korrigiert“ werden könnten, sind in größerer Schrift dargestellt.

Um festzustellen, ob diese 11 Austausche an konservierten Positionen konservierte Proteindomänen betreffen, wurde die unmittelbare Sequenzumgebung auf ihren Konservierungsgrad untersucht. Dazu wurden in einem Fenster von 20 Aminosäuren um die in Frage stehenden Stellen konservierte und nicht-konservierte Positionen gezählt. Die Position des Fensters wurde dabei so gewählt, daß es eine maximale Anzahl an konservierten Aminosäureresten umfasst, da die untersuchte Position einerseits am Rand oder aber in der Mitte einer konservierten Domäne liegen kann. Der Quotient aus variablen zu konservierten Positionen liefert einen Wert (I-Wert). Je kleiner dieser Wert, um so größer ist die Konservierung der Domäne, in der die untersuchte Substitution auftritt (Tab. 7).

Tabelle 7: Kodonsubstitutionen an konservierten Positionen im Tabak/*Atropa*-Vergleich

Gen	Aminosäure-substitution <sup>a</sup>	I <sup>b</sup>
<b><i>atpA</i></b>	P-L 264 <sup>ed</sup>	0
<b><i>ndhD</i></b>	S-L 225 <sup>ed</sup>	0.1
<b><i>psaB</i></b>	Q-E 248	0.2
<b><i>rps14</i></b>	P-L 50 <sup>ed</sup>	0.25
<b><i>psbE</i></b>	P-S 72 <sup>ed</sup>	0.3
<b><i>atpB</i></b>	T-K 95	0.35
<b><i>atpB</i></b>	T-M 129	0.35
<b><i>ycf3</i></b>	K-Q 13	0.4
<b><i>ndhD</i></b>	S-L 200 <sup>ed</sup>	0.6
<b><i>clpP</i></b>	I-M 125	0.65
<b><i>matK</i></b>	C-F 313	0.95

<sup>b</sup> Verhältnis der variablen zu den invariablen Positionen in einem Fenster von 20 Kodonen um die Substitution  
<sup>ed</sup> Kodontransition auf Transkriptebene durch RNA-Edierung "korrigiert"

Interessanterweise werden unter den fünf Austausch in am stärksten konservierten Domänen (I-Wert kleiner/gleich 0,3) vier durch C-zu-U-RNA-Edierung in Tabak wieder aufgehoben, d.h. diese Basenaustausche wirken sich nicht auf das Protein aus (Hirose *et al.* 1999; Tab. 7). Nur für eines der betroffenen Proteine liegen verwertbare Kristallstrukturdaten vor, nämlich für die  $\alpha$ -Untereinheit der plastidären ATP-Synthase aus Spinat (Groth und Pohl 2001). So ist die zu L264 homologe Aminosäure in Spinat in *Atropa* im Zentrum des Proteins zu finden. Verändert man diesen Rest *in silico* zu Prolin, dem unedierten Zustand in Tabak, dann ergeben sich störende Interaktionen mit den Resten A267 und F318, was die Bedeutung der Edierung dieser Stelle für das Protein unterstreicht (PDB IFX0; Groth und Pohl 2001).

Der fünfte, ebenfalls in einer hochkonservierten Domäne gelegene Austausch betrifft das Gen *psaB*, das für eine Kernkomponente des Photosystem I-Reaktionszentrums kodiert. Die Kristallstruktur des verwandten Proteinkomplexes in *Synechococcus sp.* zeigt, daß der Austausch eine Position betrifft, die an der Oberfläche des Proteins liegt und nicht mit anderen Komponenten des Reaktionszentrums interagiert (PDB Id: 1JB0; Jordan *et al.* 2000).

Auch die beiden in weniger konservierten Domänen (höhere I-Werte) liegenden Substitutionen im *atpB*-Gen betreffen exponierte Aminosäurepositionen im homologen Protein von Spinat (PDB IFX0; Groth und Pohl 2001). Für die weiteren Substitutionen in *ycf3*, *ndhD* und *matK* liegen keine Strukturdaten vor.

### 3.1.2.1.3 Analyse von offenen Leserahmen unbekannter Funktion

In Tabak sind zusätzlich zum von Angiospermen bekannten Kanon plastidärer Gene 11 offene Leserahmen annotiert worden, für die der Nachweis einer Funktion (noch) aussteht. Einen Aufschluss über ihre funktionelle Signifikanz sollte ihr Konservierungsgrad geben. Es wurden daher Sequenzen sowohl von *Atropa* und von Tabak als auch von Spinat, der Nachtkerze (*Oenothera elata*; Hupfer *et al.* 2000) und von *Arabidopsis* (Sato *et al.* 1999) in die Untersuchung miteinbezogen. Das Plastidenchromosom von Spinat wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Régis Mache (Grenoble, Frankreich) sequenziert (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001). Ausgehend von den elf Loci in Tabak wurden Sequenzvergleiche mit homologen Bereichen der anderen Arten angefertigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Sechs der elf Tabak-ORFs sind auch in *Atropa* in voller Länge erhalten, während die restlichen fünf keinen adäquaten Gegenpart in *Atropa* besitzen, da sie alle vorzeitig terminieren. So sind die zu ORF 105 und ORF74 aus Tabak homologen Leserahmen in *Atropa* als Folge von deletionsabhängigen Leserasterverschiebungen nur 58 Basentriplets lang, bzw. in zwei kleinere Leserahmen von 30 und 35 Triplets geteilt. Die homologen Leserahmen von Tabak ORF70A, ORF103 und ORF75 sind in *Atropa* ebenfalls stark verkürzt, da Punktmutationen vorzeitige Stoppkodonen erzeugt haben.

Betrachtet man die homologen Bereiche in den anderen Dikotyledonen, so ergibt sich, daß kein einziger der 11 Tabakleserahmen in irgendeiner der untersuchten Arten vollständig erhalten ist. Obwohl die zugrunde liegenden Nukleotidsequenzen sehr ähnlich sind (zwischen 81% und 95%), unterscheiden sich die Leserahmen immens. Sie sind in ihrer Länge stark reduziert oder/und fragmentiert. So zerfällt beispielsweise Tabak ORF 115 in *Oenothera* und *Arabidopsis* in drei Teile (Tab. 8). Die Konservierung der Aminosäuresequenz ist von Fall zu Fall unterschiedlich, bleibt aber meist beschränkt auf Teilbereiche. So sind die Homologen der Tabak-ORFs 105, 74, 92, 79, 115 und 70A in Spinat, *Oenothera* und *Arabidopsis* weniger als 50% identisch. Höhere Konservierung ergibt sich für Tabak-

Tabelle 8: Vergleich der 11 in Tabak annotierten ORFs mit homologen Regionen in *Atropa* und anderen Dikotyledonen

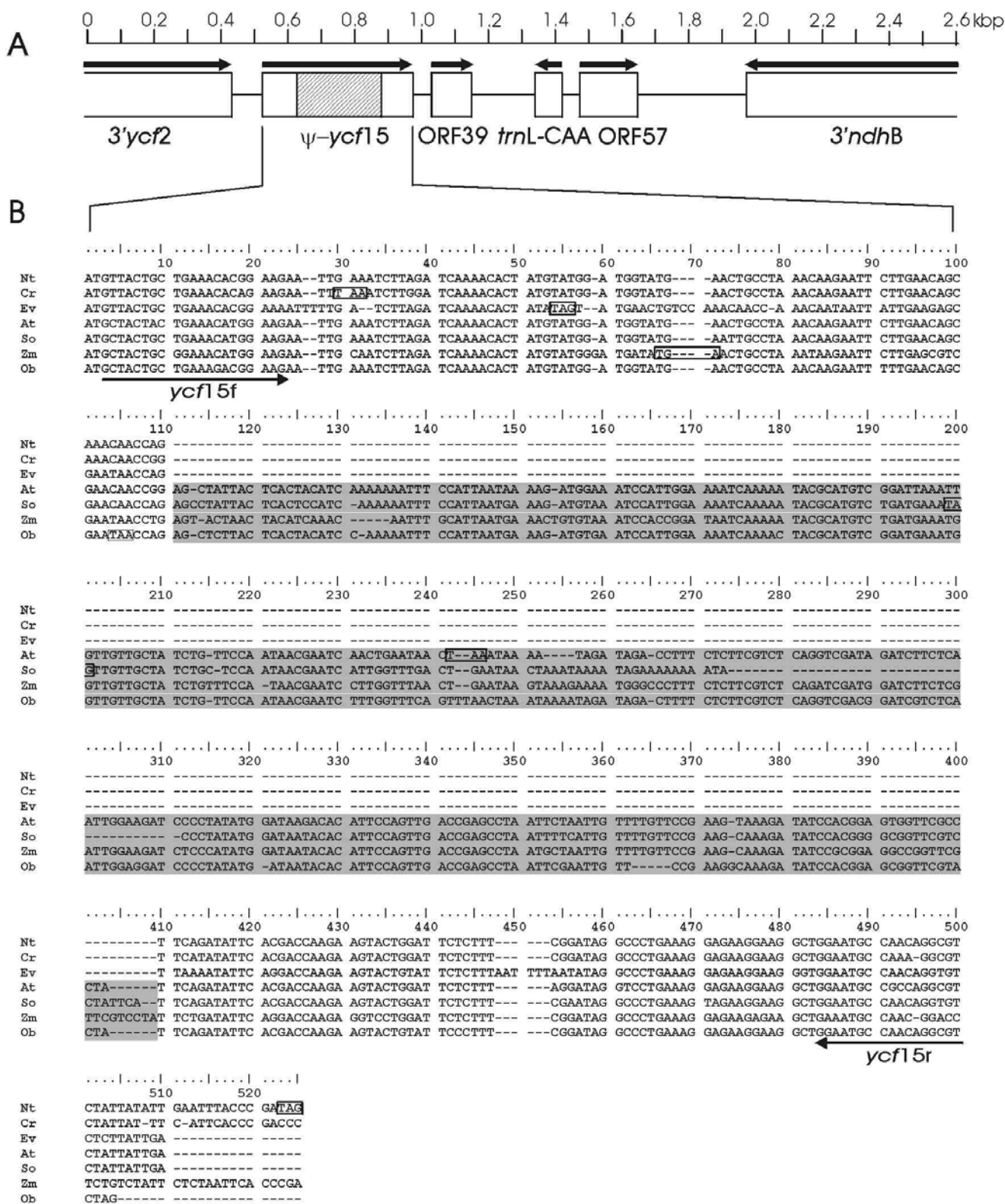
Tabak	Intergenische Region	<i>Atropa</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Oenothera</i>	Spinat
ORF105	<i>trnS</i> (UGA)- <i>ycf9</i> LSC	2 Deletionen; Überrest: <b>ORF58</b>	<b>ORF57</b> <b>ORF17</b>	<b>ORF21</b>	<b>ORF43</b>
ORF74	<i>ycf3-trnS</i> (GGA) LSC	2 Deletionen; Überrest: <b>ORF30</b> und <b>ORF35a</b>	-	<b>ORF41</b>	<b>ORF27a</b> <b>ORF25</b>
ORF70A	<i>trnT</i> (UGU)- <i>trnL</i> (UAA) LSC	TGG-zu-TAG-Mutation nach 2 AA, Überrest: <b>ORF35b</b>	<b>ORF20</b>	<b>ORF19</b>	<b>ORF27b</b>
ORF99	<i>petA-psbJ</i> LSC	7 Kodonenaustausche: <b>ORF99</b>	-	-	-
ORF103	<i>psbE-petL</i> LSC	GAA-zu-TAA-Mutation nach 80 AA: <b>ORF80</b>	-	-	-
ORF92	<i>ycf15-trnL</i> (CAA) IR	1 Kodonaustausch <b>ORF92</b>	<b>ORF39</b>	<b>ORF48</b>	<b>ORF39a</b>
ORF115	<i>ycf15-trnL</i> IR	1 Kodonaustausch <b>ORF115</b>	<b>ORF22</b> <b>ORF27</b>	<b>ORF71</b> <b>ORF29</b> <b>ORF26a</b>	<b>ORF39b</b> <b>ORF24</b>
ORF79	<i>trnL</i> (CAA)- <i>ndhB</i> IR	2 Kodonenaustausche: <b>ORF79</b>	-	<b>ORF22</b> <b>ORF56</b>	<b>ORF57</b> <b>ORF38</b>
ORF70B	<i>3'rps12-trnV</i> (GAC) IR	1 Kodonaustausch: <b>ORF70B</b>	-	<b>ORF48</b>	<b>ORF47</b>
ORF131	<i>3'rps12-trnV</i> (GAC) IR	identisch: <b>ORF131</b>	<b>ORF36</b> <b>ORF42</b> <b>ORF49</b>	<b>ORF25</b> <b>ORF26b</b>	<b>ORF54a</b> <b>ORF54b</b>
ORF75	<i>trnN</i> (GUU)- ORF350 IR	GAA-zu-TAA-Mutation nach 69 AA: <b>ORF69</b>	-	<b>ORF26c</b>	<b>ORF26</b>

Die genaue Position der ORFs in Tabak findet sich unter dem zugehörigen EMBL-Datenbankeintrag (Acc. Nr. Z00044). Die hier in den anderen Arten an homologer Stelle gefundenen ORFs sind aufgelistet mit einer Angabe ihrer Länge in Kodonen.

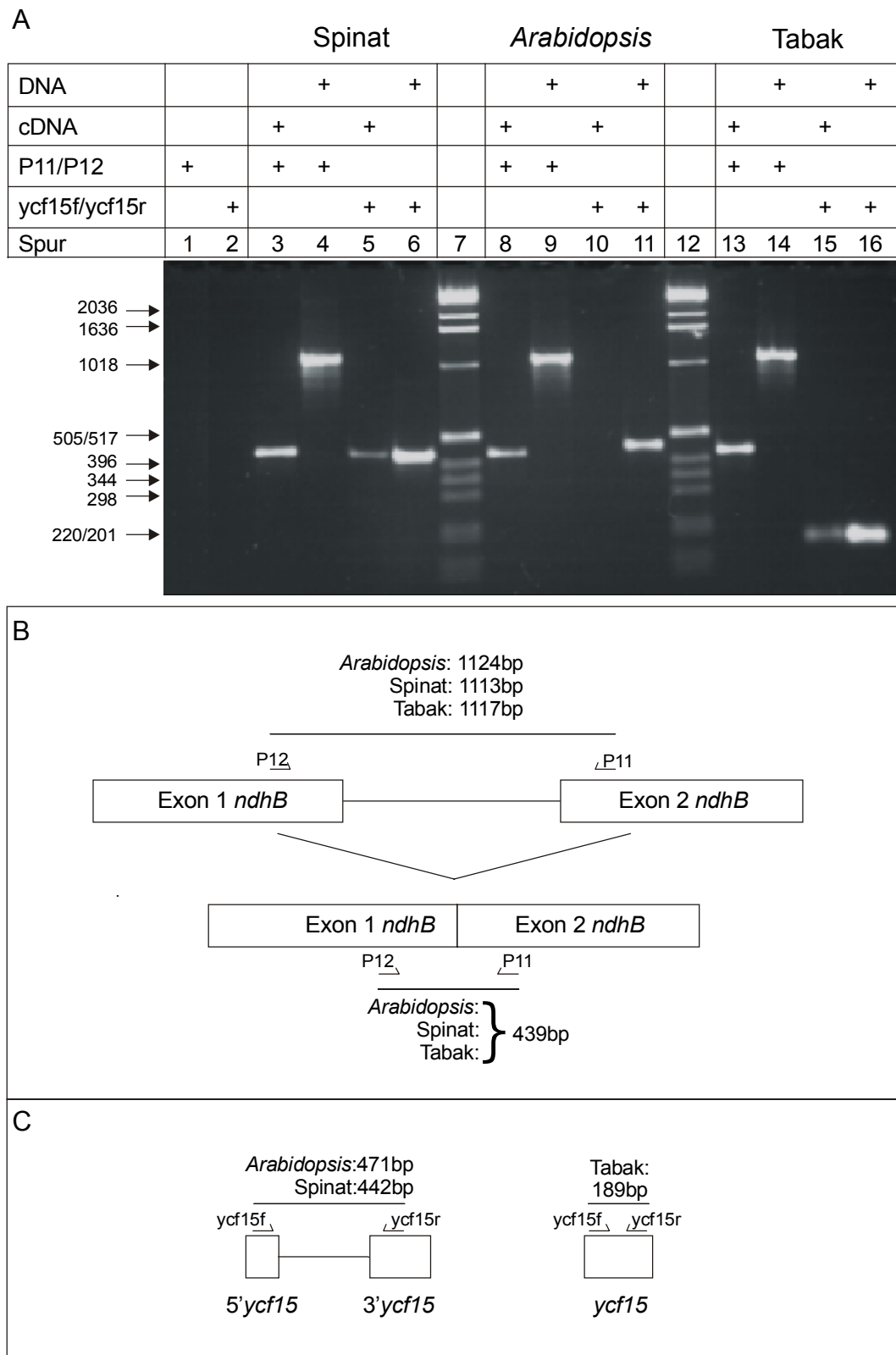
ORFs 131, 75 und 70B, die zwar nur als Fragmente in den anderen Arten vorkommen, aber über die Gesamtlänge dieser Fragmente 50 bis 90% Sequenzidentität zeigen. Insgesamt jedoch sind die in Tabak annotierten ORFs weder in der Länge noch in der Aminosäuresequenz in Dikotyledonen konserviert.

Neben echten Genen und ORFs sind in Plastidenchromosomen auch sogenannte hypothetische offenen Leseraster (*ycf*) annotiert worden, deren Funktion zwar unbekannt war, deren hohe Sequenzkonservierung in Pflanzen verschiedenster phyletischer Linien jedoch eine funktionelle Bedeutung nahe legt. Tatsächlich konnten für die meisten dieser *ycfs* mittlerweile Funktionen nachgewiesen werden

(Xie und Merchant 1996; Ruf *et al.* 1997; Rolland *et al.* 1997; Hager *et al.* 2001; Swiatek *et al.* 2001), nicht jedoch für *ycf1*, *ycf2* und *ycf15*. Diese drei Leserahmen besitzen im Gegensatz zum gesamten Rest plastidärer kodierender Bereiche keine Entsprechung in Prokaryoten (Martin *et al.* 1998). Durch die Disruption von *ycf1* und *ycf2* konnte gezeigt werden, daß es sich um essentielle Gene für das Überleben der Pflanze handelt (Drescher *et al.* 2000). Für *ycf15* steht ein solcher Nachweis noch aus. Dieser Leserahmen ist identisch zwischen Tabak und *Atropa*, zeigt aber deutliche Längenunterschiede zwischen verschiedenen anderen Arten. So findet man in *Arabidopsis* und Spinat eine Insertion von ca. 250 Bp im Vergleich mit Tabak und *Atropa* (Abb. 8; *Atropa*-Sequenz im gezeigten Bereich identisch mit Tabak). Diese Insertion ist wesentlich weniger stark konserviert als es die flankierenden Bereiche sind und enthält mehrere Stoppkodonen. Ihre Verbreitung in Vertretern der Rosiden (*Arabidopsis*), Caryophyllales (Spinat) und den weiter entfernten Monocotyledonen (Mais), aber Abwesenheit in den Asteriden Tabak, *Cuscuta reflexa* und *Epifagus virginiana* zeigt, daß es sich um eine ursprüngliche Sequenz der Angiospermen handelt. In den Asteriden unterbricht dieses Sequenzelement den Leserahmen von *ycf15* und müsste entfernt werden, wenn es sich um ein funktionales Gen handelte (Nimzyk *et al.* 1993). Eine Möglichkeit, dieses Sequenzelement zu entfernen, wäre über einen posttranskriptionalen spleißähnlichen Vorgang, und deshalb wurde ihre Prozessierung auf cDNA-Ebene untersucht. Dazu wurden cDNAs von Tabak, *Arabidopsis* und Spinat mit den für *ycf15* spezifischen Oligonukleotiden *ycf15for* und *ycf15rev* amplifiziert (siehe Abb. 8 und 9). Die Amplifikate wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Amplifikationsprodukte für Tabak entsprachen der erwarteten Größe von 189 Bp, sowohl auf DNA-, wie auch auf cDNA-Ebene (Spuren 15 und 16; Abb. 9). Für die Spinat-cDNA konnte ebenfalls nur ein Amplifikat nachgewiesen werden, das der Länge des PCR-Produkts von genomischer DNA entspricht, jedoch kein kürzeres, möglicherweise von einem Spleißvorgang herrührendes Produkt (Spuren 5 und 6; 250 Bp). Dagegen war *ycf15* in *Arabidopsis* auf cDNA-Ebene überhaupt nicht nachweisbar (Spur 10). Als Kontrolle wurde das Spleißen von *ndhB* untersucht, das in allen drei Arten nachgewiesen werden konnte und die Integrität der verwendeten cDNAs bestätigt (Spuren 3, 4, 8, 9, 13 und 14). Da also *ycf15* außer in Tabak und *Atropa* kein Leseraster darstellt und in *A. thaliana* nicht einmal transkribiert wird, darf geschlossen werden, daß es sich bei diesem Leserahmen nicht um ein proteinkodierendes Gen handelt.



**Abbildung 8: Position und Struktur von *ycf15* in Angiospermen. (A) Lokalisation von *ycf15* zwischen den Transkriptionseinheiten von *ycf2* und *ndhB*. Die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. (B) Vergleich von *ycf15*-Sequenzen aus 7 Angiospermen. Pfeile geben die Positionen der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide an. Stoppkodonen sind gerahmt. Der Sequenzeinschub ist schattiert dargestellt. Abkürzungen wie in Abb. 7. Cr = *Cuscuta reflexa*.**



**Abbildung 9: PCR-Analyse der Genexpression von *ycf15* und *ndhB* in drei dikotylen Pflanzen**  
**(A)** Die Amplifikation wurde mit genspezifischen Oligonukleotiden (*ndhB*: P11/P12; *ycf15*: *ycf15f/ycf15r*) durchgeführt. Die Größen der Banden des Längenmarkers in Bp sind auf der linken Seite angegeben (Spuren 7 und 12). Kontrollreaktionen mit Wasser statt DNA-Matrize zeigen die Spuren 1 und 2. **(B + C)** Schematische Darstellung der Position der Oligonukleotide und die erwarteten Längen der PCR-Produkte.

Insgesamt scheinen die in Tabak annotierten ORFs einschließlich von *ycf15* keine funktionelle Bedeutung zu besitzen. Von daher spielen die in diesen Bereichen gefundenen Unterschiede sehr wahrscheinlich keine Rolle in der Kern/Plastom-Interaktion und sollten damit auch nicht verantwortlich für kompartimentelle Inkompatibilität in Cybriden sein.

#### 3.1.2.1.4 Der RNA-Editotyp von *Atropa* im Vergleich zu dem von Tabak

Als Editotyp wird die Gesamtheit aller Edierungsstellen eines Plastoms bezeichnet, in Tabak beispielsweise umfasst der Editotyp 31 bisher beschriebene Stellen (Hirose *et al.* 1999). Von diesen sind nur 28 auch in *Atropa* auf DNA-Ebene vorhanden. Die 3 in *Atropa* im Vergleich zu Tabak fehlenden Stellen finden sich in den mRNAs der Gene *atpA*, *rps14* und *psbE*. Zwei weitere tabakspezifische Stellen im Gen *ndhD*, die vorher aus der Literatur nicht bekannt waren, wurden in dieser Arbeit identifiziert, so daß also nun insgesamt 33 Tabakstellen beschrieben sind. Die beiden neuen Stellen finden sich an den Positionen 118352 und 118427 im Tabakplastidenchromsom. Ihre Prozessierung führt zu S-nach-L-Kodonenübergängen und den Aminosäureresten 200 und 225 des NdhD-Proteins. Diese Stellen werden im weiteren in Anlehnung an die Nomenklatur von Tsudzuki *et al.* (2001) *ndhD*-3 und -4 genannt.

Die 28 Tabak und *Atropa* gemeinsamen Stellen wurden ausgehend von *Atropa* cDNA amplifiziert und die Amplifikate sequenziert. Alle diese Stellen werden in *Atropa* ediert, allerdings treten Unterschiede im Ausmaß der Edierung im Vergleich zu Tabak auf (Abb. 10A). So sind die Stellen *rps14*-1 und *rpoB*-2 in *Atropa* nur partiell ediert, d.h. neben dem T-Signal im Chromatogramm gibt es auch ein C-Signal, das dem unedierten Zustand der RNA entspricht. Andere Stellen des *rpoB*-Transkripts wie *rpoB*-3 sind hingegen voll ediert. Dies belegt, daß das C-Signal bei *rpoB*-2 nicht auf eine DNA-Verunreinigung des Amplifikats zurückgeht. Stellen, die schon in Tabak nur partiell ediert vorgefunden wurden, wie in *rpoA* und *ndhD*-1, sind auch in *Atropa* nur teilediert (Abb. 10A und nicht gezeigte Daten).

Um auch Stellen zu finden, die *Atropa*-spezifisch sind, wurden solche Aminosäuresubstitutionen im *Atropa*/Tabak-Vergleich auf cDNA-Ebene untersucht, die potentiell durch RNA-Edierung rückgängig gemacht werden könnten (Tab. 6,



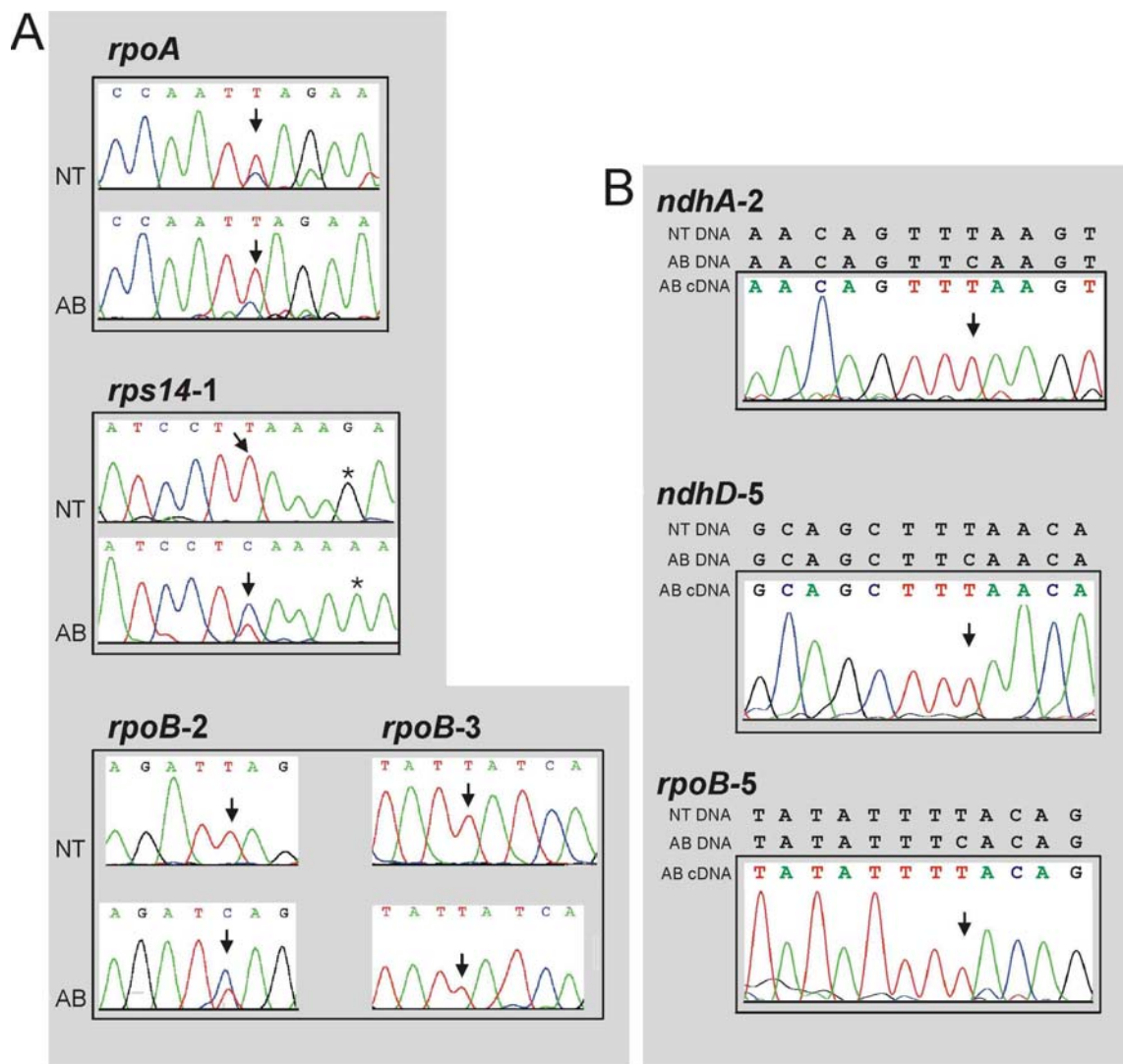


Abbildung 10: RNA-Edierung plastidärer Transkripte in *Atropa*. Relevante Bereiche der cDNAs von *rpoB*, *rps14*, *rpoA*, *ndhD* und *ndhA* wurden über PCR amplifiziert und sequenziert. Ein Ausschnitt der Chromatogramme und der zugehörigen Sequenz ist jeweils gezeigt. Pfeile = Edierungsstelle. Sternchen = Sequenzunterschied zwischen Nt und Ab. Nomenklatur der Edierungsstellen nach Tsudzuki *et al.* (2001). (A) Quantitative Edierungsdifferenzen zwischen *Atropa* und Tabak. Die beiden Chromatogramme zum Gen *rpoB* gehen auf dieselbe Sequenzierungsreaktion zurück. (B) *Atropa*-spezifische Edierungsereignisse. Der Sequenzvergleich des DNA-Segments aus beiden Solananceen plus das Chromatogramm der Sequenzierung eines von der cDNA hergestellten Amplifikates sind gezeigt.

durch große Buchstaben hervorgehoben). Dieser Untersuchung wurden alle diejenigen edierungsabhängigen Kodonenübergänge zugrundegelegt, die aus anderen Angiospermen bekannt sind (Tsudzuki *et al.* 2001). Gemäß diesen bekannten, durch RNA-Edierung herbeigeführten Kodonenübergängen wurden im *Atropa*/Tabak-Vergleich aller proteinkodierenden Gene insgesamt 13 potentielle Edierungsstellen in 8 Genen identifiziert (Tabelle 6). Die Analyse dieser Stellen auf cDNA-Ebene ergab, daß nur 3 tatsächlich ediert werden (Abb. 10B). Zwei davon, im *ndhA*- (Stelle 2; Kodon 189) und *ndhD*- (Stelle 5; Kodon 293) Transkript, waren schon aus Mais und Reis beschrieben worden (Maier *et al.* 1995; Lutz und Maliga

2001). Die dritte wird auch im *rpoB*-Transkript (Stelle V; Kodon 809) von *Arabidopsis* ediert (M. Tillich persönliche Mitteilung). Interessanterweise gibt es diese Stelle auch in *P. thunbergii*, ohne allerdings in dieser Pflanze prozessiert zu werden (Wakasugi *et al.* 1996).

Tabak besitzt also 33, *Atropa* 31 plastidäre Edierungsstellen, von denen 3 nicht in Tabak vorkommen. Auf der anderen Seite besitzt Tabak 5 Stellen, die in *Atropa* fehlen, so daß die beiden Editotypen sich deutlich unterscheiden. Auf Grund der hohen Bedeutung der RNA-Edierung für die Proteinfunktion und weil die Maschinerie der Edierung kernkodiert ist, war zu vermuten, daß diese Unterschiede in den Editotypen eine Rolle in der Kern/Plastom-Inkompatibilität der Cybriden spielen (siehe Abschnitt 3.1.3.7).

Neben den Edierungsstellen an sich wurden auch die potentiellen *cis*-Sequenzen der Edierung in den beiden Solanaceen verglichen. Da bekannt ist, daß diese Erkennungssequenzen in den meisten untersuchten Fällen unmittelbar stromauf der Stelle liegen und 3'-Sequenzen kaum Einfluss auf die Edierung zu haben scheinen, wurde ein Fenster von -50 bis +10 Nukleotide um die Edierungsstelle nach Basenunterschieden abgesucht. In diesem Sequenzbereich fanden sich bei insgesamt nur 5 Stellen in 4 Genen (*rpoA*, *ndhD*, *ndhA*, *rps14*) einige wenige Unterschiede, die in Tabelle 9 angegeben sind. Auch diese Unterschiede können zu Edierungsdefekten in Cybriden führen, wenn der Kernfaktor der einen Art nicht mehr die veränderte *cis*-Sequenz der anderen Art erkennt.

**Tabelle 9: Unterschiede in potentiellen *cis*-Sequenzen von Edierungsstellen im Vergleich zwischen *Atropa* und Tabak**

Edierungsstelle* [Position im Tabak-Plastidenchromosom]	Basenaustausche im Bereich -50 bis +10 von Nt nach Ab
<i>ndhA</i> 1 [123591]	-19 C nach T
<i>ndhA</i> 2 [121713]	-5 C nach T
<i>ndhD</i> 3 [118643]	+7 G nach A und +10 T nach C
<i>rpoA</i> 1 [80639]	-38 A nach C
<i>rps14</i> 1 [38802]	+4 G nach A (siehe auch Abb. 23)

\* Position und Nomenklatur nach Tsudzuki *et al.* (2001)

### 3.1.2.1.5 Unterschiede in Intronen

Im Gegensatz zur Intronzahl und -position, die in Tabak und *Atropa*

konserviert sind, gibt es in der Intronsequenz einige Unterschiede. Dabei dominieren im Gegensatz zu kodierenden Bereichen Indels gegenüber Punktmutationen (siehe Abschnitt 3.1.2.1.2). Insgesamt finden sich 12 Insertionen und 20 Deletionen in 15 Intronen mit einer Länge von 1 bis maximal 37 Bp (*trnG*-UCC Intron).

Die 19 plastidären Intronen der Gruppe II bilden für diese Introngruppe typische komplexe Sekundärstrukturen aus, die essentiell für den Spleißprozess sind, darunter die zwei besonders konservierten Subdomänen V und VI (Michel *et al.* 1989). Die beiden Domänen bilden den 3'-terminalen Abschluss der Intronfaltungen und spielen eine wichtige Rolle bei der katalytischen Entfernung des Introns.

**Tabelle 10: Beispiele für Sequenzunterschiede in Intronen zwischen *Atropa* und Tabak**

Gen	Intronklasse <sup>§</sup>	Partieller Sequenzvergleich <sup>#</sup>
<i>clpP</i> Intron 2	Gruppe IIA1	<pre>             -7 TTTTGTTATATCATC              TTT-----TATCATC </pre>
<i>atpF</i>	Gruppe IIA1	<pre>             -95 GTAATT-----GAGCGT              GTAATTAAGTAATTGAGCGT </pre>
<i>trnK-UUU</i>	Gruppe IIA1	<pre>             -31 CATTFAATTTTA              CATT-TTTTA </pre>
<i>rps16</i>	Gruppe IIB1	<pre>             -9 CAATCCCAAT        CTATCCCAAT </pre>
<i>ycf3</i> Intron 2	Gruppe IIB1	<pre>             -2 CTATTCGGC     CTATTCGTC </pre>
<i>trnV-UAC</i>	Gruppe IIA1	<pre>             -10 CCTGTTTTAC     TCTGTTTTAC </pre>
<i>trnL-UAA</i>	Gruppe I	<pre>             -9 TCGTAAGAGG        TAGTAAGAGG </pre>

<sup>§</sup> nach Michel und Ferat (1995) <sup>#</sup> Die Position relativ zum ersten Nukleotid des 3'-Exons ist angegeben. Unterschiede sind fett hervorgehoben.

Entsprechend der großen Konservierung dieser Bereiche zwischen Arten verschiedenster Verwandtschaftskreise finden sich auch zwischen Tabak und *Atropa* nur sehr wenige Unterschiede in den maximal 78 (Gruppe IIB), bzw. 121 Nukleotiden (Gruppe IIA), in die die Domänen V und VI eingebettet sind (Michel *et al.* 1989). Nur vier Intronen weisen Indels in diesem Bereich auf, wobei je zweimal die Domäne VI (*clpP*-Intron 2, *trnK-UUU*) und zweimal die Domäne V (*clpP*-Intron 1, *atpF*; Tab. 10) betroffen sind. Basenaustausche finden sich in diesem Bereich etwas häufiger, und zwar in den Intronen der Gene *trnV-UAC*, *trnK-UUU*, *rps16*, *atpF*, *ycf3* Intron 2, *clpP*

Intron 1 und 2 und *rpl2* (siehe Beispiele in Tab. 10).

Die beobachteten Basenaustausche können möglicherweise die Faltung der betroffenen Introndomänen verändern. Da bekannt ist, daß Intronsequenzen mit nukleären Faktoren interagieren, ist denkbar, daß es in den Tabak/*Atropa*-Cybriden zu fehlerhaften Interaktionen von nukleär kodierten Spleißfaktoren mit artfremden plastidären Spleißfaktoren und somit eventuell sogar zum Ausfall des Spleißens kommt. Ungespleißte mRNAs würden aber zu aberranten Peptiden führen, was die Entwicklung der Plastiden in den Cybriden natürlich beeinträchtigen würde.

### 3.1.2.2 Vergleich intergenischer Regionen

Das Plastidenchromosom von *Atropa* ist 749 Bp länger als das von Tabak, was hauptsächlich auf eine Expansion des IR zurückzuführen ist, der 542 Bp weiter in die SSC Regionen reicht als in Tabak. Derartige Größenveränderungen des IR sind auch in verschiedenen anderen Pflanzenarten beschrieben worden (Kung *et al.* 1982; Maier *et al.* 1990; Goulding *et al.* 1996). Zum Längenunterschied von Plastidenchromosomen tragen jedoch auch eine Reihe von Insertionen und Deletionen bei, die sich mit wenigen Ausnahmen (siehe Abschnitt 3.1.2.1.1 und 3.1.2.1.5) in intergenischen Bereichen befinden (Aldrich *et al.* 1988; Wolfe *et al.* 1992). So gibt es relativ zu Tabak in den nichtkodierenden Bereichen von *Atropa* 65 Insertionen und 60 Deletionen von mindestens 5 Bp Länge. Nimmt man die Unterschiede von wenigen bis zu nur einem Nukleotid hinzu, vergrößert sich die Anzahl von Indels in nicht-kodierenden Bereichen auf 274. In kodierenden Regionen wurden dagegen nur 11 Indels gefunden (siehe Abschnitt 3.1.1.1) Ungefähr die Hälfte aller Indels, die  $\geq 5$  Bp sind, sind assoziiert mit einer direkten Repetition (Beispiel in Abb. 11). Darunter fallen auch einige wenige Erweiterungen oder Verkürzungen von Homopolymerabschnitten (nicht gezeigt). Diese direkten Repetitionen gehen möglicherweise auf Replikationsfehler (*replication slippage*) oder Fehlpaarungen während eines Rekombinationsereignisses zurück (Winter und Herrmann 1987; Wolfson, Higgins und Sears 1991; Hancock 1996). Tatsächlich befinden sich die meisten der gefundenen Repetitionen in AT-reichen Regionen, von denen bekannt ist, daß hier zumindest in Bakterien besonders häufig "replication slippage" vorkommt (Levinson und Gutman 1987). In einer sehr detaillierten phylogenetischen Analyse an *Epifagus virginiana* konnte außerdem gezeigt werden, daß Tandemrepetitionen an Zahl zunehmen können, aber nur sehr selten wieder

reduziert werden (Wolfe *et al.* 1992). Diese Untersuchungen zeigen, daß die beobachteten Repetitionen im *Atropa*/Tabak-Vergleich keineswegs ungewöhnlich sind. Offensichtlich evolvieren viele intergenische Bereiche rasch und ohne nennenswerten Selektionsdruck, so daß man annehmen kann, daß die hier gefundenen zwischenartlichen Unterschiede wohl keine funktionelle Bedeutung besitzen und somit auch in den Cybriden für Kern/Plastom-Inkompatibilität vermutlich keine Rolle spielen.



**Abbildung 11: Insertion in *A. belladonna* assoziiert mit einer direkten Repetition im *trnT*(UGU)-*trnL*(UAA) intergenischen Bereich. Pfeile = 6 Bp Repetition.**

### 3.1.2.2.1 Promotoren

Von den 16 beschriebenen PEP-Promotoren des Tabaks sind in *Atropa* 15 identisch. So sind alle "-10"- und "-35"-Boxen dieser Promotoren konserviert und auch der Abstand zwischen den Sequenzelementen und zum Transkriptionsstart ist in beiden Arten gleich. Oftmals sind nicht nur die Kernelemente des Promotors, sondern auch längere Abschnitte der Sequenzumgebung sehr ähnlich oder gleich. Dies ist besonders augenfällig beim *psbD*-Promotor, der mehrere zusätzliche Transkriptionselemente weiter stromauf des Kernpromotors besitzt. Diese Elemente spielen eine Rolle bei der Blaulichtabhängigkeit der Transkriptionsinitiation (Christopher *et al.* 1992; Allison und Maliga 1995) und sind 100% identisch zwischen Tabak und *Atropa*.

