

Vergleichende Sequenzanalyse der fünf Grundplastome der Sektion
***Oenothera* (Gattung *Oenothera*) –**
Analyse des Cytochrom-Komplexes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Holger Hupfer

aus München

2002

1. Gutachter: Prof. R. G. Herrmann

2. Gutachter: Prof. L. Eichacker

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2003

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Plastidengenom (Plastom)	1
1.2 Funktionen des Plastoms	5
1.3 Multiproteinkomplexe.....	6
1.3.1 Die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran	6
1.3.2 <i>Clp</i> -Protease	7
1.4 Plastiden-spezifische Gendefekte	8
1.5 Inkompatibilität zwischen Genom und Plastom.....	11
1.6 Die Gattung <i>Oenothera</i>	12
1.7 <i>Oenothera</i> als Modell zur Untersuchung von Genom-/Plastom-Inkompatibilität	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Geräte	17
2.2 Material	18
2.2.1 Chemikalien.....	18
2.2.2 Enzyme	18
2.2.3 Längenstandards	18
2.2.4 Bakterienstämme	19
2.2.5 Plasmide	19
2.2.6 Synthetische Oligonukleotide.....	19
2.2.7 Medien und Lösungen zur Anzucht von Bakterien.....	22
2.2.8 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Pflanzen.....	22

2.2.9	Allgemeine Lösungen.....	26
2.2.10	Pflanzenmaterial	27
2.2.11	Verbrauchsmaterialien	28
2.3	Methoden.....	28
2.3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	28
2.3.2	Gerichtete Mutagenese von Plastiden-DNA.....	30
2.3.3	Methoden zur Manipulation und Analyse von DNA	33
2.3.4	Methoden zur Manipulation und Analyse von RNA.....	38
2.3.5	Methoden zur Analyse von Proteinen	43
2.3.6	Bioinformatische Methoden	47
3	ERGEBNISSE.....	49
3.1	Phänotypen der Kern-Plastidengenom-Kombinationen.....	49
3.2	Allgemeine Struktur der <i>Oenothera</i>-Plastidengenome	51
3.3	Genomorganisation	54
3.3.1	Gengehalt.....	55
3.3.2	Intronen.....	58
3.3.3	Grenzen zwischen den Einzelkopieregionen und den invertierten Repetitionen .	60
3.3.4	Pseudogene	62
3.3.5	Repetitive Elemente.....	63
3.3.6	Regulatorische Elemente	65
3.3.7	Nutzung von Aminosäurekodonen (“codon usage“).....	68
3.3.8	Verteilung von Start-/Stoppkodonen.....	69
3.3.9	Proteine und abgeleitete Struktur	71
3.3.10	Edierungsmuster	82
3.4	Die Plastommutante IIγ.....	85
3.4.1	Phänotyp der Mutante.....	85
3.4.2	Ultrastruktur der Plastiden.....	86
3.4.3	Immunochemische Analysen.....	86
3.4.4	Lokalisation der Mutation	89
3.5	Die Plastommutante IIθ	90

3.5.1	Phänotyp der Mutante.....	90
3.5.2	Ultrastruktur der Plastiden.....	90
3.5.3	Fluoreszenzanalysen.....	91
3.5.4	Lokalisation der Mutation.....	92
3.5.5	Expression von <i>petB</i>	95
3.5.6	Immunologische Analysen.....	97
3.6	Weitere Plastommutanten	98
3.6.1	Weitere <i>Oenothera</i> -Mutanten.....	98
3.6.2	Punktmutanten von <i>petA</i> in Tabak.....	99
4	DISKUSSION.....	101
4.1	Jedes <i>Oenothera</i> -Plastom kodiert für 78 Proteine und 34 RNAs	102
4.2	Repetitionsbedingte Längenvarianzen zwischen den Plastomen betreffen keine konservierten Regionen einzelner Gene	102
4.3	Genlokalisierte Deletionen können die Funktionalität der Genprodukte beeinträchtigen.....	103
4.4	Die regulatorischen Sequenzen sind zwischen den fünf Plastomen hoch konserviert.....	103
4.5	Die Integration eines <i>trnV</i> ^{GAC} -Pseudogens in Plastom I hat keinen Einfluss auf das Transkriptmuster des rRNA-Operons.....	105
4.6	Die Unterschiede an den Exon/Intron-Grenzen beeinflussen den korrekten Spleißvorgang nicht.....	106
4.7	Die Variation der Start-/Stoppkodonen beeinflusst die Genexpression nicht	107
4.8	In allen fünf <i>Oenothera</i> -Plastomen werden die Aminosäurekodonen mit gleicher Häufigkeit benutzt	108
4.9	Von den beiden Genen für Initiator-tRNAs ist nur eine Variante unter dikotylen Pflanzen konserviert.....	108

4.10	Aminosäureunterschiede der plastidär kodierten Proteine können die Interaktion mit nukleär kodierten Proteinuntereinheiten beeinträchtigen.....	109
4.10.1	Die plastidär-kodierte P-Untereinheit der <i>Clp</i> -Protease ist möglicherweise nicht proteolytisch aktiv.....	109
4.10.2	Der durch Plastom II kodierte N-Terminus des <i>CemA</i> -Proteins der Plastidenhüllmembran liegt auf der „falschen“ Membranseite	110
4.10.3	Einzelne Aminosäureautausche können durch Edierung kompensiert werden ..	111
4.11	Die unterschiedlichen Vermehrungsgeschwindigkeiten sind möglicherweise mit einer Struktur nahe der Initiator-tRNA-Gene assoziiert.....	112
4.12	Mögliche Beteiligung der Stammschleifenstruktur im intergenischen Bereich zwischen <i>trnM</i> und <i>trnG</i> an der Stabilisierung des <i>trnM</i>-Transkripts und Gewährleistung der Verfügbarkeit der Initiator-tRNA	114
4.13	Die Determinaten für Genom/Plastom-Inkompatibilität in <i>Oenothera</i> sind sehr wahrscheinlich für jede Kombination verschieden	115
4.14	Die Plastommutante IIγ besitzt ein defekte α-Untereinheit des Cytochroms b₅₅₉....	118
4.15	Die Plastommutante IIθ kann aufgrund einer Deletion zweier Basenpaare das <i>petB</i>-Transkript nicht mehr spleißen.....	118
5	ZUSAMMENFASSUNG	120
6	LITERATUR.....	123
7	PUBLIKATIONEN.....	143
	DANKSAGUNG	144
	LEBENS LAUF	145

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
<i>aadA</i>	Gen für die Spektinomycinresistenz
AA-I	Genotyp AA mit Plastom I aus <i>Oenothera elata</i> ssp. <i>hookeri</i> Rasse <i>Johansen</i> (Wildtyp)
AA-II	Genotyp AA mit Plastom II aus <i>Oenothera biennis</i>
AA-III	Genotyp AA mit Plastom III aus <i>Oenothera glazioviana</i>
AA-IV	Genotyp AA mit Plastom IV aus <i>Oenothera parviflora</i>
<i>acc</i>	Gen für Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>atp</i>	Gen für Untereinheit der ATP-Synthase
BAP	6-Benzylaminopurin
BC-IV	Genotyp BC mit Plastom IV aus <i>Oenothera parviflora</i> (Wildtyp)
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CC-V	Genotyp CC mit Plastom V aus <i>Oenothera argillicola</i> (Wildtyp)
cDNA	komplementäre DNA
CES	Kontrolle epistatischer Synthese (von engl.: <i>control of epistatic synthesis</i>)
CP	Chlorophyllbindungsprotein
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
<i>cv.</i>	Kultursorte
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E ₅₅₀	Extinktion bei 550 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol- <i>bis</i> (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
G	Guanosin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<i>inf</i>	Gen für translationalen Initiationsfaktor
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IR	invertierte Sequenzwiederholung (von engl.: <i>inverted repeat</i>)
kBp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LSC	grosse Einzelkopieregion (von engl.: <i>large single copy region</i>)
M	Mol pro Liter
<i>mat</i>	Gen für Maturase-ähnliches Protein
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropylsulfonsäure
mRNA	Botenribonukleinsäure (von engl.: <i>messenger RNA</i>)
NAA	1-Naphthylessigsäure
NADH	reduziertes Nicotinsäure-adenin-dinukleotid
NADP ⁺	oxidiertes Nicotinsäure-adenin-dinukleotidphosphat

<i>ndh</i>	Gen für Untereinheit der NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase
<i>p. a.</i>	Analysenqualität
<i>P. hartwegii</i>	<i>Pinus hartwegii</i>
<i>P. montezumae</i>	<i>Pinus montezumae</i>
P700	Reaktionzentrumsproteine des PS I
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>pet</i>	Gen für Untereinheit der plastidären Elektronentransportkette
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
<i>psa</i>	Gen für Untereinheit des Photosystem I
<i>psb</i>	Gen für Untereinheit des Photosystem II
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (von engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleotid-5'-triphosphat
<i>rpl</i>	Gen für Protein der grossen ribosomalen Untereinheit
<i>rpo</i>	Gen für Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rps</i>	Gen für Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	kleine Einzelkopieregion (von engl.: <i>small single copy region</i>)

Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
<i>trn</i>	Gen für Transfer-RNAs
tRNA	Transferribonukleinsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
<i>ycf</i>	hypothetisches Leseraster in Chloroplasten (von engl.: <i>hypothetical chloroplast reading frame</i>)

Abkürzungen für Einheiten des internationalen Masssystems (SI-Einheiten) und chemische Verbindungen sind nicht aufgelistet.

1 Einleitung

1.1 Das Plastidengenom (Plastom)

Schon seit am Anfang des 20. Jahrhunderts von MERESCHKOWSKY die Hypothese formuliert wurde, dass zwischen Plastiden und Wirtszellen eine symbiotische Beziehung bestehen müsse (Mereschkowsky 1910), wurde immer wieder über den Ursprung der Organellen diskutiert (Raven 1970; Gray und Doolittle 1982). Im Jahre 1970 wurde von Lynn MARGULIS die Endosymbiontenhypothese formuliert, nach der sowohl die Mitochondrien und die Plastiden von ehemals freilebenden Eubakterien abstammen (Margulis 1970; Gray 1989). Nach heutigem Kenntnisstand ist der Ursprung von Mitochondrien und Plastiden monophyletisch, d. h. alle heutigen Mitochondrien und die daraus sekundär hervorgegangenen Hydrogenosomen (Müller 1993) von mitochondrienlosen Pilzen und Protisten gehen auf ein einziges Endosymbioseereignis zurück (Woese 1977; Whatley *et al.* 1979; Bui *et al.* 1996; Dyall und Johnson 2000). Ebenso sind die heute vorkommenden Plastiden, die von nur zwei Membranen umschlossen werden, das Ergebnis eines zweiten singulären Endosymbioseereignisses, bei dem ein Chlorophyll und Phycobilisomen enthaltender Prokaryot in eine eukaryotische Zelle mit archaebakteriellem Charakter (Gray 1989; Herrmann 1997; Martin und Müller 1998; Xiong *et al.* 2000), die bereits über Mitochondrien verfügte, aufgenommen wurde. Aus phylogenetischen Untersuchungen lässt sich heute der Ursprung der Mitochondrien aus dem Kreis der α -Proteobakterien (Rotte *et al.* 2000), der Ursprung der Plastiden aus mit den heutigen Cyanobakterien verwandten Prokaryoten ableiten (Bhattacharya und Medlin 1998; Qiu und Palmer 1999).

Nach der Aufnahme in die Wirtszelle wurden die Prokaryoten in ein bestehendes genetisches System integriert, wobei nahezu der gesamte Grundstoffwechsel der Symbionten von der Wirtszelle übernommen wurde und ein massiver Gentransfer aus den Organellen in den Zellkern einsetzte (Herrmann 1997; Martin und Herrmann 1998). Andere Gene, auch Gene des Wirts, gingen aufgrund der funktionellen Redundanz oder einer nicht länger benötigten Funktion ihres Produkts verloren. Alle plastidären Gene, die für Komponenten des Grundstoffwechsels kodieren sowie alle regulatorischen Untereinheiten der photosynthetischen und metabolischen Multiproteinkomplexe wurden im Verlauf der Evolution komplett, die von komplexen Strukturen teilweise in den Zellkern übertragen. Die letzteren sind daher dualen genetischen Ursprung. Die Expression kern- und plastomkodierter Gene für solche Komponenten der Zellorganellen muss daher koordiniert und streng reguliert erfolgen (Herrmann 1997; Martin und Herrmann 1998).

Von der ehemals in Cyanobakterien vorhandenen genetischen Information verblieben ungefähr 3 % als plastidäre DNA (Desoxyribonukleinsäure, von englisch: deoxyribonucleic acid) in Form der Organellengenome (Kaneko *et al.* 1996; Race *et al.* 1998). Die Bestimmung der Gesamtsequenzen von mittlerweile mehr als zwanzig Plastidengenomen (Plastome) von Algen (z. B. Hallick *et al.* 1993; Kowallik *et al.* 1995; Reith und Munholland 1995; Stirewalt *et al.* 1995; Wakasugi *et al.* 1997; Douglas und Penny 1998), Moosen (Ohyama *et al.* 1986) und Landpflanzen (Shinozaki *et al.* 1986; Hiratsuka *et al.* 1989; Wolfe *et al.* 1992; Wakasugi *et al.* 1994; Maier *et al.* 1995; Sato *et al.* 1999; Schmitz-Linneweber *et al.* 2001, 2002) ergab bemerkenswerte Gemeinsamkeiten zwischen in der Phylogenie wenig verwandten Linien. Sowohl in der strukturellen Anordnung als auch in der Kodierungskapazität sind die Unterschiede zwischen Algen und höheren Pflanzen sehr gering. Zwar gingen während der Evolution innerhalb der Linie, die zu den Grünalgen und Landpflanzen führt, und der Linie, die zu den Rotalgen führt, jeweils andere Gene verloren, der größte Teil hingegen ist identisch (Martin *et al.* 1998). Diese Gene kodieren größtenteils für Untereinheiten der in der Thylakoidmembran lokalisierten Multiproteinkomplexe oder für Komponenten des genetischen Systems, um diese Information zu dekodieren (Shinozaki *et al.* 1986).

Innerhalb der Landpflanzen sind die Plastome hinsichtlich des Gengehalts noch stärker konserviert. Die Plastome der Organellen, die direkt aus der „primären Endosymbiose“ hervorgegangen sind (Delwiche und Palmer 1996; Douglas 1998; Gray 1999; Martin *et al.* 1998), also die der Glaucocystophyten, Rotalgen und Grünalgen einschliesslich der Landpflanzen, besitzen 45 Proteine kodierende Gene (Martin *et al.* 1998) sowie 34 Gene für

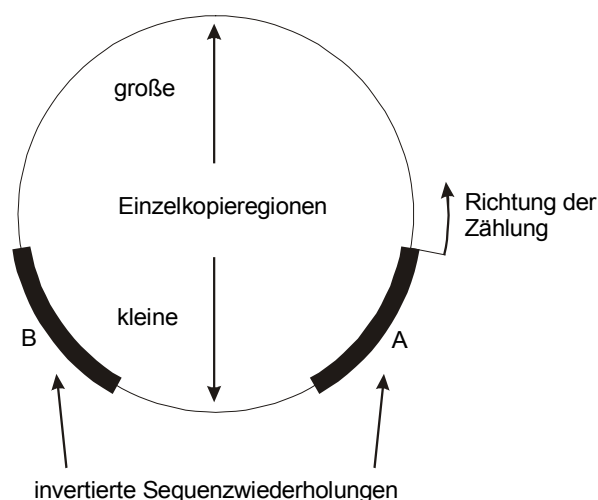


Abbildung 1.1: Allgemeines Schema der Landpflanzenplastome (z. B. Tabak oder Spinat)

strukturelle Ribonukleinsäuren (RNA, von englisch: ribonucleic acid), also für ribosomale RNAs und Transfer-RNAs (tRNAs) gemeinsam. In den Glaucocystophyten und Rotalgen liegt die Gesamtzahl der Gene bei bis zu 220 (in *Porphyra purpurea*, Reith und Munholland 1995), in den Grünalgen und Landpflanzen bei etwa 120-140 (Shinozaki *et al.* 1986; Wakasugi *et al.* 1997).

Bei verschiedenen Arten oder innerhalb ganzer Linien wurden Gene verloren, jedoch stellen diese Verluste Ausnahmen dar (Martin *et al.* 1998). So fehlen in den Plastomen der Monokotyledonen die beiden längsten Leseraster *ycf1* und *ycf2* (Katayama und Ogihara 1996). Den in Dikotyledonen essentiellen Genen konnte bisher noch keine Funktion zugewiesen werden (Drescher *et al.* 2000). In den höheren Dikotelydonen, jedoch nicht in Spinat (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001), fehlt hingegen das Gen für den Translations-Initiationsfaktor 1 (*infA*); die oben genannten Gene sind komplett vorhanden (Millen *et al.* 2001).

In allen drei Genomen der Gräser fehlt *accD*, das für die katalytische Untereinheit der (eubakteriellen) Acetyl-CoA-Carboxylase, einem Enzym des Fettsäurestoffwechsels, kodiert. Die Funktion wurde von einer Isoform des eukaryotischen Enzyms, das in die Plastiden importiert wird, übernommen (Sasaki *et al.* 1995).

Ein Vergleich der Plastome von Tabak (*Nicotiana tabacum*, Magnoliophyta) und des Lebermooses *Marchantia polymorpha* zeigt die allgemein in den Gefäßpflanzen konservierte Strukturierung des Plastoms (

Abbildung 1.1) in eine kleine und eine grosse Einzelkopieregion (SSC bzw. LSC, von englisch: small single copy region bzw. large single copy region), die durch ein Paar invertierter Sequenzwiederholungen (IR_A bzw. IR_B, von englisch: inverse Repetitionen A bzw. B), die die Gene für die ribosomalen RNAs (rRNA) enthalten, auf (Palmer und Stein 1986).

Durch Expansion/Reduktion der invertierten Sequenzwiederholungen können die einzelnen Regionen zum Teil deutliche Längendifferenzen aufweisen. Hierdurch kann es an den Grenzen der einzelnen Segmente zu einer Verlagerung der Gene kommen, die in diesen Regionen lokalisiert sind. Das Plastom von *Pelargonium hortorum* (Palmer *et al.* 1987a) besitzt deutlich verlängerte IR-Regionen. Deren Länge beträgt 76 kBp gegenüber 25 kBp in Tabak, wodurch die grosse Einzelkopieregion nur ca. 58 kBp, und die kleine Einzelkopieregion nur 7 kBp umfasst. Der Zahl der Gene in den einzelnen Abschnitten unterscheidet sich in diesem Fall durch die massive Expansion stark von anderen Angiospermen wie Tabak oder Spinat.

Die Plastome der nicht-photosynthetisch aktiven Parasiten, wie zum Beispiel von *Epifagus virginiana* (Wolfe *et al.* 1992) oder *Lathrea clandestina* (Delavault *et al.* 1995), weisen ebenfalls die typische quatripartite Struktur auf. Die vier Segmente der Chromosomen sind in ihrer Länge jedoch stark reduziert, da viele der für die Photosynthese benötigten Gene als Pseudogene vorliegen oder vollständig aus dem Plastidengenom eliminiert wurden.

Eine fast vollständige Reduktion der IR_{A/B}-Regionen zeigt das komplett sequenzierte Plastom von *Pinus thunbergii*. Hier sind die invertierten Sequenzwiederholungen auf nur noch 184 Basenpaare reduziert. Die typischerweise in den IR-Regionen lokalisierten Gene der rRNAs sind dadurch komplett in die kleine Einzelkopieregion verschoben (Wakasugi *et al.* 1994). Auch hier ist der Gengehalt der einzelnen Regionen im Vergleich zu anderen Plastomen völlig verschieden. So ist in *Pinus* in den IR-Regionen nur noch ein Gen, *trnI*^{CAU}, vollständig enthalten.

Abweichungen von der quatripartiten Struktur des Plastoms treten bei den Leguminosen (Palmer *et al.* 1988; Palmer *et al.* 1987) sowie möglicherweise bei Koniferen außer den *Pinaceae* (Raubeson und Jansen 1990) auf. Die Plastome innerhalb dieser Familien sind gekennzeichnet durch den zum Teil vollständigen Verlust einer der beiden Kopien der invertierten Sequenzwiederholungen (Palmer und Thompson 1982; Michalowski *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987b).