Unter den bekannten PEP-Promotoren finden sich nur in dem des *trnG*-UCC-Gens Basenaustausche zwischen Tabak und *Atropa*. Allerdings betreffen die zwei dort gefundenen Austausche weder die "-10"- noch die "-35"-Boxen, sondern befinden sich zwischen diesen Elementen (Abb. 12). In Prokaryoten können diese verbindenden Promoterabschnitte beliebig in ihrer Sequenz, nicht jedoch in ihrer Länge verändert werden, ohne daß die Promoteraktivität betroffen wäre (Busby und Ebricht 1994). Daher ist es wahrscheinlich, daß die observierten Punktmutationen im *trnG*-UCC-Promotor ebenfalls keine Auswirkung auf die Transkriptionsinitiation in der



Auch die NEP-Promotoren sind also insgesamt überraschend hoch zwischen *Atropa* und Tabak konserviert und es gilt genau wie für PEP-Promotoren, daß diese Sequenzelemente auch im fremden Kernhintergrund der Cybriden auf Grund ihrer hohen Konservierung funktionieren sollten.

### 3.1.2.2.2 Für die Translation relevante Sequenzelemente

Das Plastidenchromosom kodiert für eine begrenzte Anzahl von ribosomalen Proteinen, während Gene für regulative Faktoren, wie die aus dem prokaryotischen System bekannten Initiations- und Elongationsfaktoren sowohl im *Atropa*- als auch im Tabakplastidenchromosom vollständig fehlen. Viele Translationsfaktoren sind also in *trans* im Kern kodiert und müssen in das Organell importiert werden. Nur wenige dieser Faktoren wurden bisher aus höheren Pflanzen isoliert (Sugiura *et al.* 1998; Fisk *et al.* 1999).

Im Vergleich zur Transkription sind die regulatorischen Sequenzen der Translation in Plastiden weniger genau untersucht (Zerges 2000). In Anlehnung an das prokaryotische System standen Shine-Dalgarno(SD)-Sequenzen lange im Mittelpunkt der Suche nach Translationselementen im 5'-UTR plastidärer Transkripte. Diese für die Interaktion mit der 16S-rRNA des Ribosoms wichtigen Sequenzabschnitte, typischerweise 5'-GGAGG-3', finden sich in Tabak vor 49 von 79 proteinkodierenden plastidären Genen innerhalb der ersten 20 Nukleotide vor dem Translationsstart (Sugiura *et al.* 1998). Allerdings gibt es auch 30 Gene ohne offensichtliche SD-Sequenz in diesem Bereich. Zudem ist der Abstand der Sequenz vom Startkodon, der in Prokaryoten streng auf  $-7 \pm 2$  Nukleotide festgelegt ist (McCarthy und Brimacombe 1994), im Tabakplastidenchromosom sehr variabel (18 bis 6 Nukleotide vor dem Startkodon; Sugiura *et al.* 1998). Sowohl der Abstand zum Startkodon als auch die Sequenz aller SD-Elemente selbst sind identisch zwischen Tabak und *Atropa*.

Nur wenige SD-Sequenzen sind im Tabak auch funktional untersucht worden. Für die SD-Sequenz von *rps14*, *atpE* and *rbcL* konnte u.a. unter Anwendung eines plastidären *in vitro*-Systems gezeigt werden, daß sie unerlässlich für die Initiation der Translation sind (Sugiura *et al.* 1998). Dabei konnte festgestellt werden, daß neben der SD-Sequenz auch andere Sequenzelemente eine Rolle für die Translationsregulation spielen. So gibt es zwei, RBS 1 und RBS 2 genannte

Sequenzelemente, sowie eine AU-reiche Box vor dem *psbA*-Gen, die zumindest *in vitro* notwendig für die Translation sind (Hirose und Sugiura 1996). Für die untranslatierten 3'- und 5'-flankierenden Bereiche dieses Gens konnte des weiteren gezeigt werden, daß Licht eine wesentliche Rolle sowohl bei der Akkumulation der mRNA als auch bei der Translation spielt (Staub und Maliga 1993, 1994, Hirose und Sugiura 1996, Eibl *et al.* 1999). Alle drei Translationselemente von *psbA* sowie der gesamte 5'- und 3'-UTR mit Ausnahme von 3 Bp sind identisch zwischen *Atropa* und Tabak (nicht gezeigt).

Auch RNA-Elemente in der 5'- und 3'-Region von *rbcL* sowie im 5'-UTR von *rps14* aus Tabak sind als transkriptstabilisierend und translationsverstärkend beschrieben worden (Shiina *et al.*, 1998; Eibl *et al.*, 1999, Hirose *et al.* 1998). Der gesamte in diesen Arbeiten analysierte 5'-UTR von *rbcL* zeigt nur 3 Basenaustausche zwischen den beiden untersuchten Solanaceen, während der 3'-UTR komplett identisch ist, genauso wie auch der untersuchte 5'-UTR-Bereich von *rps14*.

Alle untersuchten Bereiche betrachtend fällt auf, daß es kaum Sequenzunterschiede zwischen Tabak und *Atropa* in den die Translation betreffenden Elementen gibt. Weder SD-Sequenzen noch andere, eher plastidenspezifische Elemente zeigen signifikante Divergenz zwischen den beiden Arten. Eine Rolle für die Kern/Plastom-Inkompatibilität in Cybriden fällt deswegen wahrscheinlich aus.

### 3.1.2.2.3 Prozessierungsstellen im 5'- und 3'-UTR plastidärer Transkripte

Das in der Regel hochkomplexe Transkriptmuster plastidärer Operonen ist das Resultat einer intensiven Prozessierung zunächst polycistronischer Primärtranskripte, die sowohl exo- als auch endonukleolytisch in kleinere, teilweise überlappende RNA-Spezies gespalten werden (Monde *et al.* 2000b). Dabei sind bisher in höheren Pflanzen keine Consensus-Sequenzen in *cis* für diese Schnittstellen definiert worden. Allerdings konnte für *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden, daß schleifenartige Sekundärstrukturen im 3'-UTR die Reifung und Stabilität des Transkripts unterstützen, vor allem, indem sie 3'->5'-Exonukleasaktivitäten unterbinden (Stern *et al.* 1991, Lee *et al.* 1996). Außerdem sind für diese Algenart *cis*-Determinanten für die 5'-UTR-Prozessierung abgeleitet



worden (Nickelsen *et al.* 1999), die allerdings nicht vom Tabak und anderen höheren Pflanzen bekannt sind.

Die große Mehrheit der involvierten Maschinerie ist sehr wahrscheinlich in *trans* im Kern kodiert, was z. B. durch den Befund unterstützt wird, daß Suppressormutationen für einen Defekt in der 5'-Reifung der *psbD*-mRNA kernkodiert sind (Nickelsen, 2000). Außerdem sind nukleäre Mutationen in Mais (Barkan *et al.*, 1995) und *Arabidopsis* (Meurer *et al.*, 1996) gefunden worden, die die Stabilität bestimmter plastidärer mRNAs verändern und sehr wahrscheinlich über den 5'-UTR wirken.

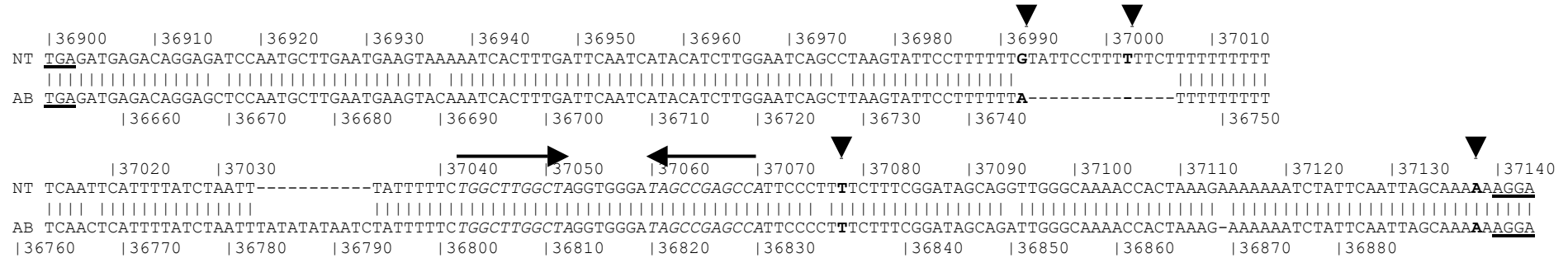
#### 3.1.2.2.3.1 3'-UTR

In Tabak wurde bisher nur der 3'-UTR von *petD* analysiert, welcher neben einer Stammschleifenstruktur noch ein weiteres Sequenzelement (die sogenannte "box 2"; zu unterscheiden von der "box 2" einiger NEP-Promotoren) besitzt, das das 3'-Ende des Transkripts definiert und stabilisiert (Monde *et al.* 2000a). Beide Sequenzelemente sind in *Atropa* und Tabak identisch, genauso wie alle anderen beschriebenen potentiellen Stammschleifenstrukturen in 3'-UTRs (etwa stromab von *rps14*, *psbI* oder *psbC*; Meng *et al.*, 1988, 1991, Yao *et al.* 1989).

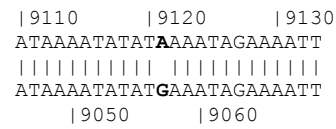
Insgesamt sind in Tabak 16 3'-Enden von verschiedenen Transkripten beschrieben worden, ohne daß die Sequenzumgebung näher analysiert worden wäre. Von diesen sind 3 in *Atropa* verändert, eine davon durch eine T zu A Transversion im 3'-UTR des *psaC*-Gens, zwei andere deletiert im 3'-UTR des *psbC*-Gens (Abb. 13). Allerdings sind in beiden Fällen weitere 3'-Termini beschrieben worden, die in beiden Arten übereinstimmen, so daß die Gemeinsamkeiten in den Termini dieser Transkriptionseinheiten zwischen Tabak und *Atropa* eher überwiegen (Yao *et al.* 1989, Hirose *et al.* 1997).

Die generelle Bedeutung des terminalen Nukleotids eines Transkripts ist nicht bekannt (Hirose und Sugiura 1997). Deshalb wurde auch die unmittelbare Sequenzumgebung der in Tabak bekannten Prozessierungsstellen in den Vergleich miteinbezogen und zwar 10 Bp stromauf und stromab der jeweiligen Stelle. Es ergab

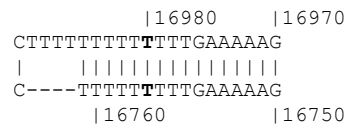
**psbC-trnS-UGA intergenic spacer**



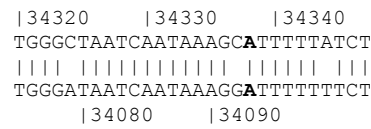
**trnG**



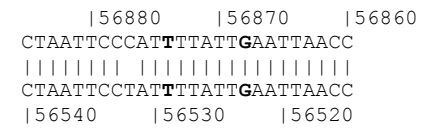
**rps2**



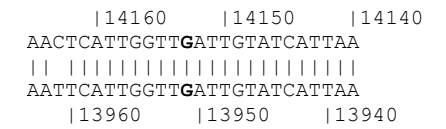
**psbD**



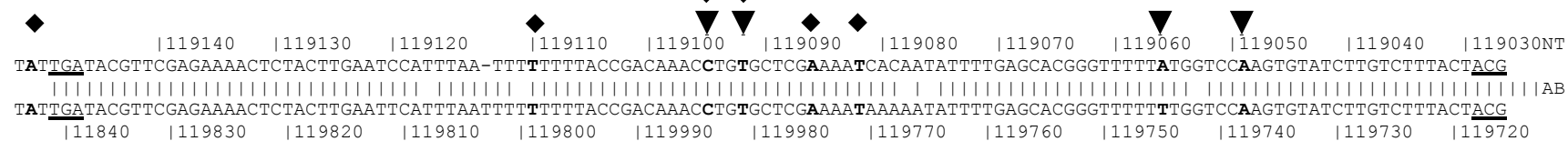
**atpB**



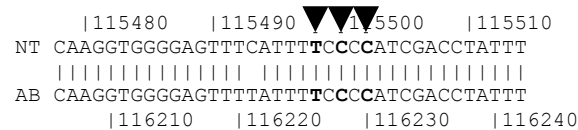
**atpH**



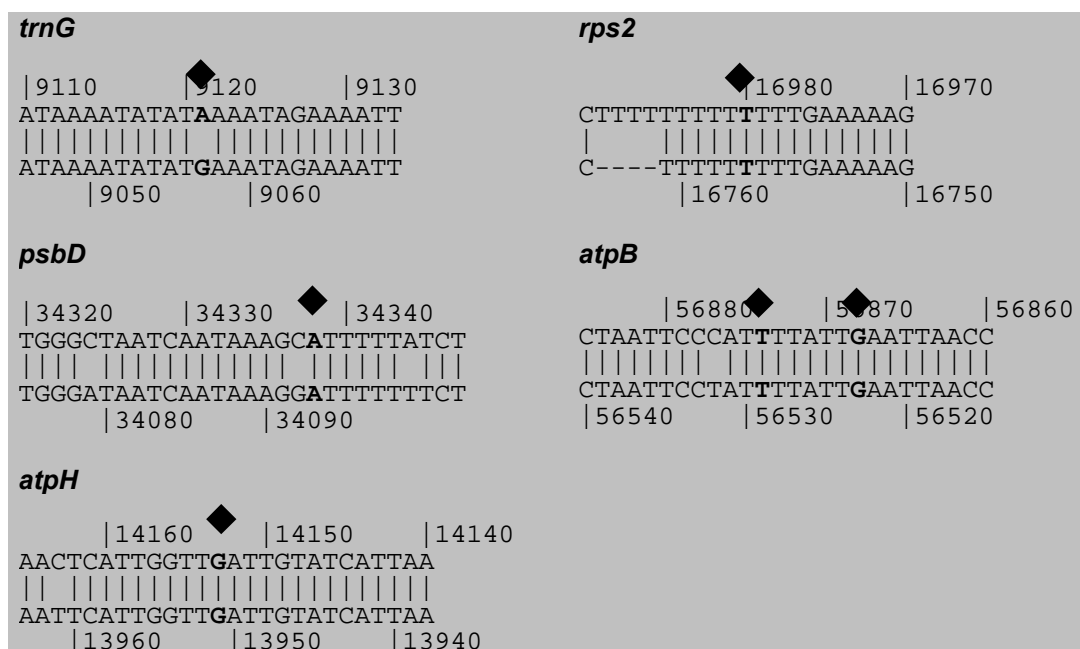
**psaC-ndhD intergenic Spacer**



**rpl32**



**Abbildung 13: Sequenzunterschiede in 3'- und 5'-flankierenden Bereichen plastidärer Gene von Tabak und *Atropa*. Dargestellt sind Vergleiche von Sequenzbereichen, die ein experimentell in Tabak bestimmtes Transkriptende enthalten (Referenzen siehe Text). ▼ = 3' Ende des jeweiligen Transkripts in Tabak; ◆ = 5'-Ende des jeweiligen Transkripts in Tabak. Die Nukleotidpositionen aller Transkriptenden sind fett dargestellt. Pfeile und kursive Sequenz = invertierte Repetition; unterstrichen = Start- bzw. Stoppkodonen (*psaC*, *psbC* und *ndhD*), sowie der Beginn des *trnS*-UAG-Gens. Obere Sequenz = Tabak; untere = *Atropa*.**



**Abbildung 14: Sequenzunterschiede in 5'-flankierenden Bereichen plastidärer Gene von Tabak und *Atropa*. Dargestellt sind Vergleiche von Sequenzbereichen, die ein experimentell im Tabak bestimmtes Transkriptende enthalten (Referenzen siehe Text). Beschriftung wie in Abb. 13.**

sich, daß die 3'-Enden plus untersuchte Sequenzumgebung von *rps14* (Meng *et al.* 1988), *psbI* (Meng *et al.* 1991), *ycf9* (Yao *et al.* 1989), *trnG*-UCC (Meng *et al.* 1991), ein 3'-Ende von *psbC* (Yao *et al.* 1989) und zwei von *psaC* (Hirose und Sugiura 1997) identisch zwischen *Atropa* und Tabak sind. Basenaustausche innerhalb des 20 Bp großen Bereichs wurden nur für ein 3'-Ende von *psaC* und *psbC* sowie 4 Bp stromauf von 3 eng nebeneinander liegenden alternativen 3'-Enden von *rpl32* gefunden (Vera *et al.* 1992; Abb. 13). Insgesamt dominieren aber die Ähnlichkeiten und es erscheint fraglich, ob die wenigen Unterschiede wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von mRNAs in Cybriden haben können.

### 3.1.2.2.3.2 5'-UTRs

Auch zur Untersuchung von Unterschieden von Prozessierungsstellen im 5'-UTR wurde ein Fenster von 20 Nukleotiden um die jeweilige Stelle analysiert. Von den vom Tabak bekannten Stellen im 5'-UTR von mRNAs sind 13 identisch (*rps2*, *atpI*, *atpF*, *atpH* (Miyagi *et al.* 1998), *atpB* (Orozco *et al.* 1990), *psbI*, *trnG*-UCC (2 Stellen), *trnR*-UCU, *trnG*-UCC (Meng *et al.* 1991), *rbcL* (Shiina *et al.* 1998), *ndhD* (3 Stellen, Hirose und Sugiura 1997), *atpB* (3 Stellen), *psbD*, *psbC* (2 Stellen; Yao *et al.* 1989) und der 16S-rRNA (Vera *et al.* 1993). Acht zeigen Basenaustausche in der Sequenzumgebung und eine ist direkt von einem Basenaustausch betroffen (Abb. 13

und 14).

#### 3.1.2.2.4 Replikationsursprünge

Es ist bekannt, daß Replikationsursprünge zwischen Arten sehr divergent sein können (Kunnimalaiyaan und Nielsen 1997a) und es ist daher vorgeschlagen worden, daß derartige Unterschiede die Spezifität und Effizienz der Replikation beeinflussen können (Hornung *et al.* 1996).

In Tabak sind zwei Replikationsursprünge durch den elektronenmikroskopischen Nachweis von Replikationsintermediaten sowie über *in vitro*-Experimente bestimmt worden (Kunnimalaiyaan und Nielsen, 1997a, Kunnimalaiyaan *et al.*, 1997). Der eine, OriA, befindet sich im *trnI*(GAU)-Intron. Er besteht minimal aus 82 Bp inklusive Schleifensekundärstruktur und einer direkten Sequenzwiederholung. Davon unterscheidet sich die homologe Sequenz in *Atropa* in nur einem Basenpaar. Der zweite Replikationsursprung, OriB, wurde im *ycf1*-Gen gefunden. Er enthält ebenfalls eine große Schleifensekundärstruktur und diverse direkte Sequenzwiederholungen. Nur 4 der 243 Bp dieses DNA-Segments unterscheiden sich zwischen den beiden Solanaceen.

Schließlich ist auch noch ein drittes Sequenzelement in Tabak innerhalb des *ndhF*-Gens beschrieben worden, das Plasmide in Hefe zu autonom replizierenden Elementen macht (daher *ars* genannt; Ohtani *et al.* 1984), ohne daß allerdings eine Funktion in der plastidären Replikation nachgewiesen wäre. Dieses Sequenzelement umfasst ca. 350 Bp, von denen nur 5 in *Atropa* im Vergleich zu Tabak verändert sind.

Es ist also festzustellen, daß Replikationsursprünge hochkonserviert in den beiden untersuchten Arten sind. Im Gegensatz dazu ist der OriA in der Länge und Anzahl von Sequenzwiederholungen sehr divergent zwischen nah verwandten Arten der Gattung *Oenothera*, was zu der Vermutung geführt hat, daß solche Unterschiede in den Replikationsursprüngen eine wichtige Rolle in der Segregationsgeschwindigkeit verschiedener Plastiden in Artbastarden spielen und somit zu Kern/Plastom-Inkompatibilität beitragen können, wenn sich die mit dem jeweiligen Kern inkompatible Plastide gegenüber der kompatiblen allein auf Grund von Vorteilen in der Replikationsgeschwindigkeit durchsetzt. Solche Unterschiede wären demnach in Artbastarden von Tabak und *Atropa* nicht zu erwarten, genauso wenig wie Probleme

in der Interaktion von kernkodierten Faktoren der Replikationsmaschinerie der einen Art mit den Replikationsursprüngen der andern in Cybriden. Dafür erscheinen die untersuchten Sequenzelemente zu ähnlich.

### 3.1.3 Molekularbiologische Analyse der *Atropa belladonna*-(*Nicotiana tabacum*)-Cybride

Wie im Abschnitt 1.2 beschrieben, weist die Kombination von Tabakplastiden und *Atropa*-Kern Defekte in der Plastidenentwicklung auf. Sie ergrünt nicht und ist nur unter heterotrophen Bedingungen überhaupt lebensfähig (Abb. 15). Im Gegensatz dazu ist die reverse Kombination von Organellen grün, fertil und kaum vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 15).

#### 3.1.3.1 Strukturanalyse cybrider Plastiden im Vergleich mit den Chloroplasten der Eltern

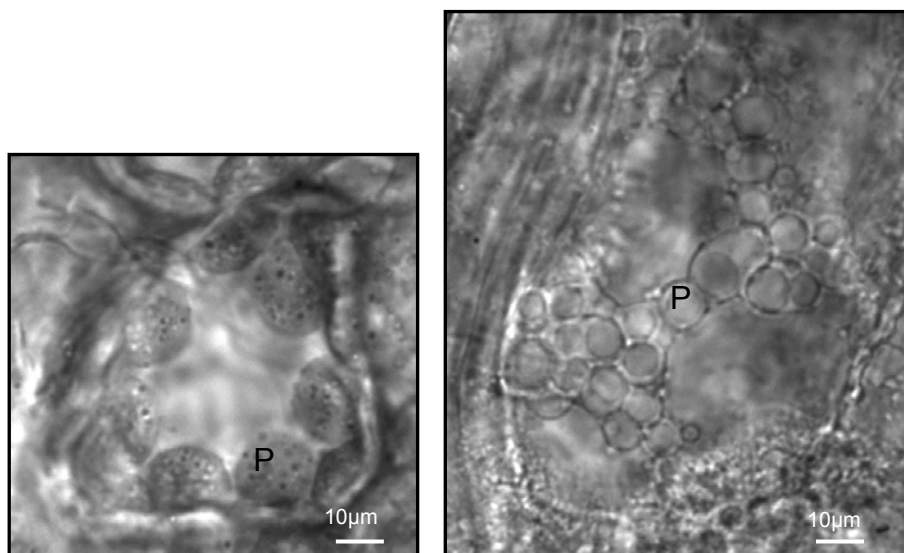
Die mikroskopische Analyse des albinotischen Materials der Ab(Nt)-Cybride im Vergleich mit den Elternpflanzen verdeutlicht die ganze Schwere des Defekts in der Entwicklung der Plastiden. Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit Blattmaterial von 3 Wochen alten, in Gewebekultur gezogenen Pflanzen durchgeführt. Verglichen wurden Zellen des Mesophylls.



**Abbildung 15:** Phänotypen der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen in Gewebekultur. Von links nach rechts: *Atropa*; *N. tabacum*; Nt(Ab)-Cybride; Ab(Nt)-Cybride.

Bereits im Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung (10x Okular, 40x Objektiv) zeigen sich grundsätzliche Unterschiede im Entwicklungszustand der beiden Plastidentypen im albinotischen und grünen Gewebe. So sind die Cybridenplastiden wesentlich kleiner als im Wildtyp und erreichen im Durchmesser

nur ca. die halbe Größe der Plastiden in *N. tabacum* (Abb. 16). Auffällig ist auch die unterschiedliche Verteilung der Plastiden in der Zelle. Während die Chloroplasten im Wildtyp regelmäßig an der Zellwand aufgereiht sind, bilden die Plastiden in der Ab(Nt)-Cybride systrophische Konglomerate, oft um den Zellkern herum. Des weiteren lässt sich erkennen, daß die in den WT-Plastiden vorhandenen inneren Strukturen in der Cybride völlig fehlen.



**Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme von *N. tabacum* (links) und Ab(Nt)-Cybriden Zellen (rechts) im Hellfeld bei 400 x Vergrößerung. Die beiden Aufnahmen sind im gleichen Maßstab dargestellt. P = Plastide.**

Die elektronenoptischen Bilder liefern eine Erklärung für die Abwesenheit der ansonsten typischen komplexen inneren Organisation eines Mesophyllchloroplasten. Die elektronendichten Strukturen weisen auf das innere Membransystem des Chloroplasten, die Thylakoide, hin. Sie bilden Stapel (Grana), die selbst im Lichtmikroskop sichtbar sind. Diese für das Funktionieren des Chloroplasten unerlässlichen Strukturen sind in beiden Wildtypen voll ausgebildet (Abb. 17, obere Reihe). Die Plastiden der weißen Ab(Nt)-Cybride haben dieses interne Membransystem jedoch fast vollständig verloren. In größeren (älteren) Plastiden füllt ein großes Vesikel fast das gesamte Volumen des Organells aus (Abb. 17, untere Reihe). In kleineren (jüngeren) Exemplaren sieht man mehrere solcher Vesikel (Abb. 17, unten rechts), jeweils von einer Membran gegen das Stroma abgegrenzt und von wenig elektronendichtem, amorphem Material angefüllt. Sie sind vermutlich rudimentäre Thylakoide. Schließlich ist noch die große Menge an stark osmiophilen

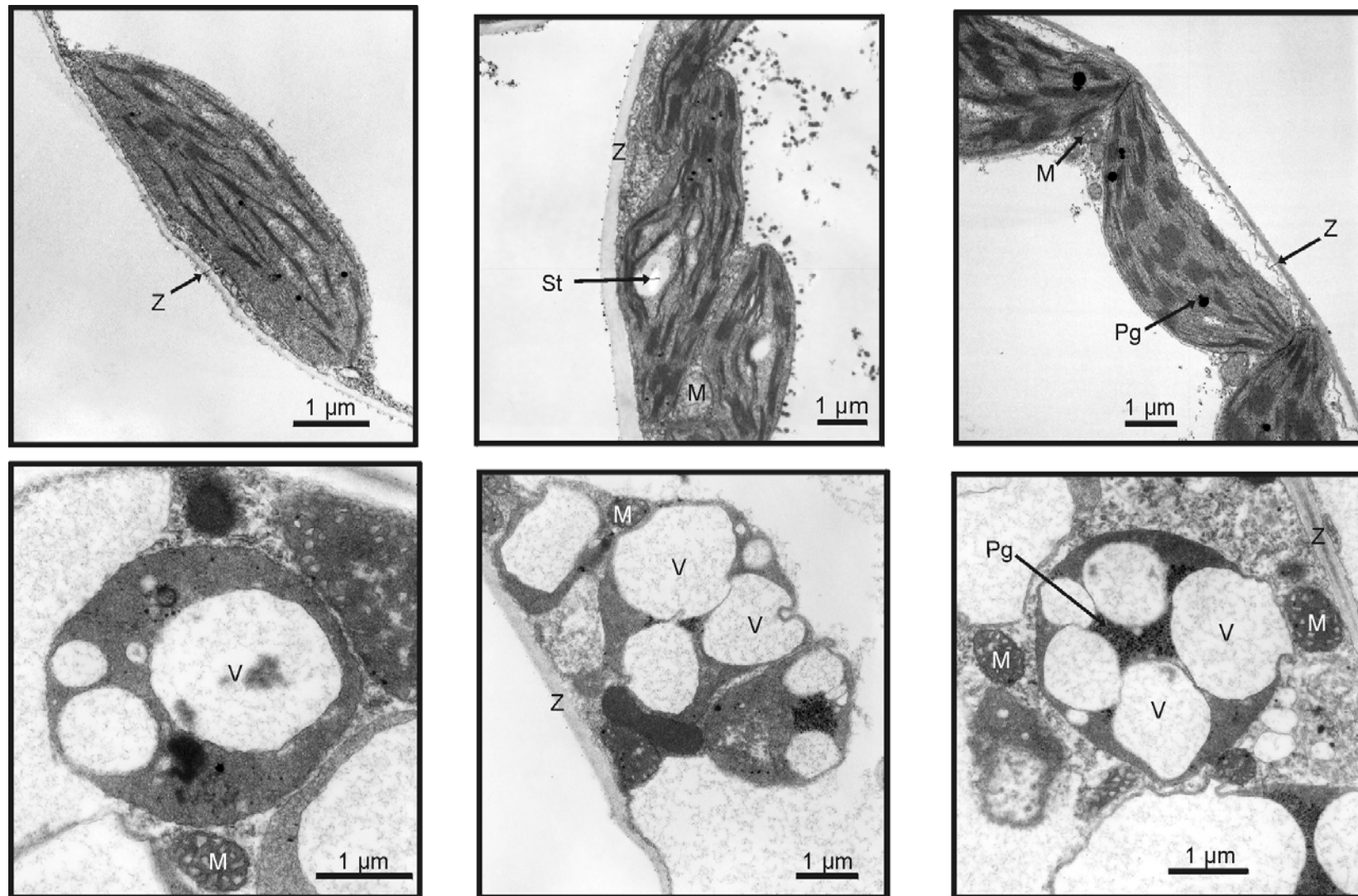


Abbildung 17: Elektronenoptische Aufnahmen von Plastiden der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen. Obere Reihe von links nach rechts: Tabak WT; *Atropa* WT; Nt(Ab)-Cybride. Untere Reihe: in verschiedenen Vergrößerungen (siehe Größenmarker) von links nach rechts sind Plastiden aus weißem Ab(Nt)-Material gezeigt. M = Mitochondrium; V = Vesikel; Pg = Plastoglobuli; Z = Zellwand; St = Stärke Korn.

Plastoglobuli bemerkenswert, die in dieser Menge und Ballung im Wildtyp nicht zu beobachten ist.

Andere Organellen cybrider Zellen, der Kern und die Mitochondrien, zeigen im Übrigen eine ganz normale Struktur und Größen, wie man sie auch im WT findet (Abb. 17; gezeigt sind nur Mitochondrien).

Im Gegensatz zu diesen deutlichen Defekten in der Entwicklung der Ab(Nt)-Cybridenplastiden sind die Plastiden der reversen Nt(Ab)-Cybride nicht von denen des WTs zu unterscheiden. Wie diese sind sie oval, ca. 5 µm lang und besitzen sowohl Grana- als auch Stromathylakoide. Eine Beeinträchtigung des inneren Membransystems ist nicht zu erkennen und die vorhandene transitorische Stärke ist ein Hinweis auf die ungebrochene Photosyntheseleistung des Gewebes (Abb. 17). Im Gegensatz zur heterotrophen Ab(Nt)-Cybride sind diese Pflanzen auch auf Erde im Gewächshaus normal wüchsig und setzen Samen an (nicht gezeigt).

### **3.1.3.2 Expressionsanalysen der Ab(Nt)-Cybride im Vergleich zum Tabak-WT**

Der albinotische Phänotyp der Ab(Nt)-Cybride im Zusammenhang mit einer drastischen Reduktion des Endomembransystems der Plastide kann viele Ursachen haben. Unter anderem sind vollständig oder sektoriell albinotische Pflanzen bekannt, deren Phänotyp auf Defekten in der plastidären Translation (Han *et al.* 1992; Zeltz *et al.* 1993), Transkription (Allison *et al.* 1996; de Santis-Maciossek *et al.* 1999), im Spleißen (Jenkins *et al.* 1997), im Chlorophyllmetabolismus (Mochizuki *et al.* 2001) oder im Energiemetabolismus (Carol *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999) beruht. Eine Analyse albinotischen Materials muss daher möglichst viele Ebenen der plastidären Genexpression beleuchten, um die Defekte eingrenzen zu können.

### **3.1.3.3 Western-Analysen plastidärer Proteine: Komponenten von Multiproteinkomplexen der Thylakoidmembran sind in der Albino-Cybride stark reduziert**

Polypeptide plastidärer Multienzymkomplexe sind teilweise plastom- und teilweise kernkodiert. Letztere werden aus dem Cytoplasma in das Organell importiert. Um die Akkumulation von plastidären Proteinen zu untersuchen, wurde ein Gesamtproteinextrakt aus Ab(Nt)- und Wildtypmaterial erstellt und durch SDS-PAGE

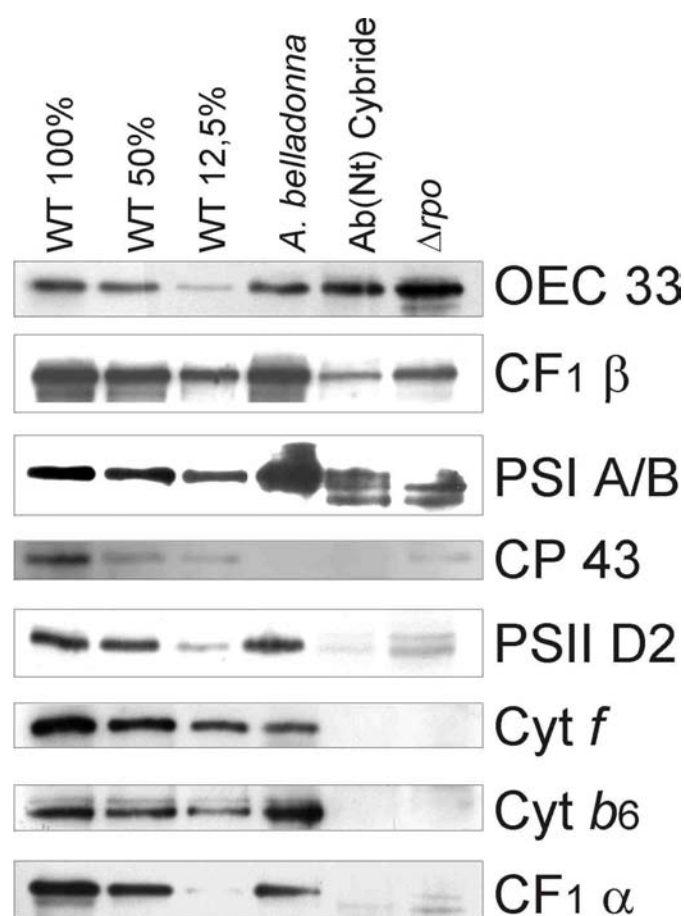


aufgetrennt. Über die Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern wurden verschiedene plastidär lokalisierte Proteine untersucht, darunter eines, das im Kern kodiert ist, das 33 kDa-Protein des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II (OEC33). Es handelt sich dabei um ein Protein, das neben der plastidären Hüllmembran auch noch die Thylakoidmembran überqueren muss, um schließlich an der luminalen Seite des Komplexes gebunden zu werden. Es wird über die sogenannte Sec-Route transportiert und wird dabei zweimal, im Stroma und beim oder nach dem Durchtritt durch die Thylakoidmembran, prozessiert (Robinson *et al.* 1998). Dieses Protein akkumuliert in der Cybride, terminal prozessiert, in ähnlichen Mengen wie im WT (Abb. 18). Dies stützt die Annahme, die beobachteten Vesikel seien Thylakoidrudimente.

Im Gegensatz zu OEC33 sind alle untersuchten Proteine der Komplexe des Photosyntheseapparates (ATP-Synthase, Cytochrom  $b_6f$ -Komplex, PSI, PSII) im cybriden Gewebe drastisch reduziert oder nicht nachweisbar. So konnten keine Signale für die Proteine Cytochrom  $f$ , Cytochrom  $b_6$ , CP43 und die  $\alpha$ -Untereinheit der ATPase nachgewiesen werden (Im Fall von CP43 war auch kein Signal im *Atropa*-WT nachweisbar, möglicherweise, weil der Antikörper nicht kreuzreagiert. Da in der Albino-Cybride das Tabakprotein detektiert werden soll, spielt dies für die Analyse aber keine Rolle). Für die  $\beta$ -Untereinheit hingegen und auch für das D2 Protein sind Signale erkennbar, wenn auch deutlich schwächer als in der stärksten Verdünnung von WT-Protein (12,5%). Dabei ist für D2 ein zusätzliches Signal in den albinotischen Pflanzen erkennbar, das etwas größer ist als im WT, was auf eine verlangsamte Prozessierung des Proteins hindeutet (siehe Doppelbande in PSII D2 im  $\Delta rpo$ -Material und schwächer auch in der Cybride). Auch die Apoproteine des Reaktionszentrums von PSI akkumulieren in Plastiden der Cybride in veränderter Form, teilweise als Polypeptide geringeren Molekulargewichts, wohl ebenfalls Degradationsprodukte, die von den polyklonalen Antikörpern detektiert werden. Tatsächlich sind veränderte Prozessierungsmuster von Proteinen, allerdings kernkodierten, den CAB-Antennenproteinen, in Cybriden bereits in einer anderen Arbeit festgestellt worden (Babiychuk *et al.* 1995).

Insgesamt lassen die Immunodetektionsexperimente erkennen, daß zwar die Akkumulation von plastomkodierten Peptiden diverser Membranproteinkomplexe

vermindert ist, daß aber andererseits kernkodierte Proteine in zum WT vergleichbaren Mengen vorhanden sind. Daneben sind auch einige wenige plastidär kodierte Peptide deutlich nachweisbar. Dies zeigt, daß weder der Import kernkodierter Peptide in der Cybride gestört ist, noch ein genereller Ausfall in der plastidären Translation vorliegt, wie er etwa bei hitzebehandeltem Roggen (Herrmann und Feierabend 1980) oder bei der *albostrians*-Mutante der Gerste (Hess *et al.* 1994) vorliegt.



**Abbildung 18:** Analyse der Akkumulation plastidärer Proteine über Immunodetektion. Detektion von plastidären Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Nylonmembranen mittels monospezifischen, polyklonalen Antikörpern. Analysiert wurden Gesamtproteinextrakte von *A. belladonna*, der albinotischen Ab(Nt)-Cybride, einer PEP-defizienten Tabakmutante ( $\Delta rpo$ , DeSantis-Maciossek *et al.* 1999) und verschiedenen Konzentrationen von *N. tabacum*-Extrakten. Die verwendeten Antikörper waren gegen Untereinheiten von Thylakoidmultiproteinkomplexen gerichtet, wie auf der rechten Seite angegeben. OEC 33 = 33 kDa-Untereinheit des wasserspaltenden Komplexes von PSII;  $CF_1\beta/CF_1\alpha$  =  $\beta/\alpha$ -Untereinheit der ATP-Synthase; PSI A/B = Apoproteine des Reaktionszentrums von PSI; D2 = Untereinheit D2 des Photosystems II; Cyt *f* = Cytochrom *f*; Cyt *b*<sub>6</sub> = Cytochrom *b*<sub>6</sub>; CP43 = 43 kDa Protein der inneren PS II Antenne.

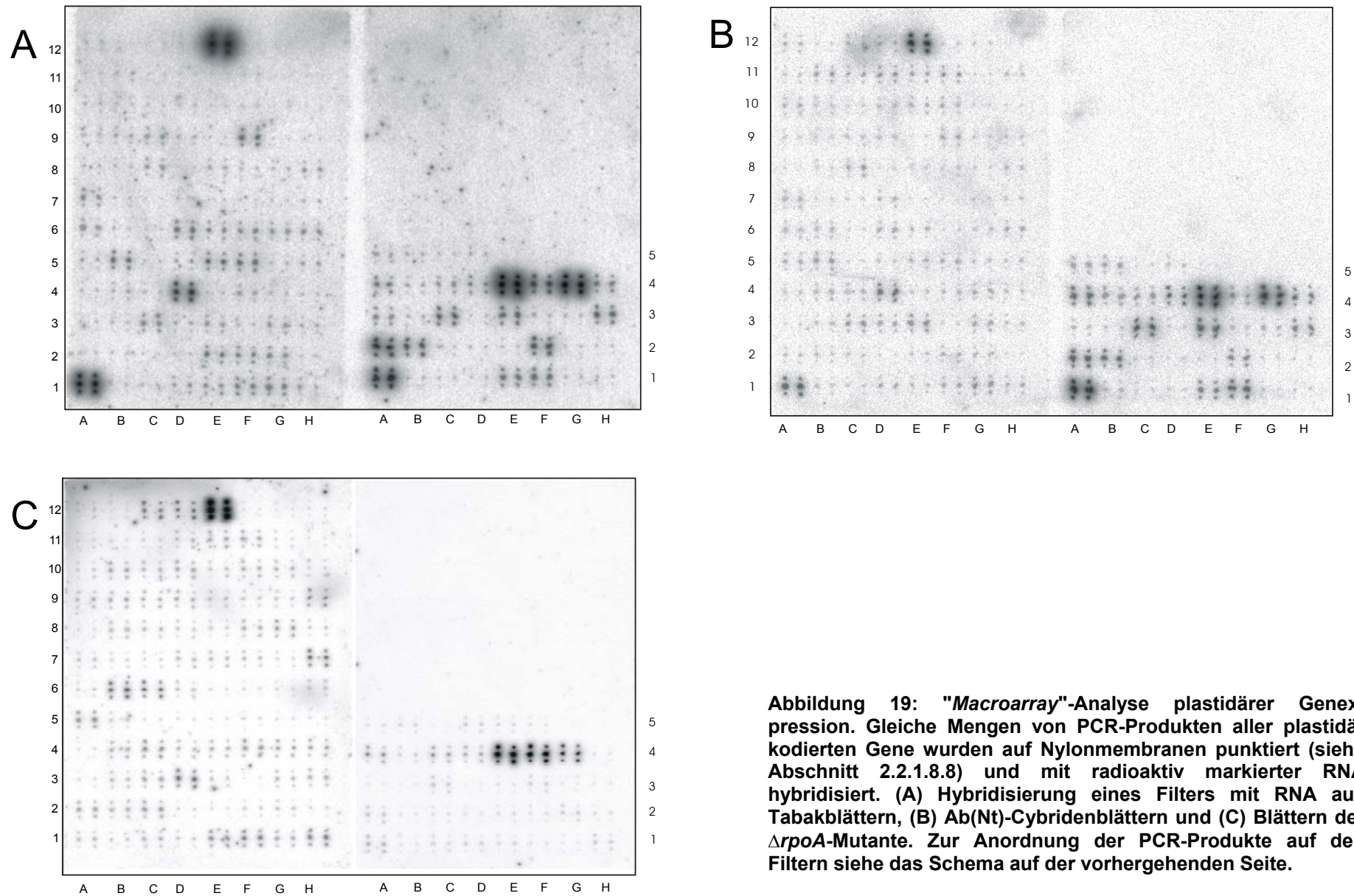
### 3.1.3.4 "Macroarray"-Analysen plastidärer Transkripte

Um die plastidäre Transkription in der albinotischen Cybride im Vergleich zum WT zu untersuchen, wurde ein sog. "macroarray"-Filter für das gesamte plastidäre Chromosom erstellt. Dazu wurden PCR-Produkte aller bekannten plastidären Gene mittels eines Roboters in drei Konzentrationen jeweils in Doppelprobe auf Nylonmembranfilter punktiert, so daß man schließlich 6 Proben pro Gen erhält. Als Kontrollen wurden Amplifikate des bakteriellen *aadA*-Gens und des Plasmids pBS II SK(-) verwendet.

Die Filter wurden mit radioaktiv markierter Gesamt-RNA aus Blättern der Ab(Nt)-Cybride, bzw. des Wildtyp-Tabaks hybridisiert. Zum Vergleich ist das Ergebnis eines von Julia Legen durchgeführten Hybridisierungsexperimentes auf einen Filter derselben Herstellungsserie mit markierter RNA aus  $\Delta rpo$ -Material dargestellt. In dieser plastidären Mutante ist die PEP-abhängige Transkription völlig unterbunden (DeSantis-Maciossek *et al.* 1999).

12	rpl2	rpl23	rps7	3' rps12	rrn16	rpl32	rps15	pBS	12								
11	rps11	rpl36	rps8	rpl14	rpl16	rps3	rpl22	rps19	11								
10	rps16	rps2	rps14	rps4	rpl33	rps18	rpl20	5' rps12	10								
9	ndhG	ndhI	ndhA	ndhH	yef1	PsbJ Operon	3' yef1	3' yef2	9								
8	orf 70B	orf 131	orf75	ndhF	yef5	ndhD	psaC	ndhE	8								
7	petD	rpoA	yef2	yef15	orf92	orf 115	orf79	ndhB	7								
6	petG	psaJ	clpP	psbB	psbT	psbN	psbH	petB	6								
5	petA	orf99	psbJ	psbL	psbF	psbE	orf 103	petL	5	trnN guu	psbJ	sprA	trnL uag	pBS	aadA		
4	ndhC	atpE	atpB	rbcL	accD	psaI	yef4	yef10	4	trnL caa	trnV gac	trnI gau	trnA ugc	rrn23	rrn 4,5	rrn5	trnR acg
3	yef9	psaB	psaA	yef3	orf74	orf 70A	ndhJ	ndhK	3	trnL uaa	trnF gaa	trnV uac	trnM cau	trnW cca	trnP ugg	infA	trnI cau
2	rpo C2	rpo C1	rpoB	yef6	psbM	psbD	psbC	orf 105	2	trnY gua	trnE uuc	trnT ggu	trnS uga	trnG gcc	trnM cau	trnS gga	trnT ugu
1	psbA	matK	psbK	psbI	atpA	atpF	atpH	atpI	1	trnH gug	trnK uuu	trnQ uug	trnS geu	trnG ucc	trnR ucu	trnC gca	trnD guc
	A	B	C	D	E	F	G	H		A	B	C	D	E	F	G	H

Abb. 19A: Schema der Anordnung der PCR-Produkte auf den "macroarrays" der folgenden Seite. Kontrollen befinden sich auf dem rechten Filter bei E5 und E6 (Vektor-DNA und PCR-Produkt des bakteriellen *aadA*-Gens).



**Abbildung 19: "Macroarray"-Analyse plastidärer Genexpression.** Gleiche Mengen von PCR-Produkten aller plastidär kodierten Gene wurden auf Nylonmembranen punktiert (siehe Abschnitt 2.2.1.8.8) und mit radioaktiv markierter RNA hybridisiert. (A) Hybridisierung eines Filters mit RNA aus Tabakblättern, (B) *Ab(Nt)*-Cybridenblättern und (C) Blättern der  $\Delta rpoA$ -Mutante. Zur Anordnung der PCR-Produkte auf den Filtern siehe das Schema auf der vorhergehenden Seite.

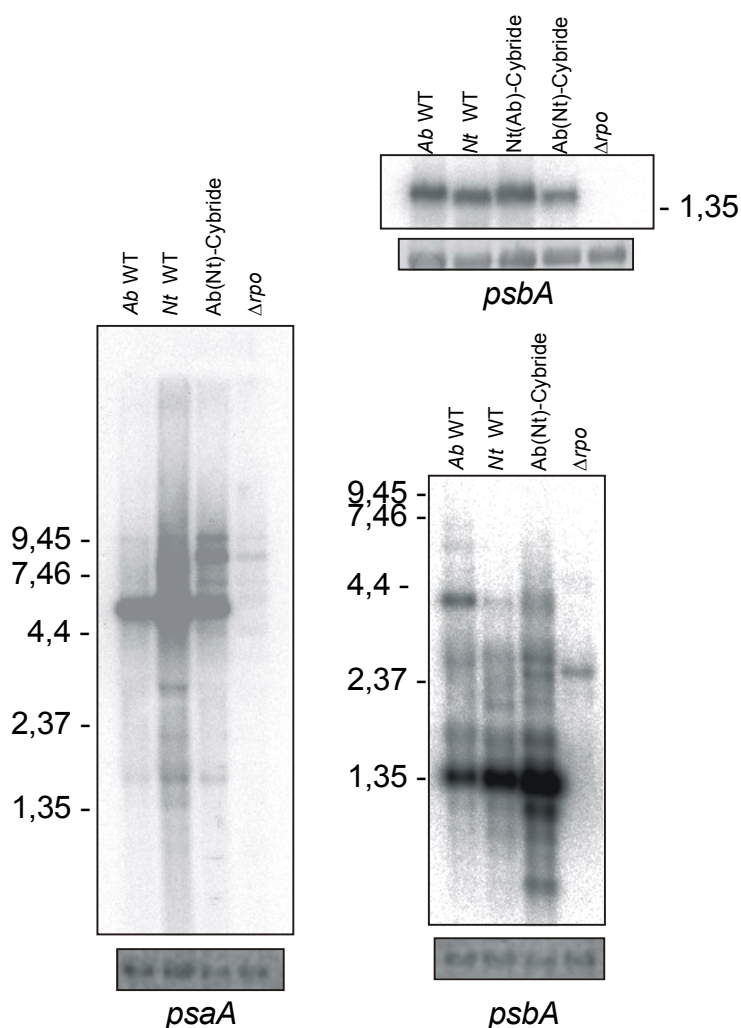
Keines der Transkripte, die im WT detektiert werden, fehlt in der Cybride (Abb. 19B). Die Negativkontrollen zeigen dagegen kein Hybridisierungssignal. Das Transkriptionsmuster in der Cybride ist dabei dem im WT ähnlicher als dem im  $\Delta rpo$ -Material. So akkumulieren verschiedene Transkripte, die im  $\Delta rpo$ -Gewebe fehlen, wie die tRNA-H(GUG) oder das des *psbA*-Gens in der Cybride durchaus vergleichbar.

Insgesamt zeigt diese Analyse, daß in der Cybride kein globaler Defekt in der Transkription vorliegt.

### 3.1.3.5 Northern-Analysen plastidärer Transkriptakkumulation

Um neben einem generellen Überblick zur Transkriptakkumulation in den Plastiden der Cybride auch Einblicke in die Prozessierung der RNAs zu erhalten, wurde die Expression einer Reihe von Genen mit Hilfe von Northern-Experimenten analysiert. Dazu wurden 5 µg Gesamt-RNA aus Blattgewebe der Albino-Cybride, der beiden Wildtypen, der reversen Nt(Ab)-Cybride und von  $\Delta rpo$ -Material elektrophoretisch aufgetrennt und mit transkriptspezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonden hybridisiert.

Zunächst fiel auf, daß es neben Transkriptmustern, die in den beiden Wildtypen weitestgehend identisch sind, wie die von *psaA*, *psbA* (Abb. 20) oder *ycf2* (Abb. 21), auch solche Transkriptmuster auftreten, die deutliche qualitative Unterschiede zeigen. Für das Gen *ycf4* beispielsweise finden sich mehrere Unterschiede sowohl im hochmolekularen Bereich um 4 - 4,4 kB als auch bei niedermolekularen Transkripten, wie dem bei 1,2 kB, das nur in *Atropa* detektiert wurde (Abb. 21, Pfeile). Nicht ganz so ausgeprägt sind die Unterschiede bei *petL*, für das ein Transkript von ca. 1,3 kB nicht in Tabak, wohl aber in *Atropa* vorhanden ist (Abb. 21, Pfeil in *petL*-Hybridisierung; Filter links). Für *ndhB* wiederum wird ein Transkript bei 2,3 kB gefunden, das in *Atropa* nicht vorhanden ist (Abb. 21, Pfeil). Diese Unterschiede können entweder bedeuten, daß sich die (Kern)Faktoren, die für die Transkriptprozessierung notwendig sind, zwischen den Arten unterscheiden, oder daß die *cis*-Determinanten bei den beiden Arten verschieden lokalisiert sind. Die Transkriptmuster der Cybriden können zu einer Aufklärung dieser Frage beitragen. Im Fall von *ycf4* ist das Transkriptmuster der Nt(Ab)-Cybride eindeutig identisch mit dem von *Atropa*, während dasjenige der weißen Ab(Nt)-Cybride



**Abbildung 20: Northern-Analysen der Gene *psaA* und *psaB* der Cybriden im Vergleich mit den Wildtypen und  $\Delta rpo$ -Material. Je 5  $\mu$ g RNA des jeweiligen Materials wurden elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Hybridisiert wurde mit strangspezifischen RNA-Sonden, die über *in vitro*-Transkription genspezifischer PCR-Produkte erstellt wurden (siehe Abschnitt 2.1.11 für die verwendeten Oligonukleotide). Zur Beladungskontrolle der Membranen ist unten jeweils eine Anfärbung der 16S-rRNA mit Methylenblau gezeigt. An der linken Seite der Autoradiographien sind die Größen des verwendeten Längenmarkers in kB angezeigt.**

zwar insgesamt schwächer erscheint, aber zumindest eine Bande bei 1,1 kB besitzt, die Tabak-spezifisch ist. Ganz ähnlich entspricht auch das Transkriptmuster für *petL* in der Nt(Ab)-Cybride dem Muster des *Atropa*-, nicht jedoch des Tabak-WT, da es die Bande bei 1,3 kB besitzt, die in Tabak nicht vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, daß die *cis*-Determinanten auf dem Plastidenchromosom, respektive den polycistronischen Transkripten, das Fragmentmuster des Primärtranskriptes bestimmen. Im Gegensatz dazu steht das *ndhB*-Transkriptmuster der Ab(Nt)-Cybride, welches vom Tabak-Muster abweicht, weil es die spezies-spezifische Bande bei 2,3 kB nicht besitzt. Offensichtlich determinieren in diesem Fall die *trans*-Faktoren

---

von *Atropa* die Prozessierung und nicht die *cis*-Sequenzen von Tabak.

Neben dem Vergleich der Transkriptmuster der Cybriden mit denen der Wildtypen wurde auch die RNA-Akkumulation von PEP-defizientem Material mit in die Analyse einbezogen. Diese albinotische Mutante hat charakteristischerweise ein quantitativ, in einigen Fällen aber auch qualitativ verändertes Transkriptmuster (Legen *et al.* 2002), da ihr die Aktivität der PEP fehlt und die verschiedenen NEP-Enzyme allein für Transkription verantwortlich sind. Es ist auffällig, daß die Muster der Cybride denen der PEP-Mutante oft, aber nicht immer, stark ähneln. Beispielsweise ist die obere von zwei Hauptbanden des *atpB*-Northern-Experiments sowohl in der Cybride als auch im PEP-defizienten Material drastisch reduziert (Abb. 21, Pfeil). Weitere Ähnlichkeiten finden sich für die Transkriptmuster von *atpA*, *ycf3*, *petL* und *ndhB*, die alle in der Cybride und in der PEP-Mutante kaum zu unterscheiden sind (Abb. 21). Zwar sind die in den beiden Mutanten gefundenen Signale in diesen Experimenten auch im WT zu sehen, aber deren Stärke ist oft deutlich verändert, meist verringert, wie z.B. bei zwei Signalen im *petL*-Experiment (Pfeile in Abb. 21) und dem dominierenden Signal im *atpA*-Northern-Experiment (Abb. 21), aber seltener auch verstärkt, wie einige Signale im *ycf2*-Transkriptmuster (Abb. 21). Außer den cybriden Transkriptmustern, die denen der PEP-Mutanten ähneln, gibt es auch solche, die dem WT gleichen. So ist das Haupttranskript von *psaA* und *psbA* in der Cybride in WT-ähnlicher Menge vorhanden, während es im PEP-defizienten Material nicht nachweisbar ist (Abb. 20). Sowohl *psbA* als auch *psaA* gelten als Gene, die in Blattzellen nahezu ausschließlich von der PEP transkribiert werden (Allison *et al.* 1996; Hajdukiewicz *et al.* 1997). Die Daten sprechen also dafür, daß für diese Operonen PEP in der Cybride aktiv ist. Für andere Operonen hingegen scheinen die deutlichen qualitativen Ähnlichkeiten zur PEP-Mutante darauf hinzudeuten, daß PEP-abhängige Transkription ausfällt. Einschränkend muß aber gesagt werden, daß quantitative Unterschiede in Northern-Experimenten mehrere Ursachen haben können. Besonders bei Unterschieden im hochmolekularen Bereich ist denkbar, daß verlangsamte Prozessierungsgeschwindigkeiten zur Akkumulation von Transkripten beitragen können. Zum andern ist im niedermolekularen Bereich damit zu rechnen, daß veränderte Degradationskinetiken bestimmter Transkripte in mutantern Material qualitative Änderung erzeugen. Dies ist bei den quantitativen Unterschieden zwischen den albinotischen Pflanzen einerseits und den Wildtypen andererseits zu



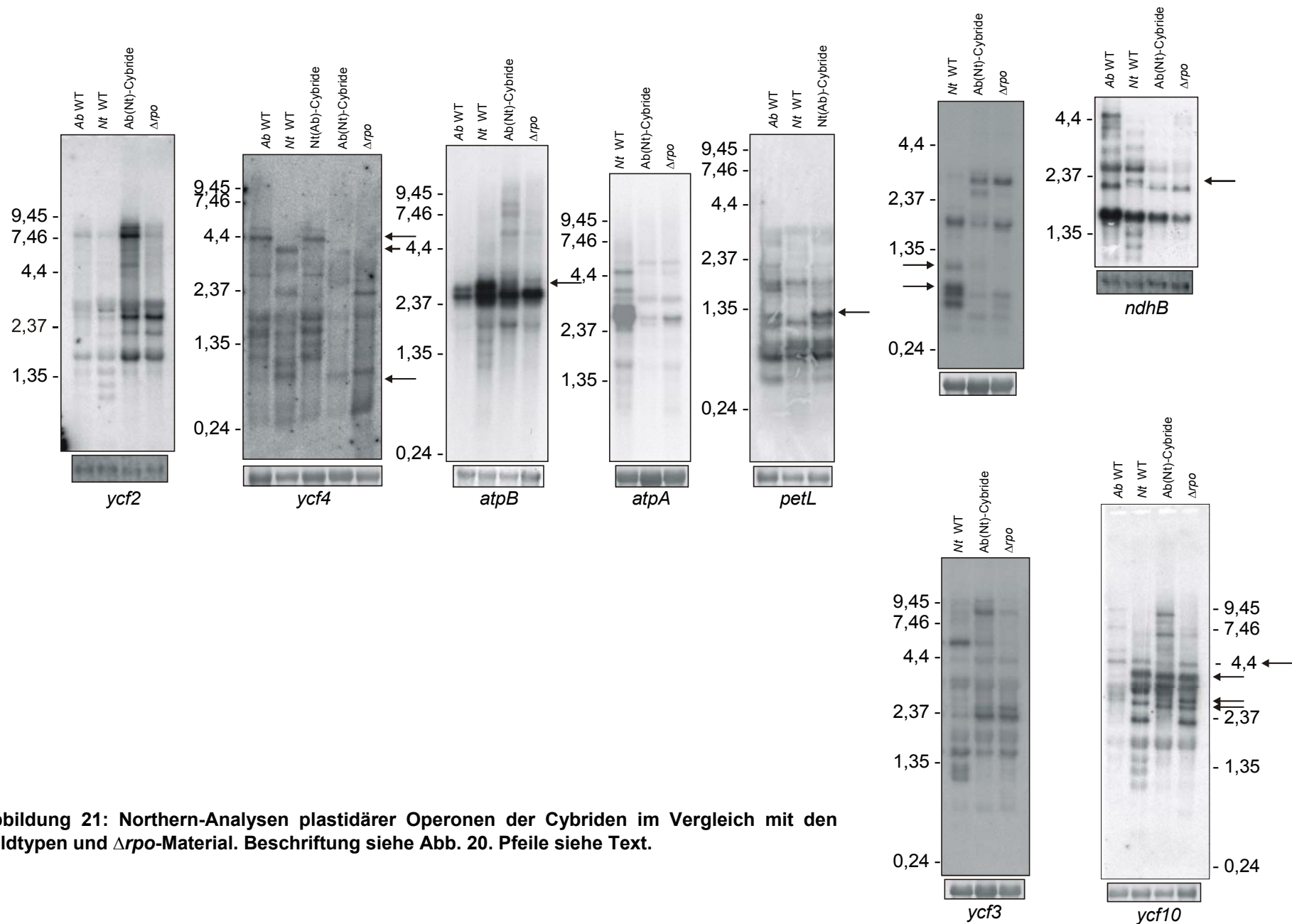


Abbildung 21: Northern-Analysen plastidärer Operonen der Cybriden im Vergleich mit den Wildtypen und  $\Delta rpo$ -Material. Beschriftung siehe Abb. 20. Pfeile siehe Text.



beachten. Es gibt allerdings unter den untersuchten Operonen eines, das neben quantitativen auch deutliche qualitative Unterschiede zwischen den Wildtypen und der albinotischen Cybride/der PEP-Mutante zeigt, nämlich die *ycf10*-Hybridisierung. Hier sind im  $\Delta rpo$ -Material und der Ab(Nt)-Cybride insgesamt vier Signale bei 2,7, 2,9, 3,9 und 4,4 kB zu sehen (Abb. 21 Pfeile), die in beiden Elternpflanzen nicht vorhanden sind. Dies unterstützt die Vermutung, daß PEP-Aktivität in der Cybride für einige Operonen, also auch für *ycf10*, eingeschränkt ist oder sogar fehlt.

Die grüne Nt(Ab)-Cybride schließlich zeigt keine Veränderungen im Transkriptmuster der hier untersuchten Operonen. Sowohl für *petL*, *psbA* als auch für *ycf4* entspricht das Muster ganz dem *Atropa* WT (Abb. 21). Die Transkription und posttranskriptionelle Prozessierung scheinen also in diesem Material nicht gestört zu sein.

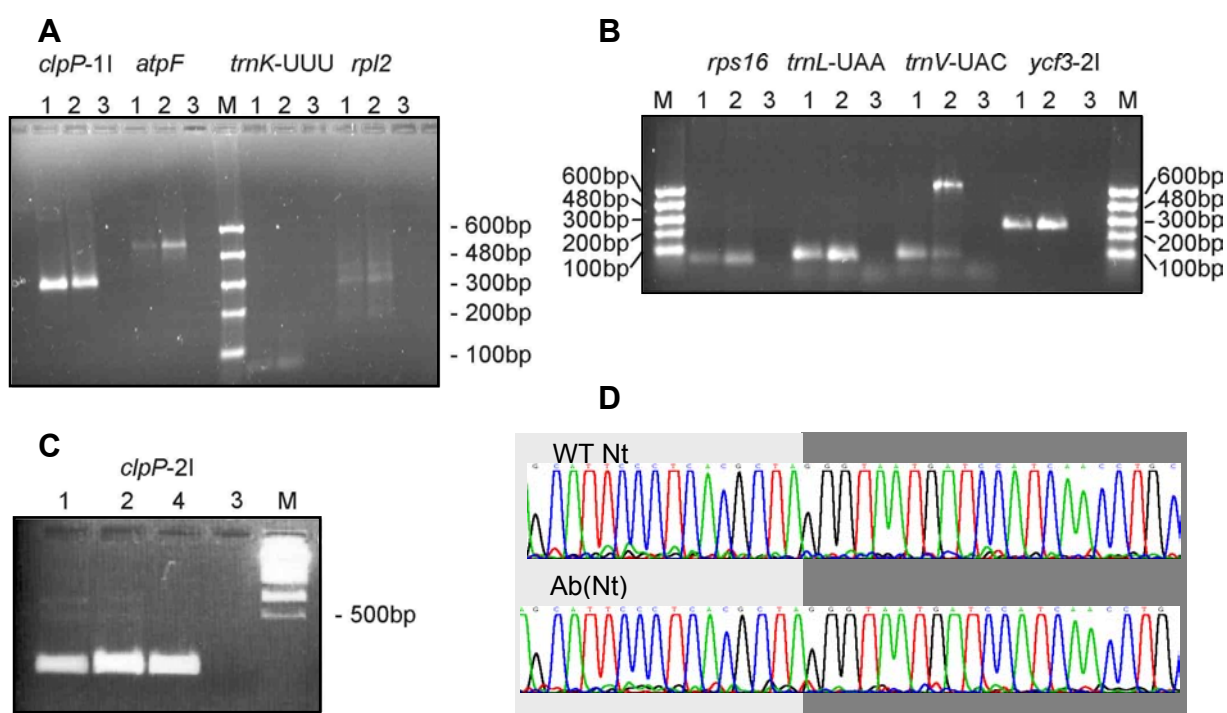
#### 3.1.3.6 RNA-Spleißen

Gemäß den in der Sequenzanalyse gefundenen Unterschieden in Intronen wurde das Spleißen solcher Gruppe II-Intronen in der Ab(Nt)-Cybride untersucht, die Unterschiede im Bereich der für die Katalyse wichtigen Domänen V und VI zwischen Tabak und *Atropa* aufweisen. Unterschiedliche Sequenzbereiche zwischen *Atropa* und dem Tabak wurden auch im einzigen Intron der Gruppe I, in der *trnL*-UAA, vorgefunden (Tab. 10). Das Spleißen dieses Introns wurde daher ebenfalls analysiert.

Durch Amplifikation entsprechender cDNAs wurde versucht, gespleißte Transkripte nachzuweisen. Die verwendeten genspezifischen Oligonukleotide finden sich in Tabelle 11. Die Amplifikation wurde mit einer Extensionszeit von 1,5 Minuten (30 Zyklen) durchgeführt, so daß auch die längeren, ungespleißten RNAs (cDNAs) amplifiziert werden konnten.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für alle 8 Transkripte, die insgesamt 9 Intronen enthalten, konnte auf diese Weise das entsprechende kurze Amplifikat nachgewiesen werden, das in seiner Länge der gespleißten RNA des WT entspricht (Abb. 22 A-C und Tab. 11). Unterschiede in der Stärke eines Signals zwischen WT und Cybride können nicht als Grundlage für eine vergleichende Quantifizierung der gespleißten RNAs dienen, weil

sich der Anteil an plastidärer RNA in der zur reversen Transkription eingesetzten Gesamtzell-RNA in WT und Cybride unterscheiden kann. Dagegen sind Differenzen in den relativen Quantitäten von "gespleißten" und "ungespleißten" Amplifikaten als Unterschiede zu werten. Ein solcher Fall liegt bei der *trnV-UAC*-mRNA vor, bei der im WT neben der "gespleißten" cDNA eine relativ hohe Menge an "ungespleißter" cDNA amplifiziert wurde, in der Cybride dagegen das "ungespleißte" Produkt unter der Nachweisgrenze liegt. Wahrscheinlich ist die Kinetik des Spleißens für die *trnV-UAC*-mRNA in der Cybride zugunsten der gespleißten Form verschoben.



**Abbildung 22: Test auf Spleißaktivität der Ab(Nt)-Cybride. (A - C) Durch PCR auf cDNA-Basis wurde das Spleißen von solchen Intronen getestet, die Unterschiede in funktionell bedeutenden Introndomänen aufweisen. 1 = Ab(Nt)-cDNA 2 = WT-Nt-cDNA 3 = Wasserkontrolle 4 = WT-Ab-cDNA. 1l/2l = 1./2. Intron des jeweiligen Gens. Die Oligonukleotide zu den jeweiligen Amplifikaten finden sich in Tabelle 11. (D) Ausschnitt aus einem Chromatogramm zur Sequenzierung der PCR-Produkte aus (C) [Spuren 1 und 2]. Hellgrauer Hintergrund = erstes; dunkelgrauer = zweites Exon. Die Spleißstelle ist im WT und in der Cybride identisch.**

Obwohl über PCR-Ansätze für alle untersuchten Transkripte eine gespleißte cDNA nachgewiesen wurde, ist dies noch kein Beweis für die Genauigkeit des Spleißvorgangs. Vor allem in solchen Fällen, in denen Domänen V und VI unterschiedlich und somit in der Cybride Fehler in der Interaktion mit Kernfaktoren auftreten können, ist möglicherweise die Spleißstelle verschoben. Um dies zu untersuchen, wurden die erhaltenen PCR-Produkte in einigen Fällen durch Sequenzierung untersucht (Gene *clpP*, *atpF*, *trnL-UAA*, *trnV-UAC*). Die korrekte (WT)

Spleißstelle wurde für diese vier mRNAs eingehalten wie am Beispiel des 2. Introns von *clpP* gezeigt ist (Abb. 22 D).

**Tabelle 11: Erwartete Länge von PCR-Produkten von spezifischen gespleißten und ungespleißten cDNAs**

Gen	Oligonukleotide	Länge des Amplifikats bei gespleißter RNA [Bp]	Länge des Amplifikats bei ungespleißter RNA [Bp]
<i>ycf3</i> 2. Intron	ycf3ex2for-P29	267	1050
<i>atpF</i>	AT7atpF-AatpF	488	1183
<i>rps16</i>	Hrps16f-AT7rps16	55	915
<i>trnK</i> -(UUU)	trnKex2rev-trnKex1for	71	2597
<i>clpP</i> 1. Intron	clpPrev2-clpPex2rev	81	800
2. Intron	clppx1for-AT7clpP	313	1120
<i>rpl2</i>	rpl2ex2rev-rpl2	216	882
<i>trnV</i> -(UAC)	AT7trnV-AtrnV	81	652
<i>trnL</i> -(UAA)	AT7trnL-AtrnL	81	584

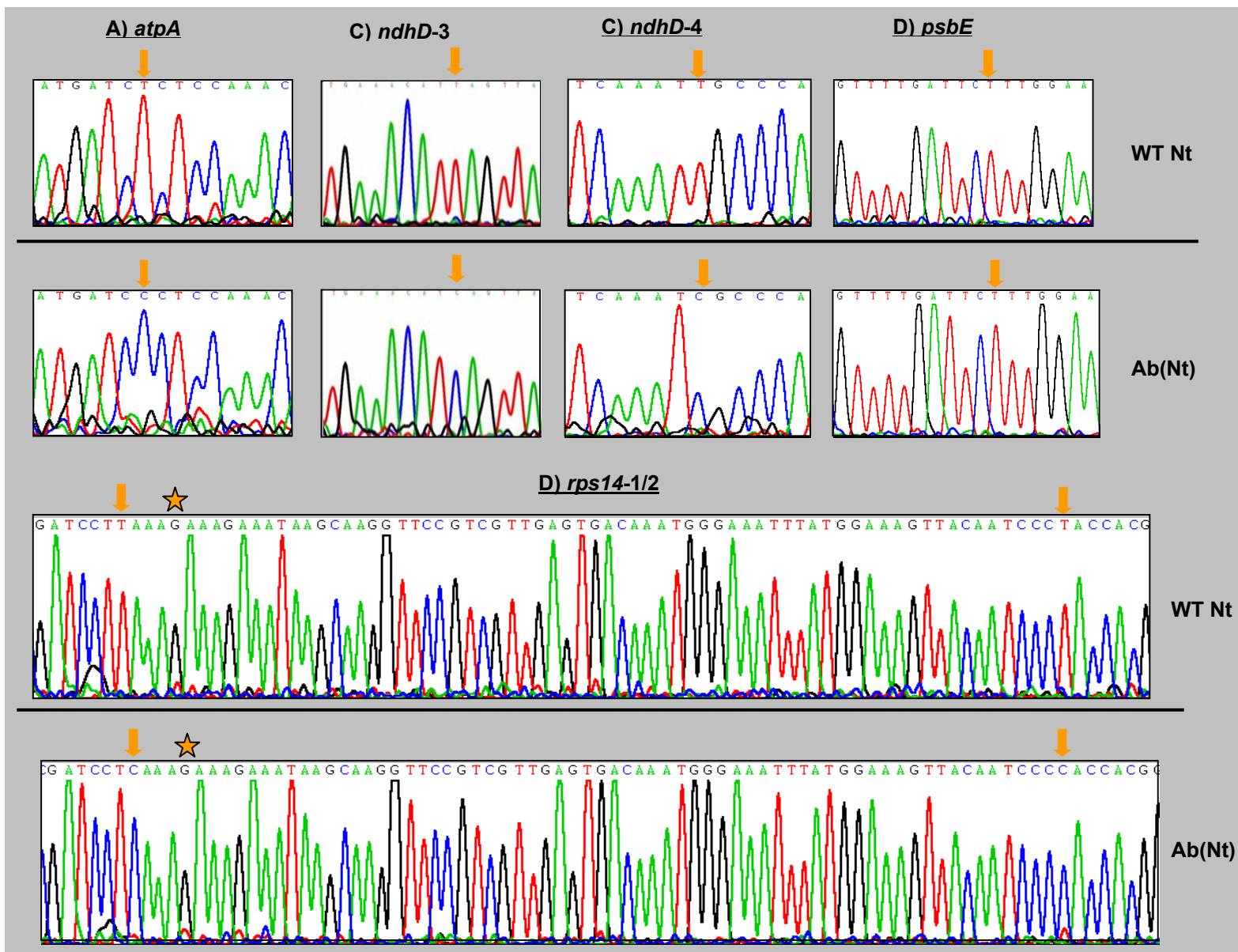
Länge der Intronen und somit der zu erwartenden Amplifikate basierend auf der Annotierung des Plastidenchromosoms aus Tabak von Shinozaki *et al* (1986)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das Spleißen in der Cybride trotz der Unterschiede in den für das Spleißen relevanten Sekundärstrukturelementen in den Intronen offensichtlich nicht beeinträchtigt ist. Das Spleißen erfolgt unter Einhaltung der WT Spleißstelle.

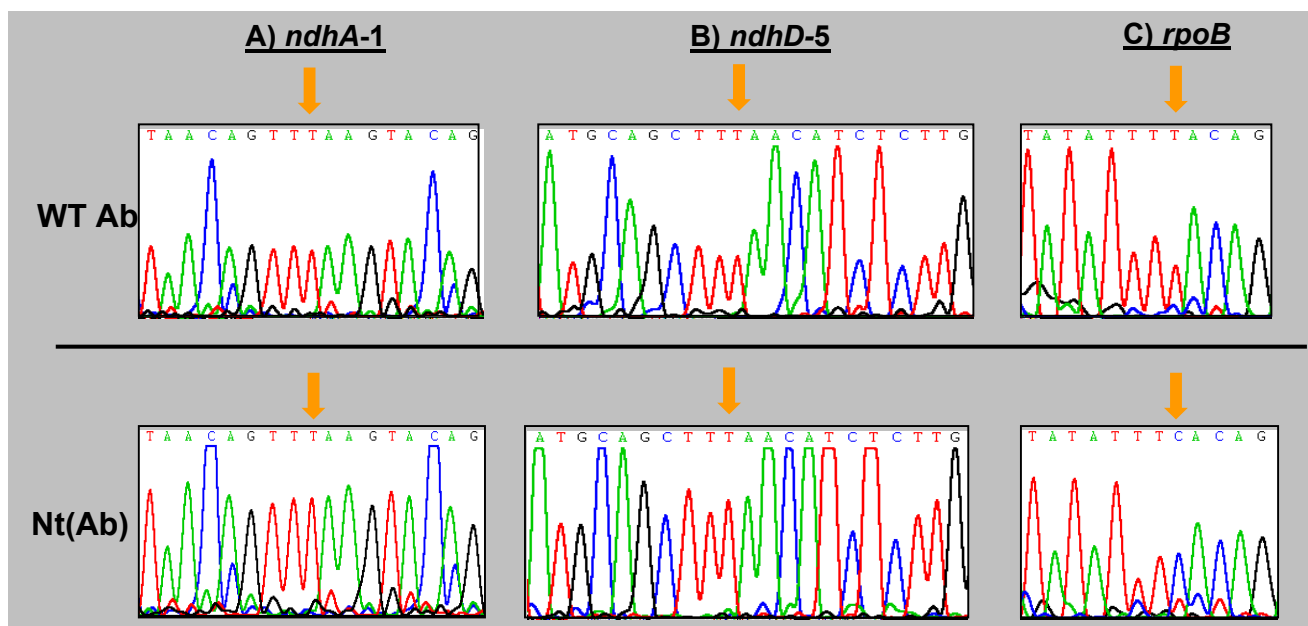
### 3.1.3.7 Analyse von RNA-Edierung an artspezifischen Stellen im heterologen Kernhintergrund der Ab(Nt)- bzw. Nt(Ab)-Cybriden

Die Analyse des Editotyps von *Atropa* hatte ergeben, daß fünf Stellen aus Tabak (*atpA*, *psbE*, *rps14-2*, *ndhD-3*; *ndhD-4*) nicht im Plastom von *Atropa* vorhanden sind. Zusätzlich wurden drei *Atropa*-spezifische Stellen (*ndhA-1*, *ndhD-5*, *rpoB-5*) gefunden. Da die Maschinerie der Edierung höchstwahrscheinlich kernkodiert ist (siehe Abschnitt 1.4.3), ergibt sich die Frage, ob die nötigen Faktoren in den Kernen beider Solanaceen vorhanden sind oder nicht.

Um dies zu klären, sollte überprüft werden, ob die 7 artspezifischen Stellen im heterologen Kernhintergrund der Ab(Nt)-, bzw. Nt(Ab)-Cybride korrekt prozessiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Regionen aus den jeweiligen cDNA-Populationen amplifiziert und die Produkte sequenziert. Ausschnitte aus den korrespondierenden Chromatogrammen sind in Abb. 23 und 24 gezeigt.



**Abbildung 23:** Prozessierung von tabakspezifischen Edierungsstellen im Kernhintergrund von *Atropa*. Amplifizierte cDNA aus Gesamt-RNA der *Ab(Nt)*-Cybride, bzw. aus Tabak-WT wurde sequenziert. Gezeigt sind Teilabschnitte dieser Sequenzen um die betreffenden Edierungsstellen (Pfeile). Die dargestellten Sequenzabschnitte sind identisch in Tabak und *Atropa* mit Ausnahme einer G-zu-A-Basensubstitution in *rps14* (Stern).



**Abbildung 24:** Prozessierung von tollkirschspezifischen Edierungsstellen im Kernhintergrund von Tabak. Amplifizierte cDNA aus Gesamt-RNA der Nt(Ab)-Cybride, bzw. aus *Atropa*-WT wurde sequenziert. Gezeigt sind Teilabschnitte dieser Sequenzen um die betreffenden Edierungsstellen (Pfeile).

In der Albino-Cybride sind weder die beiden Stellen in *ndhD* (-3 und -4), noch die in *atpA*, und auch nicht die in *rps14* (-2) normal ediert (Abb. 23). Die Edierung fällt für drei dieser vier Stellen vollständig aus, d.h. mit der hier verwendeten Methode kann kein ediertes Nukleotid detektiert werden. Für die Stelle *rps14*-2 findet Edierung dagegen statt, wenn auch im Vergleich zum WT stark vermindert. Das edierte T-Signal, nur wenig oberhalb der Nachweisgrenze (Abb. 23), wird neben dem überwiegend "unedierten" C-Signal reproduzierbar aufgefunden.

Außerdem wurde ein Defekt einer Edierungsstelle in *rps14*, die in beiden Arten konserviert ist, festgestellt (*rps14*-1). Allerdings findet sich ein Unterschied zwischen *Atropa* und Tabak 4 Nukleotide stromab der Stelle. Hier unterbricht ein G in Tabak einen in *Atropa* 7 Nukleotide lange, reine A-Folge. Diese Stelle wird in *Atropa* nur teilediert (Abb. 23 und 10).

Dieser reduzierten bzw. fehlenden Edierung *Atropa*-fremder Stellen steht eine Stelle in *psbE* entgegen, die in der Ab(Nt)-Cybride wie im WT vollständig ediert zu sein scheint (Abb. 23). Offensichtlich ist in diesem Fall die Edierungskapazität zwischen *Atropa* und Tabak erhalten geblieben, so daß hier heterologes Edieren stattfinden kann.

In der grünen Nt(Ab)-Cybride wurden die drei für *Atropa* spezifischen Stellen untersucht. In diesem Fall reicht die Edierungskapazität des Tabakkerns für zwei der drei Stellen (*ndhA-1*, *ndhD-5*) aus, während die Stelle in *rpoB* unediert bleibt (Abb. 24).

Die in den Cybriden festgestellte Edierung von artfremden Stellen, sogenanntes heterologes Edieren, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden und ist als eine sehr große Überraschung zu werten, da alle bisherigen Versuche, artfremde Stellen heterolog zu prozessieren, bisher fehlschlagen (Bock *et al.* 1994; Reed und Hanson 1997).

Neben Unterschieden zwischen Tabak und *Atropa*, die direkt Edierungsstellen betrafen, wurden auch Unterschiede in den Bereichen unmittelbar 5' von Edierungsstellen gefunden (Tab. 9). Diese Sequenzabschnitte sind kritisch für die Bindung von kernkodierten Edierungsfaktoren (z.B. Hirose und Sugiura 2001) und können somit in den Cybriden u. U. nicht erkannt werden. Es zeigte sich, daß keine der betroffenen Stellen in den Genen *rpoA*, *ndhD* und *ndhA* in ihrer Edierungseffizienz beeinträchtigt ist (nicht gezeigt). Allein die in Abb. 23 gezeigte Stelle *rps14-1*, die einen Basenaustausch im 3'-Bereich der Edierungsstelle zwischen Tabak und *Atropa* aufweist, wird im Tabakkernhintergrund nicht ediert. Bisher gibt es in der Literatur allerdings keine Hinweise auf einen Einfluß von 3' zur Edierungsstelle gelegenen Sequenzelementen, die die Edierung beeinflussen würden (Bock 2000).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Edierungsdefekte in den Cybriden auftreten, die auf die unterschiedlichen Editotypen der Eltern zurückgeführt werden können. Dabei ist die Ab(Nt)-Cybride mit insgesamt fünf Defekten wesentlich stärker betroffen als die Nt(Ab)-Cybride mit nur einem Defekt. Dies korreliert auffallend mit den Phänotypen der beiden Cybriden. Der Verlust von Edierung führt höchstwahrscheinlich zu Mängeln in den betroffenen Polypeptiden, kann also zu den Problemen vor allem der Albino-Cybride beitragen. Daß auf der anderen Seite die eigentlich erwarteten Verluste von Edierung in der grünen Cybride zum Teil durch heterologes Edieren eben doch nicht auftreten, ist als Erkenntnis neu und bietet eine Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen.

### 3.1.4 Transformation der Cybride

Die Daten aus dem Sequenzierprojekt und die Expressionsanalysen der Cybridenplastiden zeigen, daß Defekte in der Cybride und Sequenzunterschiede zwischen Tabak und *Atropa* möglicherweise in ursächlichem Zusammenhang stehen. Um einen solchen Zusammenhang zu belegen, sollte eine Strategie entwickelt werden, die es ermöglicht, über die Einbringung von plastidären DNA-Fragmenten aus *Atropa* in das Tabakplastom der Cybride die Inkompatibilität zwischen den Organellen aufzuheben. Dieser Ansatz wird in der Literatur "rescue"-Experiment genannt, weil aus einem aberranten Phänotyp heraus der WT-Phänotyp "gerettet" wird. Der Ansatz ist Standard beispielsweise im Rahmen der Analyse von *Arabidopsis*-Kernmutanten (z.B. Wang *et al.* 2002).

#### 3.1.4.1 Transformation mit *aadA* als selektivem Marker an einer neutralen Insertionsstelle

##### 3.1.4.1.1 Spektinomycin blockiert die Regeneration von Cybridenkalli

Das Antibiotikum Spektinomycin, das aus dem Pilz *Streptomyces* spp. gewonnen wird, inhibiert die prokaryotische Translation an 70S-Ribosomen. Auch in Plastiden verschiedener Pflanzen, wie z.B. Tabak ist es wirksam und unterbindet die Regeneration von Kalli und schließlich die Differenzierung von Schösslingen aus Blattstücken (Bock 2001). Dies ist Voraussetzung für den Einsatz des *aadA*-Gens als selektiver Marker, der Resistenz gegen Spectinomycin vermittelt. Allerdings sind andere Pflanzen, wie einige Poaceen (Schwarz und Kössel 1980) resistent gegen dieses Antibiotikum bei Konzentrationen, die das Wachstum von Tabak bereits inhibieren.