Neben der Expansion/Reduktion der IR-Regionen sind Inversionen innerhalb der Einzelkopieregionen die häufigsten Arten der Umstrukturierung in plastidärer DNA. Phylogenetisch gut charakterisiert sind beispielsweise die drei Inversionen, die die Plastome der Gräser von anderen Monokotyledonen abgrenzen (Howe 1985; Howe *et al.* 1988; Katayama *et al.* 1996). Innerhalb der Gymnospermen unterscheiden sich die Gattungen *Abies* und *Tsuga* durch eine 42 kBp-Inversion von anderen *Pinaceae* (Tsumura *et al.* 2000), und eine 50 kBp-Inversion trennt die Subfamilie *Papilionoidae* von den beiden anderen Subfamilien *Caesalpinioideae* und *Mimosoideae* in der Familie *Leguminosae* (Doyle *et al.* 1996) voneinander. Die Endpunkte der Inversion sind dabei an annähernd der gleichen Stelle lokalisiert wie die Endpunkte einer Inversion innerhalb der Subsektion *Oenothera* der Gattung *Oenothera* (Gordon *et al.* 1982; Hachtel *et al.* 1991). Bei solchen Umstrukturierungen der Plastome sind trotz der Umlagerungen alle in Tabak charakterisierten Operonen erhalten geblieben. Eine Ausnahme stellt das Plastom von *Trachelium caeruleum* dar. Es ist so stark

umstrukturiert, dass sogar mehrere Operonstrukturen aufgebrochen wurden (Palmer 1985; Cosner *et al.* 1997).

Meist grenzen diese Unterschiede verschiedene Gattungen innerhalb einer Familie oder verschiedene Familien innerhalb einer Ordnung ab. Jedoch treten auch innerhalb von Gattungen Intra-Plastomvarianzen auf (Herrmann *et al.* 1980). So werden bei den eng verwandten *Pinus*-Arten *P. hartwegii* und *P. montezumae*, die den gleichen Lebensraum bevölkern, aufgrund von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismusanalysen (RFLP-Analysen) 51 verschiedene Plastom-Genotypen, die entweder ausschliesslich in einer der beiden Arten vorkamen oder von beiden Arten geteilt wurden, charakterisiert (Matos 2000). Byrne *et al.* zeigen bei der australischen Art *Lambertia orbifolia* im Rahmen einer populationsgenetischen Arbeit intraspezifische Plastomvariation. Aus verschiedenen Populationen wurden fünf Haplotypen aufgrund von RFLP-Analysen charakterisiert (Byrne *et al.* 1999).

Schliesslich werden in der oben angeführten Subsektion *Euoenothera* durch RFLP-Analysen verschiedene Plastome voneinander abgegrenzt (Gordon *et al.* 1982).

1.2 Funktionen des Plastoms

Trotz aller Variationen in der Struktur und der Kodierungskapazität ist die Ursache für die Bewahrung genetischer Information in Form des Plastoms wahrscheinlich in allen plastidenhaltigen Organismen sehr ähnlich. Hierfür existieren mehrere mögliche Szenarien: (1) Der massive Fluss genetischer Information in Richtung des Zellkerns ist noch nicht abgeschlossen, daher muss die Information in der Plastide solange aufrecht erhalten werden, bis der Reimport der translozierten Proteine etabliert ist. (2) Es gibt Proteine, deren Gene nicht transloziert werden können, (a) weil das Gen zu groß ist, um funktionell intakt, etwa über ein RNA-Stadium durch reverse Transkription in das nukleäre Genom integriert zu werden, oder (b) weil Gene aus regulatorischen Gründen in enger räumlicher Nähe zum Wirkungsort des Proteins abgelesen werden müssen (Allen und Raven 1996). In den Thylakoidmembranen werden bestimmte Proteine (z. B. das D1-Protein des Photosystems II) schnell und häufig geschädigt. Die nicht mehr funktionellen Untereinheiten müssen rasch und effizient ersetzt werden (Campbell *et al.* 1998). (c) Es ist auch vorstellbar, dass die Translation bestimmter mRNAs mit der Transkription der Gene eng gekoppelt sein muss. Die räumliche Trennung der beiden Prozesse führt zu einem Verlust der korrekten Faltung der Proteine oder nötige Kofaktoren können post-translational nicht in eine gefaltete Proteinkette integriert werden. Auch könnten (d) einige Membranproteine kotranslational in die Thylakoidmembran integriert werden.

Mehrere der oben genannten Szenarien können zusammen zutreffend sein. Jedoch gilt für alle gemeinsam, dass zur Dekodierung der notwendigen Information(en) das gesamte genetische System in der Plastide aufrecht erhalten werden muss. Hierfür werden Gene für die ribosomalen Proteine, für die ribosomalen RNAs sowie für tRNAs benötigt. Darüberhinaus enthalten einige Gene Intronen, die gespleißt werden müssen. Für diesen Vorgang wird sehr wahrscheinlich das Genprodukt von *matK* benötigt (Ems *et al.* 1995; Hess *et al.* 1994; Hübschmann *et al.* 1996).

1.3 Multiproteinkomplexe

1.3.1 Die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran

In der Thylakoidmembran von Plastiden höherer Pflanzen sind die Multiproteinkomplexe der Elektronentransportkette, die Antennenkomplexe sowie die ATP-Synthase (Wollman *et al.* 1999) und die NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase (Sazanov *et al.* 1998; Casano *et al.* 2000) lokalisiert. Die Untereinheiten für diese Membrankomplexe werden vom nukleären und vom plastidären Genom kodiert; in Abbildung 1.2 ist dies durch die Verwendung verschiedener Farben verdeutlicht.

Die Spaltung von Wasser am Photosystem II (PS II) setzt Elektronen frei, die mit Hilfe der Sonnenenergie auf einen energiereicheren Zustand angeregt werden. Die Elektronen durchlaufen die Elektronentransportkette, bestehend aus Photosystem II, Cytochrom *b₆f*-Komplex und Photosystem I. Im Photosystem I werden die Elektronen ein weiteres Mal mit Hilfe der Sonnenenergie angeregt, bevor sie schliesslich auf NADP^+ übertragen werden. Zwischen dem Cytochrom-Komplex und den beiden Photosystemen werden die Elektronen durch mobile Transportmoleküle übertragen – Plastochinon zwischen dem PS II und dem Cytochrom-Komplex und das kupferhaltige Protein Plastocyanin zwischen dem Cytochrom-Komplex und PS I. Die Energie der Elektronen, die durch den Cytochrom-Komplex fließen, ermöglicht das Pumpen von Protonen aus dem Stroma in das Thylakoidlumen, deren Rückfluss durch die ATP-Synthetase entlang des über die Thylakoidmembran verlaufenden Konzentrationsgradienten die Synthese von ATP antreibt.

Um die Untereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe in den benötigten stöchiometrischen Mengen zu synthetisieren, muss zwischen den Plastiden und dem Zellkern ein Austausch von Information stattfinden. Dieses sogenannte „Plastidensignal“ steht im Fokus zahlreicher Untersuchungen (z. B. Taylor 1989; Mayfield 1990; Hess *et al.* 1997). Den bisherigen Ergeb-

nissen zufolge ist als gesichert anzusehen, dass das Signal nicht durch ein Protein oder eine Nukleinsäure vermittelt wird. Ribosomen-defiziente Gerste-Mutanten (zusammengefasst in Börner 1986), die nicht in der Lage sind, plastidär kodierte Proteine zu exprimieren, und karotenoid-defiziente Mutanten (Taylor 1989), die aufgrund der Photoschädigung der Plastiden keine funktionellen Proteine mehr herstellen können, reprimieren die Expression nukleär kodierter Chloroplastenproteine als Antwort auf den Entwicklungszustand der geschädigten Plastiden. Der letztendliche Nachweis, dass auch Nukleinsäuren als Vermittler des Signal ausscheiden, steht noch aus. Bisher konnte noch in keinem Fall gezeigt werden, dass Nukleinsäuren aus den Plastiden in das Cytoplasma exportiert wurden. Jedoch scheinen an diesem Signal sowohl Intermediate des Chlorophyllmetabolismus (Kropat *et al.* 1997, 2000; Mochizuki *et al.* 2001) als auch der Redoxzustand der Plastiden (Oswald *et al.* 2001; Pfannschmidt *et al.* 2001) beteiligt zu sein.

Am Aufbau des Transmembran-pH-Gradienten und damit am Redoxzustand der Thylakoidmembran ist neben den beiden Photosystemen und der ATP-Synthase auch der Cytochrom *b₆f*-Komplex beteiligt. Die Zusammensetzung des Komplexes ist gut untersucht, jedoch ist der Prozess der Elektronenübertragung vom Cytochrom-Komplex auf das Plastocyanin und von dort auf das PS I nur teilweise experimentell untersucht (Haehnel *et al.* 1994). Für eine Reihe von Teilschritten existieren nur theoretische Modelle (Illerhaus *et al.* 2000). Die Herstellung von definierten Punktmutanten erlaubt die Beteiligung einzelner Aminosäuren am Elektronentransport im Detail zu erforschen.

1.3.2 Clp-Protease

Einen löslichen Proteinkomplex stellt die Clp-Protease dar. Die plastidäre Clp-Protease gehört zu einer Familie von Serin-Proteasen, die im Komplex mit regulatorischen ATPase-Untereinheiten vorliegen (Sokolenko *et al.* 1998; Halperin *et al.* 2001). Neben einer plastidär kodierten proteolytischen ClpP-Untereinheit existieren in *Arabidopsis thaliana* stellvertretend für höhere Pflanzen sechs nukleär kodierte proteolytische ClpP-Untereinheiten. Eine dieser nukleären Untereinheiten, ClpP2, wird in Mitochondrien transloziert (Halperin *et al.* 2001). Daneben gibt es noch weitere vier Untereinheiten, die als ClpR bezeichnet werden, die Homologie zu ClpP zeigen. Diesen Untereinheiten fehlt jedoch die katalytische Triade Serin-Histidin-Aspartat (Adam *et al.* 2001), so dass die ClpR-Untereinheiten nicht als proteolytische Untereinheiten dienen können. In einer nukleär kodierten Untereinheit ClpP2 fehlt der Aspartatrest der katalytischen Triade, wenngleich die Untereinheit in Mitochondrien als proteolytische Untereinheit funktioniert (Halperin *et al.* 2001).

Die *Clp*-Protease wird durch regulatorische ATPase-Untereinheiten, *ClpC* und *ClpD* in Plastiden von *Arabidopsis* und *ClpX* in Mitochondrien, reguliert (Kiyosue *et al.* 1993; Sokolenko *et al.* 1998; Halperin *et al.* 2001). Alle regulatorischen Untereinheiten werden in höheren Pflanzen im Nukleus kodiert.

1.4 Plastiden-spezifische Gendefekte

Cytochrom *f*-Mutanten wurden in *Chlamydomonas* zur Aufklärung der Interaktion zwischen dem Cytochrom *f* und dem Plastocyanin *in vivo* untersucht. Die Dreifachmutante der Aminosäuren K58, K65 und K66 zeigte nur unter heterotrophen Bedingungen eine Beeinträchtigung der Reoxidation des Cytochroms *f* und in der Assemblierung des Komplexes (Soriano *et al.* 1996). Wurde zusätzlich zu einer der drei Aminosäuren, die sich in der basischen Regionen der grösseren Domäne befinden, die Aminosäure K187 in der basischen Region der kleineren Domäne des Proteins verändert, so wurde in diesen Doppelmutanten eine verkürzte Photooxidationszeit des Cytochroms *f* gemessen (Cramer *et al.* 1996).

Einige Beispiele zeigen, dass die Effekte und Mechanismen in *Chlamydomonas* und in höheren Pflanzen unterschiedlich sein können. So zeigt die Behandlung von Zellen mit Gabaculin, einem Inhibitor der Chlorophyll- und Hämbiosynthese, in *Chlamydomonas* rasche Degradation von Apo-Cytochrom *f*, in Weizen und Weidelgras (*Lolium temulentum*) hingegen ist das Apoprotein stabil. Dieser Befund spricht für unterschiedliche Mechanismen in der Assemblierung und der Stabilisierung des Cytochrom *b₆f*-Komplexes (Anderson und Gray 1991; Howe *et al.* 1995). Auch die Regulation der Stöchiometrie der einzelnen Untereinheiten des Cytochrom *b₆f*-Komplexes ist in *Chlamydomonas* und höheren Pflanzen unterschiedlich.

In Linien, denen entweder das Gen für Cytochrom b_6 (*petB*) oder für die Untereinheit IV (*petD*) fehlt, akkumulieren etwa 10% des Wildtyp-Niveaus von Cytochrom *f*, wohingegen in Tabak keine Akkumulation stattfindet (Kuras und Wollman 1994; Choquet *et al.* 1998; Monde *et al.* 2000). Darüberhinaus ist auch die Genomorganisation des Plastoms von *Chlamydomonas* mit dem höherer Pflanzen nicht vergleichbar. Während in höheren Pflanzen die eubakterielle polycistronische Operonstruktur weiter vorherrscht, scheinen in *Chlamydomonas* die meisten Gene als monocistronische Einheiten organisiert zu sein (Westhoff und Herrmann 1988; Drapier *et al.* 1998). Die Herstellung entsprechender Mutanten in höheren Pflanzen könnte weitere mechanistische und funktionelle Aspekte des Elektronentransports durch den Cytochrom *b₆f*-Komplex liefern, die in Kontrast mit jene aus *Chlamydomonas* stehen.

Neben diesen in höheren Pflanzen aufwändig herzustellenden, definierten Mutanten eignen sich auch die spontan auftretenden Mutanten für viele Untersuchungen. Viele der Mutationen treten spontan auf, entspringen somatischen Fusionen (Herstellung von Cybriden) oder durch den Einfluss chemischer Agenzien. Gut untersucht sind bisher die nukleären Mutanten *iojap* aus Mais (Han *et al.* 1992; Shumway und Weier 1967; Walbot und Coe 1979), *albostrians* aus Gerste (Börner *et al.* 1976; Hess *et al.* 1994) und *pm7* (Epp *et al.* 1987) sowie die Plastommutante $I\sigma$ aus *Oenothera* (Hildebrandt *et al.* 1984; Winter und Herrmann 1987). Auch mitochondriale Mutationen können bedeutenden Einfluss auf die Funktion oder Entwicklung der Plastiden haben. So zeigt beispielsweise die NCS2-Mutante aus Mais abnormes Wachstum, sektorielle Bleichheit der Blätter sowie verminderte CO₂-Fixierung in den bleichen Sektoren (Roussel *et al.* 1991). In Tabelle 1.1 sind weitere Mutationen zusammengestellt. An vielen dieser Mutanten könnten nach eingehender Charakterisierung der Mutationen beispielsweise regulatorische und funktionelle Aspekte des komplexen pflanzlichen Systems studiert werden.

Tabelle 1.1: Gene, die die Funktion und Entwicklung der Plastiden beeinflussen

Kompartiment	Name	Organismus	Referenzen
Nukleus	<i>albostrians</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Börner <i>et al.</i> 1976; Hess <i>et al.</i> 1994; Hübschmann <i>et al.</i> 1996
	<i>iojap</i>	<i>Zea mays</i>	Han <i>et al.</i> 1992; Shumway und Weier 1967; Walbot und Coe 1979
	<i>pm7</i>	<i>Oenothera elata</i> ssp. <i>hookeri</i>	Epp <i>et al.</i> 1987
	<i>chm</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Redei und Plurad 1973

Mitochondrium	NCS2, NCS5	<i>Z. mays</i>	Marienfeld und Newton 1994; Newton <i>et al.</i> 1990; Roussell <i>et al.</i> 1991
	NCV	<i>Solanum lycopersicon</i> -Cybriden	Bonnema <i>et al.</i> 1995
	<i>falcifolia</i>	<i>Oenothera biennis</i> × <i>O. glazioviana</i>	Stubbe 1970
Chloroplast	Iσ	<i>O. elata</i> ssp. <i>hookeri</i>	Hildebrandt <i>et al.</i> 1984
	<i>en: alba-1</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	Herrmann 1971; Schaffner <i>et al.</i> 1995
	<i>en: gilva-1</i> ("Mrs. Pollock")	<i>Pelargonium zonale</i>	Herrmann <i>et al.</i> 1976
	"Mrs. Parker"	<i>Pelargonium zonale</i>	Börner <i>et al.</i> 1972

1.5 Inkompatibilität zwischen Genom und Plastom

Bei Artkreuzung können bei kompartmentellen Austauschen, vor allem zwischen Zellkern und Plastiden, in bestimmten Kombinationen Störungen in der Chloroplastenentwicklung und Chlorophyllsynthese auftreten. Diese Inkompatibilität wurde in *Oenothera* zuerst hauptsächlich von Renner (1924, 1936) und später von Stubbe (1955, 1959) als „Bastardbleichheit bzw -scheckung“ beschrieben, je nachdem, ob eine oder zwei der elterlichen Plastidentypen davon betroffen waren. Ähnliche Defekte in der Plastidenentwicklung von interspezifischen Hybriden wurden später bei *Trifolium* (Pandey *et al.* 1987; Przywara *et al.* 1989), *Pelargonium* (Metzlaff *et al.* 1982), *Impatiens* (Arisumi 1985) und *Zantedeschia* (Yao *et al.* 1994, 1995; Yao und Cohen 2000) beobachtet und untersucht. In all diesen inkompatiblen Kombinationen von Genomen und Plastomen können weisse (*albino*), gelbliche (*xanthina*), luteszente (blass-grüne) oder vireszente Blätter (gelbliche Blätter bei jungen Pflanzen, die im Laufe der Entwicklung ergrünen) auftreten (Stubbe 1959). Dies zeigt an, dass in der Eukaryotenzelle eine Koevolution der genetischen Kompartimente, deren Komponenten spezifisch miteinander interagieren, stattfindet.

Um inkompatible Genom/Plastom-Kombinationen auszuprägen, müssen verschiedene Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Eine der Voraussetzungen liegt in der Varianz von Plastomen. Eine zweite Grundvoraussetzung ist die Art der Plastidenvererbung. Bei biparentaler Vererbung der Plastiden oder Plastiden-DNA entmischen sich diese Plastomvarianten während der Entwicklung der Pflanzen, was zur Panaschierung der Nachkommen führt (Metzlaff *et al.* 1982). Einen weiteren Mechanismus zur Ausbildung von Inkompatibilität

stellt die Eliminierung einer der elterlichen Plastiden-DNAs in den Keimzellen oder der Zygote dar. Das erhalten gebliebene Plastom ist dann häufig unverträglich mit dem hybriden nukleären Genom (Birky 195, 2001).

Die Ursache für die Inkompatibilität kann auf regulatorischer oder struktureller Ebene zu finden sein (Kochevenko *et al.* 1999). Die Expression nukleärer und plastidärer Gene für plastidär lokalisierte Komponenten ist in Pflanzenzellen streng koordiniert reguliert. So kann eine Mutation in einem plastidären bzw. nukleären Gen für ein plastidäres Protein die Expression weiterer plastidärer oder nukleärer Gene für Plastidenproteine verhindern (Leon und Arroyo 1998).

Die Tatsache, dass die Untereinheiten für Thylakoidmembrankomplexe von zwei verschiedenen Subgenomen kodiert werden, kann in bestimmten Kreuzungen zur Inkompatibilität führen. Wenn auch die Aminosäuresequenzen zwischen eng verwandten Spezies häufig wenig variiert (Martin *et al.* 1998), kann trotz Assemblierung eine korrekte Interaktion aufgrund struktureller Unzulänglichkeiten einer der Proteinuntereinheiten zum Ausfall der Funktion des Komplexes führen (Kanevski *et al.* 1999). Das von Kanevski *et al.* untersuchte, artifizielle System der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) aus Tabak und Sonnenblume (*Helianthus*) simuliert beispielsweise eine Situation, die in inkompatiblen Genom-/Plastom-Kombinationen auftreten kann.

Neben Unterschieden in kodierenden Bereichen können auch unterschiedliche Sequenzen von regulatorischen Elementen das Zusammenspiel von Nukleus und Plastide stören. Die Inkompatibilität kann dabei auf allen regulatorischen Ebenen, bei der Transkription, den verschiedenen Stufen der Reifung der mRNA oder bei der Translation, auftreten. So führt beispielsweise die Einführung einer heterologen Edierungsstelle aus Spinat in das Plastom von Tabak zur Ausbildung eines mutanten Phänotyps (Bock *et al.* 1994).