Ob Spektinomycin ein geeigneter Inhibitor der Regeneration auch der weißen Cybride ist, sollte in einer Verdünnungsreihe des Antibiotikums untersucht werden, das in Konzentrationen von 100, 200, 300, 400 und 500 µg/ml RMOP AE59-Medium beigegeben wurde. Je 20 ca. 0,5 x 0,5 cm große Blattstückchen der Ab(Nt)-Cybride wurden im Doppelansatz auf Petrischalen mit diesem Medium ausgelegt und es wurde die Regeneration beobachtet (Tab. 12). Als Regenerat wurde jeder mit bloßem Auge erkennbare Sprossansatz gewertet. Zur Kontrolle der Regeneration wurden auf Spektinomycin-freiem Medium ebenfalls Ab(Nt)-Blattstücke und auch WT-Blattstücke

ausgelegt.

**Tabelle 12: Regeneration der Ab(Nt)-Cybride auf spektinomycinfreiem und spektinomycinhaltigem Medium**

Spektinomycin [µg/ml]	Pflanze	Regenerate nach 6 Wochen	Zusätzliche Regenerate nach 10 Wochen	Regenerate gesamt
0	WT Nt	41/50*	37/35	163
0	Ab(Nt)	12/19	3/6	40
100	Ab(Nt)	2/1	2/3	8
200	Ab(Nt)	0/0	1/2	3
300	Ab(Nt)	0/0	0/0	0
400	Ab(Nt)	1/0	0/0	1
500	Ab(Nt)	0/0	0/0	0

\* ausgewertet wurde die Regeneration von jeweils 2 Kulturschalen

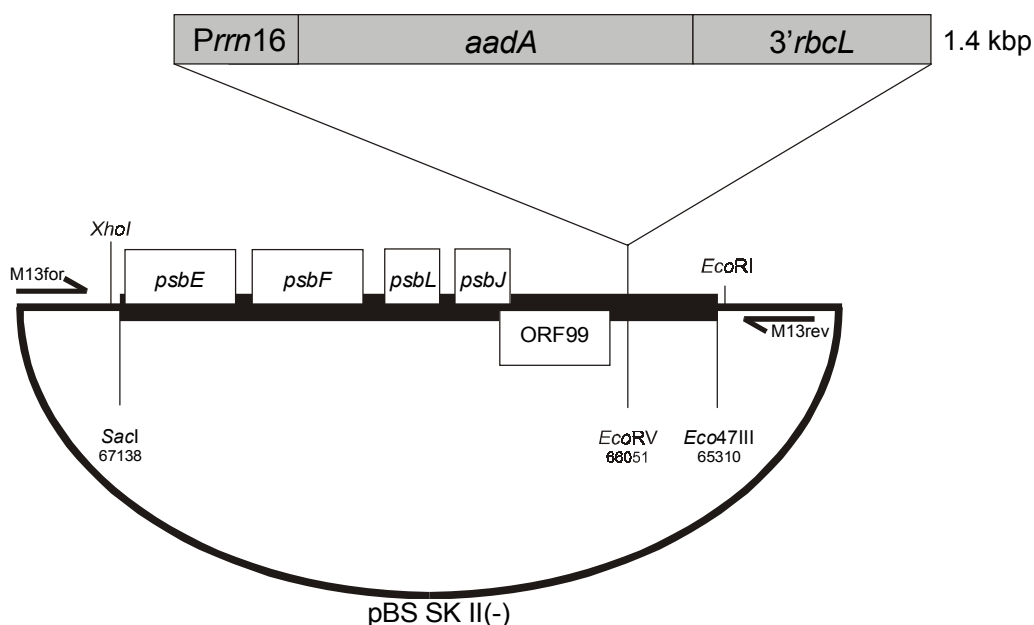
Die Ergebnisse zeigen, daß die albinotische Cybride sensitiv für Spektinomycin und Spektinomycin damit ein geeigneter Selektionsmarker ist. Nur bei geringeren Konzentrationen entstanden einige wenige Regenerate. Bei 400 µg/ml Spektinomycin wurde ein Regenerat isoliert, das möglicherweise auf eine spontane Mutation für Spektinomycinresistenz zurückgeht. Da aber bereits bei 300 µg/ml Antibiotikum die Regeneration komplett unterbunden zu sein scheint, wurde bei späteren Transformationsexperimenten mit etwas weniger Spektinomycin selektiert als dies beim WT der Fall ist (400 im Gegensatz zu 500 µg/ml Spektinomycin). Im Übrigen ist die Regeneration des cybriden Materials insgesamt wesentlich schlechter als die des WTs und erreicht nur etwa ein Viertel der Effizienz auf nicht-selektivem Medium.

### 3.1.4.1.2 Vektorkonstruktion

Zur Transformation wurde ein von Ralph Regel erstellter Vektor (pRR3,5) genutzt. Dieses pBlueskript-Derivat ist ein Abkömmling des Ba1-Vektors aus der Tabak-Klonbank von Professor Sugiura (Sugiura *et al.* 1986). Der Vektor besitzt ein 10,3 kB langes BamHI-Fragment als Insertion. Ein Teil der Insertion mit einer Länge von 3576 Bp wurde von Position 65310 bis 67138 (EMBL-Akz. Nr. Z00044) mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *Eco47III* herausgeschnitten, das überhängende *SacI*-Ende in einer Klenow-Polymerasereaktion aufgefüllt und in die *EcoRV*-Stelle des Blueskript SKII-Vektors eingesetzt. Dieses Insert überspannt das *psbE*-Operon von Tabak und fast den gesamten intergenischen Bereich zwischen *psbF* und *petA*. In der letztgenannten Region findet sich eine singuläre Schnittstelle für *EcoRV*, die zur Klonierung der *aadA*-Kassette benutzt wurde (Abb. 25).



Die *aadA*-Kassette in der Schnittstelle *EcoRV* im intergenischen Bereich zwischen *petA* und *psbF* ist bereits in der Arbeitsgruppe Bock (1996) als auch in unserer Gruppe von Ralph Regel zur Transformation von WT-Tabak erfolgreich eingesetzt worden (Regel *et al.* 2001). Die erhaltenen Transformanten wachsen in Gewebekultur normal, sind fertil und autotroph. Keinerlei physiologischer morphologischer Defekt wurde bisher festgestellt (Bock *et al.* 1996; Regel *et al.* 2001). Es scheint sich also um eine neutrale Insertionsstelle des Tabakplastidenchromosoms zu handeln.



**Abbildung 25: Konstruktion des Transformationsvektors pBAB.** In den Grundvektor *pBS SK II (-)* wurde ein Fragment des Tabakplastidenchromosoms (fett hervorgehobene Linie; Position im Plastidenchromosom angegeben) in die *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors eingefügt. Bindestellen für die Oligonukleotide *M13 for* und *M13rev*, sowie zwei Schnittstellen in *pBS SK II(-)* sind angegeben. Die zur Integration der *aadA*-Expressionskassette verwendete *EcoRV*-Schnittstelle ist ebenfalls markiert. *Prn16* = Promotor des 16S-RNA-Gens von Tabak; *3'rbcl* = 3'-regulatorischer Bereich des *rbcl*-Gens aus *C. reinhardtii*; weiße Rechtecke = Gene auf dem Plastidenchromosom von Tabak.

Die Kassette selbst besteht aus dem *aadA* Leserahmen aus *E. coli*, vor den der Promotor des 16S-rRNA-Gens aus Tabak gesetzt worden ist, und der mit dem 3'-terminalen Bereich des *rbcl*-Gens aus *C. reinhardtii* abschließt (Koop *et al.* 1996). *aadA* kodiert für die Aminoglycosid-3''-Adenylyl-Transferase, die Spektinomycin über eine Adenylierung unwirksam macht. Die Kassette wurde so in *pRR3,5* eingesetzt, daß der Promotor des *psbE*-Operons und der Kassette gleichsinnig ausgerichtet waren. Die Konstruktion erhielt den Namen *pBaB*.

### 3.1.4.1.3 Transformation

Der Vektor pBaB wurde aufgereinigt (Qiagen-midi-Säulen) und über ballistische Transformation in das weiße Material eingebracht. Dazu wurden jeweils mehrere Cybridenblätter eng nebeneinander auf eine Petrischale mit RMOP59-Medium gelegt, um den Trefferbereich der Partikelkanone abzudecken. Im Gegensatz zu Tabak reicht dazu wegen der geringeren Fläche ein einzelnes Blatt der Cybride nicht aus.

Insgesamt wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten je 18 Platten von 4 - 5 Blättern mit dem Konstrukt beschossen. Da die Blätter der Albino-Cybride wesentlich dünner und insgesamt fragiler erscheinen, wurde der Versuch unternommen, die Hälfte der Blätter mit einem Druck von nur 600 psi statt der für Tabak üblichen 900 psi zu beschießen. Die Blätter wurden nach zwei Tagen in etwa 3 x 3 mm große Stücke geschnitten, auf spektinomycinhaltiges RMOP59-Medium (400 µg/µl) überführt und in der Kulturkammer inkubiert. Alle drei Wochen wurden die Blattstücke auf frisches Medium transferiert. Auch nach 12 Wochen Inkubation konnte kein Regenerat isoliert werden, d.h., daß keine Expression der *aadA*-Kassette erreicht werden konnte. Entweder wird die Kassette in der Cybride nicht transkribiert und/oder translatiert oder gar nicht erst in das Plastidenchromosom integriert.

### 3.1.4.2 Transformation von Regeneraten ohne Selektion

In der Erstbeschreibung der Ab(Nt)-Cybride wird erwähnt, daß auf dem weißen Blatthintergrund vereinzelt grüne Gewebeflecken auftreten (Kushnir *et al.* 1991). In den zweieinhalb Jahren, in denen die Albino-Cybride im Rahmen dieser Arbeit in Gewebekultur gehalten wurde, sind ebenfalls zwei solcher spontanen grünen Punkte gefunden worden. Ohne daß diese spontanen grünen Punkte näher untersucht worden wären, kann man vermuten, daß hier lokal Chlorophyll akkumulierte und eine Veränderung in der Plastidenentwicklung aufgetreten ist. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Ereignissen um somatische Mutationen, die in räumlich begrenzter Weise Inkompatibilität aufheben. Somaklonale Veränderungen sind tatsächlich im Plastidengenom innerhalb einer Pflanze beschrieben worden (Frey 1999). Eine solche Veränderung sollte auch über Plastidentransformation von cybridem Gewebe zu provozieren sein. Dazu wurden nicht wie üblich Blätter, sondern junge Regenerate von 0,2 – 1 cm Größe mit

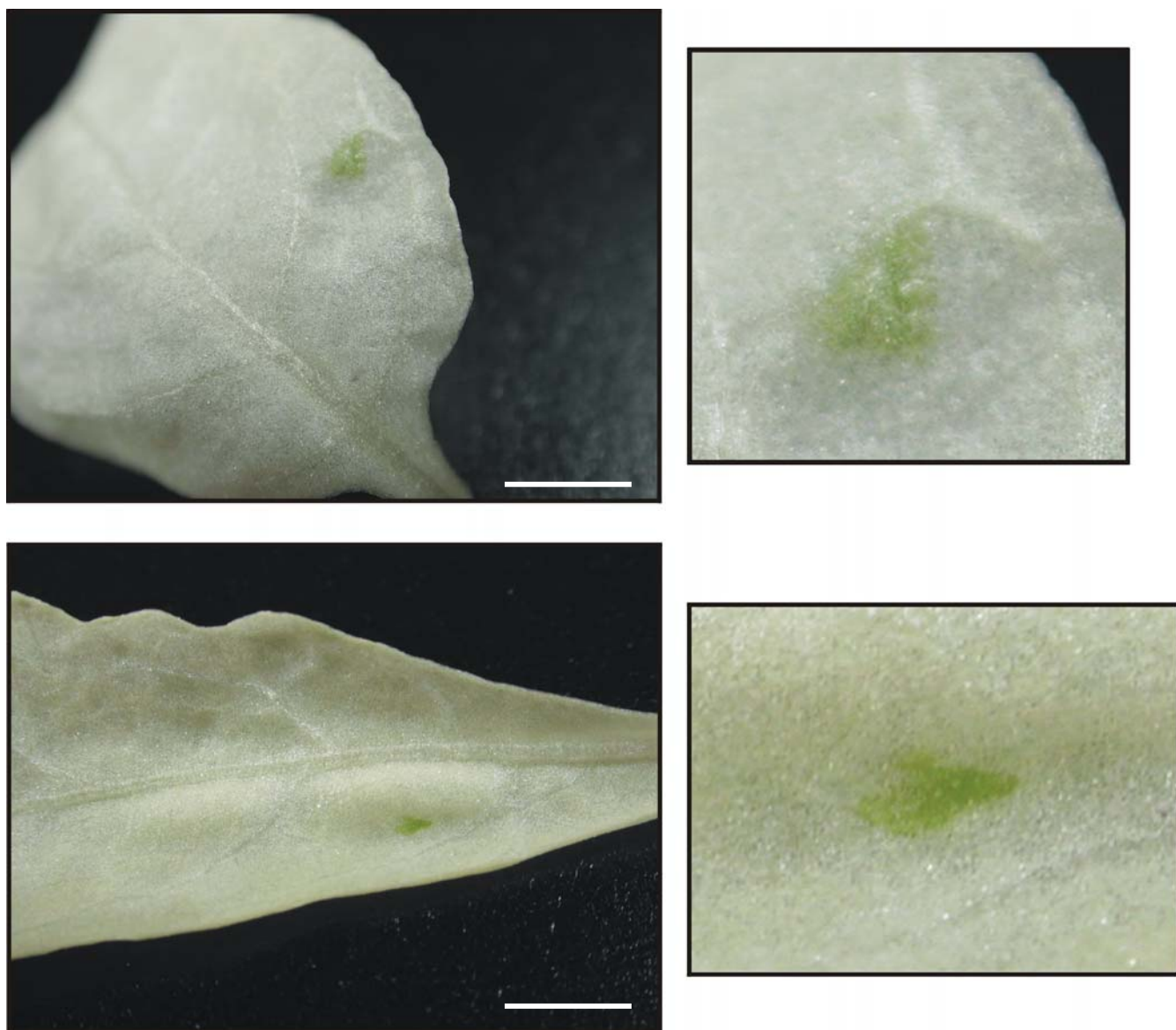
Plastiden-DNA aus *Atropa* beschossen. Dem lag die Annahme zu Grunde, daß bei einem Transformationsereignis in den apikalen Blattprimordien alle Nachkommen solcher meristematischen Zellen die Transformation trügen, was zu einem Klon von transformierten Zellen führen sollte.

Verschiedene DNA-Präparationen wurden zur Transformation eingesetzt. Ein Teil der Versuche wurde mit Gesamt-DNA aus isolierten Plastiden durchgeführt, ein anderer mit Teilen der in Tabelle 4 beschriebenen Klonbank. Im Falle der Transformation mit isolierter Plastiden-DNA wurden 30 µg DNA auf die Goldpartikel aufgebracht. Für die Transformation mit der Klonbank wurde versucht, mit einer möglichst geringen Anzahl von Klonen einen möglichst großen Bereich des Plastidenchromosoms abzudecken. Dazu waren alle Klone der Bank außer pBAbK13, pBAbB36 und pBAbP12 nötig. Von jedem dieser Klone wurden 2 µg, also insgesamt 32 µg DNA eingesetzt.

Wie in Tabelle 13 dargestellt, führte sowohl die Transformation mit der Klonbank von *Atropa* als auch mit aus Plastiden isolierter DNA dieser Pflanze zu grünen Gewebeflecken. Die beobachteten Flecken waren von unterschiedlicher Größe, meist jedoch 1 - 1,5 mm<sup>2</sup> und zeigen in der Vergrößerung keine klare Abgrenzung gegen das weiße Gewebe (Abb. 26).

Keine derartigen Flecken wurden gefunden, wenn mit Gesamt-DNA aus isolierten Tabakplastiden oder mit dem Vektor pBS SK II(-) beschossen wurde. Diese Kontrollen zeigen, daß nicht die Verletzung des Gewebes durch die Goldpartikel oder die Anwesenheit von eingebrachter DNA allein das Entstehen eines grünen Punktes hervorrufen kann. Zudem macht das Experiment mit der Plastiden-DNA von Tabak klar, daß die grünen Punkte auf einen Unterschied in der plastidären DNA der beiden Arten zurückgehen müssen.

Erfolgreich verliefen auch Experimente, in denen nur der Klon pBAbK14 oder pBAbB60 verwendet wurden. Diese beiden Klone überlappen mit nur 1626 Bp innerhalb des *rpoC2* Gens. Das Plasmid pBAbK14 gehört innerhalb der *Atropa*-Klonbank zu den rekombinanten DNAs mit eher kürzeren Inserts und trägt ausschließlich *rpoC2*-Sequenz. Die in *Atropa belladonna* gefundene Deletion



**Abbildung 26: Grüne Gewebeflecken auf weißem Blatthintergrund 8 Wochen nach Beschuss mit dem Vektor pBAbK14. Digitalphotographie. Rechts: Vergrößerungen der grünen Bereiche. Balken = 1 cm.**

im *rpoC2*-Gen, die insgesamt 3 Kodonen, darunter eines für ein hochkonserviertes Phenylalanin betrifft (siehe Abb. 7C), ist Teil dieses Klons.

Die Verwendung des Klons pBAbP7, der ebenfalls ein Gen (*accD*) trägt, das eine Deletion in *Atropa* aufweist, erbrachte keine grünen Gewebeflecken. Auch mit DNA des Klons pBAbK46 konnten keine grünen Gewebeflecken erzeugt werden. Beide Experimente unterstreichen die Spezifität der Transformation, die nur mit DNA, die *rpoC2*-Sequenz enthält, erfolgreich zu verlaufen scheint.

Tabelle 13: Transformationsexperimente zur Reversion der weißen Cybride

DNA	Kodierung	Anzahl Experimente: Anzahl Pflanzen	Grüne Gewebeflecken
pBAbK14	<i>rpoC2</i>	3:35/31/31	5/8/4
pBAbB60	<i>rpoC2</i> ; 6 tRNA Gene; <i>atpA,F,H,I</i> ; <i>rps2</i>	2:33/26	4/2
pBAbP7	<i>accD</i>	1:26	0
pBK46	<i>rpoC1</i> ; <i>rpoB</i> ; <i>petN</i> ; <i>psbM</i> ; 5 tRNA Gene	1:30	0
pBSII SK- Nt Plastiden-DNA	- Alle plastidären Gene von Tabak	2:24/29 1:29	0/0 0
<i>Atropa</i> Klonbank Ab Plastiden-DNA	siehe Text Alle plastidären Gene von <i>Atropa</i>	1:22 2:30/30	6 6/3
pTArps14ed; pTAndhDed; pTAatpAed	Teile der Gene <i>ndhA</i> , <i>ndhD</i> und <i>rps14</i>	1: 62	0

### 3.1.4.3 Transformation mit *Atropa*-Edierungsstellen

Die Edierungsdefekte der Ab(Nt)-Cybride legen nahe, daß auch diese Loci an der Ausbildung von Inkompatibilität beteiligt sein können. Um zu testen, ob die Ersetzung der drei betroffenen Edierungsstellen aus Tabak durch die homologen, jedoch keine Edierungsstelle aufweisenden Sequenzen von *Atropa* ebenfalls eine Reversion zu WT ermöglicht, wurden drei Transformationsvektoren erstellt.

Dazu wurden Bereiche plastidärer DNA, die die entsprechenden Edierungsstellen der Gene *rps14*, *ndhA* und *ndhD* umfassen, über PCR amplifiziert und in den TA-Vektor kloniert (Tab. 14). Je 10 µg der resultierenden Vektoren pTArps14ed, pTAndhDed und pTAatpAed wurden gemischt und zusammen zur Transformation wie im Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben eingesetzt, jedoch ohne daß grüne Geweberevertanten erzeugt werden konnten (Tab. 13). Möglicherweise reicht die Wiederherstellung des unedierten, *Atropa*-gemäßen Zustandes nicht aus für eine zum Ergrünen führende Reversion und sei es auch nur eine partielle. Zudem ist nicht bekannt, ob es zu Rekombinationen von mehreren Vektoren mit Plastidenchromosomen innerhalb einer Plastide überhaupt kommen kann. Doppeltransformationen ohne selektiven Marker sind bisher aus der Literatur nicht bekannt und es erscheint möglich, daß jede Edierungsstelle für sich allein nicht hinreichend für eine Reversion ist. Weitere Experimente mit einzelnen Edierungsstellen als transformierendes Agens sind zur Klärung dieser Frage

notwendig.

**Tabelle 14: Insertionen der Transformationsvektoren pTArps14ed, pTAndhDed und pTAatpAed**

Vektor	Zur Amplifikation verwendete Oligonukleotide	Länge des flankierenden 5'-Bereichs [Bp]*	Länge des flankierenden 3'-Bereichs [Bp]*
pTAatpAed	AT7atpA-atpHF6	359	216
pTArps14ed	AtrnG(GCC)-HpsaBfor2	798	357
pTAndhDed	ndhDrev-AndhD	377	673

\* betrifft die gesamte Länge der Insertion von der Edierungsstelle an

#### 3.1.4.4 Analyse "revertanter" grüner Punkte

Die Transformation von Regeneraten der Ab(Nt)-Cybride ohne selektiven Marker hat das Entstehen von grünen Gewebeflecken zur Folge. Diese Flecken sind stabil und verschwinden erst, wenn das gesamte Blatt verwelkt, also erst 2 - 3 Monate nach ihrem Entstehen.

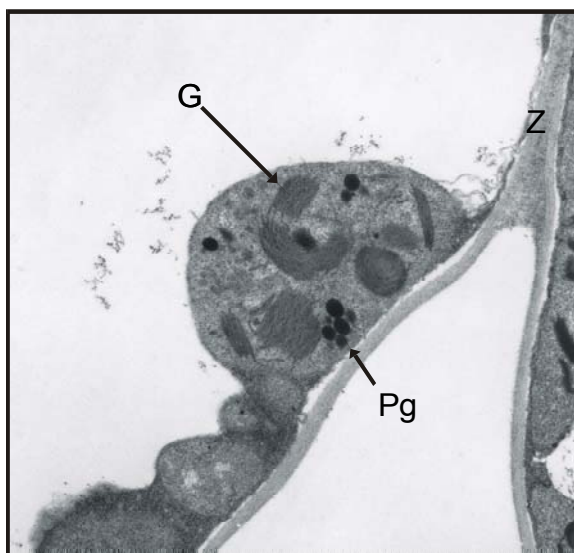
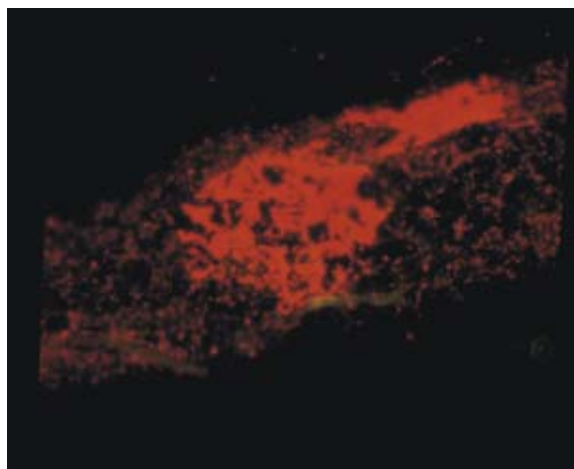
Die Analyse dieser Gewebebereiche sollte klären, inwieweit die Plastiden hier eine Umstrukturierung erfahren haben. Außerdem sollte versucht werden, die zur Transformation verwendete DNA im grünen Gewebe nachzuweisen.

##### 3.1.4.4.1 UV-Mikroskopie und Ultrastruktur grüner Gewebeflecken

Chloroplasten zeigen unter UV-Licht eine starke Autofluoreszenz. Hochenergetische Strahlung führt in den Antennen der Photosysteme zu einem Überangebot an angeregten Elektronen, die ihre Energie unter anderem in Form von Fluoreszenzlicht abgeben können. In Plastidentypen, die keine Thylakoide ausbilden, wie z.B. in den Plastiden der Wurzel gibt es diese Fluoreszenz nicht.

Um zu überprüfen, ob die grünen Gewebeflecken fluoreszieren, wurden Blattquerschnitte durch einen grünen Punkt, der aus einer Transformation mit dem Plasmid pBAbK14 stammte, untersucht und unter UV-Licht mikroskopiert. Die Fluoreszenzunterschiede zwischen weißem und grünem Gewebe sind in Abb. 27 dargestellt. Die stark fluoreszierenden Bereiche entsprechen dem grünen Gewebe, während in den umgebenden weißen Bereichen nur schwache Hintergrundsignale detektierbar sind. Die Aufnahme zeigt auch, daß die Fluoreszenz sich über mehrere Zelltypen innerhalb der dorsiventralen Achse des Blattes erstreckt, da sowohl

Epidermiszellen an der Blattoberfläche als auch Zellen des Palisadenparenchyms und des tiefer gelegenen Schwammparenchyms ein stärkeres Fluoreszenzsignal als der Hintergrund besitzen.



**Abbildung 27: Mikroskopische Analyse eines Grünen Gewebeflecken nach Transformation der Ab(Nt)-Cybride mit pBAbK14. Oben: Fluoreszenzmikroskopie eines Blattquerschnitts durch einen grünen Punkt. Stark fluoreszierende Bereiche stimmen überein mit grünem Gewebe. Gelb fluoreszierende, längliche Bereiche entsprechen Leitbündeln. Bo/Bu = Blattober/unterseite. Unten: Elektronenoptische Aufnahme einer Plastide aus einem grünem Gewebesektor. G = Thylakoidstapel; Z = Zellwand; Pg = Plastoglobuli**

Beachtenswert ist auch, daß überhaupt ein Hintergrundsignal im weißen Gewebe vorhanden ist, ohne daß man dort Thylakoid-ähnliche Strukturen (Abb. 17) oder Chlorophyllakkumulation beobachten kann. Möglicherweise gibt es eine geringe Akkumulation von partiellen oder ganzen Photosystemen und damit auch von Chlorophyll in den vesikelähnlichen Membranen, die zu der beobachteten Hintergrundfluoreszenz führt. Dies steht in Einklang damit, daß das Albino-Material

unter extremen Schwachlicht in jungen Entwicklungsstadien Spuren von Chlorophyll enthält.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die starke Fluoreszenz im grünen Gewebefleck darauf hindeutet, daß zumindest teilweise Elektronenfluss im Innern der Plastiden vorhanden ist. Möglicherweise ist auch das schwächere Signal im weißen Gewebe Auswirkung eines minimalen Elektronentransportes. Der Unterschied zwischen weißem und revertantem Gewebe ist jedenfalls deutlich.

Wie unter UV-Licht zeigen die grünen Gewebebereiche, genauer die Plastiden, auch im Elektronenmikroskop deutliche Unterschiede zu denen des umgebenden weißen Hintergrunds (Abb. 27). Die starke Vesikulierung ist aufgehoben, statt dessen treten Endomembranstrukturen auf, die auch Stapelungen zeigen, ähnlich den Granathylakoiden des WT. Allerdings sind die Stapel ungeordnet über das Stroma verteilt und scheinen nicht durch Stromathylakoide verbunden zu sein. Dies zeigt, daß keinesfalls vollentwickelte Chloroplasten in grünen Bereichen anzutreffen sind, die Reversion also unvollständig ist.

#### **3.1.4.4.2 PCR-Analysen grüner Gewebeflecken**

Um nach der Transformation in den grünen Gewebeflecken eventuell in das Plastidenchromosom integrierte oder auch freie DNA nachzuweisen, wurde ein modifiziertes PCR-Protokoll verwendet (Abschnitt 2.2.1.7.2), das direkt mit Gewebestückchen als DNA-Quelle funktioniert.

##### **3.1.4.4.2.1 PCR von grünen Gewebeflecken zum Nachweis der Rekombination der *Atropa-rpoC2*-Sequenz in das Plastidenchromosom der Ab(Nt)-Cybride**

Der auffälligste Unterschied in den DNA-Fragmenten, die in Transformationsexperimenten hinreichend zur Entstehung von grünen Gewebeflecken waren, bestand in einer Deletion im *rpoC2*-Gen von *Atropa* (Abb. 7C). Es sollte untersucht werden, ob nach der Transformation mit dem Klon pAbK14 die *Atropa*-Deletion in grünen Gewebeflecken nachweisbar ist.

Zur Detektion von über ballistische Transformation in die Cybride eingebrachte DNA des *Atropa*-Plastidenchromosoms muss gewährleistet sein, daß die



eingebraachte von der endogenen Tabak-DNA der Albino-Cybride unterschieden werden kann. Um das zu erreichen, wurden die Oligonukleotide der PCR so gewählt, daß ihre 3'-Enden spezifisch für die Sequenz von *Atropa* sind (Abb. 28A). Über einen Temperaturgradienten von verschiedenen Anlagerungstemperaturen für die Oligonukleotide (50°C - 60°C) konnte gezeigt werden, daß Tabak-Plastiden-DNA als Matrize für die PCR bei mehr als 52,9°C nicht mehr geeignet ist. Keine Amplifikate waren bei dieser oder höherer Temperatur detektierbar, während Plastiden-DNA aus *Atropa* fast im gesamten Temperaturbereich amplifizierbar ist (Abb. 28B). Die grundsätzliche Amplifizierbarkeit des *rpoC2*-Gens aus der Tabak-DNA wurde über eine andere, tabakspezifische Amplifikation nachgewiesen (nicht gezeigt).

A

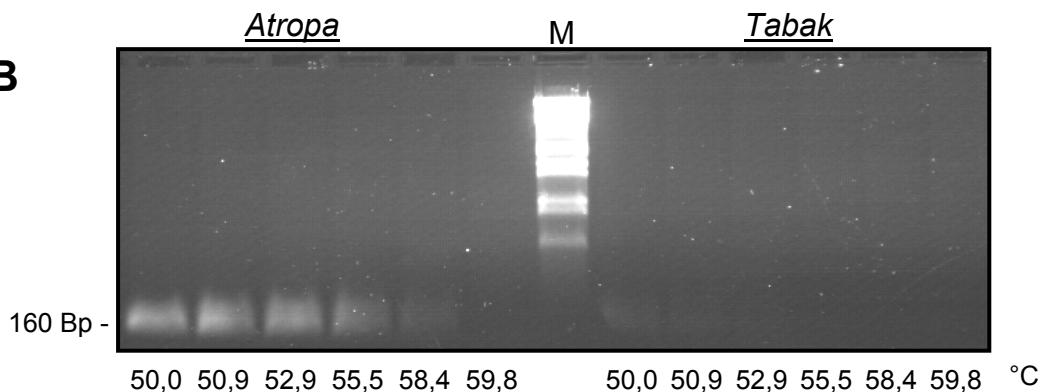
```

|18410      |120      |18430      |18440      |18450      |18460      |18470      |18480      |18490      |18500
TTGGAATTAGGGGATCTTTTAAATTGATTTTATCACACTGTGATATTTACATCCTTGAATGCCCCATTTCGAGAACAATTGGCTGCTGACAAAAT
|||||
TTGGAATTAGGCGATCTTTTAAATTGAGTCTTTTATCACACTGTGATATTTA-----ATGTCCCATTCGAGAACAATTGGCTGATGACAAAAT
|18190      |18200      |18210      |18220      |18230      |18240      |18250      |18260      |18270

|18510      |18520      |18530      |18540      |18550      |18560      |18570      |18580      |18590      |18600
TATCAACGACTGACATTCCTTATTCTATTTAACAACGTATGAATAGTTCCTTGAGGTTGGTTAATAGATTGTTGAATTTTGCCTTGGAAATAGGAATAA
|||||
TATCAACGACTGACATTCCTTATTCTATTCAACAACGTATGAATAGTTCCTTGAGGTTGGTTAAGAGATTGTTGAATTTTGCCTTGGAAATAGGAATAA
|18280      |18290      |18300      |18310      |18320      |18330      |18340      |18350      |18360      |18370

```

B



**Abbildung 28: Spezifische Amplifikation eines *Atropa rpoC2*-Genfragments. (A) Sequenzvergleich der amplifizierten Region zwischen Tabak (oben) und *Atropa* (unten). (B) Amplifikate aufgetrennt auf einem 2%igen Agarosegel. Links vom Marker: DNA von *Atropa* als Matrize; rechts: DNA von Tabak. Beide DNAs waren mit dem Oligonukleotidpaar AtrnY-AT7trnY gleichermaßen amplifizierbar (nicht gezeigt). Unten: Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide der jeweiligen Reaktion. M = Marker: Lambda-DNA mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut.**

Im Folgenden wurden grüne Gewebeflecken aus der pAbK14-Transformation und zur Kontrolle weiße Gewebestückchen gleicher Größe von nicht-transformierten Blättern untersucht. Die Gewebestückchen wurden zerdrückt und dann in Wasser

heftig geschüttelt. Diese Flüssigkeit wurde auf zwei PCR-Reaktionen aufgeteilt, die der Amplifikation des *rpoC2*-Gens und (zur Kontrolle) eines tRNA-Gens (*trnY-GUA*, nicht gezeigt) dienten. Die Amplifikation wurde bei für Tabak-DNA nicht-permissiver Hybridisierungstemperatur durchgeführt (57°C; Abb. 29A).

Überraschenderweise konnte nicht nur für den grünen Fleck ein Amplifikat nachgewiesen werden, sondern auch für das weiße Gewebe (Abb. 29A). Die Kontrollen zeigten, daß (a) keine Verunreinigung mit exogener DNA vorhanden ist (Kontrolle ohne Matrize; Spur 4) und (b) Tabak-DNA wie erwartet bei dieser Temperatur nicht amplifiziert wurde (Spur 3). Die PCR-Produkte wurden gefällt und sequenziert und es stellte sich heraus, daß in den von beiden Gewebetypen gewonnenen Amplifikaten eine Überlagerung von zwei Sequenzen vorlag, d.h. an den Stellen, an denen sich Tabak und *Atropa* unterscheiden, wurden Doppelsignale gefunden (nicht gezeigt). Um deutlich zu machen, daß dieses Sequenzierungsergebnis tatsächlich auf mehrere Amplifikate zurückgeht, wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes auf einem 10%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es konnten zwei Banden nachgewiesen werden, die den Amplifikaten der WT-Pflanzen zu entsprechen scheinen (Abb. 29B).

Sowohl die Amplifikate aus dem grünen Gewebeflecken als auch aus der Kontrolle auf weißes Gewebe wurden in den TA-Vektor kloniert und sequenziert. Zwei Typen von Sequenzen wurden aus beiden Klonierungen isoliert: erstens Klone, die identisch mit der von *Atropa* sind, also eine Deletion und die anderen Basenaustausche im Vergleich zu Tabak besitzen, und zweitens Klone, die sowohl von Tabak als auch von *Atropa* in ihrer Sequenz abweichen (Abb. 29C). Diese Klone haben im Vergleich zu Tabak zwei Nukleotide verloren und weisen in allen drei Leserahmen Stoppkodonen auf. Dies deutet darauf hin, daß es sich um ein nicht-funktionelles, also Pseudogen, handelt.

Da die gefundenen Sequenzen nicht aus der Plastide stammen können, die ja in der Ab(Nt)-Cybride von Tabak stammt, muß es sich um promiskuitive DNA handeln, DNA also, die von der *Atropa*-Plastide in den *Atropa*-Kern oder das *Atropa*-Mitochondrium transferiert wurde und somit auch in der Cybride präsent ist. Die möglicherweise über die Transformation eingebrachte DNA ist nicht von der im

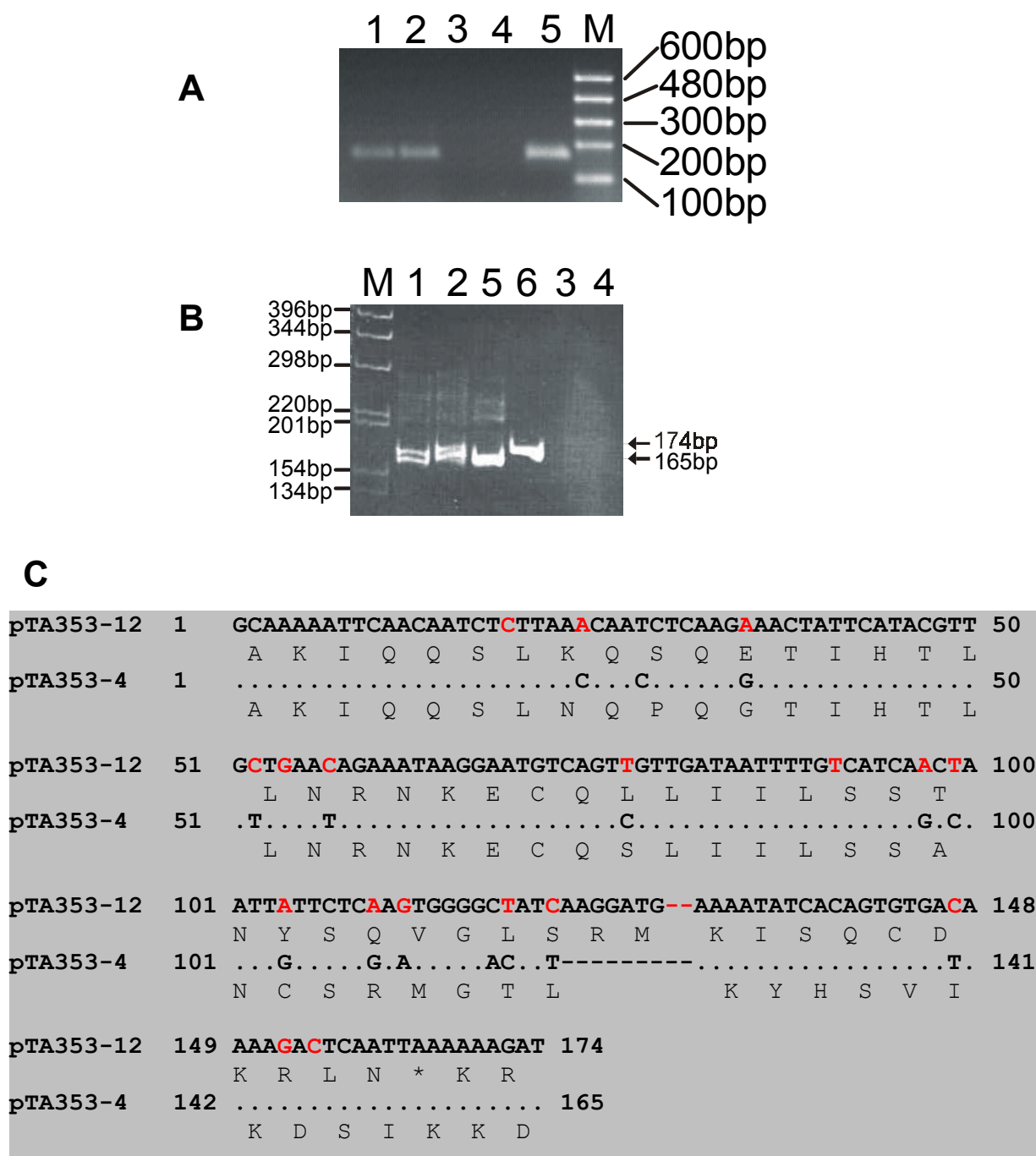


Abbildung 29: PCR-Analyse eines grünen revertanten Gewebeflecken der Ab(Nt)-Cybride auf Integration von *Atropa-rpoC2*-DNA. (A) Agarose-Gelelektrophorese (2%) von PCR-Produkten eines Teils des *Atropa rpoC2* Gens, die mit den Oligonukleotiden ABrpoC2for und ABrpoC2rev bei für Tabak nicht-permissiver Anlagerungstemperatur amplifiziert wurden (57°C; siehe Abb. 28). Matrizen: 1 = grünes Gewebestück erhalten nach Transformation mit pBAbK14; 2 = weißes Gewebestück einer nicht transformierten Pflanze; 3 = Tabak-WT-DNA; 4 = Wasser; 5 = *Atropa*-WT-DNA. (B) PAGE (10%) derselben PCR-Produkte (1 - 5) aus (A) plus einer PCR auf Tabak-DNA bei permissiver Temperatur (Spur 6; 48°C). Rechts des Gelphotos sind die erwarteten Längen des Tabak- und *Atropa*-Amplifikats angegeben. (C) Partieller Sequenzvergleich zweier Klone, die aus der Klonierung des PCR-Produktes in der mit 1 bezeichneten Spur stammen. Identische Nukleotide in beiden Klonen sind durch Punkte in der Sequenz von pTA353-4 dargestellt. Die Sequenz des Klons pTA353-4 ist identisch mit der plastidären Sequenz von *Atropa*. Die Sequenz des Klons pTA353-12 ist weder identisch mit *Atropa*, noch mit Tabak (rot = Nukleotide in pTA353-12, die von Tabak abweichen). Infolge der Deletion von 2 Nukleotiden in pTA353-12 kommt es zu einer Rasterverschiebung, die zu einem Stoppkodon führt (Sternchen).

Gewebe bereits vorhandenen promiskuitiven Kopie zu unterscheiden. Weitere Experimente müssen zeigen, ob eine Integration der zur Transformation verwendeten DNA erfolgt ist.

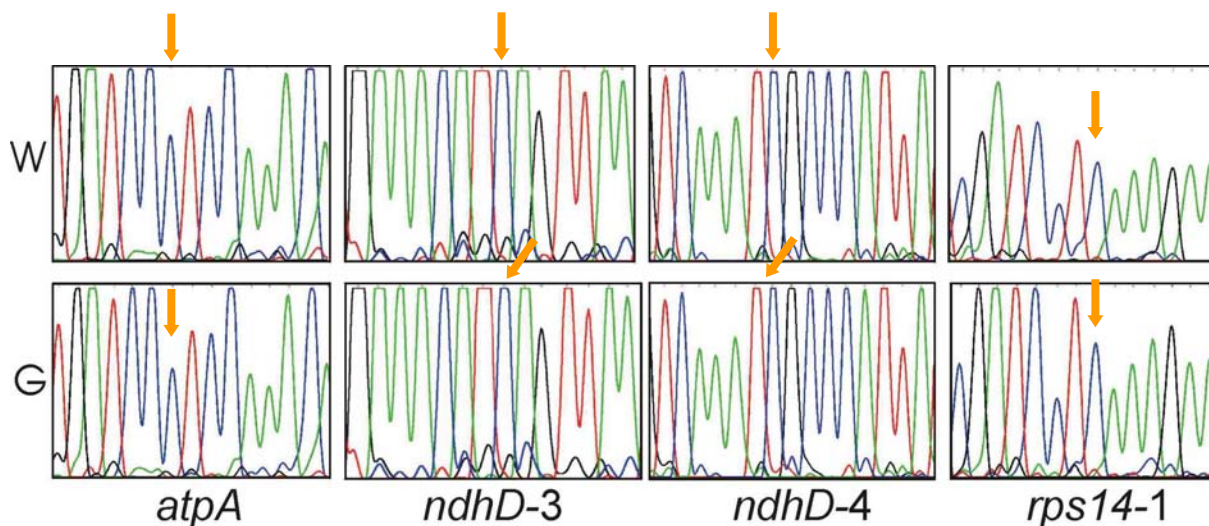
#### **3.1.4.4.2 PCR von grünen Gewebeflecken zum Nachweis des Austausches von artspezifischen Edierungsstellen**

Neben dem Unterschied im *rpoC2*-Gen erbrachte der Sequenzvergleich, daß die plastidären Editotypen der beiden Solanaceen Tabak und *Atropa* verschieden sind. Nachdem die Expressionsanalysen gezeigt hatten, daß in der Albino-Cybride zumindest vier der tabakspezifischen Stellen nicht ediert werden, lag es nahe zu vermuten, daß diese Prozessierungsdefekte ebenfalls am Block der Plastidenentwicklung beteiligt sind. In diesem Falle wären schon "edierte" DNA-Sequenzen potentielle Auslöser für die Entstehung grüner Punkte, da sie den *Atropa*-Kern in der weißen Cybride der unlösbaren Aufgabe enthöben, Tabakstellen zu edieren.

Um dies zu testen, wurden grüne Punkte mittels PCR und anschließender Klonierung der Amplifikate auf die Anwesenheit von *Atropa*-Sequenzen an den Edierungsstellen untersucht. Als Matrize dienten zwei grüne Punkte, die nach der Transformation mit Gesamtplastiden-DNA von *Atropa* entstanden waren. Wiederum wurde das Material zerkleinert, in Wasser aufgeschwemmt und auf drei PCR-Reaktionen verteilt. Mittels der Oligonukleotidpaare EatpArev/EatpAfor, Erps14rev/Erps14for und EndhDrev/EndhDfor konnten so aus einem grünen Fleck alle vier in der Cybride unediert bleibenden spezifischen Tabakstellen analysiert werden (das *ndhD*-Amplifikat enthält die Edierungsstellen *ndhD-3* und *ndhD-4*). Da die verwendeten Oligonukleotide nicht artspezifisch gewählt waren, konnten potentiell beide Sequenzen, sowohl die endogene Tabak- als auch die eingebrachte *Atropa*-Sequenz detektiert werden.

Die Direktsequenzierung der Amplifikate zeigte, daß ausschließlich Tabaksequenz amplifiziert wurde (Abb. 30). Das für die *Atropa*-Sequenz erwartete T-Signal der *atpA*-Stelle fehlt völlig, während ein minimales T-Signal für die *ndhD-4*- und *rps14*-Stelle zu sehen ist, das allerdings nicht über der Stärke des Hintergrundsignals liegt. Möglicherweise sind die *Atropa*-Sequenzen in den revertanten Sektoren nicht abundant genug, um sie in einer Direktsequenzierung

nachzuweisen. Deshalb wurden die Amplifikate in den TA-Vektor kloniert und pro PCR je 20 oder mehr einzelne Klone sequenziert (nicht gezeigt). Keiner der Klone zeigte ein T an der Edierungsstelle, so daß es unwahrscheinlich ist, daß eine Transformation im Bereich der untersuchten Sequenzen, also der Edierungsstellen stattgefunden hat.



**Abbildung 30:** Edierungsstellen im grünen revertanten Gewebe. Ausschnitte aus Chromatogrammen einer Sequenzierung von PCR-Produkten, die alle von nur einer Matrize, einem grünen revertanten Gewebesektor (G) stammen. Als Kontrolle wurde ein Stück weißes Gewebe vom selben Blatt genutzt (W). Pfeile: Edierungsstellen. Oligonukleotide zur Amplifizierung siehe Text. Zuordnung der Farben der Chromatogramme zu spezifischen Basen: blau = C; grün = A; schwarz = G; rot = T.

### 3.1.4.4.3 Regenerationsanalyse grüner Gewebeflecken

Die über Partikelbombardierung erhaltenen grünen Gewebeflecken sind kein transientes Phänomen sondern bis zum Absterben des gesamten Blattes stabil. Um die Untersuchungen zu vereinfachen, wäre es jedoch wünschenswert, mehr Material zur Verfügung zu haben. Daher sollte versucht werden, aus den grünen Punkten eine Pflanze zu regenerieren. Diese Analysen wurden von meinem Kommilitonen Ralph Regel durchgeführt und sollen hier nur kurz zusammengefasst werden. Drei Versuche wurden durchgeführt.

1. Ein grüner Gewebefleck wurde im umgebenden Gewebe belassen, jedoch unter dem Binokular (Sterilbank) sektoriell angeschnitten und auf RMOP59-Medium über 8 Wochen beobachtet (3% Saccharose). Der grüne Bereich blieb bis zum Ende des Versuches sichtbar, vergrößerte sich jedoch nicht. Statt dessen überwucherte weißer Kallus von den nicht-grünen Schnittstellen aus die grünen Bereiche und musste mehrmals zurückgeschnitten werden. Offensichtlich haben die grünen Zellen

keinen Vorteil in der Ausbildung von Kallus und/oder die grünen Chloroplasten teilen sich nicht oder werden nicht an die Tochterzellen weitergegeben. Auch nach der völligen Isolierung des grünen Flecks von umgebenden weißen Gewebe erfolgte keine grüne Kallusbildung.

2. Um eine möglicherweise vorhandene Photosyntheseaktivität als selektiven Marker auszunutzen, wurde in einem weiteren Regenerationsversuch ein ebenfalls mechanisch verletzter grüner Gewebefleck auf ein RMOP59-Medium mit reduziertem metabolisierbarem Kohlenstoff inkubiert (0,7% statt 3% Saccharose). Zwar war die Regeneration des weißen Gewebes nicht so stark wie im Vollmedium, aber der grüne Gewebefleck zeigte erneut kein Wachstum und keinen Kallusansatz.

3. Möglicherweise ist das grüne Gewebe im Nachteil gegenüber weißem Gewebe, weil Lichtenergie eingefangen, dann aber nicht in einer kompletten Elektronentransportkette auf den finalen Akzeptor NADP übertragen wird, sondern in dem teilweise revertierten grünen Bereich andere unspezifische Akzeptoren finden muss und somit zur Oxidation und Schädigung plastidärer Strukturen beiträgt. Um dies auszuschließen, wurde ein weiterer angeschnittener grüner Gewebefleck auf RMOPAE59 im Dunkeln inkubiert, aber auch in diesem Fall erfolgte nur Regeneration von weißem, nicht grünen Gewebe.

Zusammengefasst zeigen die Regenerationsexperimente, daß eine Regeneration der grünen Punkte in ganze Pflanzen oder zumindest grünen Kallus unter den gewählten Bedingungen nicht möglich ist.

### **3.2 Spleißabhängiges, heterologes Edieren in Tabakplastiden**

Das Plastidenchromosom des Spinats weist 11 Gene auf, die für Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase kodieren (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001). Das *ndhA*-Gen ist Teil einer polycistronischen Transkriptionseinheit, die insgesamt 7 *ndh*-Gene und *psaC* umfasst; letzteres kodiert für die Untereinheit VII des PSI. Im Laufe der Prozessierung des Primärtranskripts wird ein Gruppe II-Intron aus der *ndhA*-mRNA entfernt, die zudem noch an zwei Positionen ediert wird (Legen *et al.* 2001). Eine dieser Edierungsstellen, *ndhA-1*, befindet sich 12 Bp stromabwärts der 3' Intron-Exon-Grenze (Abb. 31). Diese Stelle wurde auch in verschiedenen

anderen Arten gefunden, u.a. in Gerste und Mais, fehlt jedoch in Tabak. Del Campo *et al.* (2000) haben gezeigt, daß drei der vier *ndhA*-Edierungsstellen in der Gerste während der Transkriptentstehung prozessiert werden, d.h. vor dem Spleißen und der endonukleolytischen Spaltung des Primärtranskripts. Die vierte Stelle jedoch, homolog zu *ndhA-1* in Spinat, verblieb unediert in ungespleißten Transkripten.

In Übereinstimmung mit diesem Befund sind rekombinante, die 3'-Spleißstelle überspannende RT-PCR Produkte in Mais immer unediert an Stelle I (Maier und Fuchs, nicht publiziert). Die Sequenzierung von gespleißten und ungespleißten RT-PCR-Produkten von Spinat ergab, daß auch in dieser Art Edierung nur für gespleißte Transkripte nachgewiesen werden kann (nicht gezeigt). Dies schließt jedoch nicht aus, daß ungespleißte mRNAs ediert werden, daß aber danach das Spleißen so rasch erfolgt, daß ungespleißte und gleichzeitig edierte Transkripte nicht nachweisbar sind.

Um zu klären, wieso eine so strikte Verknüpfung von Spleißen und Edieren der *ndhA*-RNA vorliegt, wurde ein transplastomischer Ansatz gewählt. Dazu wurden "unedierte" gespleißte und ungespleißte *ndhA*-Fragmente aus Spinat an eine neutrale Stelle des Tabakplastidenchromosoms eingebracht. Die für das Edieren nötigen Kernfaktoren sollten über Protoplastenfusion der transgenen Tabak- mit Spinatprotoplasten bereitgestellt werden, wie in Bock und Koop (1997) beschrieben. Untersuchungen zur Edierung der eingebrachten Konstrukte sollten dann zeigen, ob die Entfernung des Introns absolut essentiell für die Edierung ist.

### 3.2.1 Konstruktion des Transformationsvektors

Ein plastidäres DNA-Fragment, das die 3'-Spleißstelle umfasst und ein weiteres, das aus gespleißten Exonsequenzen besteht, wurden unabhängig voneinander mit dem selektierbaren Markergen *aadA* in einem Klonierungsvektor verknüpft.

Als Basisklon diente dabei der bereits im Abschnitt 3.1.4.1.2 beschriebene Transformationsvektor pBAB, der eine *aadA*-Kassette flankiert von Bereichen der *petA-psbJ* intergenischen Region enthält. Dieser Klon besitzt eine singuläre *HindIII*-Schnittstelle, die zur Integration der *ndhA*-Fragmente diente (Abb. 32A).

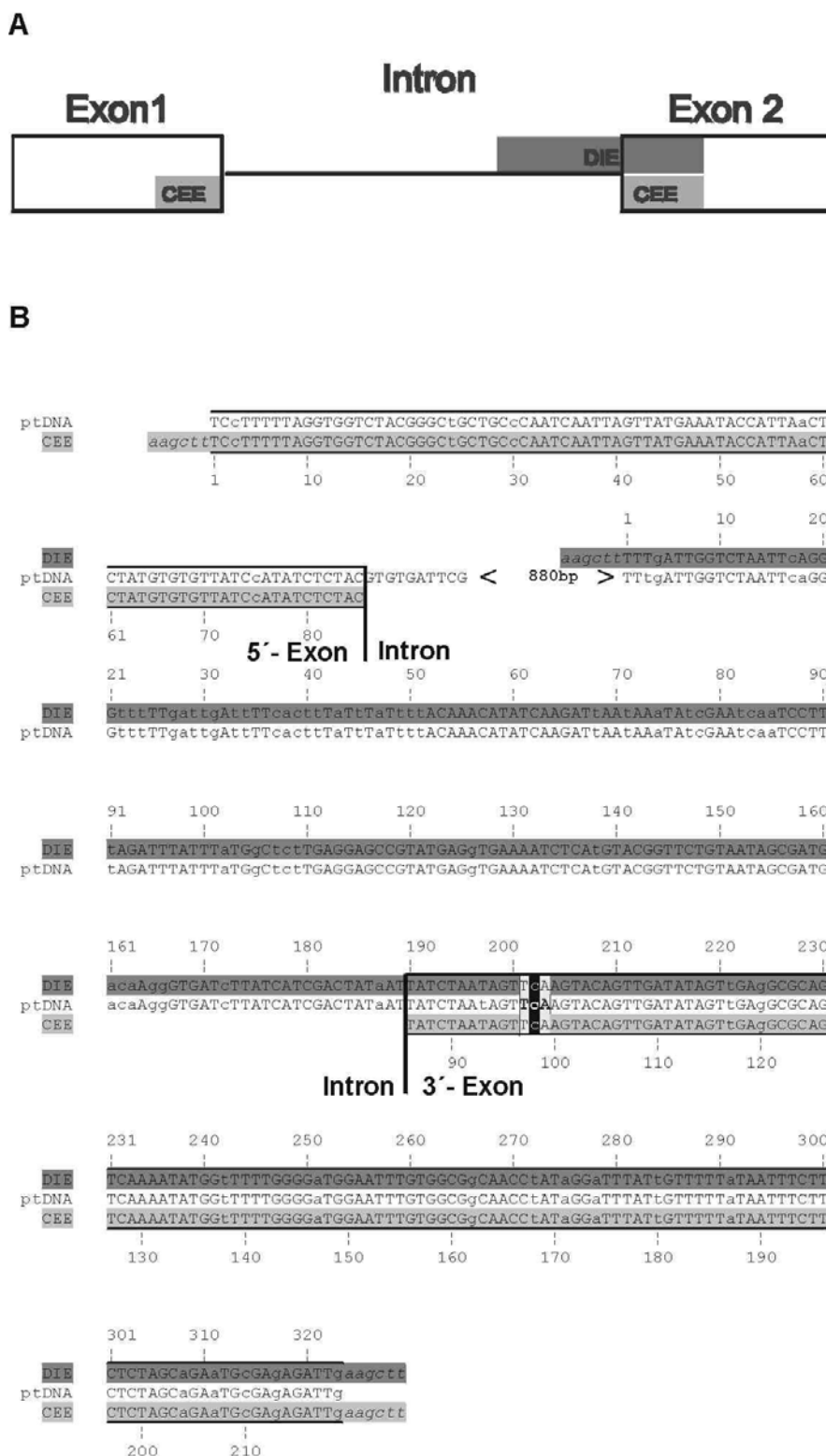


Abbildung 31: Sequenzvergleich der intronhaltigen und intronfreien Konstrukte DIE und CEE. (A) Schematische Darstellung des Spinat *ndhA*-Gens. DNA-Fragmente, die Teil der Vektoren pCEE und pDIE sind, sind dunkel- bzw. hellgrau hervorgehoben. (B) DNA-Sequenz des Spinat-*ndhA*-Gens und der Konstrukte pCEE und pDIE. Die pCEE-Sequenz enthält Teile der fusionierten 5'- und 3'-Exons, wohingegen pDIE die 3' Intron-Exon-Grenze umfasst. Exonsequenzen sind eingerahmt. Die Edierungsstelle ist schwarz markiert; kursiv = über PCR eingefügte *Hind*III-Schnittstellen. Kleinbuchstaben = Nukleotide, die im Spinat von der korrespondierenden Tabaksequenz abweichen. Schattierung wie in (A).



Die Amplifikation des Intron-Exon-Fragments wurde mit den Oligonukleotiden HndhAex2rev und HndhAinfor durchgeführt, was zu einem PCR-Produkt führt, das von *HindIII*-Restriktionsschnittstellen flankiert ist. Das PCR-Produkt wurde mit *HindIII* geschnitten und in die singuläre Schnittstelle des Vektors pBAB kloniert. Plasmide, die eine Insertion in derselben Transkriptionsrichtung wie die *aadA*-Kassette aufwiesen, erhielten den Namen pDIE.

Die Konstruktion des intronfreien *ndhA*-Fragments wurde ausgehend von cDNA begonnen. Der C-Rest an der Stelle *ndhA*-1 wurde über eine PCR-Mutagenese eingebracht. Zwei PCR-Produkte wurden dazu mit den Oligonukleotiden HndhAex2rev/mundhAfor und HndhAex1for/mundhArev mit Spinat-cDNA als Matrize hergestellt. Die beiden Oligonukleotide mundhAfor und mundhArev sind revers komplementär zueinander und weisen einen C-zu-T-Basenaustausch relativ zur *ndhA*-cDNA-Sequenz aus Spinat an der Edierungsstelle auf. Auf diese Weise wird der unedierte Zustand in der PCR wiederhergestellt. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel gereinigt und je 20 ng Amplifikat in einer zweiten PCR mit den Oligonukleotiden HndhAex1for und HndhAex2rev eingesetzt (Initialzyklus: 94°C-30 Sek., 50°C-30 Sek., 72°C-5 Min.; dann 30 Amplifikationszyklen mit reduzierter Extensionszeit von 1 Min. 30 Sek.). Das resultierende DNA-Fragment wurde mit *HindIII* restringiert und wie das Intron-Exon-Fragment in den Vektor pBAB kloniert. Diese rekombinante DNA erhielt den Namen pCEE (Abb. 32A).

### **3.2.2 Integration der *ndhA*-1 Edierungsstelle aus Spinat in das Tabak-Plastidenchromosom und Isolierung von Transformanten**

Die beiden Plasmide pCEE und pDIE wurden durch ballistische Transformation in das Tabakplastidengenom eingebracht. Über Spektinomycinselektion gelang es, eine Reihe von Transformanten für beide Konstrukte zu isolieren. Die Pflanzen waren in Gewebekultur nicht vom WT zu unterscheiden.

PCR-Analysen mit außerhalb und innerhalb des Konstrukts gelegenen Oligonukleotiden (P1/P2;P3/P4; Abb. 32A und B) zeigten, daß die Kassette korrekt in das Plastidengenom integriert war. Southern-Analysen bestätigten dies und zeigten zudem, daß das Pflanzenmaterial sehr rasch den homoplastomischen Zustand für die Insertion erreicht hatte, nämlich nach nur einem Regenerationszyklus (Abb. 32C).

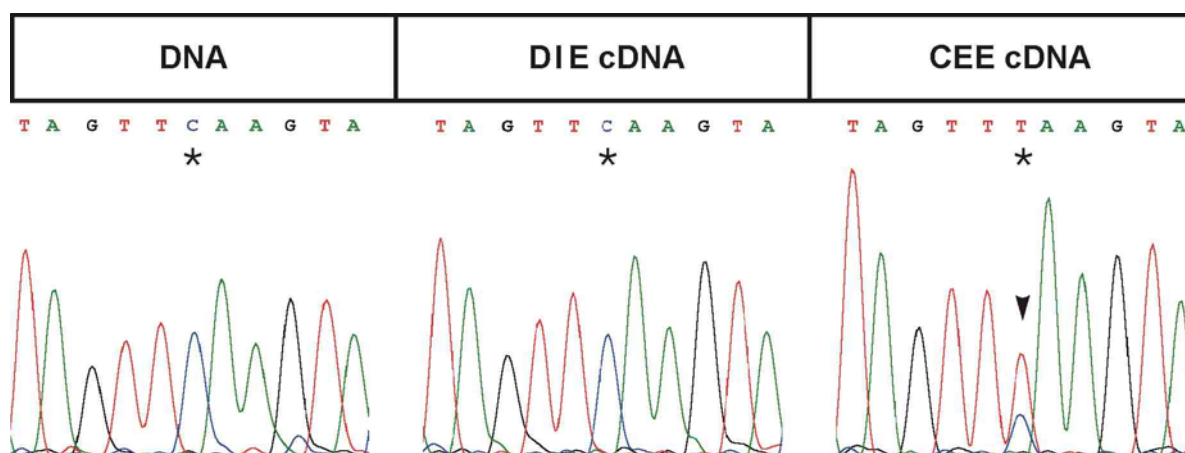
In allen untersuchten Transformanten war das Restriktionsfragment (3,3 kB), das



ausschließlich Fragmente von 5,0 bzw. 4,9 kB detektiert, die um die erwartete Länge der inserierten Kassetten im Vergleich zum WT-Fragment vergrößert sind.

### 3.2.3 Prozessierung des exprimierten Transgens: Die Spinatedierungsstelle wird heterolog ediert, aber nur in intronfreien Transkripten

Das gespleißte *ndhA*-Transkript ist in WT-Spinatpflanzen zu 100% ediert. Um zu untersuchen, ob die Edierung in den beiden chimären Konstrukten auftrat, wurde cDNA aus den transplastomischen Linien mittels der Oligonukleotide P3 und *ndhAex2rev* amplifiziert und die Produkte wurden direkt sequenziert. Überraschenderweise wurde das Spinat-CEE-Konstrukt in Tabak ediert, so daß eine Fusion mit Spinatprotoplasten zur Bereitstellung der Kernfaktoren nicht nötig war. Nur ein geringer Anteil an „unediertem C“ (Abb. 33) wurde beobachtet, was anzeigt, daß die Edierung des Transgens nicht ganz die Effizienz des WTs erreicht. Trotz der geringeren Effizienz bleibt jedoch bemerkenswert, daß der Tabakkern wie in der Nt(Ab)-Cybride bereits beobachtet (siehe Abschnitt 3.1.3.7) in der Lage ist, die heterologe Stelle zu erkennen und zu prozessieren.



**Abbildung 33:** Nur intronfreie CEE-Transkripte werden ediert. Um die Edierung der Konstrukte CEE und DIE zu überprüfen, wurden spezifische PCRs auf cDNA der Linien Nt-CEE-5 und Nt-DIE-1 mit den Oligonukleotiden P3 und *ndhAex2rev* durchgeführt und die Produkte sequenziert. Spinat-DNA wurde mit den Primern *ndhAex1for* und *ndhAex2rev* amplifiziert. Für alle drei Sequenzierreaktionen wurde das gleiche Oligonukleotid (*ndhAex1for*) benutzt. Nur das relevante kurze Sequenzintervall von 11 Nukleotiden aus dem gesamten Chromatogramm ist gezeigt. Die Edierungsstelle ist mit einem Stern gekennzeichnet. C-zu-T-Basenkonversion wurde nur in der CEE-Sequenz gefunden (Pfeil). Ein schwächeres C-Signal unterhalb des T-Signals zeigt, daß auch unedierte CEE-RNAs in der Transkriptpopulation vorhanden sind.

Im Gegensatz zu Transkripten des CEE-Konstrukts waren die des DIE-Konstrukts überhaupt nicht ediert. Dies zeigt, daß entweder die partielle Intronsequenz des DIE-Konstrukts Edierung an dieser Stelle behindert oder daß

Sequenzelemente in Exon 1, die im CEE-Konstrukt vorhanden sind, notwendig für die Edierung sind.

### 3.2.4 Expression des Transgens: Die eingebrachten Konstrukte pDIE und pCEE werden gleichstark exprimiert

Die Edierungsmaschinerie kann für bestimmte Stellen, wie für *psbL*- und *rpoB*-Transkripte gezeigt, nur eine limitierte Menge an Transkripten prozessieren (Chaudhuri *et al* 1995; Reed und Hanson, 1997). Es ist vermutet worden, daß die Überexpression von Edierungsstellen in diesen Arbeiten zur Titrierung des spezifischen Transfaktors führte (Chaudhuri *et al* 1995; Reed und Hanson, 1997). Um auszuschließen, daß die beiden Transgene CEE und DIE in unterschiedlicher Weise den RNA-Metabolismus der Plastide beeinflussen und somit sekundär die beobachteten Edierungsunterschiede hervorrufen, wurde die Transkriptakkumulation ausgewählter Operonen untersucht.

Transkripte, die das *aadA*-Gen einschließen, akkumulieren in beiden Linien in vergleichbarer Weise (Abb. 34). D.h., die in die *aadA*-Kassette integrierten Spinat-*ndhA*-Fragmente unterscheiden sich nicht in der Abundanz ihrer Transkripte. Des weiteren wurde ebenfalls über Northern-Experimente untersucht, ob die Expression der Transgene Einfluss in *trans* auf endogene *ndhA*-Transkripte hat, und ob in *cis* ein Effekt auf das der *aadA*-Kassette vorausgehende *psbEFLJ*-Operon vorhanden ist. Wie in Abb. 34 zu sehen, sind die Mengen des dem WT entsprechenden Transkripts im *psbLJ*-Northern-Experiment in den transplastomischen Linien reduziert. Zusätzlich tritt eine wesentlich größere Bande auf, die von der Promotoraktivität des endogenen *psbE*-Promotors stammt (Bande mit Stern). Diese Bande wird auch mit der Sonde für *aadA* und *ndhA* detektiert, überspannt also das gesamte Operon inklusive der *aadA*-Kassette. Einige weniger abundante, im WT sichtbare Transkripte des *psbEFLJ*-Operons akkumulieren in den DIE- und CEE-Linien nicht. In der Hybridisierung für *ndhA* zeigen beide transplastomische Linien ein zum WT beinahe identisches Transkriptmuster, das nur zwei Unterschiede aufweist, nämlich die vom Transgen stammenden RNA-Spezies (Pfeil und Stern in Abb. 34).

Trotz der vor allem im *psbEFLJ*-Operon beobachteten quantitativen und qualitativen Unterschiede zum WT ist festzuhalten, das die Transkriptmuster und –mengen zwischen den beiden transgenen Linien nicht variieren. CEE- und DIE-

Pflanzen weisen ein identisches Transkriptmuster auf, so daß geschlossen werden kann, daß die Unterschiede in der Edierung der Stelle *ndhA-1* nicht auf unterschiedlichen Transkriptakkumulationen beruhen, sondern in der Struktur der Transgene begründet sind: nur die CEE-RNA ist ein geeignetes Ziel für den Edierungsapparat.

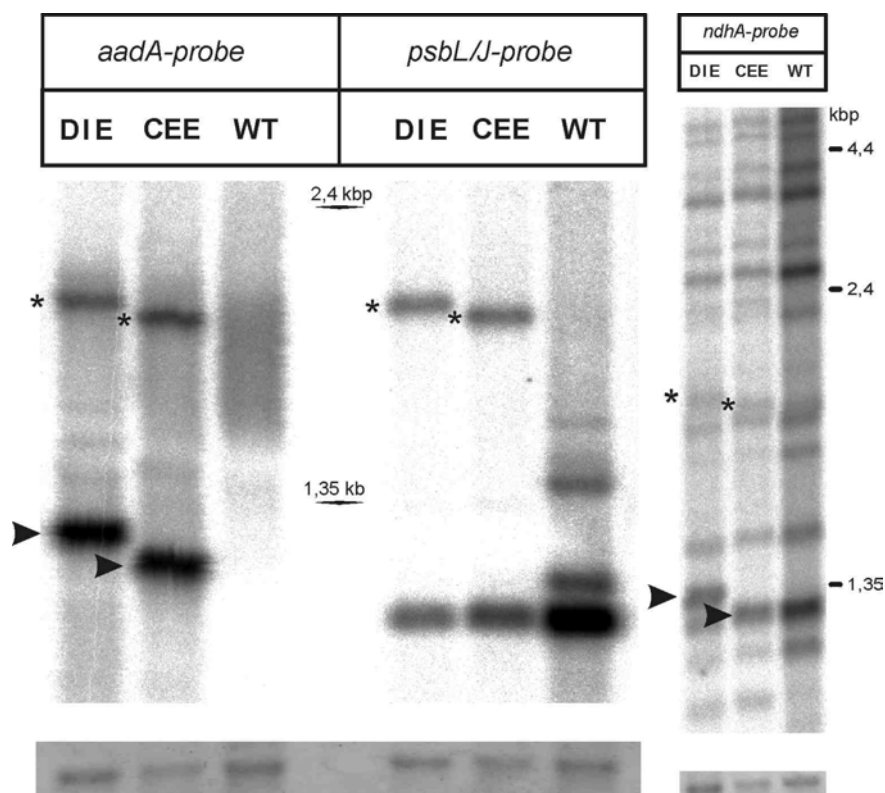


Abbildung 34: CEE- und DIE-Transkripte akkumulieren in ähnlichen Mengen. Um die stationären RNA-Mengen in den transplastomischen Linien im Vergleich zum WT abzuschätzen, wurden je 5 µg Gesamtzell-RNA der Linien Nt-CEE-5 und Nt-DIE-1 sowie des WT in einer Agarosegelelektrophorese (1%) fraktioniert, auf eine Membran transferiert und mit einzelsträngigen Antisense-RNA-Sonden gegen die Transkripte der Gene *aadA*, *psbLJ* und *ndhA* hybridisiert. Pfeile = RNA-Spezies, die zum monocistronischen *aadA*/CEE, bzw. *aadA*/DIE-Transkript gehören und daher sowohl mit der *aadA*-, als auch mit der *ndhA*-Sonde detektiert werden. \* = Transkripte, die in allen drei Hybridisierungsversuchen detektiert werden und von der Transkriptinitiation am *psbE*-Promotor resultieren (Bock *et al.* 1994). Ihr 3'-Ende wird durch die 3'-regulatorische Sequenz der Kasette determiniert. Unten = Methyleneblauanfärbungen der 16S-rRNA vor der Hybridisierung demonstrierten, daß annäherungsweise gleiche RNA-Mengen geladen wurden.

### 3.3 Heterologes Edieren als Folge der Allotetraploidie von *N. tabacum*

#### 3.3.1 *N. tomentosiformis* besitzt wie Spinat die Edierungsstelle *ndhA-1* und prozessiert sie effizient

Der überraschendste Befund der vorliegenden Arbeit ist sicherlich, daß heterologes Edieren nachgewiesen werden konnte, und das gleich in zwei

unterschiedlichen Systemen, der Tabak/*Atropa*-Cybride und im transplastomischen Ansatz eines Spinatgens in Tabak. So wurde zum einen die Stelle im *psbE*-Gen aus Tabak im *Atropa*-Kernhintergrund der Ab(Nt)-Cybride ediert (Abb. 23). Zum anderen findet auch die Edierung der Stellen *ndhD*-5 und *ndhA*-1 aus *Atropa* im Tabakkernhintergrund der reversen Nt(Ab)-Cybride statt (Abb. 24). Auch im transplastomischen Ansatz wird die Stelle *ndhA*-1 aus Spinat, die homolog zur *Atropa ndhA*-1-Stelle ist, ediert (Abb. 33). Es stellt sich die Frage nach dem Ursprung dieser Edierungsaktivitäten.

*Nicotiana tabacum* als eine allotetraploide Art besitzt Plastiden vom maternalen Elter *N. sylvestris* und einen nukleären Chromosomensatz, der sich in etwa gleichen Teilen aus Erbmaterial von *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* zusammensetzt (Lim *et al.* 2000b).

Um herauszufinden, ob Edierungskapazitäten der in Tabak heterolog edierten Stellen auch in den Eltern von Tabak vorhanden sind, wurden die korrespondierenden *ndhA*- und *ndhD*-DNA- und cDNA-Segmente amplifiziert und sequenziert. Ein Sequenzvergleich relevanter Regionen ist in Abb. 35 gezeigt.

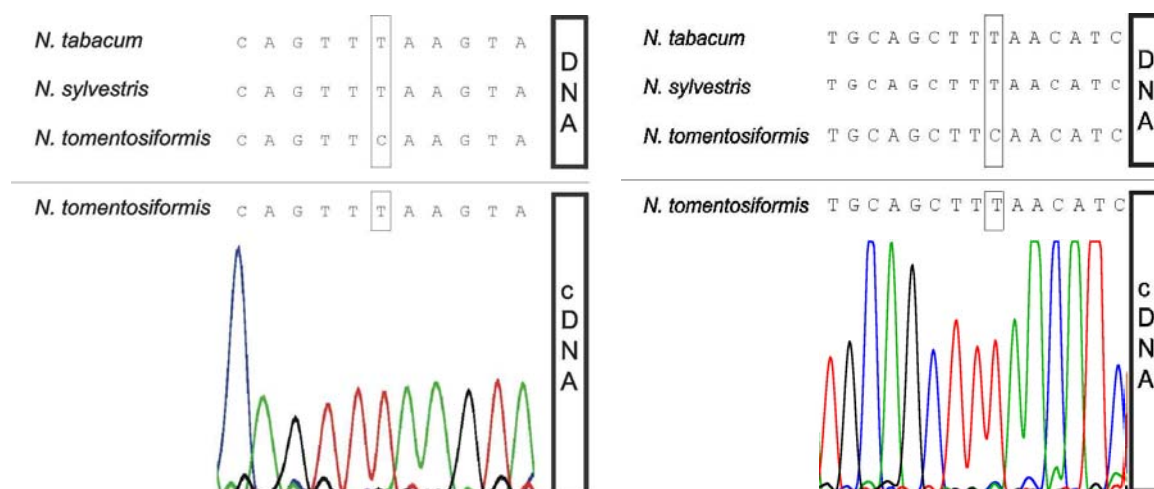


Abbildung 35: Im Gegensatz zu *N. sylvestris* und *N. tabacum* besitzt *N. tomentosiformis* die Edierungsstellen *ndhA*-1 (links) und *ndhD*-5 (rechts). Oberhalb der Trennlinie: Partielle *ndhA*- und *ndhD*-DNA-Sequenzen der drei untersuchten *Nicotiana*-Arten. Unterhalb der Trennlinie: Teile der *ndhA*- und *ndhD*-Sequenzen auf cDNA-Ebene zusammen mit dem jeweiligen Chromatogrammausschnitt. Die Edierungsstelle ist eingerahmt.

Wie erwartet, besitzt das *N. sylvestris*-Plastom als direkter Vorläufer des

Tabakplastoms keine Edierungsstellen an den jeweiligen Positionen der beiden *ndh*-Gene. Im Gegensatz dazu weist *N. tomentosiformis* beide Stellen auf, und die entsprechende cDNA-Sequenz zeigt, daß die Pflanze die Kapazität zur Edierung der Stelle besitzt. Dieser Befund deutet an, daß Tabak die Fähigkeit *ndhA-1* und *ndhD-5* zu edieren von seinem paternalen Elter *N. tomentosiformis* ererbt hat.

### **3.3.2 Warum in bisherigen Experimenten kein heterologes Edieren nachgewiesen werden konnte**

Bisherige Studien zum heterologen Edieren in Tabak beschäftigten sich mit der Spinatstelle im *psbF*-Gen und der Maisstelle im *rpoB*-Gen, wobei keine der beiden Sequenzen im transplastomischen Ansatz ediert werden konnten (Bock *et al.* 1994; Reed und Hanson, 1997). Es schien interessant zu fragen, ob das Ausbleiben von heterologer Edierung in diesen Fällen ebenfalls über die Allotetraploidie von Tabak zu erklären ist.

Deshalb wurden die relevanten Bereiche auf DNA-Ebene in *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* sequenziert (nicht gezeigt). Es stellte sich heraus, daß keiner der beiden Eltern eine homologe *psbF*- oder *rpoB*-Edierungsstelle besitzt. Deshalb ist es nicht überraschend, daß Tabak nicht in der Lage ist, diese Stellen heterolog zu edieren. Dies unterstützt den Befund, daß die Edierungskapazität von Tabak eng, möglicherweise additiv mit der der elterlichen Genome verknüpft ist.

### **3.3.3 Heterologes Edieren transplastomischer CEE-Pflanzen hat keinen Einfluss auf andere endogene Edierungsstellen**

Die Untersuchung der parentalen, plastidären Genotypen legt nahe, daß der rezente Tabak die Kapazität zur heterologen Edierung zumindest der hier beschriebenen Fälle vom paternalen Elter ererbt hat. Es ist jedoch unklar, warum diese Aktivität für ca. 6 Mio. Jahre beibehalten wurde, dem geschätzten Alter von Tabak (Okamura und Goldberg, 1985), ohne daß das korrespondierende Ziel dieser Aktivität, die Edierungsstellen *ndhA-1* und *ndhD-5* im Plastidengenom vorhanden waren.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß die involvierten Edierungsfaktoren, die spezifisch die *ndhA*- und *ndhD*-Stelle erkennen, eine andere Funktion ausüben und beispielsweise noch bei der Prozessierung weiterer, anderer Stellen eine Rolle



spielen. Es ist bekannt, daß transplastomisch überexprimierte Edierungsstellen mit der endogenen Stelle um *trans*-Faktoren konkurrieren, was letztlich zu einer Erniedrigung der Edierungseffizienz der endogenen WT-Stellen führen kann (Chaudhuri *et al.* 1995, Reed und Hanson 1997). Auch die transplastomische Linie CEE stellt eine solche Überexprimierung dar, da das Transgen und mithin die *ndhA*-1-Stelle unter dem Einfluss von zwei Promotoren steht, dem des *psbEFLJ*-Operons und dem ungleich stärkeren der *aadA*-Kassette, dem 16S-rRNA-Promotor. Falls nun der Spezifitätsfaktor, der heterolog die *ndhA*-1 Stelle erkennt, eine weitere Stelle des Plastidentranskripts bedient, könnte die Überexpression der *ndhA*-Stelle zu einer Titrierung des Faktors und somit zu einer Reduktion der Edierung der endogenen Stelle führen. Um dies zu testen, wurde der gesamte Editotyp einer CEE-Pflanze untersucht, d.h. alle 33 Tabakstellen wurden auf cDNA-Ebene sequenziert. Es stellte sich heraus, daß keine Stelle weniger effizient als im WT ediert wird (nicht gezeigt). Offensichtlich behindert die Expression des *ndhA*-Transgens nicht die Prozessierung irgendeiner endogenen Stelle, zumindest nicht unter den vorliegenden Expressionsbedingungen.

Alternativ könnte der Faktor eine Funktion in der Edierung mitochondrialer Stellen haben. Möglicherweise liegt die Funktion des Edierungsfaktors in Tabak auch auf ganz anderer Ebene, abseits von Edierung. Die nach wie vor ausstehende Klonierung von nukleären Edierungsfaktoren sollte helfen, diese Frage zu klären.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde, ausgehend von verschiedenen Experimentalmodellen der Versuch unternommen, die Interaktion des Kerns und der Plastide einer Pflanzenzelle näher zu untersuchen. Dazu wurden (i) somatisch hergestellte Neukombinationen von Organellen, Tabak/*Atropa*-Cybriden, biochemisch und molekularbiologisch untersucht, um die Ursachen der offensichtlichen Defekte in der Plastidenentwicklung dieser Pflanzen aufzuklären. Da es im Vorfeld keine Hinweise auf die Qualität des Defektes gab, war dieser Ansatz von grundsätzlicher Natur. Parallel dazu wurde (ii) über einen transplastomischen Ansatz eine spezifische Komponente der Genom/Plastom-Interaktion, das RNA-Edieren, untersucht. Interessanterweise konvergierten die beiden Ansätze letztlich im Befund des heterologen Edierens. (iii) Abschließende Untersuchungen zur kernkodierten Edierungskapazität von Tabak zeigten für beide Modelle die Bedeutung der phylogenetischen Herkunft von Kernfaktoren auf und warfen ein völlig neues Licht auf die Evolution des Edierungsapparates, auch im Hinblick auf Mechanismen der Mikroevolution in Höheren Pflanzen.

### 4.1 Der Vergleich der Plastidenchromosomen von *Atropa belladonna* und *Nicotiana tabacum* als Modell zum Studium von plastidärer Mikrodiversität

Die Basis zur Untersuchung von Kern/Plastom-Inkompatibilität im vorliegenden System bildete die Sequenzierung des Plastidenchromosoms von *Atropa*. Im Vergleich zum Tabak sollten Unterschiede herausgearbeitet werden, die möglicherweise einen Einfluss auf die Interaktion mit dem Zellkern haben. Oder mit anderen Worten: welche Sequenzelemente plastidärer Chromosomen evolvieren im zwischenartlichen Vergleich rasch, sind also Grundlage für Mikrodiversität und damit letztlich für Kern/Plastom-Inkompatibilität und Artbildung? *Atropa* und Tabak sind dafür zwei sehr geeignete Untersuchungsobjekte, weil 1. das Plastidenchromosom des Tabaks funktionell, also seine Expression betreffend, als eines der bestcharakterisierten Plastidenchromosomen höherer Pflanzen überhaupt gilt, 2. zwischenartliche Cybriden für *Atropa* und Tabak zur Verfügung stehen, an Hand denen die Auswirkung von Plastomunterschieden im artfremden Kernhintergrund direkt untersucht werden können und 3. die Tabakplastide als eine von wenigen Plastiden überhaupt transplastomischen Strategien zugänglich ist.