1.6 Die Gattung *Oenothera*

Die ursprünglich in Amerika beheimatete Gattung *Oenothera* ist in mehrere Sektionen und Subsektionen gegliedert. Die Sektion *Oenothera* ist in die Subsektionen *Oenothera*, *Munzia*, *Raimannia*, *Emersonia* und *Nutantigemma* gegliedert (Dietrich *et al.* 1997). Arten der Sektion *Oenothera* Subsektion *Oenothera* kommen nur in Nord- und Mittelamerika vor und wurden u. a. in Europa eingeführt. In den auch als Euenotheren bekannten Arten dieser Subsektion sind drei voneinander verschiedene Grundgenotypen charakterisiert, die als A-, B- bzw. C-Genome bezeichnet werden (Stubbe 1959). Die Genome werden durch homozygote Arten repräsentiert, die in der Meiose mit allen sieben Chromosomen Bivalente ausbilden können

(Abbildung 1.3). Das Genom A kommt in den homozygoten Arten *O. elata* Kunth mit drei verschiedenen Unterarten, *O. jamesii* Torrey & Gray und *O. longissima* Rydb. sowie den komplex-heterozygoten *O. wolfii* Raven, Dietr. & Stubbe und *O. villosa* Thunb. mit zwei Unterarten vor. Diese Arten sind mit dem Plastidentyp I ausgestattet (Stubbe 1959; Dietrich *et al.* 1997). Das Genom B wird homozygot von verschiedenen Rassen von *O. grandiflora* L'Hér. und komplex-heterozygot von *O. nutans* Atk. & Bartlett und Rassen von *O. grandiflora* mit einem leicht veränderten B-Genom repräsentiert (Schumacher und Steiner 1993; Schumacher *et al.* 1992; für die Erläuterung von Komplex-Heterozygotie siehe (Abbildung 1.3 und unten). Alle diese Arten besitzen den Plastidentyp III (Stubbe 1959; Dietrich *et al.* 1997). Die dritte homozygote Linie mit dem Genom C wird von *O. argillicola* Mackenzie repräsentiert. Diese Art ist endemisch in den Appalachen im Osten der Vereinigten Staaten (Stinson 1953). Sie trägt Plastiden des genetisch definierten Typs V (Stubbe 1959; Dietrich *et al.* 1997).

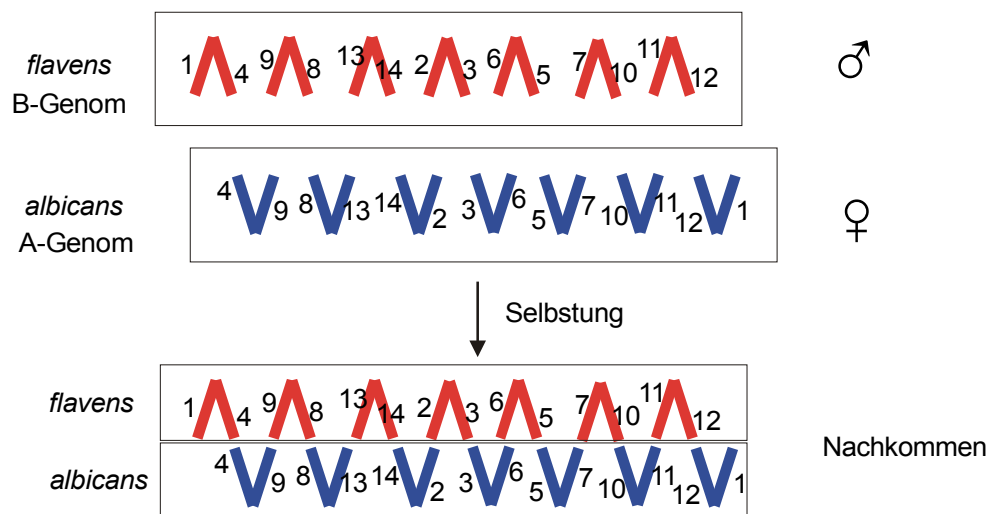


Abbildung 1.3: Schema der Komplex-Heterozygotie am Beispiel der permanenten Hybride *O. biennis*. Die beiden „Rennerkomplexe“ *flavens* und *albicans* sind aufgrund gametophytischer Letalfaktoren nur im Pollen bzw. in der Eizelle aktiv. Aufgrund der Chromosomentranslokationen in jedem Komplex ist die Durchmischung nicht möglich. Die Stabilität der heterozygoten Arten wird durch alternativ wirkende gametophytische Letalfaktoren erzielt.

Alle anderen Arten der Subsektion *Oenothera* sind komplex-heterozygot. Sie sind durch interspezifische Hybridisierung der homozygoten Arten entstanden (Cleland 1972; Dietrich *et al.* 1997). Durch die anschließende Translokation ganzer Chromosomenarme wurden „Komplexe“ ausgebildet (Tabelle 1.2), d. h. die maternalen und paternalen Chromosomen bilden

eine sogenannte „Zick-Zack“-Anordnung in der Meiose, die die Durchmischung der beiden elterlichen Komplexe bei der Weitergabe auf die Tochterzellen verhindert (Renner 1917). Chromosomentranslokationen treten auch innerhalb einer Art auf, so z. B. bei den unterschiedlichen Rassen von *O. grandiflora* (siehe oben). In den komplex-heterozygoten Hybriden ist die Zahl der Translokationen erheblich grösser. Hybridisierung zwischen dem A- und dem B-Genom resultiert in der Entstehung von Hybriden mit dem Plastidentyp II. Das (komplex-heterozygote) A-Genom unterscheidet sich jedoch von dem der homozygoten Spezies, es wird daher die Unterscheidung zwischen A₁ und A₂ vorgenommen (Stubbe 1959). Diese Kombination wird u. a. von *O. biennis* L. (= *O. suaveolens* Desf. ex Pers.) repräsentiert. In anderen AB-Hybriden sind Plastiden von Typ III enthalten (Stubbe 1959). Hier steht *O. glazioviana* Micheli (= *O. lamarckiana* de Vries) stellvertretend für diese Hybridisierung (Abbildung 1.4).

Die beiden verbleibenden Kombinationen, AC und BC, sind beide mit Plastiden des Typs IV vergesellschaftet. Die Spezies *O. oakesiana* (A. Gray) Robbins und *O. parviflora* L. sind die Repräsentanten dieser Hybridisierungen.

Tabelle 1.2: „Rennerkomplexe“ einiger ausgewählter *Oenothera*-Spezies.

Spezies	„Rennerkomplexe“	
<i>O. elata</i> ssp. <i>hookeri</i> Torr. & Gray	^h <i>hookeri</i>	^h <i>hookeri</i>
<i>O. elata</i> ssp. <i>hookeri</i> Rasse Johansen Torr. & Gray	^h <i>johansen</i>	^h <i>johansen</i>
<i>O. biennis</i> L. (<i>suaveolens</i> -Phänotyp)	<i>albicans</i>	<i>flavens</i>
<i>O. grandiflora</i> L'Hér.	^h <i>grandiflora</i>	^h <i>grandiflora</i>
<i>O. parviflora</i> L.	<i>augens</i>	<i>subcurvans</i>
<i>O. argillicola</i> Mack.	^h <i>argillicola</i>	^h <i>argillicola</i>
<i>O. glazioviana</i> Micheli (= <i>O. lamarckiana</i> de Vries)	<i>gaudens</i>	<i>velans</i>

Der Superscript ^h (= „haplo-“) zeigt an, dass sowohl die paternalen als auch die maternalen Gametophyten den identischen „Rennerkomplex“ vererben. Bei *O. biennis* weichen die Phänotypen voneinander ab, was zur Klassifikation mehrerer verschiedener „Arten“ geführt hat (siehe hierzu Dietrich *et al.* 1997).

		Plastom				
Genom		I	II	III	IV	V
	AA					
AB						
BB						
BC						
CC						
AC						

	normalgrün (viridis)		weiß, im Wachstum oder in der Keimung gehemmt
	blassgrün (chlorina)		letal; wenn ausnahmsweise realisiert, dann weiß
	gelbgrün (lutescens)		leicht vergilbend
	periodisch lutescens		periodisch bleich (diversi-virescens)
	gelbgrün bis gelb		periodisch bleich (virescens)
	weiß oder gelb (albina oder xantha)		

Abbildung 1.4: Kombinationsrechteck nach Stubbe (1959, 1989). Gezeigt ist die Ergrünungsfähigkeit von Plastiden vor dem Hintergrund verschiedener nukleärer Genome. Die Kombinationen der natürlich vorkommenden Arten sind rot markiert.

1.7 *Oenothera* als Modell zur Untersuchung von Genom-/Plastom-Inkompatibilität

Oenothera eignet sich hervorragend für das Studium von Genom-/Plastom-Inkompatibilität, da diese Gattung einzigartige Eigenschaften aufweist. Die zumeist komplex-heterozygoten Arten sind innerhalb der Subsektion *Oenothera* frei kreuzbar. Die daraus resultierende Nachkommenschaft ist im Gegensatz zu anderen Fällen fertil und besitzt wegen biparentaler Transmission häufig die Plastiden beider Eltern, die in der Entwicklung der Pflanzen segregieren und zu Bastardscheckung, d. h. der Variegation des Blattgewebes aus weissen und grünen Sektoren, führen, wenn ein Plastidentyp inkompatibel mit dem hybriden Zellkern ist (Kutzelnigg und Stubbe 1974). Die Variegation entsteht durch die Kombination von kompatiblen und inkompatiblen Plastidentypen mit dem Hybridgenom, welches aus je einem

„Rennerkomplex“ beider Eltern besteht. Die Ergrünungsfähigkeit der 30 möglichen Kombinationen wurde von Stubbe untersucht und im Kombinationsrechteck (Stubbe 1959) schematisch dargestellt (Abbildung 1.4).

Wie aus diesem Schema hervorgeht, gibt es zwischen den Genomen und den Plastomen eine enge Bindung in den natürlich vorkommenden Kombinationen (in Abbildung 1.4 rot markiert). So kann beispielsweise das B-Genom nur in Kombination mit den Plastomen II, III oder IV voll ergrünen. Der Schluss liegt nahe, dass die Ursachen für die wechselseitigen Präferenzen sowohl im nukleären Genom als auch im Plastom kodiert liegen müssen.

Neben der Ergrünungsdefizienz treten auch andere Defekte bei der Inkompatibilität zwischen Genom und Plastom auf. Die phänotypischen Anzeichen reichen bis hin zum Verlust der Plastiden- und Zellteilung sowie einer gestörten Gametophytenentwicklung. Ultrastrukturell lassen sich die Plastiden inkompatibler Kombinationen oftmals am fehlenden internen Membransystem erkennen (Glick und Sears 1994; Przywara *et al.* 1989). Experimente mit *Zantedeschia* (Yao und Cohen 2000) führen zu vergleichbaren Ergebnissen; sie zeigen, dass sich bei der Keimung im Dunklen kein semi-kristalliner Prolamellarkörper ausbildet (Ryberg *et al.* 1993), der als Vorstufe für die Ausbildung von Thylakoidmembranen dient.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein erster Schritt zu einem tieferen Verständnis der Interaktion von Genom und Plastom im Formenkreis *Oenothera* gemacht werden. Mögliche plastom-lokalisierte Determinanten für die Genom-/Plastom-Inkompatibilität sollen durch die vergleichende Sequenzierung der fünf genetisch unterscheidbaren Plastomvarianten identifiziert werden.

Darüberhinaus wurden spontan entstandene Plastommutanten von *Oenothera* und Punktmutanten des Cytochroms *f* in Tabak hergestellt und molekular untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Bakterienschüttler Lab-Shaker	B. Braun GmbH, Melsungen
Bakterieninkubator B5060	Heraeus GmbH, Hanau
Spektralphotometer LKB Ultrospec Plus	LKB, Cambridge, England
Thermocycler:	
PCR Express	Thermo Hybaid GmbH, Heidelberg
Cyclone 96	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV-Crosslinker UV Stratalinker 1800	Stratagene GmbH, Heidelberg
Sequenzierautomaten:	
ABI PRISM™ 377 Sequenzierautomat	Applied Biosystems, Weiterstadt
LI-COR 4200 IR ² Sequenzierautomat	LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge Sigma 2MK	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode
Tischkühlzentrifuge 3K30	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode
Zentrifuge Beckman Avanti J-25	Beckman Instrument GmbH, München
Ultrazentrifuge Beckman L8-55M	Beckman Instrument GmbH, München
Geldokumentationssystem:	
Bachofer UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer Laboratoriumsgeräte GmbH, Reutlingen
CSC Camera Controller	raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhorst
Mitsubishi Video Copy Processor P66DE	Mitsubishi Electric Corporation, Tokio, Japan
Hybridisierungsöfen Typ 400	Bachofer Laboratoriumsgeräte GmbH, Reutlingen
Fujifilm BAS-1500 Phosphoimaging-System	Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anderslautend angegeben, in *p. a.*-Qualität von folgenden Herstellern bezogen: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; Fluka GmbH, Neu-Ulm; ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim; Merck KGaA, Darmstadt; Riedel de Häen AG, Seelze; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe; Serva Feinbiochemika, Heidelberg und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen.

2.2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
DNase I	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Superscript™ RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7-RNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden

Die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Bsp*120I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I und *Sal*I wurden mit den entsprechenden 10-fach konzentrierten Puffern von MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und New England Biolabs GmbH (Schwalbach) bezogen.

2.2.3 Längenstandards

Als DNA-Längenstandard wurde restringierte DNA des Bakteriophagen Lambda verwendet. Die DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben der Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hind*III (beide von MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) geschnitten. Die entstehenden Fragmente besitzen folgende Längen (in Bp): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125.

Für kleine DNA-Fragmente wurde ein Gemisch aus verschiedenen PCR-Produkten als Grössenstandard verwendet. Die Längen hiervon sind (in Bp): 600, 430, 300, 200, 100.

Als Proteinmolekulargewichtsstandard diente eine vorgefertigte Proteinmischung von Amersham Pharmacia Biotech GmbH mit den Grössen (in kDa): 94, 67, 43, 30, 20,1 und 14,1.

2.2.4 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α : *gyrA96 recA1 endA1 relA1 thi-1 hsdR17 supE44 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169 ϕ 80 Δ *lacZ* Δ M15 (Hanahan 1983; Woodcock *et al.* 1989)

E. coli XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'**proAB lacI⁺Z* Δ M15 Tn10 (Tet^r)] (Bullock *et al.* 1989)

2.2.5 Plasmide

pBluescript® II SK⁻

Short *et al.* 1988

Alting-Mees und Short 1989

Stratagene GmbH, Heidelberg

2.2.6 Synthetische Oligonukleotide

Genspezifische Oligonukleotide zur Sequenzierung, für die “primer extension“-Analysen und zur Herstellung einzelsträngiger RNA-Sonden wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) und metabion GmbH (Martinsried) bezogen.

Zur Sequenzierung der Plastidenchromosomen wurde ein Satz von etwa 600 gen- und speziesspezifischer Oligonukleotide verwendet. Darüberhinaus wurden zur orientierenden Sequenzierung die Oligonukleotide M13for und M13rev benutzt:

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
M13for	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G

Die Oligonukleotide für die “primer extension“-Analysen waren am 5'-Ende mit einem Fluorophor (IRD700) markiert, der die Verwendung des LI-COR Sequenzierautomaten erlaubt.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
PE16SrRNA	IRD700-AAC TCT TCC ATG AGA TCA TAG TTG C
PEpsbEOE	IRD700-GTA AGC TAA ACC CGT GCT GAC
PEpetLOE	IRD700-AAT AAG TCG TAT CTT GGT CAG

Zur Herstellung von einzelsträngigen RNA-Sonden für die Hybridisierung immobilisierter RNA auf Nylonmembranen mit wurde an jedes Oligonukleotid am 5'-Ende die Sequenz des T7-Bakteriophagen-Promotors angefügt (die Nukleotide der T7-Promotorsequenz sind in der folgenden Liste unterstrichen und ohne Zwischenraum dargestellt). Diese Extension erlaubte die *in vitro*-Transkription vom doppelsträngigen PCR-Produkt.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
AT7psbE	<u>GTAATACGACTCACTATAGG</u> GAT CTA CTA AAT TCA TCG AGT T
ApsbE	AAG CAC AGG AGA ACG TTC GT
AT7trnV-GAC	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> GGC TTA GGG ATA ATC AGG CTC
AtrnV-GAC	GGG AAG GGA TAT AAC TCA GC

AT7petB (im Exon 2 des Gens *petB* gelegen)

GTAATACGACTCACTATA GGG ACA CCT GTT ACT ATT TT

psbHF3 (im Exon 2 des Gens *petB* gelegen)

CAA CAG TCA CTG AGG CTT TT

petBT7Intronrev GTAATACGACTCACTATAGG GGA TAT GGA ATA GAA CG

petBIntronfor CCC TGT TTT ATT TTG ATC CAA GT

Bei der sequenzspezifischen Mutagenese des Gens *petA* wurden zur Herstellung der PCR-Produkte in beiden Schritten die folgenden Oligonukleotide verwendet:

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
petAfor	TCC AGC AAA TAG CAG AAT CGT G

SpetA TTA CAC GTT AAT GGT TGA TC

Die Oligonukleotide entsprechen den Positionen 64247-64268 (petAfor) bzw. 65127-65148 (SpetA) im Plastidenchromosom in Tabak (Shinozaki *et al.* 1986).

Zur Herstellung der ersten PCR-Fragmente wurden entsprechend mutierte Oligonukleotide der folgenden Sequenzen eingesetzt. Die gegenüber der Wildtypsequenz veränderten Nukleotide sind fett, die neu eingeführte Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen dargestellt. Zur Vereinfachung ist für jede Mutagenese nur ein Oligonukleotid angegeben, das korrespondierende Oligonukleotid ist revers komplementär zur angegebenen Sequenz.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
Y1Lfor	CCA TTT CAA <u>GTG CAC</u> TTC CCA TTT TTG C
F4Ifor	CAA GTG CAT ATC <u>CAA TTA</u> TTG CAC AGC AG
F4Qfor	CAA GTG CAT ATC <u>CAA TTC</u> AAG CAC AGC AG
Y9Qfor	GCA CAG CAG <u>GGC CAA</u> GAA AAT CCA CGA
N11Dfor	CAG CAG GGT TAT <u>GAG GAT</u> CCA CGA GAA G
N23Dfor	GTA TTG TAT <u>GTG CAG</u> ATT GCC ATT TAG
N23Yfor	GTA TTG TAT <u>GTG CAT</u> ATT GCC ATT TAG
K58Qfor	GAT ATG CAA <u>CTG CAG</u> CAG GTT CTT GC
A62Dfor	GAA ACA GGT TCT <u>CGA</u> TAA TGG TAA AAG G
K65Q/R66Qfor	CAG GTT CTT GCT AAT <u>GGC CAA</u> CAA GGG GGG TTG AAC GTG GGG
K65Q/R66Qfor	CAG GTT CTT GCT AAT GGT GAA CAA GGG GGT <u>TTA AAC</u> GTG GGG
R66Qfor	CAG GTT CTT GCT AAT GGT AAA CAA GGG GGT <u>TTA AAC</u> GTG GGG
R154Qfor	TAG GCG GGA <u>ACC AGG</u> GAA GGG GTC AGA TTT A
R156Qfor	CGG GAA CAG <u>GGG CCA</u> GGG TCA GAT TTA
Y160Lfor	AAG GGG TCA <u>GAT CTT</u> ACC CGA CGG CAG C
K185Qfor	GCA AAA TCA <u>TAC GTC</u> AAG AAA AGG GTG GG

P209Rfor

GAT ATT ATC CCC CGC GGA CCA GAA CT

2.2.7 Medien und Lösungen zur Anzucht von Bakterien

Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Endvolumen von 1000 ml. Für Platten wurden 14 g Agar pro Liter Medium zugegeben. Alle Medien wurden bei 121°C und 2 bar Druck dampfsterilisiert. Die Selektion wurde mit entsprechenden Antibiotika durchgeführt, die zu 55–60°C temperiertem Medium zugegeben wurden:

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin (Serva Feinbiochemika, Heidelberg)	70 mg/ml	H ₂ O	70 µg/ml
Tetracyclin (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)	5 mg/ml	Ethanol	50 µg/ml

LB-Medium:

10 g	Pepton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl

Die Selektion mittels Ampicillin wurde zusätzlich durch die Verwendung von X-Gal- und IPTG-haltigen Blau/Weiss-Selektionsplatten (20 µg/ml bzw. 50 µg/ml) unterstützt.

2.2.8 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Pflanzen

Die Mengenangaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf einen Liter. Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 5,7 eingestellt. Alle Medien wurden durch Autoklavieren bei 115°C und 2 bar Druck sterilisiert.

Zur Selektion transgener Tabakpflanzen wurden zu den entsprechenden Medien nach dem Abkühlen auf 50–55°C Spektinomycin einer Konzentration von 500 µg/ml zugegeben.