Interessanterweise zeigen die beiden reziproken Cybriden dabei grundverschiedene Phänotypen - die eine nicht vom WT zu unterscheiden, die andere albinotisch – was die Erwartung schürt, daß auch auf molekularer Ebene eine direktionale Komponente von Inkompatibilität besteht. Daß es sich hier nicht um einen Spezialfall sondern um ein weiterverbreitetes Phänomen handelt, zeigen Hybriden von Arten innerhalb der Gattung *Oenothera* (Stubbe 1989), sowie Cybriden und somatische Hybriden der Arten *Lycopersicon peruvianum* und *L. esculentum* (Ratushnyak *et al.* 1993; Kochevenko *et al.* 2000), bzw. der Arten *N. tabacum* und *Petunia hybrida* (Glimelius und Bonnet 1986; Pental *et al.* 1986), die ebenfalls abhängig von der Kombination elterlicher Organellen Inkompatibilität zeigen oder nicht.

#### 4.1.1 Hohe Konservierung regulatorischer Sequenzelemente

Intergenische Regionen plastidärer Chromosomen sind bekannt für ihre hohe evolutionäre Variabilität (Curtis und Clegg 1984; Wolfe *et al.* 1987; Gielly und Taberlet 1994). Etwas überraschend war daher, daß in den intergenischen Bereichen liegende regulatorische Sequenzelemente wenig bis gar nicht zwischen den beiden hier untersuchten Arten variieren. So waren alle bekannten SD-Elemente identisch zwischen beiden Arten und auch andere regulatorische, die Translation betreffende Sequenzabschnitte, variieren wenig. Fast genauso konserviert sind Promotoren und andere die Transkription beeinflussende Sequenzen. Auch in den mutmaßlichen Replikationsursprüngen finden sich so gut wie keine Unterschiede zwischen *Atropa* und Tabak.

Allein an und um die Prozessierungsstellen von polycistronischen RNAs gab es einige wenige Basenaustausche zwischen Tabak und *Atropa* (Abb. 13 und 14), die allerdings in ihrer Bedeutung durch die hohe Redundanz an beschriebenen 5'- und 3'-Enden in Frage gestellt werden. Fast für jedes untersuchte Tabaktranskript sind nämlich mehrere 3'- und 5'-Enden bekannt, ohne daß den Molekülen mit verschiedenen Enden eine funktionelle Bedeutung zuzuordnen wäre. Vor allem ist nie gezeigt worden, daß die terminalen Nukleotide einer mRNA wichtig für die Erkennung durch eine nukleolytische, kernkodierte Aktivität sind. Auch die Auswirkung der Sequenzumgebung dieser Nukleotide auf die Prozessierung sind in Tabak nicht untersucht, so daß die Bedeutung der gefundenen Unterschiede zwischen *Atropa* und Tabak für die Interaktion mit endo- und exonukleolytischen

Aktivitäten sehr schwierig zu bestimmen ist. Im Gegensatz zu Promotoren und SD-Sequenzen gibt es also für die Prozessierung keinen festgelegten Sequenzkonsensus. Fest steht jedoch, daß in anderen Fällen das Ausbleiben eines Prozessierungsereignisses in UTRs nicht notwendigerweise fatal ist. Beispielsweise scheint der Verlust von Prozessierung im UTR der 16S-rRNA, der *rbcL*-mRNA und der Initiator-tRNA nach Antisense-Inaktivierung der plastidären Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) in *Arabidopsis* keinen Einfluss auf den Phänotyp der Pflanze zu haben (Michael Walter, Uni Ulm, Tagungsbeitrag bei der 15. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Wermelskirchen, 2002). Deshalb ist zu vermuten, daß die Basenaustausche an und in der Sequenzumgebung von 3'- und 5'-Enden keine entscheidende Bedeutung für die Genexpression haben, so daß selbst wenn im cybriden System einzelne Prozessierungsereignisse ausblieben, dies keinen nennenswerten Einfluss auf den Phänotyp haben sollte.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen der beiden Solanaceen zum ersten Mal in einer umfassenden Analyse aller bekannten regulatorischen Elemente, daß intergenische Bereiche nicht einheitlich evolvieren, sondern daß man Inseln hoher Konservierung, also beispielsweise Promotoren, von umgebenden funktionslosen Bereichen klar unterscheiden muss.

Genau genommen ist die Konservierung regulatorischer Elemente ebenso hoch wie die von langsam evolvierenden Genen. Das Gen der großen Untereinheit der RuBisCo (*rbcL*) beispielsweise weist 10 Basenaustausche bei einer Gesamtlänge von 1434 Nukleotiden im *Atropa*/Tabak-Vergleich auf (0,70%). In allen 29 hier untersuchten Promotoren von Tabak fanden sich in *Atropa* nur 5 Basenaustausche. Legt man eine durchschnittliche Länge von NEP- und PEP-Promotoren von 20, bzw. 30 Bp zu Grunde, so kommt man auf einen Prozentsatz an Basenaustauschen von 0,68%. Nimmt man die zu 100% konservierten SD-Sequenzen hinzu, verringert sich der Prozentsatz an Basenaustauschen in regulatorischen Elementen noch weiter. Die pauschale Aussage, daß intergenische Regionen wesentlich variabler sind als kodierende Bereiche, lässt sich also nur aufrechterhalten, wenn man die regulatorischen Elemente ausklammert.

#### **4.1.2 Einige Unterschiede in Intronen betreffen Sequenzelemente, die für das Spleißen von Bedeutung sind**

Wie intergenische Regionen gehören auch Intronen zum "nichtkodierenden" Anteil plastidärer DNA. Trotzdem evolvieren Intronsequenzen nicht frei, da sie in der Lage sein müssen, RNA-Sekundärstrukturen korrekt auszubilden, die erforderlich für den Spleißvorgang sind. Neben der korrekten Sekundärstruktur spielen auch kernkodierte, proteinogene Faktoren eine Rolle, von denen einige isoliert worden sind (Barkan und Goldschmidt-Clermond 2000). Diese Faktoren sind mit den Intronen in Multiproteinkomplexen assoziiert und sind für den Spleißvorgang unerlässlich (Jenkins und Barkan 2001; Rivier *et al.* 2001). Der exakte Zielbereich innerhalb der Intronstruktur wurde bisher nicht aufgeklärt, aber zumindest ist schon seit längerem bekannt, daß vor allem die 3'-terminalen Introndomänen V und VI hoch konserviert und funktionell bedeutend sind (Michel *et al.* 1989). Diese Domänen wurden im Hinblick auf Unterschiede im *Atropa*/Tabak-Vergleich untersucht.

Im Gegensatz zu den Introndomänen I - IV, in denen Basenaustausche und auch Indels häufig auftraten, zeigten die Domänen V und VI im zwischenartlichen Vergleich nur wenige Veränderungen. In diesen Bereichen wurden insgesamt nur 2 Indels und einige wenige Basenaustausche in zusammen sieben der 20 Gruppe-II-Intronen gefunden. Wesentlich häufiger finden sich Veränderungen, auch Indels, in den anderen 4 Domänen. Diese Unterschiede bilden einen auffallenden Aspekt in der Mikrodiversität der beiden Arten und können potentiell für Kern/Plastom-Inkompatibilität mitverantwortlich sein.

#### **4.1.3 Unterschiede in kodierenden Regionen sind selten und betreffen fast ausschließlich evolutiv variable Bereiche**

Bei der Untersuchung von Unterschieden in kodierenden Bereichen wurde zwischen Insertionen/Deletionen und Kodonsubstitutionen unterschieden. Alle Veränderungen wurden in einem Sequenzvergleich verschiedener Landpflanzen auf ihre Konservierung überprüft. Unter den Indels fand sich dabei nur eine Deletion, die ein konserviertes Kodon betrifft, im *rpoC2*-Gen von *Atropa*. Weder die Funktion der korrespondierenden Proteindomäne noch die des betroffenen konservierten Phenylalanins ist bekannt.

Grundsätzlich ergibt sich bei einem wie hier durchgeführten Vergleich die Schwierigkeit der Bewertung von Unterschieden in kodierenden Bereichen, da notwendigerweise auf die Funktion der betroffenen Subdomäne des jeweiligen Genprodukts eingegangen werden muss. Nur die wenigsten plastidären Proteine sind jedoch kristallographisch und funktionell so genau untersucht, daß man die Bedeutung des Verlusts oder der Substitution einzelner Aminosäuren werten kann. Besonders interessant für die Bedeutung von Indels und Kodonsubstitutionen für die Kern/Plastom-Interaktion wäre zu wissen, inwieweit Peptidbereiche betroffen sind, die für die Interaktion mit Kernfaktoren eine Rolle spielen. Diesbezügliche Daten waren aber unter den betroffenen Proteinen nur für die ribosomalen Komponenten Rps16 und die 16S-rRNA zu erhalten, wobei in beiden Fällen die durch Indels betroffenen Regionen, soweit bekannt, keine Rolle bei der Interaktion mit andern Faktoren spielen. So bleibt für alle anderen Indels nur der Weg über die Konservierung der jeweiligen Domäne als Maß für ihre mögliche Bedeutung im Hinblick auf Kern/Plastom-Inkompatibilität. Dies ist durchaus legitim, da man annehmen darf, daß eine Interaktion zweier Proteine oder auch RNAs dazu beiträgt, die evolutiven Freiheitsgrade des korrespondierenden Sequenzabschnitts weiter einzuschränken und damit die Konservierung zu erhöhen.

Außer im *rpoC2*-Gen betrifft kein Indel in kodierenden Bereichen ein konserviertes Kodon. Im Gegenteil, die betroffenen Bereiche sind oft auch in anderen Arten von Indels betroffen (*ycf1*, *rps16*, *accD*) und/oder befinden sich außerhalb höher konservierter Regionen (*ycf1*, *ccsA*, *rrn16*; siehe Abschnitt 3.1.2.1.1). Auf Grund dieser Daten scheint es unwahrscheinlich, daß die Indels – mit Ausnahme der *Atropa*-Deletion im *rpoC2*-Gen, die ein konserviertes Kodon betrifft – einen entscheidenden Beitrag zur Kern/Plastom-Inkompatibilität leisten.

#### **4.1.4 Kodonsubstitutionen in höchstkonservierten Bereichen werden durch RNA-Edierung in Tabak entschärft**

Für die Bewertung der gefundenen Kodonaustausche ergeben sich die gleichen Schwierigkeiten, wie für die Bewertung von Indels: In den meisten Fällen kann den betroffenen Aminosäuren keine Funktion in der Interaktion mit Kernfaktoren zugeordnet werden, so daß statt dessen wiederum die Konservierung der jeweiligen

veränderten Positionen untersucht wurde. Nur ein geringer Prozentsatz (3%) aller Austausche betrifft konservierte Kodonen, also solche, die sich in einem Sequenzvergleich von 10 Landpflanzen als nicht variabel herausstellen. Diese Kodonen wurden weiter nach ihrer Einbettung in konservierte Domänen untersucht (Tab. 7). Bemerkenswerterweise waren unter den Kodonveränderungen, die in hochkonservierten Domänen liegen, 5 Austausche, die durch RNA-Edierung in Tabak posttranskriptional korrigiert werden. Für eine dieser Stellen (in *atpA*) lagen Strukturdaten des Spinathomologs vor, die zeigten, daß das genomisch kodierte Prolin im Gegensatz zum durch Edierung umkodierten Leucin nicht in das Peptid eingepasst werden kann. Dies unterstreicht, daß RNA-Edierung notwendige Voraussetzung für die Produktion korrekter Peptide ist und legt die Vermutung nahe, daß andere Edierungsereignisse eine ähnliche Bedeutung haben. Für Edierungsstellen in *accD* (Sasaki *et al* 2001), *petB* (Zito *et al.* 1997), *psbF* (Bock *et al.* 1994) und *ndhD* (Hirose und Sugiura 1997) konnte dies auch experimentell gezeigt werden. Im zwischenartlichen *Atropa*/Tabak-Vergleich hat es den Anschein, als ob besonders hochkonservierte Substitutionen per RNA-Edierung korrigiert werden. Oder anders ausgedrückt: Austausche an hochkonservierten Positionen auf DNA-Ebene gibt es im *Atropa*/Tabak-Vergleich so gut wie keine, außer der jeweilige Kodonübergang wird durch Edierung nachträglich auf RNA-Ebene entschärft.

#### 4.1.5 Artspezifische Edierung als Motor der Speziation

Der von Hirose *et al.* (1999) beschriebene Editotyp von Tabak weist 31 Stellen auf. Drei davon, in den Genen *atpA* (Kodon 264), *psbE* (Kodon 72) und *rps14* (Stelle 2; Kodon 50), sind nicht in *Atropa* vorhanden, wie die Analyse der Kodonsubstitutionen zeigte (s.o.). Unter den Substitutionen in hochkonservierten Bereichen waren zudem zwei weitere im Gen *ndhD* (Kodon 220 und Kodon 225), die ebenfalls durch Edierung in Tabak an dieser Stelle in das konservierte Triplet überführt werden. Diese beiden Edierungsereignisse waren bisher nicht für Tabak beschrieben worden. Die verbleibenden 28 Tabakstellen waren in *Atropa* ebenfalls vorhanden und werden in beiden Arten mit gleicher Effizienz ediert, von zwei Ausnahmen abgesehen: Stellen in der *rpoB*-mRNA (Stelle 2, Kodon 158) und in der *rps14*-mRNA (Stelle 1, Kodon 27) sind in *Atropa* nur teilediert.

Partielle Edierung ist ein bisher kaum verstandenes Phänomen, das schon



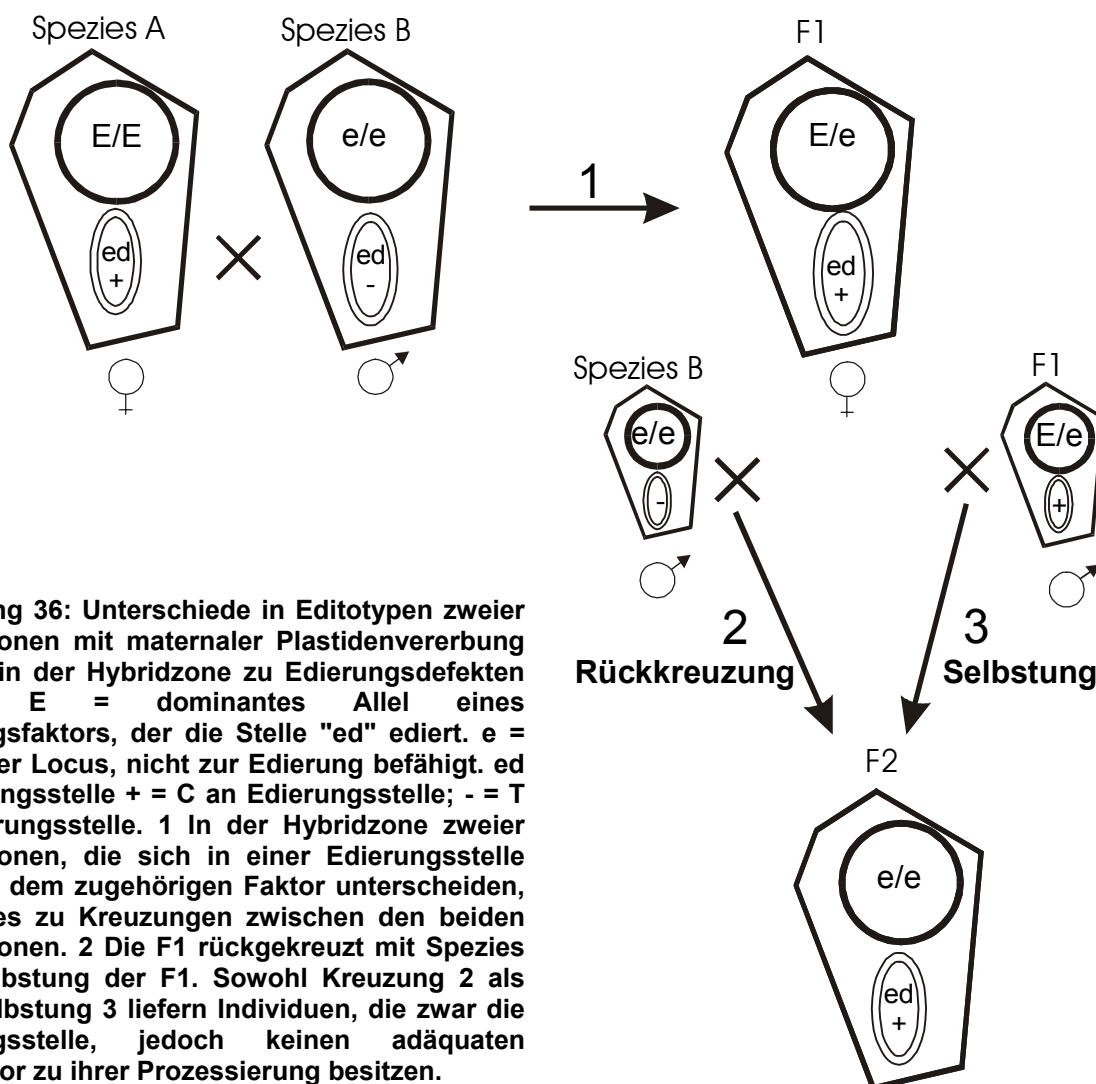
mehrfach beschrieben worden ist (Hirose *et al.* 1999; Karcher und Bock 2001). Wenn man annimmt, daß RNA-Edierung nötig ist, um das richtige Kodon an konservierten Positionen zu generieren, muss man im Fall der Teiledierung fragen, warum der zu fordernde Einbau der falschen Aminosäure in das Protein keine negativen Folgen für die Pflanze hat. Eine Antwort wäre, daß beide Aminosäuren an dieser Stelle ihren Zweck haben, oder daß ein gewisser Prozentsatz an Peptiden mit falschen Aminosäuren toleriert werden kann. Möglicherweise ist partielles Edieren eine Modellsituation für die Entstehung einer Edierungsstelle. Kommt es in einer Pflanze zu einer T-zu-C-Mutation auf DNA-Ebene, die ein konserviertes Kodon betrifft, so besteht die Gefahr, daß wenn zu viele Chromosomen einer Plastide diese Mutation tragen, es durch Segregationsphänomene zu einem mutanten Phänotyp kommt. Gibt es in der Zelle hingegen einen Faktor, der, wenn auch zunächst wenig effizient, auf RNA-Ebene diese Mutation rückgängig macht, können Zellen und letztlich vitale Pflanzen segregieren, die homoplastomisch für die Mutation sind. Es ist anzunehmen, daß der Faktor nicht von vorneherein perfekt edieren kann, sondern nur einen Teil aller Transkripte zu edieren in der Lage ist: dann eben fände man partielles Edieren. In den folgenden Generationen könnten solche Individuen selektiert werden, die besser edieren und irgendwann würde die Volledierung erreicht sein, wenn dies opportun ist. Kann dagegen ein gewisser Prozentsatz an unedierter mRNA toleriert werden, oder ist sogar förderlich, weil dann zwei variante Polypeptide mit potentiell verschiedenen Funktionen bereit stehen, so wird der Faktor nicht auf Effizienz selektioniert. Um in den hier beschriebenen Fällen zu unterscheiden, ob partielle Edierung als Übergangszustand vorliegt oder weil darauf selektioniert wird, müßte die Funktion der betroffenen Aminosäuren näher untersucht werden.

Basierend auf den Kodonübergängen, die in *Atropa* potentiell durch Edierung an Tabak angeglichen werden könnten (in Tabelle 6, durch große Buchstaben hervorgehoben), wurde nach *Atropa*-spezifischen Stellen gefahndet. Auf diese Weise konnten Stellen in den Genen *ndhD* (Stelle 4; Kodon 293), *ndhA* (Stelle 2; Kodon 189) und *rpoB* (Stelle 5; Kodon 809) identifiziert werden, die aus anderen Pflanzen bereits bekannt waren.

Unter den beobachteten Unterschieden zwischen den beiden hier

untersuchten Plastidenchromosomen nimmt die RNA-Edierung eine besondere Rolle ein. Wie bei keinem anderen Unterschied, der gefunden wurde, sei es in Intronen oder in kodierenden Bereichen, muss man davon ausgehen, daß die Veränderung in der Edierung eine funktionelle Bedeutung hat. Alle bisherigen funktionellen Untersuchungen bestätigen, daß RNA-Edierung wichtige Kodonen betrifft (Bock *et al.* 1994; Zito *et al.* 1997; Hirose und Sugiura 1997; Sasaki *et al.* 2001). RNA-Edierung darf deshalb als eine wichtige Komponente von Mikrodiversität angesehen werden, die sich wesentlich von anderen hier beschriebenen interplastidären Differenzen unterscheidet. Während nämlich anzunehmen ist, daß die beobachteten Unterschiede in Intronen und kodierenden Bereichen nur graduell auf die Interaktion mit Kernfaktoren Einfluss haben, ist die RNA-Edierung ein Ja/Nein-Ereignis. Wenn eine Edierungsstelle vorhanden ist, muss sie prozessiert werden, sonst wird letztlich eine falsche, nichtfunktionelle Aminosäure an entscheidender Position in das korrespondierende Peptid eingebaut (außer beide Aminosäuren hätten funktionelle Bedeutung; s.o.). Wenn hingegen ein Basenaustausch in einem Intron oder an nichtkonservierter Stelle in kodierenden Bereichen stattfindet, so sind meist wenig konservierte Kodonen betroffen und somit wäre der Effekt auf die Funktion weniger ausgeprägt. Viele solcher Unterschiede werden zwar auch zu Inkompatibilität zwischen Organellen führen, aber in gradueller Weise, während RNA-Edierung einen stärkeren, eher saltatorischen Effekt auf die Kern/Plastom-Interaktion hat.

Die Abgrenzung von natürlichen Populationen könnte jedenfalls nach den vorliegenden Daten allein mit Edierungsunterschieden erklärt werden, zumindest unter der Annahme, daß der Verlust einer Edierungsstelle auch den Verlust des zugehörigen Kernfaktors nach sich zieht, wie z.B. für die Spinatstelle im *psbF*-Gen gezeigt wurde (Bock *et al.* 1994; Bock und Koop 1997). Arten mit unterschiedlichen Editotypen könnten demnach zwar in der Hybridzone normale Nachkommen produzieren, in der F<sub>2</sub>-Generation bzw. nach Rückkreuzungen würden jedoch Genotypen segregieren, die Edierungsfaktoren nicht besäßen und somit Proteindefekte aufweisen würden (Abb. 36). Die Produktivität der Nachkommen solcher Hybride wäre also vermindert, was einen Nachteil in der Konkurrenz mit den Elternarten darstellen kann.



**Abbildung 36: Unterschiede in Editotypen zweier Populationen mit maternaler Plastidenvererbung können in der Hybridzone zu Edierungsdefekten führen. E = dominantes Allel eines Edierungsfaktors, der die Stelle "ed" ediert. e = rezessiver Locus, nicht zur Edierung befähigt. ed = Edierungsstelle + = C an Edierungsstelle; - = T an Edierungsstelle. 1 In der Hybridzone zweier Populationen, die sich in einer Edierungsstelle (ed) und dem zugehörigen Faktor unterscheiden, kommt es zu Kreuzungen zwischen den beiden Populationen. 2 Die F1 rückgekreuzt mit Spezies B. 3 Selbstung der F1. Sowohl Kreuzung 2 als auch Selbstung 3 liefern Individuen, die zwar die Edierungsstelle, jedoch keinen adäquaten Kernfaktor zu ihrer Prozessierung besitzen.**

Zweifelsohne zeigen die Daten, daß Edierungsstellen rasch evolvieren. Die 7 speziesspezifischen Stellen zwischen den nah verwandten Solanaceen *Atropa* und Tabak sind dafür ein schlagender Beweis. Auch in anderen Untersuchungen, die sich allerdings hauptsächlich auf mitochondriale Daten stützten, wurde vermerkt, daß Edierungsstellen schnell, ja sogar schneller als neutrale Positionen evolvieren (Shields und Wolfe 1997). Der Vergleich verschiedener Editotypen phyletisch weiter voneinander entfernter Arten (Reis und Mais) verführte sogar einige Forscher zu der Schlussfolgerung, die meisten Edierungsereignisse wären "überflüssig (dispensable)", weil sie fast gar keine Konservierung von Edierungsstellen finden konnten (Lutz und Maliga 2001). Diese Argumentation verwechselt jedoch die Funktionalität einer Stelle mit deren evolutiver Dynamik. Zwar belegen die Unterschiede im Editotyp zwischen Arten, daß der Verlust einer Stelle keinen Nachteil darstellt, aber wenn ein C-Rest an konservierter Position auftritt, dann wird RNA-Edierung zu einer entscheidenden Bedingung für die korrekte Produktion des

korrespondierenden Peptids, d.h. der Vorgang "Edierung" an sich ist sehr wohl von großer Bedeutung, auch wenn es scheint, als könne der Organismus insgesamt auf Edierung verzichten. Dieser Gedanke passt gut in das Modell von Covello und Gray (1993), die annehmen, daß RNA-Edierung ein primär durch genetische Drift entstandener Prozess ist und erst später zu einem sich selbst perpetuierenden Prozess von quasi-parasitischer Natur wurde, der irgendwann nach der Etablierung der primären Endosymbiosen, die zum Mitochondrium, bzw. zur Plastide führten, das eukaryotische Genom besiedelt hat, höchstwahrscheinlich in einem gemeinsamen Vorfahren von höheren Pflanzen und Bryophyten (Beckert *et al.* 2001).

Wo auch immer der Ursprung von RNA-Edierung liegt, die hier präsentierten Daten zeigen deutlich die Ausnahmestellung dieses Prozesses für Mikrodiversität zwischen plastidären Chromosomen auf. Zum ersten Mal liegt damit Evidenz vor, daß innerhalb einer Familie von Blütenpflanzen vor allem Editotypen funktionelle Unterschiede zwischen Plastomen hervorrufen können. Im Vergleich dazu erscheinen die wenigen gefundenen Unterschiede in Intronen, regulatorischen intergenischen Regionen, Replikationsursprüngen und Genen von geringerer Bedeutung für die Abgrenzung von Arten.

#### **4.2 Die Prozessierung der *ndhA*-mRNA ist zeitlich streng reguliert**

Die verschiedenen Prozessierungsschritte primärer mRNAs sind weitestgehend unabhängig voneinander (Barkan 1988; Westhoff und Herrmann 1988). Auch im Fall der RNA-Edierung ist in Plastiden bisher keine Abhängigkeit von anderen Prozessierungsereignissen, wie z.B. dem Spleißen bekannt geworden. (Freyer *et al.* 1993; Ruf *et al.* 1994). Erst vor kurzem erbrachten cDNA-Analysen, daß die Edierung einer bestimmten Stelle der *ndhA*-mRNA in Gerste mit dem Spleißen des benachbarten Gruppe II-Introns verknüpft ist (del Campo *et al.* 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vivo*-Evidenz für die mechanistische und kinetische Beziehung der beiden Prozesse im *ndhA*-Transkript erhalten. Nach der Einbringung von Exon-Exon-, bzw. Exon-Intron-Konstrukten, die beide die Edierungsstelle *ndhA*-1 trugen, stellte sich heraus, daß nur die 'gespleißte' Form ediert werden konnte. Anscheinend muss das Intron aus dem Transkript entfernt werden, damit Edierung vonstatten gehen kann. Eine Erklärung für diese strenge

Abfolge der Prozessierungsereignisse könnte in den Sequenzanforderungen der beiden Prozesse liegen. Sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, daß die *cis*-Determinanten für RNA-Edierung unmittelbar stromauf von der Edierungsstelle zu finden sind, typischerweise 12 bis 40 Nukleotide lang (Bock *et al.* 1996; 1997; Chaudhuri *et al.* 1996; Hirose und Sugiura 2001). Für das *ndhA*-Gen sind die *cis*-Sequenzen nicht bestimmt worden, aber die Transformation hat gezeigt, daß das Exon-Exon-Konstrukt hinreichend für RNA-Edierung ist. Es stellt sich die Frage, ob das Intron selbst störend auf die Edierung wirkt oder ob essentielle *cis*-Sequenzen im 5'-Exon liegen, die erst in Folge des Spleißens in unmittelbare Nähe der Stelle rücken.

Für die Prozessierung der *ndhA*-mRNA in der Gerste ist vorgeschlagen worden, daß das Intron mit Teilen des 3'-Exons basenpaart und so eine Struktur ausbildet, die einerseits wichtig für das Spleißen ist, andererseits aber die *cis*-Determinanten für die Edierung der Edierungsstelle maskiert (del Campo *et al.* 2000). In diesem Szenario wäre es nicht unbedingt die Verknüpfung der Exons sondern als Konsequenz des Spleißens nur die Demaskierung der 3'-Exonsequenz unmittelbar neben der Edierungsstelle, die Edierung ermöglicht. Eine solche massive Faltung der RNA würde jedoch potentiell mit bereits beschriebenen tertiären Interaktionen, beispielsweise der  $\delta$ - $\delta'$ -Basenpaarung, und auch mit Sekundärstrukturen, wie der Formation von Introndomäne VI, interferieren (Michel und Ferat 1995), was letztlich das Spleißen verhindern würde. Diese Interaktionen sind nicht betroffen, wenn man annimmt, daß es die Zusammenführung und nicht die Demaskierung von *cis*-Sequenzen ist, die die Voraussetzung für Edierung schafft. Deshalb ist die plausibelste Erklärung für die strikte Reihenfolge von Spleißen und Edieren in der *ndhA*-mRNA, daß die durch das Intron getrennten *cis*-Elemente infolge des Spleißens zusammengebracht werden müssen, um Edierung zu ermöglichen.

Den evolutionären Ursprung dieser geteilten *cis*-Sequenz kann zweierlei Ursache haben. Entweder war *ndhA* bereits ein geteiltes Gen bevor die Edierungsstelle entstand, oder das Intron inserierte im Zuge eines 'Homing'-ähnlichen Prozesses (Chevalier und Stoddard 2001) in das *ndhA*-Gen und zerteilte die bereits vorhandene *cis*-Sequenz der Edierungsstelle. Im Lebermoos *Marchantia polymorpha* ist *ndhA* wie in höheren Pflanzen durch ein Intron an exakt der gleichen

Position geteilt, besitzt aber weder in diesem Gen noch an anderer Position im Plastom eine Edierungsstelle. Dies ist Evidenz für ein Szenario, in dem Edierung erst spät die Bühne betritt, also erst nach der Ankunft von Intronen, so daß vermutet werden kann, daß die *cis*-Elemente - getrennt durch die nahezu tausend Nukleotidpaare des Gruppe II-Introns im *ndhA*-Gen - in beiden Exons evolvierten.

#### **4.3 Unterschiede in RNA-Editotypen und RNA-Polymerasegenen als Determinanten von Kern/Plastom-Inkompatibilität in Ab(Nt)-Cybriden**

Die beiden reziproken Tabak/*Atropa* Cybriden stellen ein ideales System dar, um zu untersuchen, ob die gefundenen Unterschiede in den plastidären Chromosomen Auswirkungen auf die Kern/Plastom-Interaktion haben. Zu diesem Zweck wurden verschiedene molekularbiologische Aspekte dieser Cybriden beleuchtet.

##### **4.3.1 Die Ab(Nt)-Cybride ist weder eine globale Translations- noch eine Importmutante, zeigt aber Defekte in der Proteinakkumulation**

Defekte in der Plastidenentwicklung können sich auf verschiedenen Ebenen der Umsetzung plastidärer Erbinformation widerspiegeln, unter anderem der Akkumulation plastidär lokalisierter Peptide. Immunologische Analysen zeigten, daß plastidär kodierte Proteine in der Ab(Nt)-Cybride gar nicht oder nur in geringen Mengen akkumulieren. Allerdings funktioniert der Import kernkodierter Peptide, wie exemplarisch für OEC33 gezeigt. Auch der plastidäre Translationsapparat scheint aktiv zu sein, sonst wären die, wenn auch geringen Mengen an PSI-Untereinheiten oder der  $\beta$ -Untereinheit der ATPase nicht zu erklären. Die fehlende oder stark verminderte Akkumulation der untersuchten Proteine ist wahrscheinlich Ursache des stark verringerten Thylakoidmembransystems und wäre daher ein sekundärer Effekt. Tatsächlich akkumulieren auch andere albinotische Mutanten wie die  $\Delta rpo$ -Pflanzen kaum plastidär kodierte Proteine. In beiden Fällen gibt es keine angemessene Zielfläche, d.h. keine Thylakoidmembran, zur Assemblierung der Komplexe. Freie Untereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe werden in der Regel proteolytisch abgebaut. Dieses Phänomen ist auch von plastidären Gendisruptionsmutanten bekannt: wenn infolge einer gezielten Mutation eine Untereinheit eines Thylakoidmembrankomplexes ausfällt, assembliert der Komplex nicht mehr und

sämtliche anderen Untereinheiten werden degradiert, akkumulieren also nicht (z.B. Kuras und Wollmann, 1994; siehe aber Swiatek *et al.* 2001). Dieses Phänomen wird CES (control by epistasy of synthesis) genannt und betrifft wohl alle Multienzymkomplexe der Thylakoidmembran (Choquet und Vallon 2000).

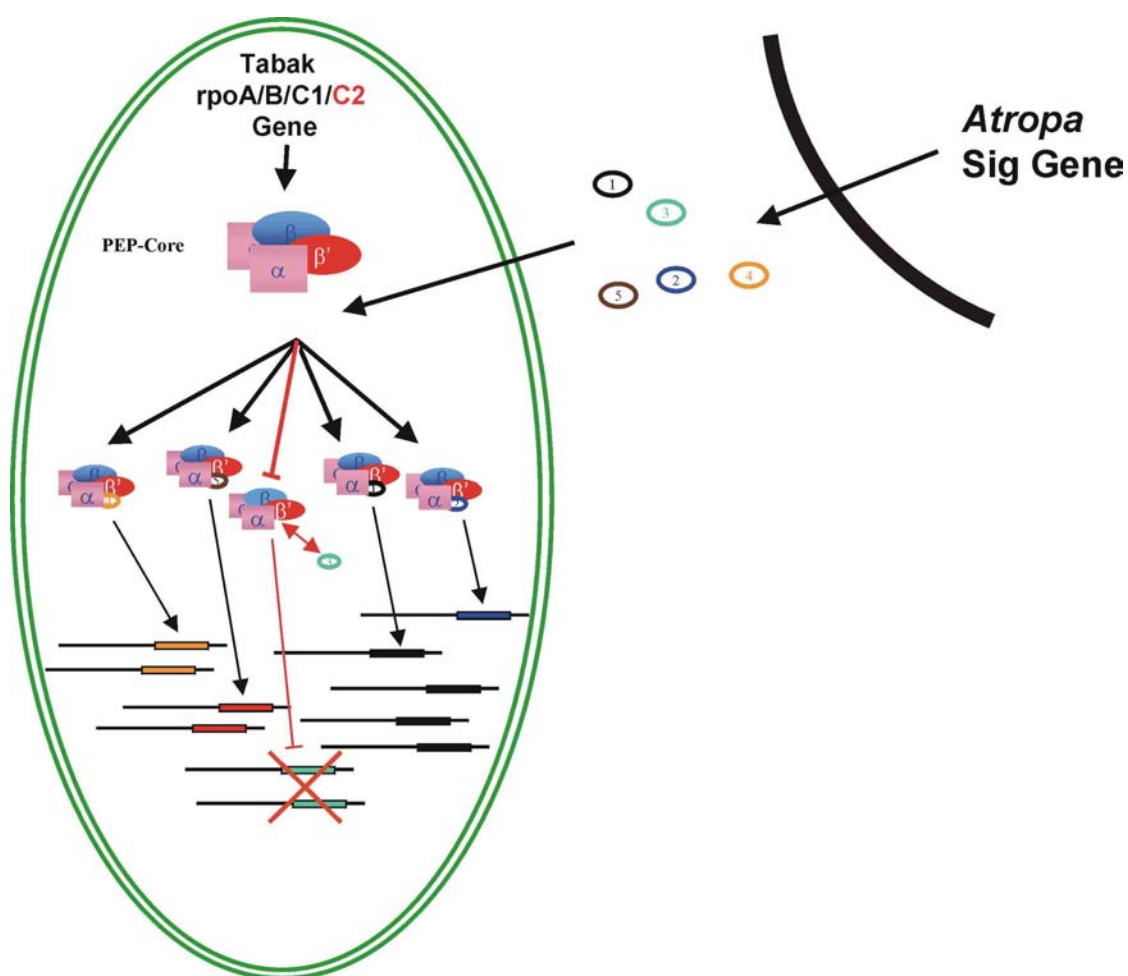
Andererseits ist natürlich auch denkbar, daß die translatierten *Atropa*-Peptide nicht korrekt mit den Tabakuntereinheiten desselben Komplexes assemblieren können. Die wenigen gefundenen Unterschiede gerade in den kodierenden Regionen der beiden Plastidenchromosomen lassen dies aber eher unwahrscheinlich erscheinen. Hypothese A aus Abb. 2 trifft daher zumindest für Thylakoidmembrankomplexe in diesem Material nicht zu.

#### **4.3.2 Störungen in der Interaktion von Sigmafaktoren mit dem Apoenzym der PEP in Ab(Nt)-Cybriden?**

Die PEP ist dualen genetischen Ursprungs. Die regulatorische, sogenannte Sigmauntereinheit dieses Enzyms ist im Kern kodiert und muss aus dem Cytoplasma importiert werden. Sigmafaktoren bilden in der Regel eine kleine Genfamilie, in *Arabidopsis* mit 6 Mitgliedern (Allison 2000). Der Verlust eines dieser Faktoren (Sig2) führte zu einem spezifischen Defekt in der Transkription bestimmter plastidärer tRNA-Gene in *Arabidopsis* (Kanamaru *et al.* 2001). Evidenz für einen Defekt in der Apoenzym/Sigmafaktor-Interaktion in der Ab(Nt)-Cybride rührt von drei unabhängigen experimentellen Beobachtungen her: (i) Transkriptanalysen zeigen, daß es quantitative und qualitative Ähnlichkeiten in der Transkriptakkumulation der Albino-Cybride und einer PEP-Disruptionsmutante gibt. Diese Ähnlichkeiten finden sich für einige, aber nicht für alle Operonen (Abb. 20 und 21). (ii) Innerhalb des *rpoC2*-Gens wurde in *Atropa* eine Deletion von drei Kodonen gefunden, von denen eines hochkonserviert in Landpflanzen ist (Abb. 7). *RpoC2* kodiert für die  $\beta$ -Untereinheit der PEP, die, ausgehend von Daten zur homologen Untereinheit in *E. coli*, den Kontakt des Apoenzyms zu Sigmafaktoren entscheidend beeinflusst (Arthur *et al.* 2000). (iii) Transformationsexperimente der weißen Cybride führten nur dann zur Entstehung von partiell revertanten Gewebeflecken, wenn die zur Transformation applizierte DNA den *Atropa*-Deletionsbereich in *rpoC2* umfasst (Tab. 13).

Aus diesen drei Befunden und publizierten Daten zur Spezifität unterschiedlicher Sigmafaktoren (Isono *et al.* 1997b; Kanamaru *et al.* 2001) lässt sich

das folgende Modell ableiten (Abb. 37; vergleiche auch Abb. 3): In der Cybride werden verschiedene *Atropa*-Sigmafaktoren in die Tabakplastide importiert. Dort bilden sie mit dem PEP-Apoenzym die einsatzfähige Polymerase. Die Sigmafaktoren haben unterschiedliche, wenn auch vielleicht überlappende Promotorvorlieben. Ein oder mehrere Sigmafaktoren können funktionell nicht korrekt an das Apoenzym andocken, weil die drei zusätzlichen Aminosäuren in der Tabak  $\beta''$ -Untereinheit in irgendeiner Weise störend für die Interaktion sind. Dies führt zum



**Abbildung 37: Modell der PEP-abhängigen Transkription in Plastiden der Ab(Nt)-Cybride. Das *rpoC2*-Gen und damit auch die  $\beta'$ -Untereinheit der PEP (beide rot) in Tabak weisen eine Insertion relativ zum homologen Protein in *Atropa* auf (zur Vereinfachung wird hier die  $\beta'$  wie in Prokaryoten als singuläres Peptid dargestellt; in Plastiden besteht es eigentlich aus den  $\beta'$ - und  $\beta''$ -Untereinheiten). Als Folge dieses Unterschieds kommt es zu Problemen in der Interaktion mit einem von mehreren Sigmafaktoren (Doppelpfeil), die letztlich zum weitgehenden Ausfall der Transkription einiger Operone führt (Transkriptionseinheiten rot ausgekreuzt). Beschriftung wie in Abb. 3.**

Ausfall der PEP-abhängigen Transkription einer Reihe von plastidären Operons, was wiederum das Transkriptmuster in Richtung eines PEP-defizienten Musters verschiebt. Wie wichtig die PEP-abhängige Transkription für die Plastidenentwicklung



ist, wird am besten durch Disruptionsmutanten von *rpo*-Genen veranschaulicht, die allesamt letal sind (De Santis-Maciossek *et al.* 1999). Schießt man das *rpoC2*-Gen aus *Atropa* in die Tabakplastiden der Albino-Cybride, so kommt es möglicherweise zu einem Austausch des Bereichs, der die Deletion in *Atropa* umfasst. Die von diesem chimären *rpoC2*-Gen kodierte  $\beta$ "-Untereinheit ermöglicht wieder eine normale Interaktion mit Sigmafaktoren, so daß der Transkriptionsdefekt in transformierten Plastiden behoben ist.

Das Modell erklärt jedoch nicht, warum die reziproke Cybride von Transkriptionsdefekten verschont bleibt. Die Tabaksigmafaktoren können offensichtlich mit der *Atropa*- $\beta$ "-Untereinheit interagieren, obwohl diese das konservierte Kodon innerhalb des deletierten Triplets nicht besitzt. Arbeiten zu Unterschieden in den Sigmafaktoren der beiden Arten sollten helfen, dieses Problem aufzuklären.