2.2.8.1 1× B5-Makroelemente nach Gamborg *et al.* (1968):

2500 mg	KNO ₃
150 mg	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
150 mg	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O

134 mg	(NH ₄) ₂ SO ₄
40 mg	Fe(III) · EDTA, Natriumsalz

2.2.8.2 1000× B5-Mikroelemente nach Gamborg *et al.* (1968) (pro 100 ml):

75 mg	KI
300 mg	H ₃ BO ₃
1000 mg	MnSO ₄ · H ₂ O
200 mg	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
25 mg	Na ₂ MoO ₄
2,5 mg	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
2,5 mg	CoCl ₂ · 6 H ₂ O

2.2.8.3 1000× B5-Vitamine nach Gamborg *et al.* (1968) (pro 100 ml):

10000 mg	myo-Inosit
100 mg	Pyridoxin · HCl
1000 mg	Thiamin · HCl
100 mg	Nikotinsäure

2.2.8.4 1× MS-Makroelemente nach Murashige und Skoog (1962):

1650 mg	NH ₄ NO ₃
1900 mg	KNO ₃
440 mg	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
370 mg	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
170 mg	KH ₂ PO ₄
40 mg	Fe(III) · EDTA, Natriumsalz

2.2.8.5 1000× MS-Mikroelemente nach Murashige und Skoog (1962) (pro 100 ml):

83 mg	KI
620 mg	H ₃ BO ₃
2230 mg	MnSO ₄ · H ₂ O

860 mg	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
25 mg	Na ₂ MoO ₄
2,5 mg	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
2,5 mg	CoCl ₂ · 6 H ₂ O

2.2.8.6 1000× MS-Vitamine nach Murashige und Skoog (1962) (pro 100 ml):

10000 mg	myo-Inosit
50 mg	Pyridoxin · HCl
10 mg	Thiamin · HCl
50 mg	Nikotinsäure
20 mg	Glycin

2.2.8.7 1× NT-Makroelemente nach Nagata und Takebe (1971):

825 mg	NH ₄ NO ₃
950 mg	KNO ₃
1233 mg	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
680 mg	KH ₂ PO ₄
220 mg	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
40 mg	Fe(III) · EDTA, Natriumsalz

2.2.8.8 1000× NT-Vitamine nach Nagata und Takebe (1971) (pro 100 ml):

10000 mg	myo-Inosit
100 mg	Thiamin · HCl

2.2.8.9 1× PCOe-Makroelemente:

1500 mg	KNO ₃
200 mg	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
200 mg	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
75 mg	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
75 mg	(NH ₄) ₂ SO ₄

75 mg NH_4Cl

2.2.8.10 1000× PCOe-Vitamine (pro 100 ml):

50 mg myo-Inosit

1 mg Pyridoxin · HCl

1 mg Thiamin · HCl

1 mg Nikotinsäure

0,02 mg Biotin

2 mg Calciumpanthotensäure

2.2.8.11 Auxin:

2 mg/ml Indolylessigsäure, in H_2O gelöst

2.2.8.12 Cytokinin:

1 mg/ml Kinetin, in 1M HCl gelöst

2.2.8.13 NT-Medium (pro Liter):

1× NT-Makroelemente

1× NT-Mikroelemente

1× NT-Vitamine

20 g Saccharose

0,4% (w/v) Gelrite

Für die Mutante II θ wurden noch jeweils 2 mg/l Kinetin und 2 mg/l Indolylessigsäure in das Medium gegeben.

2.2.8.14 PCOe-Medium (pro Liter):

1× PCOe-Makroelemente

1× B5-Mikroelemente

1× PCOe-Vitamine

50 mg Kaseinhydrolysat

20 g Saccharose

0,4% (w/v) Gelrite

Für die Mutanten Iε und I_t wurden zusätzlich noch jeweils 0,2 mg/l Kinetin und 2 mg/l Indolylessigsäure zum Medium zugegeben.

2.2.8.15 **RMOP-Medium nach Svab *et al.* (1990)**

1×	MS-Makroelemente
1×	MS-Mikroelemente
1×	NT-Vitamine
1 mg	Benzylaminopurin (BAP, 1 mg/ml)
0,1 mg	Naphthylelessigsäure (NAA, 0,1 mg/ml)
30 g	Saccharose
0,6% (w/v)	Agar

2.2.8.16 **Modifiziertes B5-Medium (pro Liter):**

1×	B5-Makroelemente
1×	B5-Mikroelemente
1×	B5-Vitamine
0,983 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
20 g	Saccharose
0,7% (w/v)	Agar

2.2.9 Allgemeine Lösungen

1× TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM	Na ₂ EDTA, pH 8,0
10× TBE:	1,34 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,44 mM	H ₃ BO ₃
	25 mM	Na ₂ EDTA, pH 8,0
20× SSC:	3 M	NaCl

0,3 M Na₃-Citrat · 3 H₂O

Methylenblau-Lösung: 0,03% (w/v) Methylenblau

0,3 M Natriumacetat, pH 5,2

2.2.10 Pflanzenmaterial

Für die Arbeit wurden Pflanzen der Rasse *Johansen* von *Oenothera elata* ssp. *hookeri* mit verschiedenen Plastomen und die Wildart *Oenothera argillicola* aus der Kollektion von Prof. Stubbe verwendet. Die Plastome I – IV wurden in den Kernhintergrund AA ^h*johansen* eingekreuzt, während die Kombination AA mit Plastom V letal ist (Stubbe 1959).

Ursprünglich stammen die Plastome aus den folgenden Wildarten. Der Genotyp und die entsprechenden Renner-Komplexe sind in Klammern angegeben:

Plastom I	<i>Oenothera elata</i> ssp. <i>hookeri</i> Rasse <i>Johansen</i> (AA ^h <i>johansen</i>)
Plastom II	<i>Oenothera biennis</i> (= <i>suaveolens</i>) (AB <i>albicans</i> · <i>flavens</i>)
Plastom III	<i>Oenothera glazioviana</i> (= <i>Oenothera lamarckiana</i> ; im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der traditionelle Name weiterverwendet) (AB <i>velans</i> · <i>gaudens</i>)
Plastom IV	<i>Oenothera parviflora</i> (= <i>atrovirens</i>) (AC <i>pingens</i> · <i>flectens</i>)
Plastom V	<i>Oenothera argillicola</i> (CC ^h <i>argillicola</i>)

Im folgenden werden die Kombinationen in Kurzform angegeben, also z. B. AA-I für die Kombination von Plastom I aus der Rasse *Johansen* mit Genotyp AA ^h*johansen* der Wildart *O. elata* ssp. *hookeri* Rasse *Johansen*. Analog gilt dann für Plastom II mit dem Genotyp AA ^h*johansen* die Kurzform AA-II, AA-III für Plastom III aus *O. glazioviana* mit dem Genotyp

AA^h*johansen*, AA-IV für die Kombination des Plastoms IV mit dem Genotyp AA^h*johansen* sowie CC-V für die Kurzbezeichnung für die Wildart *O. argillicola*.

Die gerichtete Mutagenese des *petA*-Gens wurden mit dem aus Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. „Petit Havanna“) isolierten Gen durchgeführt.

2.2.11 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikverbrauchsmaterialien wurden von Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich und Eppendorf AG, Hamburg, bezogen.

2.3 Methoden

2.3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Grundlegende Techniken wie die Präparation und Präzipitation von Nukleinsäuren, die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen, Restriktion von DNA, Elution von DNA aus Agarosegelen, die Extraktion mit Phenol/Chloroform wurden nach den Vorschriften, die in Ausubel *et al.* (1998) und Sambrook *et al.* (1989) wiedergegeben sind, durchgeführt.

Für die vorliegenden Arbeiten mit Bakterien, Pflanzen und Nukleinsäuren wurden ausschliesslich keimfreie Lösungen, Medien, Reaktionsgefäße und Geräte verwendet. Hierzu wurden alle Geräte, Glasgefäße und hitzestabilen Lösungen und Medien durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und 2 bar Druck sterilisiert. Alle hitzelablen Lösungen sowie die Lösungen und Medien, die für die Verwendung mit RNA bestimmt waren, wurden durch einen Filter der Porengrösse 0,45 µm sterilfiltriert. Alle Glasgeräte und Mörser mit Pistillen wurden vor der Verwendung zur RNA-Isolation mit 0,5 M NaOH von RNasen dekontaminiert oder bei 180°C hitzesterilisiert. Zur Prävention einer neuerlichen Kontamination mit DNase und RNase wurde mit Latexhandschuhen gearbeitet.

2.3.1.1 Sterilisierung von Saatgut

Saatgut, das für die Gewebekultur von *Oenothera* bestimmt war, wurde mit Wasserstoffperoxid oberflächensterilisiert. Hierzu wurden die Samen zunächst mit 70% Ethanol und 0,05% (v/v) Tween-20 2 Minuten lang gespült. Desweiteren wurden die Samen dreimal je 10 Minuten lang mit 30% H₂O₂ sterilisiert. Anschliessend wurde das an der Oberfläche haftende Wasserstoffperoxid dreimal mit sterilem Wasser abgespült. Die getrockneten Samen wurden auf das zur Kulturmedium gelegt.

2.3.1.2 Kultivierung von Pflanzen

Die unter Pflanzenmaterial angegebenen Materialien wurden unter Standardbedingungen im Gewächshaus kultiviert. Die Mutanten wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium vorgekeimt.

Die bearbeiteten Mutanten sowie die Tabakpflanzen für die Mutagenese wurden unter einer Lichtintensität von ca. $100 \mu\text{Mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^2$ in Klimakammern bei 24°C in steriler Gewebekultur gehalten. Der Licht-/Dunkelrhythmus betrug 16 Stunden Tag/8 Stunden Nacht.

2.3.1.3 Isolierung von Plastiden

Homogenisationspuffer:	330 mM	Saccharose
	50 mM	Tris/Acetat, pH 7,2
	10 mM	Na_2EDTA
	1 mM	DTT
	0,5% (w/v)	PVP

Waschpuffer:	330 mM	Saccharose
	50 mM	Tris/Acetat, pH 7,2
	10 mM	Na_2EDTA
	1 mM	DTT

Verdünnungspuffer:	25 mM	Tris/HCl, pH 8,0
--------------------	-------	------------------

Lösungen für den Saccharosegradienten:

	20%	Saccharose in Verdünnungspuffer
	60%	Saccharose in Verdünnungspuffer
Resuspendierungspuffer:	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	20 mM	Na_2EDTA

Die Isolierung von Plastiden wurde im Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen und Materialien durchgeführt. Dafür wurden aus 10–40 g Blattmaterial die Mittelrippen entfernt und die Blattoberflächen im drei- bis zehnfachen Volumen Homogenisationspuffer mehrmals für ein bis zwei Sekunden im Homogenisator aufgeschlossen, durch Gaze der Porengröße $20 \mu\text{m}$ und zwei

Lagen Miracloth (Calbiochem GmbH, Bad Soden) filtriert und sofort für 3 Minuten im JA14-Rotor (Beckman) bei 10000 UpM bei 10°C zentrifugiert. Die sedimentierten Chloroplasten wurden in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 5000 UpM (10°C) im JA20-Rotor (Beckman) zentrifugiert, bis der Überstand geklärt war, und in maximal 5 ml Waschpuffer resuspendiert.

Die Chloroplastensuspension wurde auf kontinuierliche Saccharosegradienten von 20-60% geladen und im Ti28-Ausschwingrotor (Beckman) für 45 Minuten bei 25000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Aus den Gradienten wurden die intakten Chloroplasten mittels einer Pasteurpipette gesammelt und mit dem doppelten Volumen Verdünnungspuffer versetzt. Die Chloroplasten wurden für 5 Minuten bei 5000 UpM und 4°C im JA20-Rotor zur Entfernung der Saccharose zentrifugiert und in 2 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen.

2.3.2 Gerichtete Mutagenese von Plastiden-DNA

Gerichtete Mutationen im Gen für das Cytochrom *f* (*petA*) wurden mit einer auf PCR basierenden Strategie (nach Marini *et al.* 1993) eingeführt. Dabei wurde bei jeder Punktmutation eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die Identifizierung der transplastomen Gene erleichterte.

2.3.2.1 *in vitro*-Herstellung von mutierter DNA

Zur Mutagenese wurden aus Tabak-Gesamt-DNA zwei Fragmente von *petA* amplifiziert, die sich an 20-25 die Mutation umgebenden Nukleotiden überlappten. Die beiden Fragmente wurden in einer zweiten PCR-Reaktion gemischt und mit genspezifischen Oligonukleotiden reamplifiziert. Die entstehenden PCR-Produkte wurden subkloniert (siehe Abschnitte 2.3.3.1-2.3.3.3). Transgene *Escherichia coli*-Zellen wurden durch RFLP-(Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)-Analysen selektiert, ein Subfragment aus diesen Plasmiden mit den Restriktionsendonukleasen *AatII* und *Bsp68I* ausgeschnitten, aus dem Agarosegel isoliert und in das mit *AatII* und *Bsp68I* restringierte Plasmid pNTpetAΔ1500::*Adaa* eingesetzt. Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein pBluescript II SK⁻-Derivat, das ein (*BstEII*)/*SacI*-Fragment aus dem Tabak-Plastidenchromosom (Positionen 63516-67137) enthält. In die singuläre *EcoRV*-Schnittstelle (Position 66053) ist die die Spektinomycin-Resistenz vermittelnde *aadA*-Kassette (Goldschmidt-Clermont 1991; Bock *et al.* 1994) entgegen der Transkriptionsrichtung des *petA*-Gens inseriert. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die hergestellten Punktmutanten des *petA*-Gens aus Tabak.

Tabelle 2.1: Gerichtete Mutationen des *petA*-Gens aus *Nicotiana tabacum*

Mutation	von Kodon	nach Kodon	RFLP
Y1L	TAT	CTT	<i>Alw44I</i>
Y1Q	TAT	CAG	<i>Alw44I</i>
F4I	TTT	ATT	<i>TasI</i>
F4Q	TTT	CAA	<i>TasI</i>
Y9Q	TAT	CAA	<i>HaeIII</i>
N11D	AAT	GAT	<i>BamHI</i>
N23D	AAT	GAT	<i>CviRI</i>
N23Y	AAT	TAT	<i>CviRI</i>
K58Q	AAA	CAG	<i>PstI</i>
A62D	GCT	GAT	<i>TaqI</i>
A62F	GCT	TTT	<i>ScaI</i>
A62K	GCT	AAG	<i>AflIII</i>
K65E	AAA	GAA	<i>TruI</i>
K65L	AAA	TTA	<i>TruI</i>
K65Q	AAA	CAA	<i>BsuRI</i>
R66Q	AGG	CAA	<i>DraI</i>
R154Q	AGG	CAG	<i>EcoRII</i>
R156Q	AGG	CAG	<i>EcoRII</i>
Y160L	TAT	TTA	<i>BglII</i>
K185Q	AAA	CAA	<i>TaiI</i>
K187E	AAG	GAG	<i>SnaBI</i>
K187Q	AAG	CAG	<i>SnaBI</i>
P209R	CCC	CGC	<i>SacII</i>
K58Q/K65Q	AAA/AAA	CAG/CAA	<i>PstI</i>

K58Q/R66Q	AAA/AGG	CAA/CAG	<i>PstI</i>
K65E/R66Q	AAA/AGG	GAA/CAA	<i>DraI</i>
K65Q/R66Q	AAA/AGG	CAA/CAA	<i>BalI</i>

K58Q/K65Q /R66Q	AAA/AAA /AGG	CAA/GAA /CAG	<i>PstI</i>
--------------------	-----------------	-----------------	-------------

2.3.2.2 **Biolistische Transformation von Tabak**

2.3.2.2.1 *Präparation DNA-beschichteter Goldpartikel*

Zur Präparation der DNA-Beschichtung auf 0,6 µm grossen Goldpartikeln wurden aus der gut gemischten Goldsuspension 35 µl in ein steriles Reaktionsgefäss überführt. Die Goldpartikel wurden abzentrifugiert und in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Anschliessend wurde das Gold erneut zentrifugiert und in 25 µl DNA-Lösung (1 µg/µl) resuspendiert, nacheinander wurden 220 µl Wasser, 250 µl 2,5 M CaCl₂ und 50 µl 0,1 M Spermidin zugegeben und 20 Minuten bei 4 °C gemischt. Anschliessend wurden die beschichteten Goldpartikel abzentrifugiert und zweimal mit je 600 ml 100%igem Ethanol gewaschen. Das Gold wurde in 72 µl 100%igem Ethanol resuspendiert und bis zur Transformation des Pflanzenmaterials auf Eis aufbewahrt.

2.3.2.2.2 *Transformation des Pflanzenmaterials*

24 Stunden vor der Transformation wurden junge Tabakblätter (Durchmesser der Blätter: etwa 3-4 cm) auf RMOP-Agarplatten mit der Unterseite nach oben ausgelegt. Zur Transformation wurden zunächst die "Rupture Discs", Makroträger und Stoppnetze mit Ethanol sowie die Partikelkanone mit UV-Strahlung sterilisiert. Die Makroträger wurden in die Halterungen eingesetzt und mit je 5,4 µl der DNA/Goldsuspension bestückt. Alle weiteren Teile wurden nach Herstellerangaben zusammengefügt. Die Agarplatten mit den Tabakblättern wurden in einem Abstand von etwa 7 cm von der Stoppplatte in die Apparatur eingesetzt und bei einem Druck von 900 psi mit den Goldpartikeln beschossen. Die Platten wurden sofort steril verschlossen und in einer Klimazelle bei 25 °C unter Standardbedingungen kultiviert.

2.3.2.2.3 *Regeneration transgener Pflanzen*

Zur Induktion der Kallusbildung wurde den beschossenen Blättern die Mittelrippe entfernt. Die Blätter wurden anschliessend in 0,5 × 0,5 cm grosse Stücke geschnitten. Die Blattstückchen wurden auf RMOP-Selektivplatten mit 500 µg/ml Spektinomycin überführt. Nach zwei Wochen wurden die zum Teil expandierten Blattstückchen erneut geschnitten und auf

frischem Selektionsmedium ausgelegt. Etwa 6-8 Wochen nach der Transformation setzte die Kallus- und Sprossbildung ein; die Sprosse wurden zur Regeneration weiter mit Antibiotikum kultiviert.

2.3.3 Methoden zur Manipulation und Analyse von DNA

2.3.3.1 Ligation von DNA

200 pmol restringierte Plasmid-DNA wurde mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA, 1 μ l des vom Hersteller mitgelieferten 10 \times T4-DNA-Ligasepuffer sowie 1 Einheit T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 μ l für 12 Stunden bei 16°C inkubiert. Bei der Ligation von glatten Enden wurden 10 Einheiten Enzym verwendet.

2.3.3.2 Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen

TFB I-Puffer:	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl ₂
	15% (w/v)	Glycerin

TFB II-Puffer:	10 mM	MOPS, pH 7,0
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
	15% (w/v)	Glycerin

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen eignen sich u. a. die *E. coli*-Stämme DH5 α und XL1-Blue. Hierzu wurde einer der beiden Stämme auf einer LB-Platte mit (im Falle von XL1-Blue) bzw. ohne (im Falle von DH5 α) Antibiotikum ausgestrichen. Eine Einzelkolonie davon wurde für zwei Stunden bei 37°C in 5 ml LB-Medium angezogen. Die gesamte Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium überimpft und 2–3 Stunden bis zu einer Extinktion von $E_{550} = 0,5$ weiter bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschliessend auf Eis gehalten.

Die Kultur wurde 10 Minuten bei 6000 UpM im JA14-Rotor bei 4°C abzentrifugiert, sodann zweimal in je 40 ml TFB I-Puffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen

wurden anschliessend wiederum bei 6000 UpM und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 8 ml TFB II-Puffer resuspendiert und als 100 µl Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Gebrauch wurden die kompetenten Zellen bei -70°C gelagert.

2.3.3.3 Transformation von *Escherichia coli* XL-1 Blue oder DH5 α

20–50 ng rekombinanter DNA wurden mit den aliquotierten, transformationskompetenten *Escherichia coli*-Zellen 15-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 37°C ohne Zugabe von Medium inkubiert; es wurde 350 µl LB-Medium zugegeben und für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. 300 µl des Transformationsansatzes wurden auf Platten mit LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion rekombinanter Klone erfolgte mittels der jeweiligen Antibiotikaresistenz und der Verwendung des auf Komplementation basierenden Blau/Weiss-Selektionssystems auf X-Gal/IPTG-haltigen (20 µg/ml bzw. 50 µg/ml) Platten.

2.3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979)

Lösung I:	50 mM	Glukose
	10 mM	Na ₂ EDTA
	25 mM	Tris/HCl, pH 8,0
Lösung II:	0,2 M	Natriumhydroxid
	1 % (w/v)	SDS
Lösung III:	3,0 M	Kaliumazetat
	1,8 M	Ameisensäure

Das Sediment einer 1,5 ml Übernachtskultur von *Escherichia coli* XL-1 Blue oder DH5 α wurde in 250 µl Lösung I resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden 250 µl Lösung II zugegeben, und nach 5-minütiger Inkubation bei RT die Proteine und genomische DNA mit 300 µl Lösung III ausgefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 UpM und 4°C wurde der Überstand mit 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von

550 µl Isopropanol ausgefällt, sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 40 µl sterilem Wasser zurückgelöst.

2.3.3.5 Isolierung von Gesamt-DNA nach Doyle und Doyle (1990)

Extraktionspuffer:	2% (w/v)	Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid (CTAB, Hexadecyl-trimethyl-ammoniumbromid)
	1,4 M	NaCl
	20 mM	Na ₂ EDTA
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	β-Mercaptoethanol

Ungefähr 100 mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Kunststoffmörser pulverisiert. Das Pulver wird mit 1 ml Extraktionspuffer 2-3mal geschüttelt und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschliessend wurde zweimal je 1 ml Chloroform zugegeben und zur Phasentrennung jeweils 10 Minuten bei 12000 UpM in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Nach der zweiten Extraktion wurde die DNA aus 950 µl der wässrigen Phase mit 660 µl Isopropanol gefällt. Das Nukleinsäuresediment wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten an der Luft getrocknet. Schliesslich wurden die Nukleinsäuren in 40 µl sterilem Wasser zurückgelöst.

2.3.3.6 Isolierung von Plastiden-DNA

Chloroplasten wurden wie oben beschrieben (Abschnitt 2.3.1.3) isoliert, zur Lyse auf eine Endkonzentration von 1% SDS gebracht und für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Zur Entfernung der plastidären Proteine wurde die Lösung mit Proteinase K (Endkonzentration 2 mg/ml) bei RT inkubiert. Die Proteinfragmente wurden durch zweifache Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt, die verbleibenden Nukleinsäuren durch Präzipitation ausgefällt. Das Nukleinsäuresediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten an der Luft getrocknet. Anschliessend wurden die Nukleinsäuren in 100 µl 1× TE-Puffer zurückgelöst.

2.3.3.7 Erstellung einer Klonbank

Plastiden-DNA aus *Oenothera* wurde wie unter Abschnitt 2.3.3.6 beschrieben isoliert und mit einer der in Abschnitt 2.2.2 aufgeführten Restriktionsendonukleasen bzw. *KpnI/SalI* geschnitten. Die Fragmente wurden nach Phenol/Chloroform-Extraktion in einen dephosphorylierten Plasmidvektor pBluescript II SK⁻ (Stratagene GmbH, Heidelberg) ligiert und in

transformationskompetente *E. coli*-Zellen (siehe Abschnitt 2.3.3.3) transformiert. Aus rekombinanten Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.3.3.4), und die Insertion mit den plasmid-spezifischen Oligonukleotiden M13for und M13rev sequenziert (siehe Abschnitt 2.3.3.9).

Nach erfolgter Identifizierung der Insertion als plasmidenspezifisch wurden die Plasmide als Vorlagen für die automatische Sequenzierung weiterverwendet. Insertionen, die sich als redundant erwiesen, wurden nicht zur weiteren Bearbeitung herangezogen.

2.3.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988)

Die Vervielfältigung von DNA oder cDNA erfolgte nach einem Standardprotokoll (Innis *et al.* 1990). Das Standardprotokoll sieht eine einleitende Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 94°C vor, an die sich 30 Zyklen von je 30 Sekunden bei 94°C, 55°C und 72°C anschliessen. Abschliessend werden die Proben noch einmal für 5 Minuten bei 72°C inkubiert, um die vollständige Synthese der Produkte zu gewährleisten. Dieses Protokoll wurde je nach den Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotiden und der Länge des zu vervielfältigenden Sequenzabschnitts modifiziert. Die Hybridisierungsphase bei 55°C wurde an die verwendeten Oligonukleotide so angepasst, dass deren Schmelztemperatur etwa 3°C oberhalb der verwendeten Hybridisierungstemperatur lag. Die Schmelztemperatur lässt sich entweder nach Thein *et al.* (1986) oder genauer nach dem "nearest-neighbor"-Algorithmus (Breslauer *et al.* 1986, SantaLucia *et al.* 1996) berechnen. Die Dauer der Synthesephase bei 72°C wurde je nach zu amplifizierender Länge variiert, jedoch immer mit der Massgabe von 1 kBp pro Minute.

2.3.3.9 Automatische Sequenzierung modifiziert nach Sanger *et al.* (1977)

Die automatische Sequenzierung erfolgte auf beiden Sequenzierautomaten nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977). Der Unterschied der beiden Systeme liegt in der Verwendung von einerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Oligonukleotiden (LICOR-System), und andererseits von markierten Didesoxynukleotiden („Terminatoren“; ABI-System), was die Möglichkeit einer Multiplex-PCR-Reaktion erlaubt. Die Reagenziensätze wurden von Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg und von PE Biosystems, Foster City, USA bezogen.

2.3.3.9.1 Sequenzierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotiden am LI-COR 4200 IR²

Die für die "primer extension"-Analysen (siehe Abschnitt 2.3.4.5) begleitende Sequenzierung wurden am LI-COR 4200 IR² durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 2,5 pmol Oligonukleotid und 150 ng DNA in 14 µl H₂O gleichmässig auf 4 Reaktionsgefässe verteilt, die vorher mit je 1,5 µl aus einer der Nukleotid-/Didesoxynukleotidlösungen des Sequenzierungssets (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) beschickt wurden. Die Ansätze wurden einer asymmetrischen Polymerasekettenreaktion gemäss den Empfehlungen des Herstellers unterworfen. Die Reaktion wurde mit formamidhaltigem Ladungspuffer gestoppt, die Proben bis zur Auftrennung auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) bei -20°C dunkel aufbewahrt.

Die Gelapparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, die entgaste Acrylamid-lösung eingefüllt und bis zur erfolgten Polymerisation der Gelmatrix horizontal gelagert. Von jedem Ansatz wurden 1,4 µl auf das Gel aufgetragen und für ca. 16 Stunden bei 2200 V aufgetrennt. Die Datenaufnahme erfolgte kontinuierlich und vollautomatisch. Zur Datenaufnahme und Analyse der Daten wurde die mitgelieferte Software benutzt.

2.3.3.9.2 Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden am ABI 377

Verdünnungspuffer:	400 mM	Tris/HCl, pH 9,0
	10 mM	MgCl ₂
Ladungspuffer:	50 mg/ml	Dextranblau (Fluka GmbH, Neu-Ulm)
	25 mM	Na ₂ EDTA

Für die Sequenzierungsreaktion wurden 5 pmol Oligonukleotid und 50–200 ng DNA in 8 µl H₂O mit 2 µl der verdünnten „Prä Mischung“ aus dem Sequenzierungsset (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) zusammenpipettiert. Die Ansätze wurden einer asymmetrischen Polymerasekettenreaktion mit 99 Zyklen (je 10 Sekunden 94°C, 46°C und 60°C) unterworfen. Die Reaktion wurde präzipitiert, gewaschen und nach dem Trocknen in 4 µl Ladungspuffer mit vier Volumen Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) resuspendiert. Bis zur Auftrennung auf einem denaturierenden PAA-Gel wurden die Proben dunkel bei -20°C gelagert.

Die Gelapparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, die entgaste Acrylamid-lösung eingefüllt und bis zur erfolgten Polymerisation der Gelmatrix horizontal gelagert. Von jedem Ansatz wurde 1 µl auf das Gel aufgetragen, und die Proben wurden für 11 Stunden bei

2500 V aufgetrennt. Die Datenaufnahme erfolgte kontinuierlich und vollautomatisch. Zur Datenaufnahme und Analyse der Daten wurde die verfügbare Software (siehe Abschnitt 2.3.6) benutzt.

2.3.4 Methoden zur Manipulation und Analyse von RNA

2.3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA modifiziert nach Kirby (1968)

Homogenisationsmedium:	330 mM	Sorbit
	200 mM	Tris/NaOH, pH 9,0
	300 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ EDTA
	10 mM	EGTA
	2% (w/v)	SDS
Natriumacetat :	4 M	Natriumacetat, pH 6,0
Tris-Borat-Puffer :	80 mM	Tris/Borsäure
	10 mM	Na ₂ EDTA, pH 8,0
Lithiumchloridlösung:	8 M	LiCl

Aus 5-10 g *Oenothera*-Blättern wurden die Mittelrippen entfernt und unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinem Pulver verrieben. 10 ml Homogenisationsmedium und 5 ml Phenol (Roti-Phenol[®]; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden auf 40°C erwärmt, und das Zellpulver wurde hinzugegeben. Zu dieser Lösung wurden 5 ml Chloroform gegeben und 20 Minuten gemischt. Die Suspension wurde bei 7700 UpM in einem JA20-Rotor (Beckman) 10 Minuten lang zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde noch je einmal mit Phenol/Chloroform (1:1 Gemisch) und Chloroform extrahiert. Mit einem fünfzehntel Volumen Natriumacetat und einem Volumen Isopropanol wurden die Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C ausgefällt.

Die Nukleinsäuren wurden bei 11500 UpM (JA20-Rotor, 4°C, 10 Minuten) sedimentiert. Das Sediment wurde an der Luft kurz getrocknet und in 1-2 ml Tris-Borat-Puffer auf

resuspendiert. Nach der Entfernung der restlichen Stärkepartikel wurden 33% (v/v) 8 M LiCl zum Überstand gegeben, um die RNA selektiv bei 0°C auszufällen. Die gefällte RNA wurde schliesslich für 10 Minuten bei 10000 UpM abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in sterilem Wasser zurückgelöst.

2.3.4.2 DNase I-Behandlung

10× DNase I-Puffer:	400 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	MgCl ₂

5-10 µg RNA wurden in einem Gesamtvolumen von 176 µl H₂O gelöst und mit 20 µl DNase I-Puffer sowie 4 µl DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim; 10 IE/µl) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz zweimal mit je 200 µl Phenol-Chloroform im Mischungsverhältnis 1:1 extrahiert. Anschliessend wurden etwaige Phenolreste mit 200 µl Chloroform aus der wässrigen Phase entfernt, bevor aus dieser mit 20 µl 3 M Natriumacetat und 500 µl 100% Ethanol über Nacht bei -20°C die Ribonukleinsäuren ausgefällt wurden. Nach der Fällung wurde die Probe bei 4°C in einer Tischkühlzentrifuge bei 15000 UpM 20 Minuten lang zentrifugiert, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Schliesslich wurde die RNA in 13,6 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.3.4.3 Amplifikation von RNA mittels PCR nach Frohman *et al.* (1988)

Um selten vorkommende RNAs zu vervielfältigen, wurde das Protokoll nach Frohman *et al.* (1988) verwendet, das für die Erststrangsynthese der cDNA genspezifische Oligonukleotide vorsieht.

Die RNA wurde zusammen mit 2,5 pmol eines Oligonukleotids, das revers komplementär zur entsprechenden RNA ist, in einem Gesamtvolumen von 21 µl für 10–15 Minuten bei 65°C inkubiert. Nachdem der Ansatz auf Eis abgekühlt war, wurden 10 µl 5× Reverse Transkriptase-Puffer, 0,4 µl 100 mM DTT und 12 µl 2 mM Desoxynukleotidmischung mit 100 Einheiten SuperScript™ Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) hinzugefügt. Der Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 42°C eine Stunde inkubiert. Anschliessend wurden 150 µl Tris/HCl-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM Na₂EDTA) hinzugegeben und mit 200 µl Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach der Präzipitation der cDNA und anschliessender Resuspendierung in 40 µl Wasser wurden 5 µl in eine PCR-Reaktion mit beiden Amplifikations-Oligonukleotiden durchgeführt. Die Parameter der PCR richteten sich nach den verwendeten Oligonukleotiden (siehe oben).

2.3.4.4 Reverse Transkription nach Veres *et al.* (1987)

Die reverse Transkription wurde nach dem Prinzip von Veres *et al.* (1987) und der Vorgehensweise, wie bei Maier *et al.* (1992) beschrieben, durchgeführt:

5× Reverse Transkriptase-Puffer:

250 mM	Tris/HCl, pH 8,3
375 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂

13,6 µl DNase I-verdauter RNA wurden für 5 Minuten mit 1 µl Hexanukleotiden (Boehringer Mannheim, Mannheim) bei 60°C inkubiert. Dem Ansatz wurden zur Durchführung der Erststrangsynthese der komplementären DNA (cDNA, von englisch: *complementary DNA*) 0,4 µl 100 mM DTT (Gibco BRL, Eggenstein), 8 µl des vom Hersteller mitgelieferten 5× Reverse Transkriptase-Puffer (Gibco BRL, Eggenstein), 16 µl 2 mM Desoxynukleotide (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 1 µl SuperScript™ Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein; 200 Einheiten/µl) zugegeben. Die Reaktion wurde mindestens 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Zur Denaturierung des DNA-RNA-Hybrids und zur alkalischen Lyse der RNA wurde der Ansatz mit 12 µl 2 M NaOH und 8 µl 50 mM Na₂EDTA versetzt, und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 80 µl gebracht. Nach 30minütiger Inkubation bei 65°C wurde die einzelsträngige cDNA mit 96 µl 1 M Tris/HCl, pH 7,5 und 440 µl 100% Ethanol ausgefällt. Hierfür wurde der Ansatz 30 Minuten lang bei 12000 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Antrocknen an der Luft in 50 µl H₂O gelöst.

2.3.4.5 Kartierung von 5'-Enden von mRNA ("primer extension"-Analyse)

10× Hybridisierungspuffer:	400 mM	MOPS, pH 6,7
	4 M	NaCl
	10 mM	Na ₂ EDTA

dNTP-Gemisch:	2 mM	dATP
	2 mM	dCTP
	2 mM	dGTP
	2 mM	dTTP

2,5 mM CTP

2,5 mM GTP

Als Vorlagen zur *in vitro*-Transkription wurden zunächst PCR-Amplifikate hergestellt, die am 5'-Ende des nicht-kodierenden Strangs einen T7-Promotor als Erweiterung an den verwendeten Oligonukleotiden besaßen. Die PCR-Produkte wurden durch Präzipitation von den Oligonukleotiden gereinigt. Anschliessend wurden 200 ng der DNA mit 2 µl 10× T7-RNA-Polymerase-Puffer (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl rNTP-Mischung (je 2,5 mM, kein UTP enthalten), 5 µl [α - 32 P]-UTP und 25 Einheiten T7-RNA-Polymerase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Der Ansatz wurde 1-2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.3.4.8 Hybridisierung von Nylonmembranen mit immobilisierter RNA

Hybridisierungslösung: 250 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

7% (w/v) SDS

2,5 mM Na₂EDTA

Waschlösung 1: 1× SSC

1% (w/v) SDS

Waschlösung 2: 0,5× SSC

1% (w/v) SDS

Waschlösung 3: 0,2× SSC

1% (w/v) SDS

Waschlösung 4: 0,1× SSC

0,5% (w/v) SDS

Die durch die Northern-Methode hergestellten Membranen mit immobilisierten RNA-Proben wurden mit 50 ml Hybridisierungslösung für 30 Minuten bei 65°C vorhybridisiert. Nach der Zugabe der einzelsträngigen, durch *in vitro*-Transkription hergestellten RNA-Sonde wurden die Membranen 12–16 Stunden bei 65°C hybridisiert. Unspezifische Signale wurden durch Waschen mit den auf 65°C vorgewärmten Waschlösungen für je 30 Minuten entfernt.

Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiografie oder mit Hilfe des Phosphoimaging-Systems BAS-1500 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan). Die Auswertung der Autoradiografien des BAS-1500-Systems erfolgte mit Hilfe der Software TINA 2.0 (raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhorst).

2.3.5 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.3.5.1 Allgemeine Methoden für die Analyse von Proteinen

Proteine wurden, soweit nicht anderweitig angegeben, in einem diskontinuierlichen Gelsystem auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (15%) nach Laemmli (1970) elektrophoretisch bei 16 mA aufgetrennt (SDS-PAGE). Anschliessend wurden die Gele einer Coomassie Brilliantblau-Färbung bzw. bei sehr geringen Mengen Protein einer Silberfärbung nach Blum *et al.* 1987 unterzogen.

Proteinkonzentrationen wurden mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

2.3.5.2 Chlorophyll-Fluoreszenzanalysen

Mit Hilfe eines Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometers (PAM-Fluorometer) wurde die *in vivo*-Fluoreszenz von Chlorophyll *a* bei 25°C gemessen (Schreiber und Krieger 1986; Schreiber 1986). Die Nomenklatur von van Kooten und Snell (1990) wurde für die Fluoreszenzparameter übernommen.

Für die Messungen wurden 2-4 Wochen alte Pflanzen verwendet. Diese wurden in steril verschlossenen Petrischalen unter der Faseroptik der Apparatur plaziert und wenige Minuten dunkeladaptiert. Um eine beschleunigte Reoxidation der Q_A-Stelle in Photosystem II zu erreichen, wurden die Pflanzen für 10 Sekunden langwelligem Rotlicht bei 720 nm ausgesetzt.

Die Grundfluoreszenz F_0 wurde durch gepulstes Meßlicht angeregt. Die maximale Fluoreszenz F_m und das Verhältnis $\frac{(F_m - F_0)}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}$ (Krause und Weiss 1991), wobei F_v die variable

Fluoreszenz darstellt, wurde durch Auslösen eines sättigenden Weißlichtpulses (7000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) von einer Sekunde unter automatischer Frequenzerhöhung auf 100 kHz ermittelt.

Die Photosynthese wurde nach einer Minute mit aktinischem Licht einer Intensität von 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) angeregt. Die Einstellung des photosynthetischen Fliessgleichgewichts (F_s) wurde für einige Minuten verfolgt. Weitere sättigende Lichtpulse während der Belichtungsphase

dienten der Ermittlung der Fluoreszenzlöschungskoeffizienten $qP = \frac{(F'_m - F_s)}{(F'_m - F'_0)}$

(„photochemisches Quenching“) und von $qN = 1 - \frac{(F'_m - F'_0)}{(F'_m - F'_0)}$ („nicht-photochemisches

Quenching“) (Schreiber 1986) sowie der Quantenausbeute des Photosystems II

$F_{II} = \frac{(F'_m - F_s)}{F'_m}$ (Genty *et al.* 1989).

2.3.5.3 Messung der P700-Redox-Kinetik *in vivo*

Hierbei basiert das Meßprinzip auf einem modifizierten PAM-Fluorometer, das zusätzlich mit einer Emittor-Detektor-Einheit (101-ED) ausgerüstet ist (Schreiber *et al.* 1988; Meurer *et al.* 1996). Das System ermöglicht eine sehr selektive Messung der lichtabhängigen Absorptionsänderung des P700 und die schnelle Erfassung der Effizienz der photosynthetischen Energieumwandlung am Photosystem I.

Dabei beruht die Ermittlung der Quantenausbeute des Photosystems I F_I : $F_I = 1 - \frac{\Delta A}{\Delta A_{\max}}$

(Verhältnis von nichtoxidiertem P700 zum insgesamt vorhandenen P700) (Harbinson und Woodward 1987) auf der *in vivo*-Absorptionsänderung des oxidierten P700 bei 830 nm. ΔA wurde mit einer Taktfrequenz von 100 kHz bei maximal möglicher Lichtintensität nach fünfminütiger Belichtung nach Abschalten des aktinischen Lichts ermittelt. Durch Rotlicht bei 820 nm induzierte Absorptionsänderungen dienten der Bestimmung von ΔA_{\max} . Nach 30 Sekunden Dunkelrotlicht lösten Weißlichtpulse von 1 Sekunde bzw. 50 μs (bei 25000 Meßpunkten in drei Minuten) die kurzzeitige Reduktion des P700 aus.

2.3.5.4 Präparation von löslichen und membrangebundenen Proteinen aus Pflanzengewebe

Homogenisationsmedium:	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	Na ₂ EDTA
	2 mM	Na ₂ EGTA

	10 mM	DTT
Carbonatpuffer:	100 mM	Na ₂ CO ₃
	10% (w/v)	Saccharose
	50 mM	DTT
Auftragspuffer:	20% (w/v)	SDS
	1% (w/v)	Bromphenolblau

Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und in 3 ml Homogenisationsmedium vollständig resuspendiert, danach 10 Min. auf Eis inkubiert und über zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, GmbH, Bad Soden) filtriert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert (4°C), um die löslichen Proteine von der Gesamtmembranfraktion abzutrennen. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und das Membransediment in Carbonatpuffer dispergiert.

Anschließend wurde der Überstand mit Trichloressigsäure auf eine Konzentration von 15% (w/v) eingestellt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden bei 10000 UpM abzentrifugiert (10 Minuten, 4°C), das Sediment noch zwei Mal mit 80%igem Aceton gewaschen und nach kurzem Trocknen in 100–500 µl Carbonatpuffer aufgenommen.