Außerdem erklärt das Modell nicht, warum die Reversion in grünen Punkten zum WT nicht vollständig ist. Dies deutet an, daß weitere Faktoren ebenfalls eine Rolle in der Kern/Plastom-Inkompatibilität spielen.

#### **4.3.3 Trotz verschiedener Unterschiede in funktionell wichtigen Intron-domänen werden die betroffenen Transkripte in der Ab(Nt)-Cybride gespleißt**

Unter den Unterschieden in Intronen zwischen Tabak und *Atropa* waren einige, die die konservierten Domänen V und V betrafen. Da Intronen mit Kernfaktoren interagieren müssen, um aus dem Transkript entfernt zu werden, lag die Vermutung nahe, daß in der weißen Cybride Spleißdefekte auftreten, die mitverantwortlich für den albinotischen Phänotyp sind.

Die von Unterschieden in Domäne V und VI betroffenen 8 Intronen wurden allesamt auf cDNA-Ebene untersucht. Für jedes dieser Transkripte konnte eine gespleißte mRNA nachgewiesen werden, d.h., die *Atropa*-Spleißfaktoren erkennen und prozessieren die veränderten Domänen der Tabakintronen ohne Problem. Offensichtlich haben die Änderungen der Primärsequenz keine entscheidende

---

Auswirkung auf Sekundär- und Tertiärstrukturen.

Zwar kann mit der verwendeten Methode (PCR auf cDNA) nicht ausgeschlossen werden, daß quantitative Unterschiede in der Spleißeffizienz zwischen der Cybride und dem WT bestehen, aber insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, daß Spleißdefekte keine Rolle in der Kern/Plastom-Inkompatibilität der Ab(Nt)-Cybride spielen.

#### **4.3.4 RNA-Edierungsdefekte in Cybriden als Teil von Kern/Plastom-Inkompatibilität**

Verschiedene Arbeiten im Bereich der plastidären RNA-Edierung deuten darauf hin, daß jeder Edierungsstelle ein Spezifitätsfaktor zugeordnet ist (Hirose und Sugiura 2001). Zusammen mit diesen Daten sorgte der Befund, daß artfremde Stellen, wenn sie in das Tabakplastidenchromsom eingebracht werden, unediert bleiben, für die grundsätzliche Annahme, daß Edierungsstelle und zugehöriger Faktor eine evolutionäre Dublette darstellen: geht die Edierungsstelle verloren, ist der Faktor überflüssig und sollte aus dem Kerngenom verschwinden (Bock 2000). Demnach sollten die insgesamt 8 artspezifischen Stellen im fremden Kernhintergrund der Ab(Nt)- bzw. Nt(Ab)-Cybride nicht ediert werden. Das traf auch für vier tabakspezifische Stellen in der Ab(Nt)-Cybride (*rps14-2*, *atpA*, *ndhD-3*; *ndhD-4*) zu. Offensichtlich besitzt der *Atropa*-Kern nicht die notwendigen Transfaktoren, um diese Stellen zu prozessieren. Daß auch eine weitere Stelle in *rps14* (Stelle 1) nicht ediert wird, mag aus Unterschieden in der Sequenzumgebung resultieren, da es einen Basenaustausch unmittelbar 3' zu dieser Edierungsstelle gibt. Allerdings müsste man dazu annehmen, daß die Edierungsmaschinerie auch auf Sequenzelemente stromab der eigentlichen Stelle angewiesen sein kann, was bisher nicht gezeigt worden ist. Alternativ käme in Betracht, daß der Verlust der Edierung an Stelle *rps14-1* durch den Edierungsdefekt an Stelle *rps14-2* verursacht wird. Allerdings ist eine definierte Reihenfolge von Edierungsereignissen auf einer mRNA bisher nicht beobachtet worden (Bock *et al.* 1997). Schließlich muss zu dieser Stelle noch bemerkt werden, daß sie schon in *Atropa*-WT nur teilediert wird. Es könnte also sein, daß der zuständige Kernfaktor schon per se schlecht an die Stelle bindet, so daß es nicht verwundert, daß bei weiterer Verschlechterung der *cis*-Sequenz, also in der Cybride der Tabaksequenz, die Edierung ganz ausbleibt.

Neben diesen Stellen der albinotischen Cybride war auch eine Stelle der gesunden, grünen Cybride im *rpoB*-Gen nicht ediert. Insgesamt blieben also 5 Stellen in den beiden Cybriden unediert, so daß an diesen Positionen falsche Aminosäuren an prominenter, wichtiger Stelle in das Protein eingebaut werden, was zum Verlust der Funktion des Peptids führen kann, wie für andere Stellen gezeigt worden ist (Bock *et al.* 1994; Hirose und Sugiura 1997; Zito *et al.* 1997; Sasaki *et al.* 2001). Dies würde bedeuten, daß Untereinheiten von immens wichtigen plastidären enzymatischen Maschinen, wie dem Ribosom (S14-Untereinheit), der NADH-Dehydrogenase (*nd4*-Untereinheit) und der ATP-Synthase ( $\alpha$ -Untereinheit) in der albinotischen Cybride geschädigt wären. Im Gegensatz zum NADH-Komplex, dessen Funktion noch in der Diskussion ist (z.B. Joet *et al.* 2001), sind das Ribosom und auch die ATP-Synthetase ohne Frage unerlässliche Komponenten der plastidären Genexpression, bzw. des plastidären Metabolismus. Eine Reduktion oder sogar ein vollständiger Verlust ihrer Funktionalität sollte schwere Folgen für die Plastide haben. So sind plastidäre ATP-Synthase-Mutanten bleichgrün, Photosynthese-defekt und somit letal (Jenkins *et al.* 1997; McCormac und Barkan, 1999). Translationsmutanten sind albinotisch und ebenfalls letal (z. B. Han *et al.* 1992). Die beobachteten Edierungsdefekte sollten also massive Auswirkungen auf die Plastidenentwicklung und damit auf die gesamte Pflanze haben. Die ATP-Synthasefunktion ist in der Plastide in dieser Arbeit nicht überprüft worden. Die Translation und damit indirekt die Funktion des Ribosoms jedoch wurde über den Test auf Akkumulierung plastidär kodierter Proteine überprüft. Dieser Test ergab, daß Translation vorhanden sein muss, da verschiedene Proteine plastidären Ursprungs nachgewiesen werden konnten, wenn auch nur in geringen Mengen. Vielleicht ist die Funktionalität des S14-Proteins nicht vollständig unterbunden und/oder S14 ist nur für die Translation einiger, aber nicht aller plastidären mRNAs nötig.

Obwohl nicht festgestellt wurde, wie der Verlust von Edierung sich letztlich auf die korrespondierenden Peptide auswirkt, macht doch die hohe Konservierung der durch Edierung wiederhergestellten Kodonen wahrscheinlich, daß die Edierungsdefekte in den drei Genen der Ab(Nt)-Cybride zu den Problemen dieser Pflanzen in der Plastidenentwicklung beitragen. Der Versuch der Restauration des unedierten, *Atropa*-gemäßen Zustandes an den drei Stellen über

Partikeltransformation war jedoch noch nicht erfolgreich. Auf Grund des Zeitbedarfs der Analyse von mehreren Monaten konnte sie bisher nur einmal durchgeführt werden. Die Transformation wurde mit allen drei Edierungsstellen gleichzeitig unternommen. Es scheint weniger wahrscheinlich, daß gleich mehrere Rekombinationsereignisse innerhalb einer Plastide stattfinden, also gleichzeitig 2 oder sogar 3 Edierungsstellen ausgetauscht werden können, da schon singuläre Transformationsereignisse im Vergleich mit den insgesamt eingeschossenen Mengen an Goldpartikeln recht selten vorkommen. Möglicherweise reicht der Austausch einer der drei Stellen allein zur wenn auch nur partiellen Wiederherstellung des WT-Phänotyps nicht aus, so daß mehrere Ansätze erforderlich sind, um auf diesem Weg grüne Punkte in weißem Gewebe zu erzeugen.

Den drei nichtedierten Stellen der Ab(Nt)-Cybride steht eine einzige in der reziproken Kombination von Organellen (Nt(Ab)-Cybride) gegenüber, die ebenfalls nicht ediert wurde. Sie liegt im *rpoB*-Gen (Kodon 809), so daß ein Defekt dieser RNA-Polymeraseuntereinheit letztlich die Transkription betreffen sollte. Ein Ausfall dieser Untereinheit führt zu einem Albino-Phänotyp (De Santis-Maciossek *et al.* 1999). Nun ist die Nt(Ab)-Cybride phänotypisch kaum von WT-Tabak zu unterscheiden, und auch Daten zur plastidären Transkription dieser Cybride gleichen denen des WT. Offensichtlich hat der Edierungsfehler hier keinen Effekt auf den Phänotyp, was im Gegensatz zu der beschriebenen funktionellen Wichtigkeit der bisher untersuchten Edierungsstellen steht. Genau genommen ist dies der erste Fall, in dem Nicht-Edieren im heterologen System keinen drastischen Phänotyp nach sich zieht. Interessanterweise existiert diese Stelle auch in *Pinus thunbergii*, wird dort jedoch nicht prozessiert (Wakasugi *et al.* 1996). Vielleicht ist dieses Phänomen analog zu zwei weiteren Stellen zu sehen, die zwar in verschiedenen Arten vorhanden sind, aber nicht in allen Arten auch ediert werden. Die *ndhB*-Stelle an Kodonposition 204 wird beispielsweise in Tabak, Reis und Mais ediert, nicht jedoch in *Arabidopsis*. Eine weitere Stelle in *rpoB* (Kodon 206) ist zwar sowohl in Reis als auch in Mais vorhanden, wird aber nur in Mais ediert. *Arabidopsis* bzw. Reis besitzen anscheinend nicht die nötigen Faktoren: die Stelle bleibt unediert, ohne daß es der Pflanze schaden würde. Möglicherweise ist es also auch an *Atropa*-Stelle *rpoB-V* ohne Bedeutung, ob durch Edierung ein Leucinkodon hergestellt wird, oder ob das genomisch kodierte Serin in das Protein eingebaut wird. *Pinus* lebt jedenfalls ganz

gut mit einem Serin an dieser Position. Der Blick auf Edierungsstellen als unbedingt wichtige Ereignisse für die Funktion eines Proteins wäre also in diesem Fall nicht haltbar.

Es bleibt festzuhalten, daß die Edierungsdefekte ungleich verteilt sind, nämlich mit fünf Defekten in der albinotischen und nur einem Defekt an funktionell wahrscheinlich weniger bedeutsamen Position in der grünen Cybride. Somit korrelieren Edierungsdefekte und beobachtete Phänotypen. Neben den Defekten in der Transkriptionsmaschinerie stellen damit Edierungsdefekte einen zweiten schwerwiegenden Fehler in der Kern/Plastom-Inkompatibilität der beteiligten Arten dar, der ursächlich für den beobachteten Phänotyp verantwortlich zu sein scheint. Es muss daher geschlossen werden, daß Kern/Plastom-Inkompatibilität polygenisch ist und somit eine vollständige Reversion zum WT über Transformationsexperimente Mehrfachtransformationen erforderte.

In jedem Fall bestätigen die Defekte in der Ab(Nt)-Cybride in der Transkription und in der RNA-Edierung, daß die Interaktion von proteinogenen Kernfaktoren und plastidären Nukleinsäuren zu Kern/Plastom-Inkompatibilität beiträgt und bestätigt somit Hypothese B aus Abb. 2.

#### **4.4 Heterologes RNA-Edieren in Cybriden und transplastomischen Pflanzen oder: wie evolutionär stabil sind Edierungsfaktoren?**

Fünf von acht heterologen Stellen sind wie erwartet nicht ediert im fremden Kernhintergrund der beiden Cybriden. Völlig überraschend sind jedoch die verbleibenden drei Stellen, *psbE* in der AB(Nt)-Cybride und *ndhA-1*, bzw. *ndhD-5* in der Nt(Ab)-Cybride überaus effizient, nämlich nicht von WT zu unterscheiden, ediert. Die Stelle *ndhA-1* wurde zudem auch im transplastomischen Ansatz in den CEE-Pflanzen heterolog prozessiert. Das bedeutet, daß der Tabakkern Faktoren besitzt, die diese Stellen erkennen und prozessieren, obwohl dazu im eigenen WT-Plastom keine Ziele vorhanden sind.

Um Hinweise auf die Phylogenie dieser Stellen zu erhalten, wurden homologe Bereiche aus *N. tomentosiformis* und *N. sylvestris* als Modellpflanzen für den Vater, respektive die Mutter des allotetraploiden Tabaks untersucht. Es stellte sich heraus,

daß *N. tomentosiformes* die Stellen *ndhA-1* und *ndhD-4* besitzt und auch effizient ediert, *N. sylvestris* jedoch ein T an den betreffenden Positionen aufweist. Die naheliegendste Schlussfolgerung ist, daß die notwendigen Edierungsfaktoren auf den Chromosomen von *N. tomentosiformis* kodiert sind und über die Allotetraploidisierung auch in den *N. tabacum*-Kern gelangten.

Andere Stellen, die in Tabak nicht heterolog ediert werden konnten, in den Genen *rpoB* (aus Mais: Reed und Hanson 1997) und *psbF* (aus Spinat: Bock *et al.* 1994), wurden ebenfalls in den Elternarten untersucht. Weder *N. tomentosiformis* noch *N. sylvestris* besitzen eine der beiden Stellen. Dies ist in Einklang mit der Erwartung, daß die Editotypen und letztlich auch das Komplement an Edierungsfaktoren im Tabak auf die Kapazitäten der Elternarten zurückgeführt werden kann. Dieser Befund wirft die Frage nach dem generellen Schicksal von Genen nach Allopolyploidisierungsereignissen auf.

Allopolyploidisierung ist ein besonders im Pflanzenreich weitverbreitetes Phänomen, das oftmals zu einer komplexen Umstrukturierung elterlicher Erbinformation führt (Comai 2000; Wendel 2000; Eckardt 2001). In vielen Fällen bleiben beide elterlichen Kopien nach der Polyploidisierung erhalten, allerdings oft mit mehr oder weniger schwerwiegenden Modifikationen (siehe Abschnitt 1.5). Allerdings gibt es auch eine Reihe von Beispielen, in denen eine parentale Kopie verloren geht (z.B. Lim *et al.* 2000a). Die Notwendigkeit, das nukleäre Genom mit den organellären Genomen zu harmonisieren (Herrmann, 1997), mag zu einer Selektion gegen vor allem paternale Gene in einer allopolyploiden Pflanze führen. Demnach ist es vorstellbar, daß einige paternale Gene nicht oder nur schlecht mit dem maternalen Cytoplasma (in uniparentaler, maternaler Plasmavererbung) harmonisieren oder daß einfach die Erhöhung der Gendosis in der Interaktion der Kompartimente Probleme verursacht. Ein Versagen in der Abstimmung des plastidären mit dem nukleären Genom würde in kompartmenteller Inkompatibilität resultieren, wie sie für Hybriden und Cybriden beschrieben wurde (s.o. Abschnitt 1.1; z.B. auch Stubbe 1989; Yao *et al.* 2000; Zubko *et al.* 2001). Kern/Plastom-Inkompatibilität kann in Artbildungsprozessen eine Rolle spielen (Caspari 1948; Michaelis 1954), auch weil verschiedene Arten unterschiedliche Editotypen haben (siehe Abb. 36). Allotetraploidie wäre in solchen Situationen eine Lösung für die

---

Überbrückung von Artgrenzen, da die Edierungsfaktoren beider Kerngenome zusammengeführt werden und so die Edierungskapazität der allotetraploiden Art auf jeden Fall in der Lage ist, beide elterlichen Editotypen abzudecken.

Im Falle der heterolog edierten Stellen *ndhA* (189), *ndhD* (298) ist es trotzdem erstaunlich, daß die notwendigen Aktivitäten über 6 Millionen Jahre, dem geschätzten Alter von Tabak (Okamura und Goldberg 1985), erhalten geblieben sind. Wieso entkamen diese Edierungsfaktoren dem häufigen Schicksal paternaler DNA in Allotetraploiden, *i.e.* Degeneration oder Deletion, obwohl sie 6 Millionen Jahre keine Zielsequenz hatten?

Eine spekulative Antwort darauf wäre, daß Edierungsfaktoren noch andere Funktion(en) ausüben. Nahe liegend wäre, daß eine solche Funktion ebenfalls in der RNA-Edierung läge, möglicherweise in der Edierung einer anderen, weiteren Stelle. Keine andere Plastidenstelle, bzw. deren *cis*-Sequenz, zeigt allerdings signifikante Homologie zu *ndhA* (Kodon 189), bzw. *ndhD* (Kodon 298). In CEE-Pflanzen wurden alle bekannten Tabakstellen auf eine Reduzierung ihrer Edierungseffizienz als Folge der Überexpression der *ndhA*-Stelle getestet. Wenn, wie in anderen Fällen gezeigt, der Edierungsfaktor durch ein Überangebot an Ziel-RNA titrierbar wäre (Chaudhuri *et al.* 1995; Reed und Hanson 1997), sollte die Effizienz der Edierung einer weiteren Stelle sinken. Dies war aber nicht der Fall. Das Gen *ndhA* besitzt zudem noch ein Homologes im Mitochondrium (Exon 3 des Gens *nad1*), das für eine Untereinheit des Komplexes I der Atmungskette kodiert. An homologer Stelle findet sich in diesem mitochondrialen Gen ebenfalls eine Edierungsstelle. Da es denkbar wäre, daß der Edierungsfaktor sowohl in die Plastide als auch in das Mitochondrium importiert wird, wie beispielsweise für eine der NEP-RNA-Polymerasen von Tabak oder für die Glycyl-tRNA-Synthetase aus *Arabidopsis* gezeigt wurde (Hedke *et al.* 2000; Duchene *et al.* 2001), könnte er zuständig für die Prozessierung auch dieser Stelle sein. In CEE-Pflanzen ist die *nad1*-Stelle jedoch nicht in ihrer Edierungseffizienz herabgesetzt (Diplomarbeit M. Tillich, 2002). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Faktor nur unter den hier verwendeten Bedingungen nicht titrierbar ist. Dennoch deuten die Daten darauf hin, daß der Faktor weder in der Edierung einer weiteren plastidären Stelle noch in der Edierung der homologen *nad1* Stelle eine Rolle spielt. Auch im Kern ist der Faktor nicht aktiv, was die Einbringung der *ndhA* II-

Stelle in den Kern von Tabak über Agrobakterientransformation zeigte. Obwohl die Stelle im Kern exprimiert werden kann, findet keine Edierung statt (Diplomarbeit M. Tillich, 2002).

Was bleibt, ist eine Funktion des *ndhA*-Faktors außerhalb von RNA-Edierung anzunehmen. Der Selektionsdruck, den Faktor zu erhalten, käme dann von einem anderen, sehr wahrscheinlich plastidären Prozess. Die Fähigkeit, eine Stelle zu edieren wäre dann nur Nebenprodukt einer ganz anderen Funktion des Faktors, denkbar z.B. im RNA-Metabolismus der Zelle. Für die Konservierung der Edierungsstelle würde dies bedeuten, daß die Stelle nicht nur jederzeit verloren gehen kann (wie jede andere Edierungsstelle; s.o.), sondern auch immer wieder gewonnen, da der Faktor unabhängig von der Stelle erhalten bleibt, was zu einem raschen transitorischen Auftauchen und Verschwinden von Edierungsstellen in der Evolution führen würde. Tatsächlich evolvieren Edierungsstellen so schnell wie neutrale Kodonpositionen (Shields und Wolfe 1997). Auf einen Stammbaum übertragen bedeutete dies, daß man kein regelmäßiges Muster erwarten könnte wie von Stammbäumen von Genen. Diese verschwinden in einem Zweig des Stammbaums auf Nimmerwiedersehen, während sie in einem anderen Zweig konstant erhalten bleiben. Im Gegensatz zu diesem "normalen" phyletischen Verhalten müsste man fordern, daß eine Edierungsstelle recht unregelmäßig verteilt über den Stammbaum auftritt. Diese Hypothese ist über ein recht einfaches Sequenzierprojekt testbar, nämlich über die Sequenzierung einer Edierungsstelle in vielen Arten einer größeren Verwandtschaftsgruppe, beispielsweise der Angiospermen, und ist Gegenstand laufender Untersuchungen.



## 5 Zusammenfassung

Die Pflanzenzelle enthält ein integriertes, kompartimentiertes genetisches System, mit den Subgenomen im Zellkern, in den Mitochondrien und den Plastiden, das aus Endocytobioseereignissen mit prokaryotischen Zellen hervorgegangen ist. Im Laufe der Evolution der eukaryotischen Zelle wurden die genetischen Potentiale der symbiontischen Partnerzellen vermischt. Dabei ging ein Teil genetischer Information verloren, ein anderer wurde aus den Organellen in den Kern transferiert, und außerdem wurde neue Information hinzugewonnen. Dies ging einher mit der Einbettung von Mitochondrien und Plastiden in die Signaltransduktionsketten und Regelkreise der Wirtszelle. Heute interagieren die Subgenome auf vielen Ebenen; ihre Expression wird in der Pflanzenzelle koordiniert in Raum, Zeit und Quantität reguliert. Die Interdependenz der Subgenome hatte ihre Koevolution zur Folge, so daß die genetischen Kompartimente der Zelle nicht mehr ohne weiteres zwischen Arten ausgetauscht werden können. Kombinationen von artfremden Organellen können zu Entwicklungsstörungen führen, wie sie sowohl von "kompartimentellen" (Genom/Plastom-) Hybriden als auch von Cybriden beschrieben worden sind (Bastardbleichheit, Bastardscheckung).

In dieser Arbeit wurden reziproke Cybriden der Arten *Atropa belladonna* und *Nicotiana tabacum* auf molekulare Determinanten von Genom/Plastom-Inkompatibilität untersucht. Die Cybriden sind je nach Kombination elterlicher Organellen entweder albinotisch [Kern von *Atropa*, Plastide vom Tabak; Ab(Nt)-Cybride] oder gleichen dem Wildtyp [Kern von Tabak; Plastide von *Atropa*, Nt(Ab)-Cybride].

1. Als Voraussetzung für einen Sequenzvergleich der plastidären Chromosomen beider Solanaceen-Arten wurde das Plastidenchromosom von *Atropa* komplett sequenziert. Der Vergleich der (*Atropa*)-Sequenz mit der bekannten des Chromosoms aus dem Tabak und anschließende molekularbiologische Untersuchungen führten zur Identifizierung von zwei potenziellen Ursachen für die Defekte im albinotischen Material.

2. Die Ab(Nt)-Cybride zeigt eine gestörte Akkumulation von Transkripten für eine Reihe von Operonen. Das resultierende aberrante Transkriptmuster ähnelte verblüffend dem von Tabakpflanzen mit Defizienz der plastidenkodierten RNA-Polymerase (PEP). Möglicherweise ist in der Cybride die Interaktion des PEP-

Apoenzym mit einem oder mehreren der kernkodierten Sigmafaktoren gestört. Tatsächlich unterscheiden sich die für eine Untereinheit der PEP kodierenden (plastidären) *rpoC2*-Gene von Tabak und *Atropa* durch eine Insertion/Deletion an einer Stelle im Molekül, die mit Sigmafaktoren interagieren kann. Transformation der Plastiden der Ab(Nt)-Cybride mit dem *rpoC2*-Gen aus Tabak führte in der Tat zu einer partiellen Reversion zum WT und macht Transkriptionsdefekte als eines von offenbar mehreren Determinanten für die Genom/Plastom-Inkompatibilität in Artbastarden wahrscheinlich.

3. Neben der Transkription ist im albinotischen Material auch die RNA-Edierung gestört. Die plastidären Editotypen beider Solanaceen ähneln einander, doch gibt es für beide Arten spezifische Edierungsstellen. Von den fünf tabakspezifischen Stellen in der Ab(Nt)-Cybride werden vier nicht ediert. Offensichtlich besitzt der *Atropa*-Kern nicht die notwendigen Kernfaktoren zur Prozessierung dieser Stellen. Da Edierung generell hochkonservierte und funktionell wichtige Aminosäurepositionen betrifft, trägt der Ausfall der Edierung sehr wahrscheinlich ebenfalls zum beobachteten Defekt in der Plastidenentwicklung bei.

4. Auf der anderen Seite werden die Stellen der grünen Nt(Ab)-Cybride, bemerkenswerterweise auch *Atropa*-spezifische, heterolog vom Tabakkern ediert. Der erstmalige Befund von heterologem Edieren stellte sich als Folge der Allotetraploidie von Tabak heraus. Untersuchungen dieser Stellen in den diploiden Eltern des allotetraploiden Tabaks, *N. tomentosiformis* als Nachkomme des Vaters und *N. sylvestris* als Nachkomme der Mutter, zeigten, daß der Tabak die Fähigkeit zur heterologen Edierung von *Atropa*-spezifischen Stellen wohl vom Vater ererbt hat. Dies wurde auch durch einen transplastomischen Ansatz bestätigt. In diesen Experimenten wurde die intronnahe *ndhA*-Edierungsstelle aus Spinat, die es auch in *N. tomentosiformis* gibt, nicht aber in *N. sylvestris*, in Tabak über ballistische Transformation eingebracht.

5. Über Konstruktionen, die entweder der gespleißten oder ungespleißten *ndhA*-mRNA inklusive der Edierungsstelle entsprachen, konnte gezeigt werden, daß die Edierung an dieser Stelle immer erst nach dem Spleißen erfolgt. Dies ist der erste Nachweis einer strikten kinetischen Verknüpfung von RNA-Edierung mit einem anderen mRNA-Reifungsschritt in Plastiden. Er zeigt an, daß das *ndhA*-Intron phylogenetisch älter als die *ndhA*-Edierungsstelle ist. Mechanistische Implikationen dieses Befundes werden diskutiert.

## 6 Abkürzungen

AA	Aminosäurerest
Ab	<i>Atropa belladonna</i>
Ac	Acetat
Bp	Basenpaar(e)
EK	Endkonzentration
Indels	Insertionen/Deletionen
IR	<i>inverted repeat</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LSC	große Einzelkopienregion ( <i>large single copy region</i> )
Lsg	Lösung
NEP	nukleär kodierte RNA-Polymerase ( <i>nuclear encoded RNA polymerase</i> )
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEP	plastidenkodierte RNA-Polymerase ( <i>plastid encoded RNA polymerase</i> )
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
ptDNA	plastidäre DNA
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
Sek.	Sekunden
SD	Shine-Dalgarno Sequenzelement
Spek	Spektinomycin
SSC	kleine Einzelkopienregion ( <i>small single copy region</i> )
UTR	untranslatierter Bereich einer plastidären RNA
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
ycf	<i>hypothetical chloroplast reading frame</i>



## 7 Literatur

1. Abdallah F, Salamini F und Leister D. 2000. A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. Trends Plant Sci. 5:141-142.
2. Aldrich J, Cherney BW, Merlin E und Christopherson L. 1988. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. Curr Genet. 14:137-46.
3. Allard P, Rak AV, Wimberly BT, Clemons WM Jr, Kalinin A, Helgstrand M, Garber MB, Ramakrishnan V und Hard T. 2000. Another piece of the ribosome: solution structure of S16 and its location in the 30S subunit. Structure Fold Des. 8:875-82.
4. Allison LA und Maliga P. 1995. Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. EMBO J. 14:3721-3730.
5. Allison LA, Simon LD, und Maliga P. 1996. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. EMBO J. 15:2802-2809.
6. Allison LA. 2000. The role of sigma factors in plastid transcription. Biochimie. 82:537-548.
7. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215:403-410.
8. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
9. Arisumi T. 1985. Rescuing abortive impatiens hybrids through aseptic culture of ovules. J Am Horticult Sci. 110:273-276.
10. Arthur TM und Burgess RR. 1998. Localization of a sigma70 binding site on the N terminus of the Escherichia coli RNA polymerase beta' subunit. J Biol Chem. 273:31381-31387.
11. Arthur TM, Anthony LC und Burgess RR. 2000. Mutational analysis of beta '260-309, a sigma 70 binding site located on Escherichia coli core RNA polymerase. J Biol Chem. 275:23113-23119.
12. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA und Struhl K (eds.). 1994-1996. Current Protocols in Molecular Biology (looseleaf edition). John Wiley & Sons, London.
13. Aviv D, Fluhr R, Edelman M und Galun E. 1980. Progeny analysis of interspecific somatic hybrids: *Nicotiana tabacum* (CMS) + *Nicotiana sylvestris* with respect to nuclear and chloroplast markers. Theor Appl Genet. 56:145-150
14. Babiychuk E, Schantz R, Cherep N, Weil JH, Gleba Y und Kushnir S. 1995. Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in Solanaceae cybrids. Mol Gen Genet. 249:648-654.
15. Barkan A und Goldschmidt-Clermont M. 2000. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. Biochimie. 82:559-572.
16. Barkan A, Voelker R, Mendel-Hartvig J, Johnson D und Walker M. 1995. Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants Phys Plant. 93 163-170.
17. Barkan A. 1988. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. EMBO J. 7:2637-2644.
18. Baur E. 1909. Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "Varietas albomarginatae hort." von *Pelargonium zonale*. Ztschr f ind Abstamm u Vererbungsl. 1: 330-351.
19. Beckert S, Muhle H, Pruchner D und Knoop V. 2001. The mitochondrial *nad2* gene as a novel marker locus for phylogenetic analysis of early land plants: a comparative analysis in mosses. Mol Phylogenet Evol. 18:117-26.
20. Belliard G, Pelletier G, Vedel F und Quetier F. 1978. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. Mol Gen Genet. 165:231-237
21. Bhattacharya D und Medlin L. 1998 Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants Plant Physiol. 116:9-15.
22. Birky CW Jr. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:11331-11338.

23. Birky CW Jr. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annu Rev Genet.* 35:125-148.
24. Birnboim HC und Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
25. Bland MM, Matzinger DF und Levings CS. 1985. Comparisons of the mitochondrial genome of *Nicotiana tabacum* with its progenitor species. *Theor. Appl. Genet.* 69:535-541.
26. Bligny M, Courtois F, Thaminy S, Chang CC, Lagrange T, Baruah-Wolff J, Stern D und Lerbs-Mache S. 2000. Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.* 19:1851-1860.
27. Bock R und Koop, HU. 1997. Extraplasmidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. *EMBO J.* 16:3282-3288.
28. Bock R, Hermann M und Fuchs M. 1997. Identification of critical nucleotide positions for plastid RNA editing site recognition. *RNA* 3:1194-1200.
29. Bock R, Hermann M und Kössel H. 1996. In vivo dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J.* 15:5052-5059.
30. Bock R. 2000. Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie.* 82:549-57.
31. Bock R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol.* 312:425-438.
32. Bock, R, Kössel H und Maliga P. 1994. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J.* 13:4623-4628.
33. Bonen L und Vogel J. 2001. The ins and outs of group II introns. *Trends Genet.* 17:322-331.
34. Borisjuk NV, Davidjuk YM, Kostishin SS, Miroshnichenco GP, Velasco R, Hemleben V und Volkov RA. 1997. Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana*. *Plant Mol Biol.* 35:655-660.
35. Brown EC, Somanchi A und Mayfield SP. 2001. Interorganellar crosstalk: new perspectives on signaling from the chloroplast to the nucleus. *Genome Biol.* 2:1021.
36. Busby S und Ebright RH. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell.* 79:743-746.
37. Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G und Kuntz M. 1999. Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell.* 11:57-68.
38. Caspari E. 1948. Cytoplasmic inheritance. *Adv Genet.* 2:2-68
39. Cerutti H, Osman M, Grandoni P und Jagendorf AT. 1992. A homolog of *Escherichia coli RecA* protein in plastids of higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:8068-8072.
40. Chaudhuri S und Maliga P. 1996. Sequences directing C to U editing of the plastid *psbL* mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. *EMBO J.* 15:5958-5964.
41. Chaudhuri S, Carrer H und Maliga P. 1995. Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids. *EMBO J.* 14:2951-2957.
42. Chester A, Scott J, Anant S und Navaratnam N. 2000. RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. *Biochim Biophys Acta.* 1494:1-13.
43. Chevalier BS und Stoddard BL. 2001. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res.* 29:3757-3774.
44. Choquet Y und Vallon O. 2000. Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie.* 82:615-34.
45. Christopher DA, Kim M und Mullet JE. 1992. A novel light-regulated promoter is conserved in cereal and dicot chloroplasts. *Plant Cell* 4:785-798.
46. Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol.* 43:387-399.
47. Corneille S, Lutz K und Maliga P. 2000. Conservation of RNA editing between rice and maize plastids: are most editing events dispensable? *Mol Gen Genet.* 264:419-424.
48. Covello PS und Gray MW. 1989. RNA editing in plant mitochondria. *Nature.* 341:662-666.

49. Covello PS und Gray MW. 1993. On the evolution of RNA editing. *Trends Genet.* 9:265-268.
50. Cséplö A, Nagy F und Maliga P. 1984. Interspecific protoplast fusion to rescue a cytoplasmic lincomycin mutation into *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Mol Gen Genet.* 198:7-11
51. Cummings MP, King LM und Kellogg EA. 1994. Slipped-strand mispairing in a plastid gene: *rpoC2* in grasses (Poaceae). *Mol Biol Evol.* 11:1-8.
52. Curtis SE und Clegg MT. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Mol Biol Evol* 1:291-301.
53. D'Arcy WG. 1979. The classification of the Solanaceae. In: *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Hawkes JG, Lester RN und Skelding AD (Hrsg.), Academic Press (for Linnean Society), London, pp. 2-49.
54. D'Arcy WG. 1991. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: *Solanaceae III. Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Hawkes JG, Lester RN, Nee M und Estrad RN (Hrsg.) Royal Botanical garden at Kew Press, London, pp. 75-137.
55. De Santis-Maciossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rudiger W, Koop HU und Herrmann RG. 1999. Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J.* 18:477-489.
56. del Campo EM, Sabater B und Martin M. 2000. Transcripts of the *ndhH-D* operon of barley plastids: possible role of unedited site III in splicing of the *ndhA* intron. *Nucleic Acids Res.* 1:1092-1098.
57. Deshpande NN, Hollingsworth M und Herrin DL. 1995. The *atpF* group-II intron-containing gene from spinach chloroplasts is not spliced in transgenic *Chlamydomonas* chloroplasts. *Curr Genet.* 28:122-127.
58. Doyle JL und Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
59. Drescher A, Hupfer H, Nickel C, Albertazzi F, Hohmann U, Herrmann RG und Maier RM C-to-U. 2002. conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame? *Mol Gen Genom.* (im Druck)
60. Drescher A, Ruf S, Calsa T Jr, Carrer H und Bock R. 2000. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J.* 22:97-104.
61. Du YC, Hong S und Spreitzer RJ. 2000. RbcS suppressor mutations improve the thermal stability and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of rbcL- mutant ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14206-11.
62. Duchene AM, Peeters N, Dietrich A, Cosset A, Small ID und Wintz H. 2001. Overlapping destinations for two dual targeted glycyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem.* 276:15275-15283.
63. Eckardt NA. 2001. A sense of self: the role of DNA sequence elimination in allopolyploidization. *Plant Cell.* 13:1699-704.
64. Eibl C, Zou Z, Beck A, Kim M, Mullet J und Koop HU. 1999. *In vivo* analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rp132* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J.* 19:333-345.
65. Estevez AM und Simpson L. 1999. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review. *Gene.* 240:247-260.
66. Fisk DG, Walker M und Barkan A. 1999. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.* 18:2621-2630.
67. Frey JE. 1999. Genetic flexibility of plant chloroplasts. *Nature.* 398:115-116.
68. Freyer R, Kiefer-Meyer MC und Kössel H. 1997. Occurrence of plastid RNA Editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:6285-6290.
69. Freyer R, Lopez C, Maier RM, Martin M, Sabater B und Kössel H. 1995. Editing of the chloroplast *ndhB* encoded transcript shows divergence between closely related members of the grass family (Poaceae). *Plant Mol Biol.* 29:679-684.
70. Fuchs M, Maier RM und Zeltz P. 2001. RNA editing in higher plant plastids: oligoribonucleotide SSCP analysis allows the proof of base conversion directly at the RNA level. *Curr Genet.* 39:384-387.

71. Galitski T, Saldanha AJ, Styles CA, Lander ES und Fink GR. 1999. Ploidy regulation of gene expression. *Science*. 285:251-254.
72. Galun E, Arzee-Gonen P, Fluhr R, Edelman M und Aviv D. 1982. Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana*: mitochondrial DNA analysis in progenies resulting from fusion between protoplasts having different organelle constitutions. *Mol Gen Genet*. 186:50-56.
73. Gamble PE und Mullet JE. 1989. Blue light regulates the accumulation of two *psbD-psbC* transcripts in barley chloroplasts. *EMBO J*. 8:2785-2794.
74. Gastony GJ. 1991. Gene silencing in a polyploid homosporous fern: Paleopolyploidy revisited. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:1602-1605.
75. Gielly L und Taberlet P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol Biol Evol*. 11:769-777.
76. Givnish TJ, Evans TM, Zjhra ML, Patterson TB, Berry PE und Sytsma KJ. 2000. Molecular evolution, adaptive radiation, and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapateaceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology. *Evolution Int J Org Evolution*. 54:1915-1937.
77. Glick RE und Sears BB. 1994. Genetically programmed chloroplast dedifferentiation as a consequence of plastome-genome incompatibility in *Oenothera*. *Plant Physiol*. 106:367-373.
78. Glimelius K und Bonnet HT. 1981. Somatic hybridisation in *Nicotiana*: restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids. *Planta*. 153:497-503
79. Glimelius K und Bonnet HT. 1986. *Nicotiana* cybrids with *Petunia* chloroplasts. *Theor Appl Genet*. 72:794-798.
80. Goh CS, Bogan AA, Joachimiak M, Walther D und Cohen FE. 2000. Co-evolution of proteins with their interaction partners. *J Mol Biol*. 299:283-93.
81. Golds TJ, Maliga P und Koop HU. 1993. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technology* 11:95-97.
82. Goldschmidt-Clermont M, Choquet Y, Girard-Bascou J, Michel F, Schirmer-Rahire M und Rochaix JD. 1991. A small chloroplast RNA may be required for trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell*. 65:135-143.
83. Goldschmidt-Clermont M, Girard-Bascou J, Choquet Y und Rochaix JD. 1990. Trans-splicing mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*. 223:417-425.
84. Goldschmidt-Clermont M. 1998. Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol*. 177:115-180.
85. Gordon KHJ, Crouse EJ, Bohnert HJ und Herrmann RG. 1981. Restriction endonuclease cleavage site map of chloroplast DNA from *Oenothera parviflora* (*Euoenothera* plastome IV) *Theor Appl Genet*. 59:281-296.
86. Gordon KHJ, Crouse EJ, Bohnert HJ und Herrmann RG. 1982. Physical mapping of differences in chloroplast DNA of the five wild type plastomes in *Oenothera* subsection *Euoenothera*. *Theor Appl Genet*. 61:373-384.
87. Gott JM und Emeson RB. 2000. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet*. 34:499-531.
88. Goulding SE, Olmstead RG, Morden CW und Wolfe KH. 1996. Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. *Mol Gen Genet*. 252:195-206.
89. Gray MW. 1999. Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 9:678-687.
90. Gressel J, Cohen N und Binding H. 1984. Somatic hybridization of an atrazin resitant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum* 2. Segregation of plastomes. *Theor Appl Genet*. 67:131-134
91. Groth G und Pohl, E. 2001. The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 A resolution. *J Biol Chem*. 276:1345-1352.
92. Gruber TM, Markov D, Sharp MM, Young BA, Lu CZ, Zhong HJ, Artsimovitch I, Geszvain KM, Arthur TM, Burgess RR, Landick R, Severinov K und Gross CA. 2001. Binding of the initiation factor sigma(70) to core RNA polymerase is a multistep process. *Mol Cell*. 8:21-31.
93. Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH und Grienemberger JM. 1989. RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature*. 1989 341:660-662.



94. Guo M, Davis D und Birchler JA. 1996. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics*.142:1349-1355.
95. Hagemann R. 1992. Plastid genetics in higher plants. In: Cell organelles Herrmann (Hrsg.) Springer, Wien, pp. 65-69.
96. Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S und Bock R. 1999. Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. *EMBO J*. 18:5834-5842.
97. Hajdukiewicz PT, Allison LA und Maliga P. 1997. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J*. 16:4041-4048.
98. Han CD, Coe EH Jr und Martienssen RA. 1992. Molecular cloning and characterization of *iojap (ij)*, a pattern striping gene of maize. *EMBO J*. 11:4037-4046.
99. Hancock JM. 1996. Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays*. 18:421-5.
100. Hedtke B, Börner T und Weihe A. 2000. One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep*. 1:435-440.
101. Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG und Börner T. 2002. Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J*. im Druck.
102. Hedtke B, Wagner I, Börner T und Hess WR. 1999. Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. *Plant J*. 19:635-643.
103. Hermann M und Bock R. 1999. Transfer of plastid RNA-editing activity to novel sites suggests a critical role for spacing in editing-site recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4856-4861.
104. Herrmann RG. 1977. Studies on *Oenothera* plastid DNAs. In: Proceedings of the international conference on regulation of developmental processes in plants. Schütte HR und Gross D (Hrsg.). Gustav Fischer, Jena, pp. 48-55.
105. Herrmann RG und Feierabend J. 1980. The presence of DNA in ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves. *Eur J Biochem*. 104:603-609.
106. Herrmann RG und Possingham, JV. 1980. Plastid DNA – the plastome. In: Results and problems in cell differentiation. Vol 10 Chloroplasts. Reinert J. (Hrsg.), Springer, Berlin, pp. 45-96.
107. Herrmann RG, Westhoff P und G Link. 1992. Biogenesis of plastids in higher plants. In: *Plant Gene Research*, vol 6. RG Herrmann (Hrsg.). Springer, Wien, New York, pp. 275-349.
108. Herrmann RG. 1996. Photosynthesis research: aspects and perspectives. In *Frontiers of molecular biology. Molecular genetics in photosynthesis*. Andersson B, Salter HA und Barber J (Hrsg.). IRL press Oxford, pp. 1-44.
109. Herrmann RG. 1997. Eukaryotism, towards a new interpretation. In: *Eukaryotism and Symbiosis*. Schenk HEA, Herrmann RG, Jeon KW, Müller NE und Schwemmler W (Hrsg.) Springer, Heidelberg, New York, pp. 73-118.
110. Hess WR, Hoch B, Zeltz P, Hubschmann T, Kossel H und Börner T. 1994. Inefficient *rp12* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell*. 6:1455-1465.
111. Hiesel R, Wissinger B, Schuster W und Brennicke A. 1989. RNA editing in plant mitochondria. *Science*. 246:1632-1634.
112. Hirose T und Sugiura M. 1996. *Cis*-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J*. 15:1687-95.
113. Hirose T und Sugiura M. 2001. Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J*. 1:1144-1152.
114. Hirose T, Fan H, Suzuki JY, Wakasugi T, Tsudzuki T, Kossel H und Sugiura M. 1996. Occurrence of silent RNA editing in chloroplasts: its species specificity and the influence of environmental and developmental conditions. *Plant Mol Biol*. 30:667-672.
115. Hirose T, Kusumegi T und Sugiura M. 1998. Translation of tobacco chloroplast *rps14* mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS Lett*. 3;430:257-260.

116. Hirose T, Kusumegi T, Tsudzuki T, und Sugiura M. 1999. RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet.* 262:462-467.
117. Hirose, T und Sugiura M. 1997. Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J.* 16:6804-6811.
118. Hirose T, Wakasugi T, Sugiura M und Kössel H. 1994. RNA editing of tobacco *petB* mRNAs occurs both in chloroplasts and non-photosynthetic proplastids. *Plant Mol Biol.* 26:509-513.
119. Hoch B, Maier RM, Appel K, Igloi GL und Kössel H. 1991. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation Kodon. *Nature.* 353:178-180.
120. Hornung S, Fulgosi H, Dörfel P und Herrmann RG. 1996. Sequence variation in the putative replication origins of the five genetically distinct basic *Euoenothera* plastid chromosomes (plastomes). *Mol Gen Genet.* 251:609-12.
121. Hübschmann T, Hess WR und Börner T 1996. Impaired splicing of the *rps12* transcript in ribosome-deficient plastids. *Plant Mol Biol.* 30:109-123.
122. Hupfer H, Swiatek M, Hornung S, Herrmann RG, Maier RM, Chiu WL und Sears B. 2000. Complete nucleotide sequence of the *Oenothera elata* plastid chromosome, representing plastome I of the five distinguishable *Euoenothera* plastomes. *Mol Gen Genet.* 263: 581-585.
123. Igloi GL und Kössel H. 1992. The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit Rev Plant Sci.* 10:525-558.
124. Inada H, Seki M, Morikawa H, Nishimura M und Iba K. 1997. Existence of three regulatory regions each containing a highly conserved motif in the promoter of plastid-encoded RNA polymerase gene (*rpoB*). *Plant J.* 11:883-90.
125. Isono K, Niwa Y, Satoh K und Kobayashi H. 1997a. Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiol.* 114:623-630.
126. Isono K, Shimizu M, Yoshimoto K, Niwa Y, Satoh K, Yokota A, Kobayashi H. 1997b. Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14948-14953.
127. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG und Gibson TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* 23:403-405.
128. Jenkins BD und Barkan A. 2001. Recruitment of a peptidyl-tRNA hydrolase as a facilitator of group II intron splicing in chloroplasts. *EMBO J.* 20:872-879.
129. Jenkins BD, Kulhanek DJ und Barkan A. 1997. Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell.* 9:283-296.
130. Joet T, Cournac L, Horvath EM, Medgyesy P und Peltier G. 2001. Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiol.* 125:1919-1929.
131. Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC und Butow RA. 1988. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science.* 240:1538-1541.
132. Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W und Krauß N. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411:909-917.
133. Ju J, Ruan C, Fuller CW, Glazer AN und Mathies RA. 1995. Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4347-4351.
134. Kanamaru K, Nagashima A, Fujiwara M, Shimada H, Shirano Y, Nakabayashi K, Shibata D, Tanaka K und Takahashi H. 2001. An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 42:1034-1043.
135. Kanevski I, Maliga P, Rhoades DF und Gutteridge S. 1999. Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower largesubunit and tobacco small subunit hybrid. *Plant Physiol.* 119:133-142.
136. Kapoor S, Suzuki JY und Sugiura M. 1997. Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J.* 11:327-337.

137. Kapoor S, Wakasugi T, Deno H und Sugiura M. 1994. An *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet.* 26:263-268.
138. Karcher D und Bock R. 2001. The amino acid sequence of a plastid protein is developmentally regulated by RNA editing. *J Biol Chem.* 2001 im Druck.
139. Karcher D und Bock R. Site-selective inhibition of plastid RNA editing by heat shock and antibiotics: a role for plastid translation in RNA editing. 1998. *Nucleic Acids Res.* 26:1185-1190.
140. Kenton A, Parokonny AS, Gleba YY und Bennett MD. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet.* 240:159-169.
141. Kirk JTO und Tilney-Bassett RAE. 1978. *The Plastids, Their chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd revised edn. Elsevier/North Holland, New York.
142. Klein T, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME und Maliga P. 1988. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by particle gun bombardment process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:8502-8505
143. Kochevenko A, Ratushnyak Y, Kornyejev D, Stasik O, Porublyova L, Kochubey S, Suprunova T und Gleba Y. 2000. Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var 'dentatum' with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell Reports.* 19:588-587.
144. Koop HU, Steinmüller K, Wagner H, Rößler C, Eibl C und Sacher L. 1996. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via PEG-mediated protoplast transformation. *Planta.* 199:193-201.
145. Krause K, Maier RM, Kofer W, Krupinska K und Herrmann RG. 2000. Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol Gen Genet.* 263:1022-1030.
146. Kudla J und Bock R. 1999. RNA editing in an untranslated region of the Ginkgo chloroplast genome. *Gene.* 1999 234:81-86.
147. Kudla J, Igloi GL, Metzlafl M, Hagemann R und Kossel H. 1992. RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by a C to U substitution within the initiation Kodon. *EMBO J.* 11:1099-1103.
148. Kung SD, Zhu YS und Shen GF. 1982. *Nicotiana* chloroplast genome III. Chloroplast DNA evolution. *Theor Appl Genet.* 61:73-79.
149. Kunnimalaiyaan M und Nielsen BL. 1997a. Fine mapping of replication origins (*oriA* and *oriB*) in *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Nucl Acids Res.* 25:3681-3686.
150. Kunnimalaiyaan M und Nielsen BL. 1997b. Chloroplast DNA replication: mechanism, enzymes and replication origins. *J Plant Biochem Biotechnol.* 6:1-7.
151. Kunnimalaiyaan M, Shi F und Nielsen BL. 1997. Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (*oriB*) downstream of the 23 S rRNA gene. *J Mol Biol.* 268:273-283.
152. Kuras R, Wollman FA. 1994. The assembly of cytochrome b6/f complexes: an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 13:1019-27.
153. Kushner S. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids, p. 17-23. In H.W. Boyer und S. Nicosia (Hrsg.) *Genetic Engineering*. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
154. Kushnir SG, Babiychuk E, Bannikova M, Momot V, Komarnitsky I, Cherep N und Gleba Y. 1991. Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome. *Mol Gen Genet.* 225:225-230.
155. Kushnir SG, Shlumukov LR, Progebnjak NJ, Berger S und Gleba Y. 1987. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome. *Mol Gen Genet.* 209:159-163.
156. Kyhse-Andersen J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 10:203-209.
157. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
158. Lam E, Kato N und Lawton M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* 411:848-853.

159. Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C., Sankoff D, Turmel M und Gray MW. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*. 387:493-497.
160. Lawrence SD, Cline K und Moore GA. 1997. Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein. *Plant Mol Biol*. 33:483-492.
161. Learn GH Jr, Shore JS, Furnier GR, Zurawski G und Clegg MT. 1992. Constraints on the evolution of plastid introns: the group II intron in the gene encoding tRNA-Val(UAC). *Mol Biol Evol*. 9:856-871.
162. Lee H, Bingham SE und Webber AN. 1996. Function of 3' non-coding sequences and stop Kodon usage in expression of the chloroplast *psaB* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*. 31:337-54.
163. Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG und Maier RM 2002. Comparative analyses of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant Journal*. im Druck.
164. Legen J, Schmitz-Linneweber C, Drescher A, Hupfer H, Tillich M, Herrmann RG und Maier RM. 2001. Decoding of the *ndhH* operon from spinach: an example for the complexity of plastid gene expression in higher plants. *Endocytobiosis and Cell Res*. 14:11-20.
165. Legen J, Schmitz-Linneweber C, Drescher A, Hupfer H, Tillich M, Herrmann RG und Maier RM. 2001. Decoding of the *ndhH* operon from spinach: an example for the complexity of plastid gene expression in higher plants. *Endocytobiosis and Cell Res*. 14:11-21.
166. Lemieux C, Otis C und Turmel M. 2000. Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature*. 403:649-652.
167. Levinson G und Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*. 4:203-221.
168. Liere K und Link G. 1995. RNA-binding activity of the *matK* protein encoded by the chloroplast *trnK* intron from mustard (*Sinapis alba* L.). *Nucleic Acids Res*. 23:917-921.
169. Liere K und Maliga P. 1999. In vitro characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J*. 18:249-257.
170. Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Bezdek M, Lichtenstein CP und Leitch AR. 2000a. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*. 109:161-172.
171. Lim KY, Matyasek R, Lichtenstein CP und Leitch AR. 2000b. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma*. 109:245-258.
172. Liu B, Vega JM und Feldman M. 1998. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome*. 41:535-542.
173. Lu B, Wilson RK, Phreaner CG, Mulligan RM und Hanson MR. 1996. Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene. *Mol Cell Biol*. 16:1543-1549.
174. Lutz KA und Maliga P. 2001. Lack of conservation of editing sites in mRNAs that encode subunits of the NAD(P)H dehydrogenase complex in plastids and mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Genet*. 40:214-219.
175. Maier RM, Dory I, Igloi G und Kössel H. 1990. The *ndhH* genes of gramminean plastomes are linked with the junctions between small single copy and inverted repeat regions. *Curr Genet*. 18:245-250.
176. Maier RM, Neckermann K, Igloi GL und Kössel H. 1995. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol*. 251:614-628.
177. Maier RM, Zeltz P, Kössel H, Bonnard G, Gualberto JM und Grienberger JM. 1996. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol*. 32:343-365.
178. Maliga P. 1995. Biolistic transformation of tobacco cells with nuclear drug resistance genes. In *Methods in plant molecular biology- a laboratory course manual*. Maliga P, Klessig DF, Cashmore AR, Gruissem W und Varner JE (Hrsg.). CSH Laboratory press, New York, pp. 37-54.

179. Manen JF, Savolainen V und Simon P. 1994. The *atpB* and *rbcL* promoters in plastid DNAs of a wide dicot range. *J Mol Evol.* 38:577-582.
180. Margulis L. 1971a. Symbiosis and evolution. 1971. *Sci Am.* 225:48-57.
181. Margulis L. 1971b. The origin of plant and animal cells. 1971. *Am Sci.* 59:230-235.
182. Martin W und Herrmann RG. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol.* 118:9-17.
183. Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M und Kowallik KV. 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature.* 393:162-165.
184. McCarthy JE und Brimacombe R. 1994. Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet.* 10:402-407.
185. McCormac DJ und Barkan A. 1999. A nuclear gene in maize required for the translation of the chloroplast *atpB/E* mRNA. *Plant Cell.* 11:1709-1716.
186. McFadden GI. 1999. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol.* 2:513-519.
187. Medgyesy P, Golling R und Nagy F. 1985. A light-sensitive recipient for the effective transfer of chloroplast and mitochondrial traits by protoplast fusion in *Nicotiana*. *Theor Appl Genet.* 70:590-594.
188. Medgyesy P, Menzcler L und Maliga P. 1982. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* in *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids. *Mol Gen Genet.* 179:693-698.
189. Medgyesy P. 1994. Cybrids. Transfer of chloroplast traits through protoplast fusion between sexually incompatible Solanaceae species. In: *Biotechnology in Agriculture and forestry. Vol 27 Somatic hybridization in crop improvement.* Bajaj YPS (Hrsg.) Springer, Berlin, pp. 72-85.
190. Menczel L, Galiba G, Nagy F und Maliga P. 1982. Effects of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in *Nicotiana*. *Genetics.* 100:487-495.
191. Menczel L, Polsby LS, Steinback KE und Maliga P. 1986. Fusion-mediated transfer of triazine-resistant chloroplasts: characterization of *Nicotiana tabacum* cybrid plants. *Mol Gen Genet.* 205:201-205.
192. Meng BY, Tanaka M, Wakasugi T, Ohme M, Shinozaki K und Sugiura M. 1988. Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by in vitro capping. *Curr. Genet.* 14:395-400.
193. Meng BY, Wakasugi T und Sugiura M. 1991. Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet.* 20:259-264.
194. Metzloff M, Pohlheim F, Börner T und Hagemann R. 1982. Hybrid variegation in the genus *Pelargonium*. *Curr Genet.* 5:245-249
195. Meurer J, Berger A, Westhoff P. 1996. A nuclear mutant of *Arabidopsis* with impaired stability on distinct transcripts of the plastid *psbB*, *psbD/C*, *ndhH*, and *ndhC* operons. *Plant Cell.* 8:1193-1207.
196. Michaelis P. 1954. Cytoplasmic inheritance in *Epilobium* and its theoretical significance. *Adv Genet.* 6:287-401.
197. Michel F und Ferat JL. 1995. Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem.* 64:435-461.
198. Michel F und Jaquier A. 1987. Long range intron-exon and intron-intron pairings involved in self-splicing of class II catalytic introns. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:201-212.
199. Michel F, Umesono K und Ozeki H. 1989. Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns--a review. *Gene.* 82:5-30.
200. Miyagi T, Kapoor S, Sugita M und Sugiura M. 1998. Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol Gen Genet.* 257:299-307.
201. Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A und Chory J. 2001. *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:2053-2058.

202. Monde RA, Schuster G und Stern DB. 2000b. Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie*. 82:573-582.
203. Monde RA, Zito F, Olive J, Wollman FA und Stern DB. 2000a. Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b6/f complex. *Plant J*. 21:61-72.
204. Mort ME, Soltis DE, Soltis PS, Francisco-Ortega J und Santos-Guerra A. 2001. Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data. *Am J Bot*. 88:76-91.
205. Mueller F und Brimacombe R. 1997b. A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. I. Fitting the RNA to a 3D electron microscopic map at 20 Å. *J Mol Biol*. 271:524-544.
206. Mueller F, und Brimacombe R. 1997a. A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. II. The RNA-protein interaction data. *J Mol Biol*. 271:545-565.
207. Murashige T und Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15:473-497
208. Nagy F, Török I und Maliga P. 1981. Extensive rearrangement in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca*. *Mol Gen Genet*. 183:437-439.
209. Nakajima Y und Mulligan RM. 2001. Heat stress results in incomplete C-to-U editing of maize chloroplast mRNAs and correlates with changes in chloroplast transcription rate. *Curr Genet*. 40:209-213.
210. Neckermann K, Zeltz P, Igloi GL, Kossel H und Maier RM. 1994. The role of RNA editing in conservation of start codons in chloroplast genomes. *Gene*. 146:177-182.
211. Neuhaus H und Link G. 1987. The chloroplast tRNA Lys (UUU) gene from mustard (*sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related protein. *Curr Genet*. 11:251-257.
212. Nickelsen J, Fleischmann M, Boudreau E, Rahire M und Rochaix JD. 1999. Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast psbD gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. 11:957-970.
213. Nickelsen J. 2000. Mutations at three different nuclear loci of *Chlamydomonas* suppress a defect in chloroplast *psbD* mRNA accumulation. *Curr Genet*. 37:136-142.
214. Nimzyk R, Schondorf T und Hachtel W. 1995. In-frame length mutations associated with short tandem repeats are located in unassigned open reading frames of *Oenothera* chloroplast DNA. *Curr Genet*. 23: 265–270.
215. Obokata J, Mikami K, Hayashida N, Nakamura M und Sugiura M. 1993. Molecular heterogeneity of photosystem I. *psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaH*, and *psaL* are all present in isoforms in *Nicotiana* spp. *Plant Physiol*. 102:1259-1267.
216. Ogiwara Y, Isono K, Kojima T, *et al.* (16 co-authors). 2001. Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol Gen Genomics*. 266:740-746.
217. Ohme M, Kamogashira T, Shinozaki K und Sugiura M. 1985. Structure and cotranscription of tobacco chloroplast genes for tRNAGlu(UUC), tRNATyr(GUA) and tRNAAsp(GUC). *Nucl Acids Res*. 13:1047-1056.
218. Ohtani T, Uchimiyama H, Kato A, Harada H, Sugita M und Sugiura M. 1984. Location and nucleotide sequence of a tobacco chloroplast DNA segment capable of replication in yeast. *Mol Gen Genet*. 195:1-4.
219. Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H und Ozeki H. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA *Nature* 322:572-574.
220. Okamura JK und Goldberg RG. 1985. Tobacco single-copy DNA is highly homologous to sequences present in the genomes of its diploid progenitors. *Mol Gen Genet*. 198:290-298.
221. Olmstead R und Palmer JD. 1991. Chloroplast DNA and systematics in the solanaceae. In: *Solanaceae III. Taxonomy, chemistry and evolution*. Hawkes JG, Lester RN, Nee M und Estrada N (Hrsg.). Kew, Royal Botanic Gardens, Linnean Society of London, London, UK, pp. 161-168.

222. O'Neill C, Horvath GV, Horvath E, Dix PJ und Medgyesy P. 1993. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J.* 3:729-738.
223. Orozco EM Jr., Chen LJ und Eilers RJ. 1990. The divergently transcribed *rbcL* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. *Curr. Genet.* 17:65-71.
224. Palmer JD. 1991. Plastid Chromosomes: Structure and evolution. In: The molecular biology of plastids. Vol 7A: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Bogorad L und Vastl I. (Hrsg.). Academic press Inc., San Diego, USA, pp. 5-53.
225. Pandey KK, Grant JE und Williams EG. 1987. Interspecific hybridisation between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. *Aust j Bot.* 35:171-182.
226. Parokony AS und Kenton AY. 1995. Comparative physical mapping and evolution of the *Nicotiana tabacum* karyotype. In: Kew Chromosome Conference IV. Brandham PE, Bennet MD. (Hrsg). Royal Botanik Gardens, Kew, pp 301-320.
227. Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle R und Renard M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet.* 191:244-250.
228. Pental D, Hamill JD, Pirrie A und Cocking EC. 1986. Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* recovery of plants with *P. hybrida* nuclear genome and *N. tabacum* chloroplast genome. *Mol Gen Genet.* 202:342-347.
229. Perl A, Aviv D und Galun E. 1991. Protoplast fusion mediated transfer of oligomycin resistance from *Nicotiana glauca* to *Solanum tuberosum* by intergeneric cybridization. *Mol Gen Genet.* 225:11-16.
230. Peter S, Spang O, Medgyesy P und Schäfer C. 1999. Consequences of intergeneric chloroplast transfers on photosynthesis and sensitivity to high light. *Australian Journal of Plant Physiology.* 26:171-177.
231. Pohlheim F. 1986. Hybrid variegation in crosses between *Pelargonium zonale* (L.) l'Herit. ex Ait. and *Pelargonium inquinans* (L.) l'Herit ex Ait. *Plant Breed.* 97:93-96.
232. Przywara I, White DWR, Sanders PM und Maher D. 1989. Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using in ovulo embryo and embryo culture. *Ann Bot.* 64:613-624.
233. Randolph-Anderson BL, Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Johnson AM, Dorthu MP und Matagne RF. 1993. Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet.* 236:235-244.
234. Ratushnyak YI, Kochevenko AS, Chererp NN, Zavgorodnaya AV, Latypov SA und Gleba YY. 1995. Alloplasmic incompatibility in cybrid plants possessing a *Lycopersicon esculentum* Mill. genome and *Lycopersicon peruvianum* var. 'dentatum' Dun. plasmagenes. *Russ J Gen.* 341:665-571.
235. Reed ML und Hanson MR. 1997. A heterologous maize *rpoB* editing site is recognized by transgenic tobacco chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.* 17:6948-6952.
236. Reed ML, Peeters NM und Hanson MR. 2001. A single alteration 20 nt 5' to an editing target inhibits chloroplast RNA editing in vivo. *Nucleic Acids Res.* 29:1507-1513.
237. Regel RE, Ivleva NB, Zer H, Meurer J, Shestakov SV, Herrmann RG, Pakrasi HB und Ohad I. 2001. Deregulation of electron flow within photosystem II in the absence of the *PsbJ* protein. *J Biol Chem.* 276:41473-41478.
238. Renner O. 1934. Die pflanzlichen Plastiden als selbstständige Elemente der genetischen Konstitution. *Ber Sächs Akad Wiss Math Phys Kl.* 86:214-266.
239. Rivier C, Goldschmidt-Clermont M und Rochaix JD. 2001. Identification of an RNA-protein complex involved in chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 20:1765-1773.
240. Robinson C, Hynds PJ, Robinson D und Mant A. 1998. Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Plant Mol Biol.* 38:209-221.
241. Rochaix JD. 1996. Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol.* 32:327-341.
242. Rochaix JD. 1997. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. *Trends Plant Sci.* 2:419-425.

- 
243. Rochaix JD. 2001. Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol.* 125:142-144.
244. Rodermel S. 2001. Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci.* 6:471-478.
245. Rodermel SR, Abbott MS und Bogorad L. 1988. Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell.* 55:673-681.
246. Rolland N, Dorne AJ, Amoroso G, Sultemeyer DF, Joyard J und Rochaix JD. 1997. Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* 16:6713-6726.
247. Ruf S, Biehler K und Bock R. 2001. A small chloroplast-encoded protein as a novel architectural component of the light-harvesting antenna. *J Cell Biol.* 149:369-378.
248. Ruf S, Kossel H und Bock R. 1997. Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol.* 139:95-102.
249. Ruf S, Zeltz P und Kössel, H. 1994. Complete RNA editing of unspliced and dicistronic transcripts of the intron-containing reading frame IRF170 from maize chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:2295-2299.
250. Rujan T und Martin W. 2001. How many genes in *Arabidopsis* come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. *Trends Genet.* 17:113-120.
251. Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual.* 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
252. Sanger F, Nicklen S und Coulsen AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 74:5463-5467.
253. Sasaki Y, Kozaki A, Ohmori A, Iguchi H und Nagano Y. 2001. Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants. *J Biol Chem.* 276:3937-3940.
254. Sasaki Y, Tomoda Y, Tomi H, Kamikubo T und Shinozaki K. 1985. Synthesis of ribulose biphosphate carboxylase in greening pea leaves. Coordination of mRNA level of two subunits. *Eur J Biochem.* 152:179-186.
255. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E und Tabata S. 1999. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 6:283-290.
256. Schmitz-Linneweber C, Maier RM, Alcaraz JP, Cottet A, Herrmann RG und Mache R. 2001. The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol Biol.* 45:307-15.
257. Schwarz Z und Kössel H. 1980. The primary structure of 16S rDNA from *Zea mays* chloroplast is homologous to *E. coli* 16S rRNA. *Nature.* 283:739-742.
258. Shields DC und Wolfe KH. 1997. Accelerated evolution of sites undergoing mRNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Mol Biol Evol.* 14:344-349.
259. Shiina T, Allison L, Maliga P. 1998. *rbcL* Transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell.* 10:1713-1722.
260. Shimada H und M Sugiura. 1991. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucl Acids Res.* 19:983-995.
261. Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, *et al.* (20 Koautoren). 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression *EMBO J.* 5:2043-2049.
262. Soltis DE und Soltis PS. 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:8089-8091.
263. Soltis DE, Tago-Nakazawa M, Xiang QY, Kawano S, Murata J, Wakabayashi M und Hibschi-Jetter C. 2001. Phylogenetic relationships and evolution in *Chrysosplenium* (Saxifragaceae) based on *matK* sequence data. *Am J Bot.* 88:883-893.
264. Song K, Lu P, Tang K und Osborn TC. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:7719-7723.
265. Song KM, Tang KL und Osborn TC. 1993. Development of synthetic *Brassica* amphidiploids by reciprocal hybridization and comparison to natural amphidiploids. *Theor Appl Genet.* 86:811-821.
-



- 
266. Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-517.
267. Sperisen C, Ryals J und Meins F. 1991. Comparison of cloned genes provides evidence for intergenomic exchange of DNA in the evolution of a tobacco glucan endo-1,3-beta-glucosidase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:1820-1824.
268. Spurr AR. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res.* 26:31-43.
269. Sriraman P, Silhavy D und Maliga P. 1998a. The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucl Acids Res.* 26:4874-4879.
270. Sriraman, P, Silhavy D und Maliga P. 1998b. Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol.* 117:1495-1499.
271. Staub JM und Maliga P. 1993. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J.* 12:601-606.
272. Staub JM und Maliga P. 1994. Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J.* 6:547-53.
273. Stern DB, Radwanski ER und Kindle KL. 1991. A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*. *Plant Cell.* 3:285-297.
274. Stoebe B, Martin W und Kowallik KV. 1998. Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes. *Plant Mol Biol Rep.* 16:243-255.
275. Stubbe W. 1959. Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. *Z Vererbungsl.* 90: 288-298.
276. Stubbe W. 1989. *Oenothera* – an ideal system for studying the interactions of genome and plastome. *Plant Mol Biol Rep.* 7:245-257.
277. Sugita M und Sugiura M. 1984. Nucleotide Sequence and transcription of the gene for the 32,000 dalton thylakoid membrane protein from *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet.* 195:308-313.
278. Sugita M, Svab Z, Maliga P und Sugiura M. 1997. Targeted deletion of *sprA* from the tobacco plastid genome indicates that the encoded small RNA is not essential for pre-16S rRNA maturation in plastids. *Mol Gen Genet.* 257:23-7.
279. Sugiura M, Hirose T und M. Sugita. 1998. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu Rev Genet.* 32:437-59.
280. Sugiura M, Shinozaki K, Zaita N, Kusuda M und Kumano M. 1986. Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping eleven ribosomal genes. *Plant Sci.* 44:211–216.
281. Sugiura M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol Biol.* 19:149-168.
282. Sugiura M. 1995. The chloroplast genome. *Essays Biochem.* 30:49-57.
283. Svab Z, Hejduckiewicz P und Maliga P. 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 87:8526-30.
284. Svab Z und Maliga P. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:913-917.
285. Svab Z, Hajdukiewicz P und Maliga P. 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:8526-8530.
286. Swiatek M, Greiner S, Kemp, S, Drescher A, Koop HU, Herrmann RG und Maier RM. Pulsed-field gel electrophoresis, a sensitive tool to judge the hetero- or homoplasmic status of plastid transformants. zur Veröffentlichung eingereicht.
287. Swiatek M, Kuras R, Sokolenko A, Higgs D, Olive J, Cinque G, Muller B, Eichacker LA, Stern DB, Bassi R, Herrmann RG und Wollman FA. 2001. The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture. *Plant Cell.* 13:1347-1367.
288. Thanh ND und Medgyesy P. 1989. Limited chloroplast transformation via recombination overcomes plastome-genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*. *Plant Mol Biol.* 12:87-93.
-

289. The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408:796-815.
290. Till B, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R und Barkan A. 2001. CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA*. 7:1227-1238.
291. Tillich M. 2002. Genexpression in Plastiden höherer Pflanzen: Splicingabhängige RNS-Edierung in Tabakplastiden. Diplomarbeit Uni München.
292. Tillich M, Schmitz-Linneweber, C, Herrmann, RG und Maier, RM. 2001. The plastid chromosome of maize (*Zea mays*): Update of the complete sequence and transcript editing sites. *Maize Genet Corp News Letters*. 75:42-44.
293. Tsudzuki T, Wakasugi T und Sugiura M. 2001. Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. *J Mol Evol*. 53:327-332.
294. Turmel M, Otis C und Lemieux C. 1999. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:10248-10253.
295. van Buuren M, Neuhaus JM, Shinshi H, Ryals J und Meins FJr. 1992. The structure and regulation of homeologous tobacco endochitinase genes of *Nicotiana sylvestris* and *N. tomentosiformis* origin. *Mol Gen Genet*. 232:460-469.
296. Vaucheret H, Vincentz M, Kronenberger J, Caboche M und Rouze P. 1989. Molecular cloning and characterisation of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol Gen Genet*. 216:10-15.
297. Vera A und Sugiura M. 1994. A novel RNA gene in the tobacco plastid genome: its possible role in the maturation of 16S rRNA. *EMBO J*. 13:2211-7.
298. Vera A und Sugiura M. 1995. Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr Genet*. 27:280-284.
299. Vera A, Hirose T und Sugiura M. 1996. A ribosomal protein gene (*rp132*) from tobacco chloroplast DNA is transcribed from alternative promoters: similarities in promoter region organization in plastid housekeeping genes. *Mol Gen Genet*. 251:518-525.
300. Vera A, Matsubayashi T und Sugiura M. 1992. Active transcription from a promoter positioned within the coding region of a divergently oriented gene: the tobacco chloroplast *rp132* gene. *Mol Gen Genet*. 233:151-156.
301. Volkov RA, Borisjuk NV, Panchuk II, Schweizer D und Hemleben V. 1999. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Mol. Biol. Evol*. 16:311-320.
302. Wakasugi T, Hirose T, Horiata M, Tsudzuki T, Kossel H, und Sugiura M. 1996. Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:8766-8770.
303. Wang X, Kang D, Feng S, Serino G, Schwechheimer C und Wei N. 2002. CSN1 N-terminal-dependent activity is required for *Arabidopsis* development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of dullins: a structure-function study of CSN1 subunit of COP9 signalosome. *Mol Biol Cell*. 13:646-655.
304. Weihe A und Börner T. 1999. Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends Plant Sci*. 4:169-170.
305. Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*. 42:225-249.
306. Westhoff P und Herrmann RG. 1988. Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur J Biochem*. 171:551-564.
307. Whitney SM, von Caemmerer S, Hudson GS und Andrews TJ. 1999. Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiol*. 121:579-588.
308. Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG und Sanford JC. 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:2726-2730.
309. Winter P und Herrmann RG. 1987. A five-base-pair-deletion in the gene for the large subunit causes the lesion in the ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase-deficient plastome mutant sigma of *Oenothera hookeri*. *Bot Acta*. 101:42-48.

310. Wolfe KH, Li WH und Sharp PM. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9054-9058.
311. Wolfe KH, Morden CW und Palmer JD. 1992. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:10648-10652.
312. Wolfson R, Higgins KG und Sears BB. 1991. Evidence for replication slippage in the evolution of *Oenothera* chloroplast DNA. *Mol Biol Evol.* 8:709-720.
313. Wu D, Wright DA, Wetzel C, Voytas DF und Rodermeil S. 1999. The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell.* 11:43-55.
314. Xie Z und Merchant S. 1996. The plastid-encoded *ccsA* gene is required for heme attachment to chloroplast c-type cytochromes. *J Biol Chem.* 271:4632-4639.
315. Yao JL und Cohen D. 2000. Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theor Appl Genet.* 101:400-406.
316. Yao JL; Cohen D und Rowland RE. 1994. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (Araceae). *Theor Appl Genet.* 88: 255-260.
317. Yao, WB, Meng BY, Tanaka M und Sugiura M. 1989. An additional promoter within the protein-coding region of the *psbD-psbC* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Nucl Acids Res.* 17:9583-9591.
318. Young BA, Anthony LC, Gruber TM, Arthur TM, Heyduk E, Lu CZ, Sharp MM, Heyduk T, Burgess RR und Gross CA. 2001. A coiled-coil from the RNA polymerase beta' subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by sigma(70). *Cell.* 105:935-944.
319. Yu W und Schuster W. 1995. Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria. *J Biol Chem.* 270:18227-18233.
320. Zeltz P, Hess WR, Neckermann K, Börner T und Kossel H. 1993. Editing of the chloroplast *rpoB* transcript is independent of chloroplast translation and shows different patterns in barley and maize. *EMBO J.* 12:4291-4296.
321. Zeltz P, Kadowaki K, Kubo N, Maier RM, Hirai A und Kossel H. 1996. A promiscuous chloroplast DNA fragment is transcribed in plant mitochondria but the encoded RNA is not edited. *Plant Mol Biol.* 31:647-656.
322. Zerges W. 2000. Translation in chloroplasts. *Biochimie* 82:583-601.
323. Zito F, Kuras R, Choquet Y, Kössel H und Wollman FA. 1997. Mutations of cytochrome b6 in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol.* 33:79-86.
324. Zubko MK, Zubko EI, Ruban AV, Adler K, Mock HP, Misera S, Gleba YY und Grimm B. 2001. Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. *Plant J.* 25:627-39.

## Danksagung

Diese Arbeit entstand am Lehrstuhl I des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann. Bei ihm möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die interessante Themenstellung bedanken. Seine Hilfestellungen in der Interpretation und Analyse von Daten haben ganz wesentlich zu meinem Verständnis wissenschaftlichen Diskurses beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Stephan bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Dr. Rainer Maier war die Seele dieser Arbeit. Vielen Dank für all die Ideen, Ratschläge und vor allem für die unendliche Geduld, mit der er mich immer wieder aufs Neue zu motivieren verstand. Schade nur, daß er auf Grund von Sippenhaft Fan des FC Bayern wurde...

Julia Legen hat mich bei der Anfertigung von "*macroarrays*" unterstützt und mit ihren Sprachjonglierkünsten meinen Wortschatz entscheidend erweitert. Vielen Dank für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld. Und was für ein Salatdressing!

Ohne Michi Tillich hätte es keine *ndhA*-Spleiß-Edierungsgeschichte gegeben. Seine Unterstützung und sein Enthusiasmus – damals noch als Michillennium-Hiwi – waren Voraussetzung für einen gelungenen Abschluß dieses Projektes.

Ihr perfekt organisiertes Sequenzierlabor und ihre aktive und beraterische Tätigkeit in Sequenzier- und Hauskaterfragen machten Ingrid Duschanek zu einer der Säulen dieser Doktorarbeit. Danke!

Holger Hupfers Hilfe bei Sequenzvergleichen und ganz allgemein bei Problemen mit störrischen Computerprogrammen hat mich vor dem einen oder anderen Nervenzusammenbruch bewahrt. Abgesehen davon bin ich ihm als exzellenten Stellspieler der "Hot Schenkel" zu tiefem Dank verpflichtet.

Sabine Kemps kritisches Hinterfragen meiner Projekte hat mich oft in Verzweiflung gestürzt. Zum Glück hatte sie meist gleich eine Lösung des jeweiligen Problems parat. Danke für die massive technische und intellektuelle Unterstützung!

Anina Neumann hatte sehr viel Geduld mit unleserlichen Anfragen und Aufträgen. Ich glaube, die paar Monate, in denen Sie sich um meine Cybriden gekümmert hat, waren die glücklichste Zeit für die armen Pflänzchen.

Ralph Regel danke ich für die Einführung in die Gewebekultur und Transformation der Cybride.

Herrn Prof. Dr. G. Wanner danke ich für die elektronenoptischen Untersuchungen.

Schließlich möchte ich mich noch bei allen anderen Labormitbewohnern bedanken, die mir das Leben in 016 versüßt haben: Peter Poltnigg, Moni Wimmer, Anja Drescher, Martin Lensch, Helena Funk, Martina Silber, Irmi Reiber, Cristina dal Bosco, Jarda, Giusy Canino, Lina Leshneva, Lena Pojidaeva, Elli Gericke, Martina Reimers, Dr. Anna Sokolenko, Gisela Nagy und Frau Maurus.

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern, die mich ohne wenn und aber all die Studienjahre unterstützt haben.

## PUBLIKATIONSLISTE

1. Legen J, Schmitz-Linneweber C, Drescher A, Hupfer H, Tillich M, Herrmann RG und Maier RM. 2001. Decoding of the *ndhH* operon from spinach: an example for the complexity of plastid gene expression in higher plants. *Endocytobiosis and Cell Res.* 14, 11-20.
2. Schmitz-Linneweber C, Maier RM, Alcaraz J-P, Cottet A, Herrmann RG, Mache R. 2001a. The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol Biol.* 45:307-315.
3. Schmitz-Linneweber C, Tillich M, Herrmann RG und Maier RM. 2001b. Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: allotetraploidy provides trans-factors. *EMBO J.* 20:4874-4883.
4. Till B, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R und Barkan A: 2001. CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA.* 7:1227-38.
5. Tillich M, Schmitz-Linneweber C, Herrmann RG und Maier RM. 2001. The plastid chromosome of maize (*Zea mays*): Update of the complete sequence and transcript editing sites. *Maize Genet. Corp. News Letters* 75:42-44
6. Schmitz-Linneweber C, Regel R, Du TG, Hupfer H, Herrmann RG und Maier RM. 2002. The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol.* Im Druck.
7. Schmitz-Linneweber C, Herrmann RG und Maier RM. 2002. The fluctuation of plastid RNA editing in plant evolution. In: (Endo)Symbiosis and Eukaryotic Organelles (Sugiura, M. ed). Logos, Berlin. Im Druck.
8. Herrmann RG, Maier RM und Schmitz-Linneweber C. (2002): Thylakoid biogenesis and dynamics: the result of a complex phylogenetic puzzle. In: Comparative functional genomics of chloroplasts, mitochondria and their bacterial – new perspectives on symbiosis and cell evolution. (Raven, J., Allen, J. eds) *Philosophical Transactions: Biological Sciences.* The Royal Society Publications, London. Im Druck.
9. Sabater B, Martin M, Schmitz-Linneweber C und Maier RM. The Origin and Evolution of Plastid RNA Editing: Clustering of RNA Editing Sites as a Consequence of Transitory Loss of Gene Function? Zur Veröffentlichung eingereicht.
10. Schmitz-Linneweber C, Regel R, Gleba Y, Wanner G, Herrmann RG und Maier RM. Nucleus/organelle incompatibility: reading and editing of tobacco plastid genetic information is impaired in an *Atropa* nuclear background. Zur Veröffentlichung eingereicht.

# Lebenslauf

**Christian Schmitz-Linneweber**

## PERSÖNLICHE DATEN

Adresse

Grasgartenweg 20  
81249 München  
0049-(089)86308172 (privat)  
0049-(089)17861-219 (Arbeit)  
csl@botanik.biologie.uni-  
muenchen.de

Familienstand

ledig

Nationalität

deutsch

Geburtsdatum und -ort

25.10.1971, Haltern, Deutschland

## AUSBILDUNG

Abitur 1991: Städtisches Gymnasium, Haltern

Zivildienst, St. Sixtus Hospital, Haltern 1991/1992

Diplom-Studium, 1992-1998

VORDIPLOM 1994: Westfälische Wilhelms Universität, Münster

DIPLOM 1998: Eberhard Karls Universität, Tübingen

HAUPTFACH: Biologie (Genetik)

NEBENFÄCHER: Biochemie und

Pflanzenphysiologie

DIPLOMARBEIT: Cloning of the *crs1* gene, a nuclear gene in *Zea mays* that mediates the splicing of the chloroplast *atpF* mRNA.

ABSCHLUSS: sehr gut (1.0) April 1998.

Dissertation, 1999-2002

Botanisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München

TITEL: Genetische Determinanten von kompartimenteller Inkompatibilität in Genom/Plastom-Artbastarden.

## **AKADEMISCHE AUSZEICHNUNGEN**

Jahresstipendium des Landes Baden-Württemberg für einen Hochschulaufenthalt in den USA, 1996-1997.

Peter Sitte Preis der deutschen Sektion der Internationalen Gesellschaft für Endozytobiologie, September 2000.

1. Preis der FEBS (Federal European Biochemistry Societies) für die Posterpräsentation ' *Nucleus-Plastome Incompatibility in Tobacco/Atropa Cybrids.*' beim Advanced course on Origin and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts, April 2001 in Hvar, Kroatien.

DAAD-Stipendium für einen Kurzaufenthalt in Nagoya, Japan Oktober/November 2001

## **EXTERNE FORSCHUNGSaufenthalte**

Diplomarbeit im Labor von Alice Barkan, Department of Molecular Biology; University of Oregon, Eugene, USA, September 1996-August 1997

Drei Kurzaufenthalte am Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain (Acciones Integradas Hispano-Alemanas): Koordinierung von gemeinsamen Forschungsprojekten zwischen der Gruppe von Prof. Bartolomé Sabater und Dr. Rainer Maier, Dezember 1999, November 2000, März 2001.

Kurzaufenthalt im Labor von Prof. M. Sugiura in Nagoya, Japan zur Erlernung eines plastidären *in vitro* Edierungssystems Oktober/November 2001

## **MITGLIEDSCHAFT**

Student. Mitglied, Internationale Gesellschaft für Endozytobiologie, seit Januar 2001.

## **FORSCHUNGSgebiet**

Kern-Plastom Inkompatibilität / plastidäre RNA-Edierung und Speziation / Einbettung von RNA-Edierung in posttranskriptionelle Prozessierung