2.3.5.5 Immunochemische Analysen

Die immunologischen Analysen wurden mit folgenden polyklonalen Antiseren durchgeführt:

<u>Proteinkomplex</u>	<u>Untereinheit</u>	<u>Bezugsquelle</u>
RuBisCO	SSU	R. Klösger, Halle
	LSU	M. Schmidt, Frankfurt
Photosystem I	P700	N. Nelson, Tel Aviv
Photosystem II	D2	J. Mullet, College Station
	Cytochrom <i>b</i> ₅₅₉ α	W. Cremer, West Lafayette
Cytochrom <i>b</i> ₆ <i>f</i>	Cytochrom <i>f</i>	G. Hauska, Regensburg
	Cytochrom <i>b</i> ₆	G. Hauska, Regensburg

Um die Filter wiederverwenden zu können, wurden sie 30 Minuten in 100 mM β -Mercaptoethanol, 2%igem SDS und 63,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) geschüttelt, mehrmals mit TBS/Tween-Puffer gewaschen und anschliessend getrocknet.

2.3.6 Bioinformatische Methoden

2.3.6.1 Computergestützte Assemblierung von DNA-Sequenzen

Die Rohsequenzen wurden mit Hilfe des Moduls Seqman II aus dem Softwarepaket LaserGene 99 (DNA Star, Inc., Madison, Wisconsin, USA) evaluiert und assembliert. Terminale Sequenzen von Insertionen in Plasmidvektoren wurden vor dem Assemblierungsschritt um eventuell vorhandene Vektorsequenzen bereinigt.

2.3.6.2 Computergestützte Annotierung der assemblierten Sequenzen

Zur Annotierung der assemblierten Gesamtsequenzen wurde das Programm Sequin 3.0 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) benutzt, um die Sequenzen in das GenBank-Format zu bringen. Mit Hilfe des ORF-Finder-Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/gorf/gorf.html>) wurden vorhandene Leseraster, mit Hilfe von tRNA-scan SE (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/>; Lowe und Eddy 1997) vorhandene tRNA-Gene und durch Homologievergleiche die Gene für ribosomale RNAs ausfindig gemacht.

2.3.6.3 Erstellung multipler Gen- oder Protein-Vergleiche („multiple alignments“)

Die Erstellung von multiplen Sequenzvergleichen erfolgte sowohl bei den Gesamtsequenzen, als auch bei Gen- und Proteinsequenzen semiautomatisch, d. h. basierend auf einer automatischen Berechnung der Vergleiche wurden zusätzlich kleinere Optimierungen manuell vorgenommen. Hierfür wurde die Software BioEdit 5.0.9 (Hall 1999) verwendet.

2.3.6.4 Methoden zur Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse umfasste Homologiesuchen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990, 1997), um homologe Gene und regulatorische Sequenzen im Vergleich mit dem vollständig sequenzierten Plastom von Tabak (Shinozaki *et al.* 1986) identifizieren zu können. Die Recherchen wurden am National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80>) und dem GenomeNet (<http://www.blast.genome.net>) durchgeführt.

Mittels der Vergleiche der Sequenzen aller fünf *Oenothera*-Grundplastome wurden die Ähnlichkeiten der Gesamtsequenzen sowie der kodierenden Bereiche nach einem modifizierten Smith-Waterman-Algorithmus (Gotoh 1982; Myers und Miller 1988; Needleman und Wunsch 1970; Smith und Waterman 1981) sowie der GC-Gehalt bestimmt. Aus den kodierenden Sequenzen wurde ausserdem die Nutzung der Kodonen (“Codon Usage”) berechnet.

Das Program TRF (Tandem Repeat Finder) wurde eingesetzt, um alle direkten Sequenzwiederholungen zu detektieren (Benson 1999). Repetitive Elemente in regulatorischen und kodierenden Sequenzen können die Expressionsprofile verschiedener Gene oder Gengruppen beeinflussen.

Die Analyse von Proteinsequenzen wurde, sofern für die Proteine oder homologe Proteine dreidimensionale Strukturen verfügbar sind, mit Hilfe von 3D-Visualisierungsprogrammen wie der von Molinaro verbesserten UCB-Version von RasMol (Sayle und Milner-White 1995) und Swiss-PDB Viewer (Guex und Peitsch 1997) durchgeführt. Die Verwendung der Swiss-PDB Viewer-Software ermöglicht die Auswirkungen von Aminosäureaustauschen an einzelnen Positionen direkt zu beobachten. Bei den Proteinen, für die keine detaillierten dreidimensionalen Daten vorliegen, wurden alle verfügbaren Informationen über strukturell und funktionell relevante Aminosäurereste für die Analyse berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypen der Kern-Plastidengenom-Kombinationen

Zur Sequenzierung und Analyse der fünf genetisch unterscheidbaren Plastidengenome (Plastome) der Sektion *Oenothera* aus der Gattung *Oenothera* wurden die Plastome verschiedener Spezies in den gleichen nukleären Hintergrund von *O. elata* ssp. *hookeri* Rasse *Johansen* (ursprünglich mit Plastom I) eingekreuzt (Stubbe 1959). Dies erfolgte für die Plastome aus *O. biennis* (enthält Plastom II), *O. glazioviana* (enthält Plastom III) und *O. parviflora* (enthält Plastom IV). Das Material dieser Kreuzungen ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Kombination von Plastom V aus *O. argillicola* mit dem nukleären Genom AA von *O. elata* ist letal, so dass hier das Plastom direkt aus der Wildart analysiert wurde. Die Kombinationen des AA-Genoms von *O. elata* mit den Plastomen I und II erscheinen in allen Entwicklungsstadien normalgrün (AA-I ist eine Wildart), wobei AA-II gelegentlich etwas heller ist (siehe auch Abbildung 1.4).



Abbildung 3.1: Phänotypen von 5 Wochen alten *Oenothera*-Pflanzen. Von links nach rechts sind dargestellt: *Oenothera elata* ssp. *hookeri* Rasse *Johansen* (AA) mit den Plastomen I, II, III und IV sowie *Oenothera argillicola* (CC) mit Plastom V. Die Kombination AA-V ist letal.

Die Kombination des Kerngenoms AA mit Plastom III kann in den ersten Entwicklungsstadien ein oder mehrere bleiche Perioden durchlaufen, die nach dem vollständigen Ergrünen

nicht mehr auftreten. Die Kombination von Plastom IV mit dem Kerngenom AA kann in seltenen Fällen letal sein, in frühen Entwicklungsstadien sind die Pflanzen meist normalgrün, im Verlauf der Entwicklung der Pflanzen verblassen die Blätter etwas, so dass ältere Pflanzen häufig etwas ausgebleicht erscheinen (siehe Abbildung 1.4). Jedoch ist diese Art von Bleichung nicht mit den bleichen Perioden in der frühen Entwicklung der Pflanzen vergleichbar, bei denen die Blätter fast vollständig weiss erscheinen (siehe AA-III in Abbildung 3.1). Die Wildart *O. argillicola* (Abbildung 3.1) ist im Vergleich zur Wildart *O. elata* ssp. *hookeri* Rasse *Johansen* stärker rötlich gefärbt, was auf einen höheren Anthocyan-gehalt zurückzuführen ist.

Der Effekt der Inkompatibilität mit dem A-Genom ist bei den Plastomen III und IV besonders deutlich, wenn die AA-Pflanzen mit den entsprechenden Wildtypen *O. glazioviana* und *O. parviflora* verglichen werden. Die Pflanzen mit dem AA-Kerngenom sind in ihrem Wachstum gegenüber den Wildtypen im Alter von 5 Wochen retardiert (Abbildung 3.2).

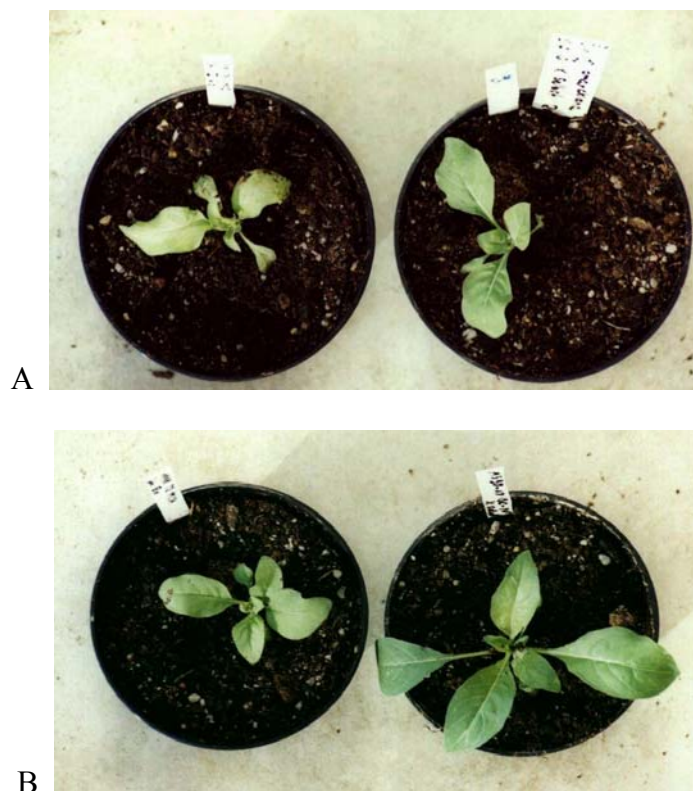


Abbildung 3.2: Phänotypen von AA-Pflanzen (jeweils links im Bild) mit den Plastomen III (A) und IV (B) im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-pflanzen (jeweils rechts im Bild) *O. glazioviana* (A) und *O. parviflora* (B). Alle Pflanzen sind etwa 5 Wochen alt.

3.2 Allgemeine Struktur der *Oenothera*-Plastidengenome

Die Gesamtsequenzen der fünf genetisch unterscheidbaren Plastidengenome (Plastome) der Sektion *Euoenothera* aus der Gattung *Oenothera* erlauben erstmals die Analyse von ganzen (Organellen-) Genomen innerhalb einer Gattung. Die Nukleotidabfolge wurde mit Hilfe der enzymatischen Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) bestimmt. Als Matrizen zur Sequenzierung dienten neben PCR-Produkten die in Tabelle 3.1 aufgelisteten klonierten Fragmente.

Tabelle 3.1: Zur Sequenzierung verwendete Klone der verschiedenen Plastome. Die Klone der Plastome II-V wurden mit *Bsp120I*, *KpnI* und *SalI* hergestellt.

Plastom I	Plastom II	Plastom III	Plastom IV	Plastom V
Sal-C, 18 kBp	IIB-168, 10,5 kBp	IIIB-1, 18 kBp	IVB-Nr9, 10 kBp	MP142, 12 kBp
Sal-E, 17 kBp	IIB-148, 8 kBp	IIIB-45, 8 kBp	IVB-screen, 8 kBp	MP132, 8,5 kBp
Sal-F, 14 kBp	IIB-97, 7 kBp	IIIB-32, 4 kBp	IVB-M69, 5,5 kBp	MP23, 8 kBp
Sal-G, 13 kBp	IIB-76, 6 kBp	IIIB-37, 4 kBp	M16, 5 kBp	MP252, 7 kBp
Sal-H, 9 kBp	IIB-21, 5,5 kBp	IIIB-54, 4 kBp	M72, 5 kBp	MP156, 6 kBp
Sal-I, 8 kBp	IIB-75, 4 kBp	IIIB-67, 3,5 kBp	M5, 4 kBp	MP404, 4,5 kBp
Sal-J, 4 kBp	IIB-123, 4 kBp	IIIB-31, 3 kBp	M14, 4 kBp	MP136, 4 kBp
Sal-L, 2 kBp	IIB-34, 3,5 kBp	IIIB-4, 2 kBp	IVB-13, 2,5 kBp	MP16, 3,5 kBp
Pst-B, 27 kBp	IIB-132, 3 kBp	IIIB-52, 2 kBp		MP269, 3,5 kBp
Pst-G, 9 kBp	IIB-33, 2 kBp	IIIB-23, 1 kBp	K18, 10 kBp	MP137, 3 kBp
Pst-I, 5 kBp	IIB-104, 0,75 kBp		K7, 4,5 kBp	Vb126, 2,5 kBp
Pst-K, 2 kBp	IIB-32, 0,6 kBp	M6, 2,5 kBp	K22, 3,5 kBp	MP407, 1,5 kBp
Bam2, 10 kBp	M4, 0,2 kBp		K42, 2 kBp	
Bam7, 6 kBp			K5, 1 kBp	VKm05, 5kBp
Bam14, 3 kBp			K10, 0,75 kBp	VKm9, 0,75 kBp
Bam15, 0,2 + 2 kBp			K8, 0,2 kBp	
Bam17, 3 kBp				
Bam18, 3 kBp			IVKS-M47, 11 kBp	
Bam20, 2 kBp			IV-4a, 7,5 kBp	
Bam21, 2 kBp				
Bam24, 2 kBp				
Bam26, 2 kBp				

Vergleicht man die allgemeine Gliederung der Genome in einzelne Abschnitte, so fügen sich die *Oenothera*-Sequenzen mit ihrer Aufteilung in zwei unterschiedlich lange Einzelkopieregionen (LSC, grosse Einzelkopieregion, von engl.: *large single copy*; SSC, kleine Einzelkopieregion, von engl.: *small single copy*), die von zwei identischen, invers orientierten Sequenzwiederholungen (IR, von engl.: *inverted repeat*) separiert werden, strukturell in die Reihe der bereits bekannten Gesamtsequenzen von Tabak (Shinozaki *et al.* 1986, Wakasugi *et al.* 1998), Spinat (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001), *Arabidopsis thaliana* (Sato *et al.* 1999), Mais (Maier *et al.* 1995), Reis (Hiratsuka *et al.* 1989) und Schwarzkiefer (Wakasugi *et al.* 1994) ein. Die beiden IR-Regionen werden als Kopie A und B bezeichnet. Die Kopie A ist *per definitionem* diejenige IR-Region, die am nächsten zu den Genen für das Photosystem II-Protein D1, *psbA*, und für die Histidinyl-tRNA^{GUG}, *trnH*, liegt (siehe

Abbildung 1.1). Kopie B liegt damit näher an der Gengruppe für die ribosomalen Proteine, der durch Fusion der eubakteriellen L2-, *spc*- und *alpha*-Operons entstanden ist (Sugita *et al.* 1997). Im Plastom der Schwarzkiefer sind diese beiden Regionen auf eine Länge von weniger als 100 Bp verkürzt und enthalten nur noch ein Gen für die IsoleucinyI-tRNA^{CAU} (Wakasugi *et al.* 1994).

Zwischen den Plastomen verschiedener Arten treten Längendifferenzen in allen vier Abschnitten auf, und auch die Grenzpunkte der einzelnen Regionen sind zwischen den Plastomen verschiedener Arten variabel. Bei den fünf *Oenothera*-Plastomen sind die Grenzen zwischen den vier Abschnitten mit der Ausnahme der Grenze J_{SA} (zwischen kleiner Einzelkopieregion und der invertierten Sequenzwiederholung IR_A) identisch. Die Plastome IV und V besitzen eine um zwei beziehungsweise ein Basenpaar verlängerte kleine Einzelkopieregion (Abbildung 3.3).

Grenze J_{LB}:

					IR _B
Plastom I	AATAGTATGT	CCGATCATTG	TAAGTATAAT	CGTAGACGCC	CTAGACCAAG
Plastom II	AATAGTATGG	CCGATCATTG	TAAGTATAAT	CGTAGACGCC	CTAGACCAAG
Plastom III	AATAGTATGG	CCGATCATTG	TAAGTATAAT	GGTAGACGCC	CTAGACCAAG
Plastom IV	AATAGTATGG	CCGATCATTG	TAAGTATAAT	GGTAGACGCC	CTAGACCAAG
Plastom V	AATAGTATGG	CCGATCATTG	TAAGTATAAT	CGTAGACGCC	CTAGACCAAG

Grenze J_{SB}:

	IR _B				
Plastom I	GCTAGGAAAA	GACCACACAC	GACGATGATT	TTTTGTTGCT	GTCGGAAAAA
Plastom II	GCTAGGAAAA	GACCACACAC	GACGATGATT	TTTTGTTGCT	GTCGGAAAAA
Plastom III	GCTAGGAAAA	GACCACACAC	GACGATGATT	TTTTGTTGCT	GTCGGAAAAA
Plastom IV	GCTAGGAAAA	GACCACACAC	GACGATGATT	TTTTGTTGCT	GTCGGAAAAA
Plastom V	GCTAGGAAAA	GACCAAACAC	GACGATGATT	TTTTGTTGCT	GTCGGAAAAA

Grenze J_{SA}:

					IR _A
Plastom I	ATCTTTATAT	GGAATATGTA	ATTTTTGAAG	TGATTCTTTC	T--TGGTCTT
Plastom II	ATCTTTATAT	GGAATATGTA	ATTTTTGAAG	TGATTCTTTC	T--TGGTCTT
Plastom III	ATCTTTATAT	GGAATATGTA	ATTTTTGAAG	TGATTCTTTC	T--TGGTCTT
Plastom IV	ATCTTTATAT	GGAATATGTA	ATTTTTGAAG	TGATTCTTTC	TCTTGGTCTT
Plastom V	ATCTTTATAT	GGAATATGTA	ATTTTTGAAG	TGATTCTTTC	TC-TGGTCTT

ΔΔ

Grenze J_{LA}:

	IR _A				
Plastom I	AAGAACTTGG	TCTAGTAAGA	CGGGCGAACG	ACGGGAATTG	AACCCGCGCG

```

Plastom II   AAGAACTTGG TCTAGTAAGA CGGGCGAACG ACGGGAATTG AACCCGCGCG
Plastom III AAGAACTTGG TCTAGTAAGA CGGGCGAACG ACGGGAATTG AACCCGCGCG
Plastom IV  AAGAACTTGG TCTAGTAAGA CGGGCGAACG ACGGGAATTG AACCCGCGCG
Plastom V   AAGAACTTGG TCTAGTAAGA CGGGCGAACG ACGGGAATTG AACCCGCGCG

```

Abbildung 3.3: Sequenzvergleich der vier Grenzregionen zwischen den Einzelkopieregionen und den invertierten Sequenzwiederholungen. An der Grenze zwischen kleiner Einzelkopieregion und IR_A-Region auftretende Variationen sind mit offenen Dreiecken gekennzeichnet.

Die Gesamtlängen der Plastidenchromosomen I bis V und die Längen für jeden der vier Abschnitte eines Chromosoms sind nachfolgend aufgeführt. Sie betragen für das Plastom I aus *O. elata* ssp. *hookeri* Rasse *Johansen* 163936 Bp (LSC-Region: 89393 Bp, SSC-Region: 18929 Bp, IR-Regionen: je 27807 Bp), für das Plastom II 164825 Bp (88996 Bp, 18901 Bp, je 28464 Bp), für das Plastom III 164977 Bp (89585 Bp, 18882 Bp, je 28255 Bp), für das Plastom IV 163642 Bp (87744 Bp, 18898 Bp, je 28500 Bp) und für das Plastom V 164755 Bp (88506 Bp, 19001 Bp, je 28624 Bp).

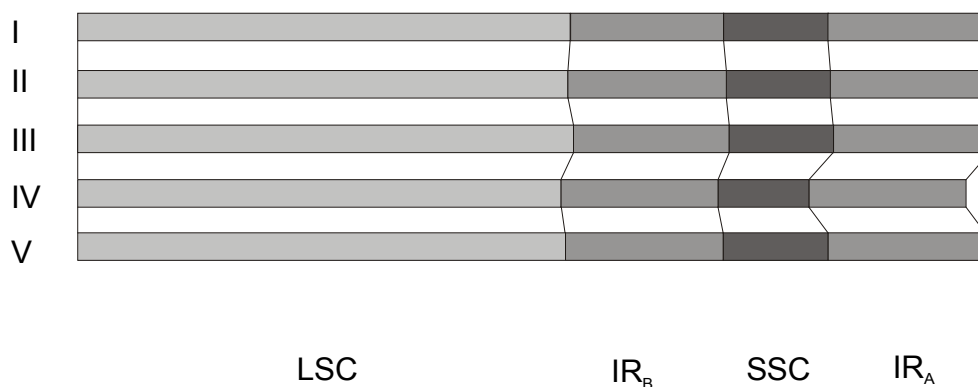


Abbildung 3.4: Längendifferenzen der einzelnen Abschnitte zwischen den *Oenothera*-Plastomen I bis V. Die beiden Einzelkopieregionen und die invertierten Regionen sind in verschiedenen Grauschattierungen dargestellt.

Trotz der teilweise beträchtlichen Längendifferenzen ist der Gehalt an Guanosin- und Cytosinnukleotiden in allen fünf Plastomen gleich (Abbildung 3.4). Er beträgt jeweils 38,2%. In den kodierenden Bereichen beträgt der GC-Gehalt von Plastom I 39,6%, in den Plastomen II, III, IV und V jeweils 39,7%. Die fünf Plastomsequenzen sind, wie im nachfolgenden Kapitel im Detail ausgeführt wird, untereinander sehr ähnlich. Die Ähnlichkeiten bewegen sich in

einem Bereich von 93% (zwischen den Plastomen I und IV bzw. I und V) bis 97% (zwischen den Plastomen II und III bzw. zwischen IV und V), also in einem Bereich, der mit dem Wert vergleichbar ist, der zwischen den Plastomen von Tabak und der Tollkirsche (*Atropa belladonna*) festgestellt wurde (>96%; Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Die folgende Matrix gibt die Ähnlichkeiten zwischen allen fünf Plastomen an.

Tabelle 3.2: Ähnlichkeitsmatrix der fünf *Oenothera*-Plastome

	Plastom I joh.	Plastom II	Plastom III	Plastom IV	Plastom V
Plastom I joh.	X	96%	94%	93%	93%
Plastom II	96%	X	97%	96%	96%
Plastom III	94%	97%	X	96%	96%
Plastom IV	93%	96%	96%	X	97%
Plastom V	93%	96%	96%	97%	X

3.3 Genomorganisation

In der grossen Einzelkopieregion tritt in allen fünf *Oenothera*-Plastomen, verglichen mit den Plastomen von Tabak und Spinat, eine Sequenzinversion auf (Herrmann *et al.* 1983). Die Inversionspunkte liegen etwa 55 kbp voneinander entfernt, an einem Ende zwischen den Genen *rps16* und *trnQ* sowie am anderen Ende des invertierten Segments zwischen *rbcL* und *accD*, so dass die Genabfolgen *rps16-rbcL* und *trnQ-accD* an den Flanken entstehen (siehe Abbildung 3.5).

An den Endpunkten der Inversion sind Sequenzwiederholungen zu finden, die als die Reste des Inversionsereignisses angesehen werden können. In der intergenischen Region zwischen *rps16* und *rbcL* in Plastom I sind drei Kopien des in Abbildung 3.5 als INV1_RBCL und zwei (zum Teil verkürzte) Kopien des als INV2_RBCL bezeichneten Sequenzmotivs vorhanden. Die Zahl der Repetitionen variiert in fünf Plastomen, so fehlt beispielsweise in Plastom V das Sequenzmotiv INV2_RBCL vollständig.

3.3.1 Gengehalt

Der Gengehalt der *Oenothera*-Plastidenchromosome ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Abgesehen von dieser grossen Inversion treten sowohl in der Genabfolge als auch dem Gengehalt weitere Unterschiede zu den Modellplastomen von Tabak und Spinat auf. Die *Oenothera*-Plastome enthalten je 110 Gene (76 für Proteine kodierende Gene, 30 Gene für tRNAs sowie 4 Gene für rRNAs) sowie zwei offene Leseraster, *ycf1* und *ycf2*, die in allen Plastomen dikotyler Pflanzen konserviert und essentiell für das Überleben der Pflanzen sind, denen aber bisher jedoch noch keine definierte Funktion zugewiesen werden konnte (Drescher *et al.* 2000). Die *Oenothera*-Plastome enthalten dagegen kein Gen für eine kleine plastidenspezifische RNA (*sprA*), welches bisher nur in Tabak identifiziert wurde (Shinozaki *et al.* 1986, Wakasugi *et al.* 1998). Eine Beteiligung der RNA an der Reifung der 16S-rRNA wird diskutiert (Vera und Sugiura 1994; Sugita *et al.* 1997).

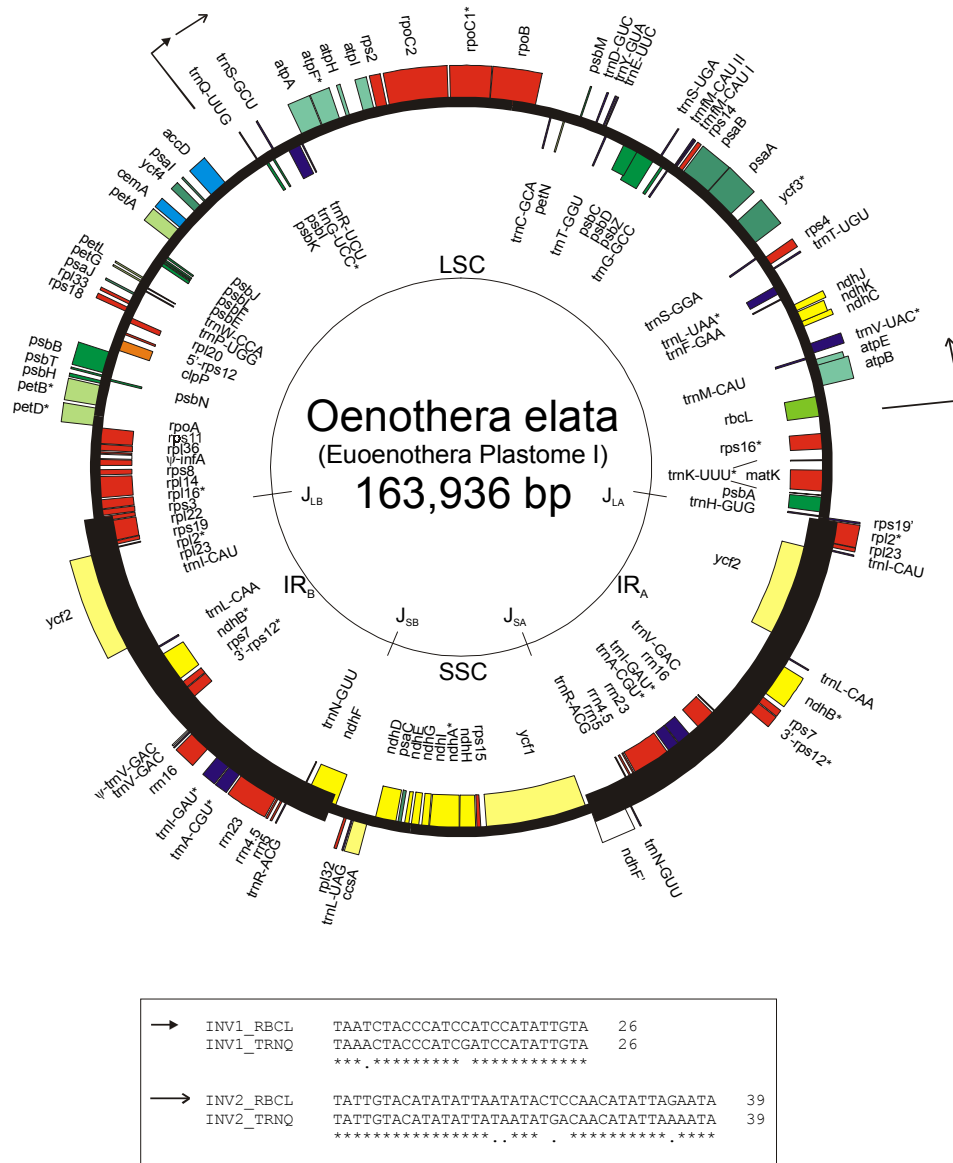


Abbildung 3.5: Physikalische Karte des Plastidengenoms von *Oenothera elata* ssp. *hookeri* Rasse *Johansen*. Innenliegende Gene werden im Uhrzeigersinn, ausserhalb des Kreises liegende gegen den Uhrzeigersinn transkribiert. Intronhaltige Gene sind mit einem Stern, Pseudogene mit einem ψ gekennzeichnet. Die Region zwischen den Pfeilen liegt im Vergleich zum Tabak invertiert vor. Die Inversion flankierende Sequenzen sind im Kasten wiedergegeben. Gene/Genprodukte sind farblich kodiert: Grüntöne kennzeichnen Photosynthesegene (*psa*, *psb*, *pet*, *atp* und *rbcL*), Rottöne kennzeichnen Gene für die Genexpressionsmaschinerie (*rpo*, *rpl*, *rps*, *matK*), in dunkelblau sind tRNA-Gene, in hellblau Gene des Kohlenstoff-Metabolismus (*accD*, *cemA*), in gelb Gene für Untereinheiten des *Ndh*-Komplexes dargestellt. Konservierte Leseraster (*ycf1*, *ycf2* und *ccsA*) sind hellgelb gefärbt. Die physikalischen Karten der weiteren *Oenothera*-Plastome weisen im Vergleich dazu keine offensichtlichen Unterschiede auf, so dass auf ihre Darstellung hier verzichtet wurde.

Tabelle 3.3: Kodierungskapazität der fünf *Oenothera*-Plastome

Kategorie	Gen(e)
Transkription	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>
RNA-Prozessierung	<i>matK</i>
Translation	<i>rrn23, rrn16, rrn5, rrn4.5</i> <i>rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19</i> <i>rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36</i> <i>trnA^{UGC}, trnC^{CGA}, trnD^{GUC}, trnE^{UUC}, trnF^{GAA}, trnG^{GCC}, trnG^{UCC}, trnH^{GUG}, trnI^{CAU}, trnI^{GAU}, trnK^{UUU}, trnL^{CAA}, trnL^{UAA}, trnL^{UAG}, trnfM^{CAU} I, trnfM^{CAU} II, trnM^{CAU}, trnN^{GUU}, trnP^{UGG}, trnQ^{UUG}, trnR^{ACG}, trnR^{UCU}, trnS^{GCU}, trnS^{GGA}, trnS^{UGA}, trnT^{GGU}, trnT^{UGU}, trnV^{UAC}, trnW^{CCA}, trnY^{GUA}</i>
Photosynthese	<i>psaA, psab, psac, psal, psaj, ycf3, ycf4</i> <i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i> <i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i> <i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i> <i>rbcL</i>
Cytochrom <i>c</i> -Synthese	<i>ccsA</i>
NADH-Dehydrogenase	<i>ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
Kohlenstoff-Metabolismus	<i>cemA</i>
Fettsäuresynthese	<i>accD</i>
Proteinabbau	<i>clpP</i>
konservierte Leseraster	<i>ycf1, ycf2</i>

Zusätzlich zum vorhandenen Genbestand existiert eine zweite Kopie des Gens für die Formyl-Methionyl-tRNA^{CAU} (*trnfM* II) in allen Plastomen, die sich mit Ausnahme des Plastoms V von der ersten Kopie (*trnfM* I) durch einen Basenaustausch unterscheidet. In Plastom V sind beide Kopien identisch, sie besitzen die Sequenz der Kopie I, GAA (Abbildung 3.6). In den Plastidengenomen anderer dikotyler Pflanzen findet sich für das Gen der Initiator-tRNA immer die Sequenz der Kopie II, die in der T ψ C-Schleife die Sequenz AAA aufweist. Im Gegensatz dazu besitzt das *trnfM*-Gen in den monokotylen Pflanzen an dieser Stelle die Sequenz GAT, unterscheidet sich also in diesem Bereich an zwei Positionen von der Sequenz

der dikotylen Pflanzen. Beide Sequenzmotive sind mit Funktionalität verknüpft. Die Sequenz von Kopie I kommt hingegen auch in der Grünalge *Prototheca* vor. Es ist ungeklärt, ob die in diesem Organismus von dem *trnFM*-Gen abgeleitete tRNA funktionell aktiv ist (Knauf und Hachtel, unveröffentlicht). Somit stellt sich auch für *Oenothera* die Frage, ob neben einem Gen für eine funktionelle tRNA eine weitere Kopie des Gens mit veränderter Sequenz die gleiche Funktion ausüben kann.

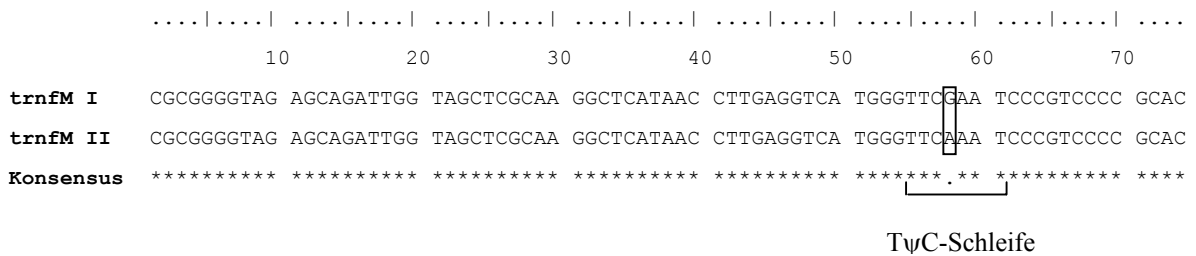


Abbildung 3.6: Sequenzvergleich der beiden Kopien des Gens für die Initiator tRNA, *trnFM I* und *trnFM II*. In Plastom V besitzen beide Kopien die Sequenz von *trnFM I*.

In den invertierten Sequenzwiederholungen lokalisierte Gene sind doppelt vorhanden. Darunter sind vier proteinkodierende Gene, eines der beiden konservierten offenen Leseraster (*ycf2*), alle vier Gene für die ribosomalen RNAs sowie sieben tRNA-Gene.

3.3.2 Intronen

17 der 110 Gene enthalten Intronsequenzen, die ebenfalls in der Tabaksequenz vorkommen. Im Gegensatz dazu steht das Fehlen von Intronen im Gen für die ATP-abhängige Protease *clpP*. Tabak besitzt zwei Intronen in diesem Gen.

Tabelle 3.4: Übersicht über die in den *Oenothera*-Plastomen kodierten Intronen. In der zweiten und dritten Spalte sind Intron-typ- und Unterklassenkategorie angegeben (nach Michel *et al.* 1989).

<u>Gen</u>	<u>Intron-</u> <u>typ</u>	<u>Unter-</u> <u>klasse</u>	<u>Länge</u> <u>in Bp</u>
<i>trnK</i> ^{UUU}	II	A1	
<i>rps16</i>	II	B1	
<i>trnV</i> ^{UAC}	II	A1	
<i>trnL</i> ^{UAA}	I	C3	
<i>ycf3</i>	II	B2	

<i>ycf3</i>	II	B1	
<i>rpoC1</i>	II	B1	
<i>atpF</i>	II	A2	
<i>trnG^{UGC}</i>	II	B2	
<i>rps12 cis *</i>	II	A1	
<i>petB</i>	II	B1	
<i>petD</i>	II	B1	
<i>rpl16</i>	II	B2	
<i>rpl2 *</i>	II	A2	
<i>ndhB *</i>	II	B2	
<i>trnI^{GAU} *</i>	II	A1	
<i>trnA^{UGC} *</i>	II	A1	
<i>ndhA</i>	II	B2	

Alle Intronen in *Oenothera* sind sowohl in ihrer Klassifikation (Michel *et al.* 1989), in ihrer Position im Genom als auch in ihren Positionen in den jeweiligen Genen zu Tabak konserviert. Ebenso wie in allen anderen bekannten Plastomen höherer Pflanzen ist das Gen für das ribosomale Protein S12, *rps12*, in zwei Teile getrennt, die sich 28 kBp bzw. 69 kBp voneinander entfernt befinden. Das Gen enthält ein in *cis* gespleißtes Intron zwischen den Exonen 2 und 3, das sich vollständig in den IR-Regionen befindet, sowie ein geteiltes in *trans* gespleißtes Intron, dessen 5'-Hälfte in der LSC-Region nach Exon 1 und dessen 3'-Hälfte in den IR-Regionen vor Exon 2 lokalisiert sind. Die verbleibenden 18 Intronen sind wie in Tabak *cis*-Intronen.

Alle 17 Intronen weisen mit Ausnahme des *trnI^{GAU}*-Introns in Plastom I an ihren Grenzen zu den Exonen Sequenzen auf, die den Konsensussequenzen prokaryotischer Intronen (Sugita und Sugiura 1996) entsprechen. Am 5'-Ende der Klasse II-Intronen von *ndhA*, *ndhB* und *rps16* in den Plastomen I, II bzw. IV ist jedoch als vierte Base anstelle eines typischerweise vorliegenden C-Nukleotids ein T-Rest kodiert. Die Effizienz des Spleißprozesses wird zumindest im Falle des *ndhB*-Gens von Plastom I und IV nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.7 links).

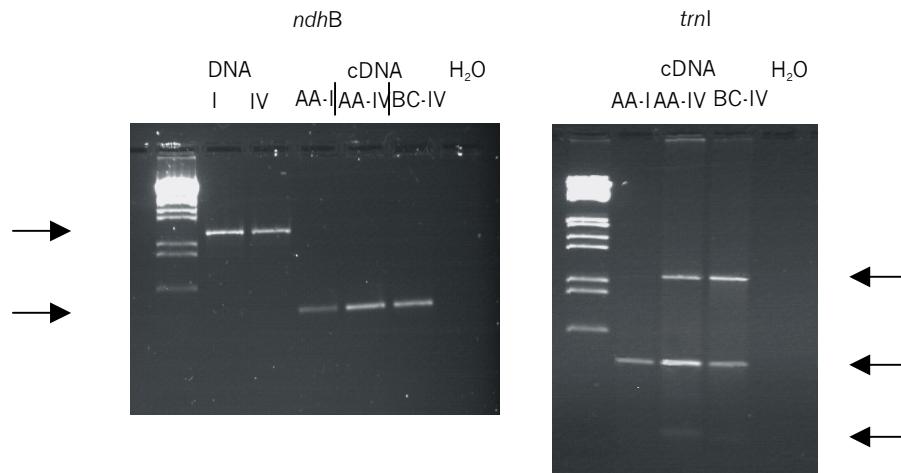


Abbildung 3.7: Reverse Transkription von Gesamt-RNA und anschliessende PCR mit Oligonukleotiden aus *ndhB* (links) und *trnI*^{GAU} (rechts). Die drei Banden im rechten Foto repräsentieren jeweils das ungespleißte (u), gespleißte (s) sowie dazwischen liegend die Heteroduplex (h) aus beiden Amplifikaten.

Das Intron von *trnI*^{GAU} (Unterklasse IIA1) unterscheidet sich im Plastom I von den anderen *Oenothera*-Plastomen durch eine zusätzliche Base an der 5'-terminalen Position im Intron. RT-PCR-Experimente zeigen, dass das Intron in jeder untersuchten Kombination (AA-I, AA-IV, BC-IV) aus der tRNA entfernt wird (Abbildung 3.7 rechts).

3.3.3 Grenzen zwischen den Einzelkopieregionen und den invertierten Repetitionen

An den Grenzen zwischen den beiden Einzelkopieregionen und den beiden IR-Regionen sind die beide Abschnitte überspannenden Gene in je einer vollständigen sowie einer weiteren verkürzten oder einer nicht-funktionellen Kopie vorhanden (in Abbildung 3.8 mit ' gekennzeichnet). An der Grenze zwischen der grossen Einzelkopieregion und den IR-Regionen betrifft dies das Gen für das ribosomale Protein S19, *rps19*. Das resultierende Protein ist um 35 Aminosäuren von 99 auf 64 Aminosäuren verkürzt und besitzt am C-Terminus eine andere Aminosäuresequenz. Es kann angenommen werden, dass dadurch die Funktion des Proteins zumindest stark beeinträchtigt wird oder sogar vollständig verloren geht (Abbildung 3.8 A). Weniger stark betroffen ist die Grenze zwischen IR-Regionen und die kleine Einzelkopieregion überspannende Gen für die Untereinheit 5 des NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase-Komplexes, *ndhF*. Dieses Protein ist bereits in seiner funktionellen Form am C-Terminus längenvariabel (es umfaßt in Plastom I 736 Aminosäuren, in den Plastomen II, III, IV und V hingegen jeweils 772 Aminosäuren). Die zweite, nicht-funktionelle Kopie wird in den Plastomen I, II und III am N-Terminus um weitere 28 Aminosäuren verkürzt, zusätzlich weisen die verkürzten Proteine von Position 4 bis 11 eine andere Sequenz auf. Aufgrund der Längendifferenzen der kleinen Einzelkopieregion verschiebt sich in den Plastomen IV und V

NDHF'OE4	-----	-----	-----	---*SDSFSW	SFPSILLLSM	V <u>M</u> LLSVYLSI	
NDHF'OE5	-----	-----	-----	----*FFLW	SFPSILLLSM	V <u>M</u> LLSVYLSI	
Konsensus					*	*****	
					▲	*****	
	
		70	80	90	100	110	120
NDHFOE1J	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHFOE2	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHFOE3L	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHFOE4	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILT	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHFOE5	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHF'OE1J	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHF'OE2	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHF'OE3L	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHF'OE4	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILT	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
NDHF'OE5	QQINRSFIYQ	YVSWTINND	FSLEFGHLID	PLASIMLILI	TTVGILVLFY	SDNYMSH...	
Konsensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****...	

Abbildung 3.8: Vergleich der Aminosäuresequenzen des ribosomalen Proteins S19 (A, vorherige Seite) und der Untereinheit 5 der NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase (B) sowie von deren verkürzten Kopien. Die Sequenz von *Rps19'* wird aufgrund einer Nukleotidsubstitution im Plastom II vorzeitig terminiert. In den verkürzten Sequenzen von *NdhF* bei den Plastomen IV und V sind potenzielle Startkodonen unterstrichen dargestellt. Die Lage der Grenzen zwischen den Einzelkopien- und den IR-Regionen sind mit einem Dreieck gekennzeichnet.

3.3.4 Pseudogene

In allen fünf Plastomen sind mindestens zwei Pseudogene vorhanden: das nicht-funktionelle Leseraster für den Translationsinitiationsfaktor 1 (ψ -*infA*) und eine nicht-funktionelle Kopie eines, in allen Plastomen konservierten Leserasters (ψ -*ycf15*). In Plastom I ist zusätzlich eine verkürzte Kopie des Gens der Valyl-tRNA^{GAC} als direkte Sequenzwiederholung in den IR-Regionen vorhanden, die in den restlichen vier Plastomen fehlt.

Wie in Kapitel 3.3.1 angemerkt, scheint auch eine der beiden Kopien der Initiator-tRNA-Gene nicht-funktionell zu sein. Die Kopie mit der Sequenz GAA im Bereich der T ψ C-Schleife ist von anderen dikotylen Pflanzen nicht bekannt, während die Sequenz der zweiten Genkopie konserviert ist. Folgerichtig sollten daher beide Genkopien in Plastom V nicht-funktionell oder nur in Kombination mit dem C-Genom funktionell sein, was wenig wahrscheinlich erscheint.

3.3.5 Repetitive Elemente

Eine Besonderheit innerhalb der Plastomsequenzen von *Oenothera* stellt die hohe Zahl an direkten Repetitionen (Tandemwiederholungen) dar. Die Länge der repetitiven Elemente reicht von 1 Bp bis hin zu 140 Bp. Die meisten Sequenzwiederholungen sind in den intergenischen Regionen lokalisiert, einige wenige jedoch auch in kodierenden Bereichen (siehe unten). Sie sind im Allgemeinen einfache Duplikationen eines kurzen Sequenzmotivs. Repetitionen mit höheren Kopienzahlen sind in der Regel nur bei kürzeren Sequenzmotiven zu beobachten.

Repetitionen innerhalb kodierender Regionen bewirken meistens eine Variation eines kurzen Aminosäuremotivs. Hiervon sind im Wesentlichen nur fünf Leseraster betroffen: *clpP*, *rps11*, *accD*, *ycf2* und *ycf1*. Wie oben beschrieben, liegt auch das Gen für die Initiator-tRNA durch eine Tandemwiederholung verdoppelt vor. Innerhalb des Gens *clpP* führt die Duplikation eines 45 Bp langen Bereichs zur Verdopplung eines 15 Aminosäuren langen Motivs am C-Terminus des Proteins. Die Sequenzwiederholung tritt nicht in Plastom IV auf. Die vierfache Wiederholung eines 6 Bp langen Motivs am 5'-Ende von *rps11* führt zur Wiederholung von zwei Aminosäurepositionen. Alle Plastome weisen diese Duplikation auf.

Die Repetitionen in den anderen drei Leserastern sind ebenfalls mehrfache Wiederholungen jeweils eines Motivs. Im *accD*-Gen (dieses kodiert für die katalytische Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase) sind diese Wiederholungen am N-Terminus eingefügt, sie reichen vom intergenischen Bereich oberhalb, d. h. 5' zum Leseraster, in dieses hinein. Im *accD*-Gen der Erbse (*Pisum sativum*) sind ebenfalls repetitive Elemente enthalten, die am N-Terminus des Proteins Aminosäuresequenzwiederholungen bewirken (Sasaki *et al.* 1989, Nagano *et al.* 1991, Smith *et al.* 1991).

In den Leserastern *ycf2* und *ycf1* sind jeweils über die gesamte Länge der Gene verschiedene Repetitionen enthalten. Bei der Analyse von *ycf2* fällt in diesem Zusammenhang auf, dass die Sequenz des Plastoms I nicht diese massiven Repetitionen, wie sie in den restlichen vier *Oenothera*-Plastomen vorgefunden werden, aufweist (nur 70% Ähnlichkeit zwischen *ycf2* der Plastome I und II). Würde man dieses Gen isoliert betrachten, so wäre die Ähnlichkeit zwischen Tabak und der *Oenothera*-I-Sequenz deutlich höher (86% Ähnlichkeit) als der anderen *Oenothera*-Plastomen zu Tabak (z. B. 60% Ähnlichkeit zu Plastom II). Im Gegensatz zu *ycf2* ist *ycf1* zwischen den fünf *Oenothera*-Plastomen stark konserviert. Die Ähnlichkeit reicht von 94% zwischen Plastom I und IV bis hin zu 97% zwischen Plastom II und IV, verglichen mit dem Gen aus Tabak (etwa 30% zu Plastom I). In beiden Leserastern sind

mehrere Repetitionen zwischen allen Plastomen in ihrer Lokalisation, nicht aber in ihrem Umfang, konserviert. In den meisten Fällen führen die Repetitionen, wie für *clpP* oder *rps11* beschrieben, zur Wiederholung eines kurzen Aminosäuresequenzmotivs: im Gen *ycf2* wird ein Oktapeptidmotiv zwischen 7- (Plastom V) und 9-fach (Plastom IV) wiederholt. Jedes einzelne Plastom weist darüber hinaus noch über das gesamte Leseraster verteilte spezifische Sequenzwiederholungen auf, die ebenfalls ausnahmslos Wiederholungen von kurzen Aminosäuremotiven darstellen. Die gleiche Situation läßt sich in *ycf1* beobachten: Acht Repetitionen, die in allen Plastomen konserviert sind, bewirken die Wiederholung eines kurzen Aminosäuremotivs (zwischen 4 und 15 Aminosäuren). Auch hier sind alle Repetitionen über die gesamte Länge des Leserasters verteilt. Es existieren, ähnlich wie in *ycf2*, weitere Repetitionen, die jedoch nicht konserviert sind und oft nur auf ein bis zwei Plastome beschränkt sind.

In den intergenischen Bereichen sind Sequenzwiederholungen häufiger zu finden. Meist handelt es sich hierbei um einfache Tandemwiederholungen von einigen wenigen Basen. Massive Repetitionen treten im Bereich des vermutlichen Replikationsursprungs auf, der innerhalb des Operons für die ribosomalen RNAs lokalisiert ist. Die fünf analysierten Plastome unterscheiden sich in diesem Bereich alle voneinander. Möglicherweise ist dadurch die Expression der rRNA-Gene beeinträchtigt.

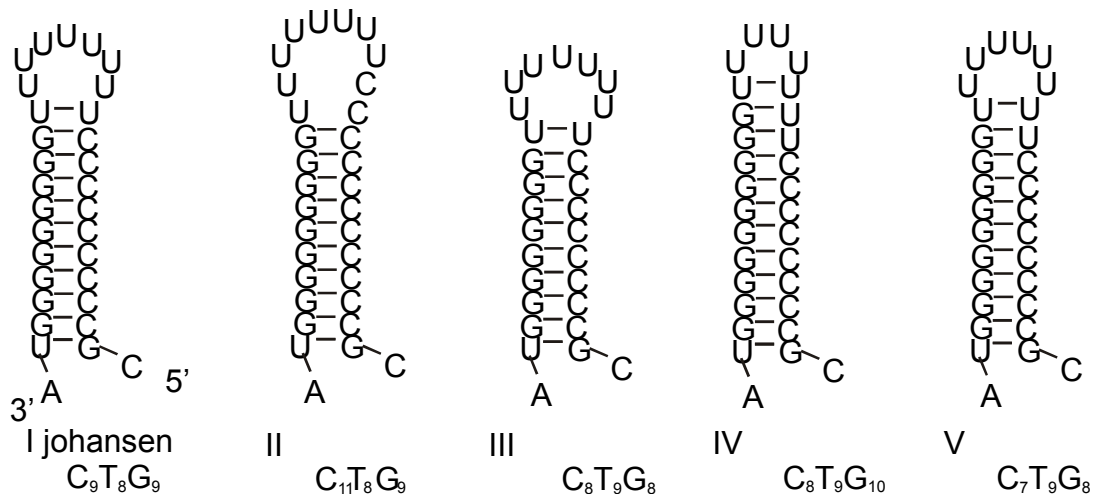


Abbildung 3.9: Potentielle Sekundärstrukturen, die sich am 3'-Ende des *trnfM*-Transkripts ausbilden können.

Ebenfalls auffällig ist ein Sequenzbereich 3'-terminal zu den beiden Genen für die Initiator-tRNA. Hier könnte sich posttranskriptional eine Stammeschleifen-Struktur ausbilden, die jedoch zwischen allen fünf Plastomen variiert (Abbildung 3.9). Die potentiellen Sekundärstrukturen, die sich in den Plastomen IV und V ausbilden, weisen als Abschluss des

Stamms zur Schleife hin ein bzw. zwei G-U-Basenpaare auf. Hingegen sind in die Stämme dieser Struktur in den anderen drei Plastomen nur Watson-Crick-Basenpaarungen integriert, eventuell könnte eine U-U-Wechselwirkung die Schleifen stabilisieren. Die Stammschleifenstruktur im intergenischen Bereich *trnFM-trnG* könnte, da sie in allen fünf Plastomen unterschiedlich ist, sowohl auf DNA- als auch auf der RNA-Ebene regulatorische Funktion ausüben. (Näheres siehe Diskussion.)

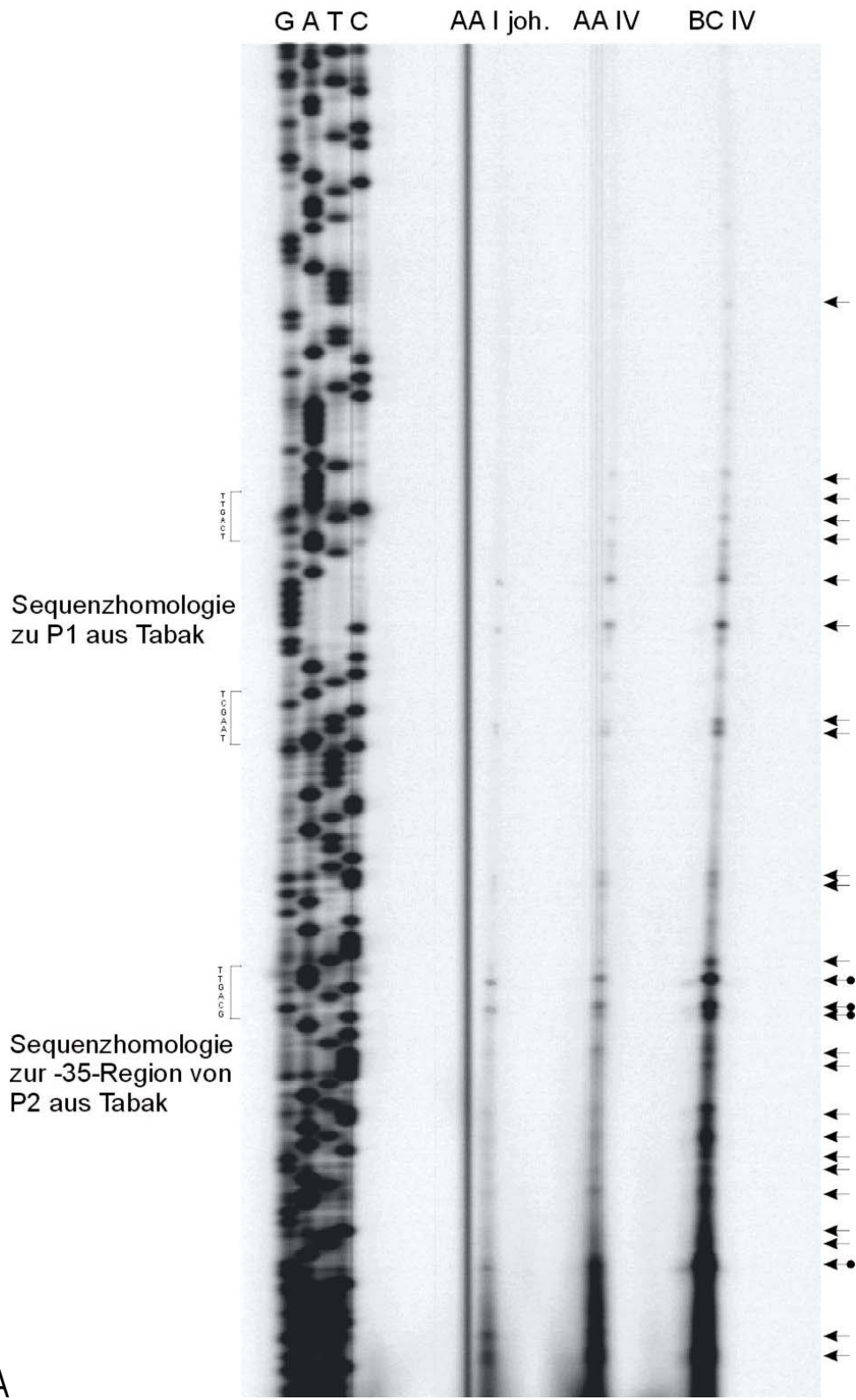
Tabelle 3.5: Thermodynamische Parameter für die potentielle Sekundärstruktur im intergenischen Bereich *trnFM-trnG* auf DNA- und RNA-Ebene. Basen, die in die Bildung des Stammes der Struktur involviert sind, sind fett gedruckt dargestellt ([StammA]-Schleife-[StammB]).

Plastom	DNA-Sekundärstruktur	ΔG_{DNA}	RNA-Sekundärstruktur	ΔG_{RNA}
I joh.	5'-G-[C ₉]-T ₈ -[G ₉]-T-3'	-15,3 kJ/mol	5'-[GC ₉ U]-U ₆ -[UG ₉ U]-3'	-21,9 kJ/mol
II	5'-GC ₂ -[C ₉]-T ₈ -[G ₉]-T-3'	-14,7 kJ/mol	5'-[GC ₉]-U ₈ C ₂ -[G ₉ U]-3'	-20,7 kJ/mol
III	5'-G-[C ₈]-T ₉ -[G ₈]-T-3'	-13,5 kJ/mol	5'-[GC ₈ U]-U ₆ -[UG ₈ U]-3'	-18,4 kJ/mol
IV	5'-G-[C ₈]-T ₈ G-[G ₈]-GT-3'	-13,2 kJ/mol	5'-[GC ₈ U ₂]-U ₆ -[G ₁₀ U]-3'	-20,3 kJ/mol
V	5'-G-[C ₇]-T ₉ -[G ₇]-GT-3'	-11,6 kJ/mol	5'-[GC ₇ U ₂]-U ₆ -[UG ₈ U]-3'	-17,1 kJ/mol

3.3.6 Regulatorische Elemente

Alle in Tabak beschriebenen Transkriptionseinheiten sind auch in allen *Oenothera*-Plastomen vorhanden und zumindest, soweit sich das aus der Sequenz ableiten läßt, auch intakt. Die in der Literatur beschriebenen, meist in Tabak untersuchten, Promotor- und Prozessierungselemente können mit wenigen Ausnahmen auch in allen *Oenothera*-Plastomen gefunden werden. Die Promotoren für die rRNA-Gene in den Plastomen I und IV sowie der Wildart *Oenothera parviflora* (BC-IV), die vor dem Gen für die 16S rRNA liegen, wurden mit Hilfe von "primer extension"-Analysen charakterisiert. Die Region zwischen den Genen für die 16S rRNA und der tRNA-Ile^{GAU} ist aufgrund multipler Repetitionen zwischen den Plastomen stark divergent. Diese Varianz könnte sich auch auf die Expression der ribosomalen RNAs auswirken. Von vielen dikotylen Pflanzen sind mindestens zwei, von Tabak sogar drei Promotoren beschrieben (Lerbs-Mache 2000). Von diesen werden unter Standardbedingungen ein bzw. in Ausnahmefällen, wie bei *Arabidopsis* oder dem Senf, zwei Promotoren für die Transkription der rRNA-Gene genutzt. Die "primer Extension"-Analysen zeigen die intensivsten Signale in einer Region, die als -35-Region des Promotors P2 beschrieben wurde (an den Positionen -76, -74 und -73 in *Oenothera*). Weitere 5'-Enden können zwischen dem Prozessierungspunkt (an Position -29 in *Oenothera*) und der -35-Region von P2 detektiert werden. Im Vergleich mit Tabak sind diese Signale nahe dem in *Oenothera* fehlenden Promotor P3 (Kapoor und Sugiura 1999; Liere und Maliga 1999) lokalisiert. Zusätzlich konnten Signale im 5'-Bereich

vor dem Gen für die tRNA-Val^{GAC} detektiert werden. RT-PCR-Experimente bestätigen die Kotranskription von *trnV^{GAC}* und den Genen für die ribosomalen RNAs (Abbildung 3.10).



A

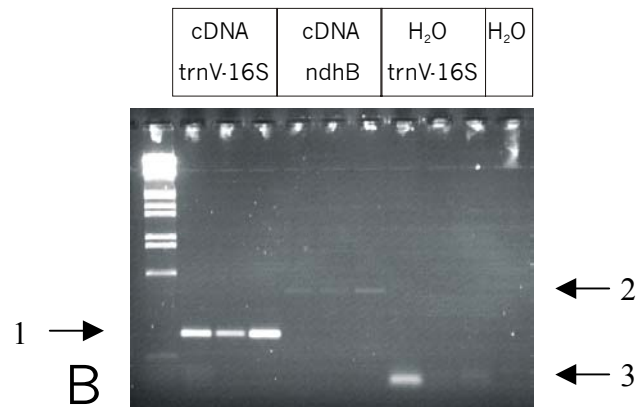


Abbildung 3.10: Diese und vorhergehende Seite: (A) “primer extension”-Experimente zur Lokalisation von 5'-Enden (mögliche Promotoren) im intergenischen Bereich zwischen *trnV* und *rrn16*. Die Punktmarkierung deutet auf mögliche Initiationsstellen der Transkription hin. (B) Reverse Transkription von Gesamt-RNA aus *Oenothera* AA-I, AA-IV sowie BC-IV und anschließende PCR mit Oligonukleotiden aus *trnV* und *rrn16* (1). Die Kontrollreaktion (*ndhB*; 2) zeigt, dass keine DNA-Kontamination der RNA-Präparation vorliegt. (3) zeigt nicht verlängerte Oligonukleotide.

RNA-Hybridisierungsexperimente an Transkripten, in deren vermutetem Promotorbereich grössere Deletionen auftreten, könnten zur Identifikation von möglichen plastom-kodierten Determinanten für die Inkompatibilität führen. Stromaufwärts des Operons *psbEFLJ* sind in den Plastomen IV und V etwa 410 Basenpaare im Vergleich mit Plastom I deletiert. Das Transkriptmuster des Operons ist zwischen den untersuchten Plastomen (siehe oben) jedoch identisch (Abbildung 3.11).

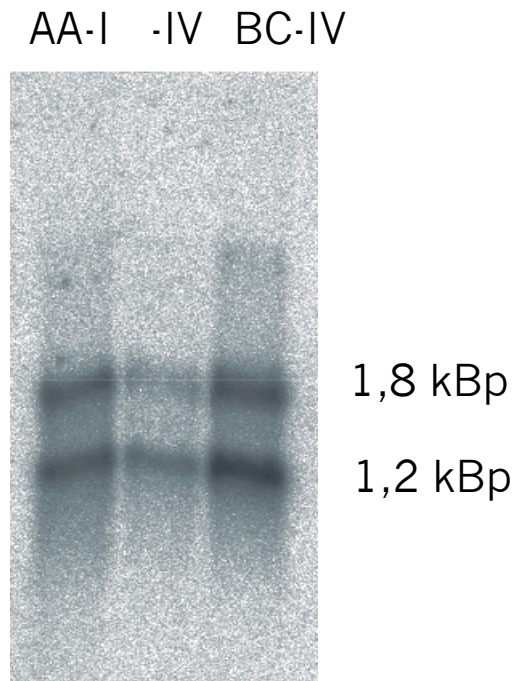


Abbildung 3.11: RNA-Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde gegen *psbE*. In allen drei untersuchten Genom/Plastom-Kombinationen ist das Transkriptionsmuster trotz einer Deletion von etwa 400 Bp im potentiellen Promotorbereich des Operon in Plastom IV identisch.

3.3.7 Nutzung von Aminosäurekodonen ("codon usage")

Die Gesamtsequenzen der fünf *Oenothera*-Plastome weisen einen für dikotyle Pflanzen typischen Gehalt an Guanosin- und Cytosinnukleotiden auf (38,2%; siehe oben). In den proteinkodierenden Genen liegt dieser Wert minimal höher (39,6-39,7%), dies reflektiert sich auch in der Verwendung der Aminosäurekodonen. In allen fünf Plastomen ist die Verwendung von AT-reichen Kodonen gegenüber der Verwendung der synonymen Kodonen, die für die gleiche Aminosäure kodieren, bevorzugt. Ausserdem werden deutlich mehr Kodonen mit Adenosin oder Thymin an der ersten oder zweiten Kodonposition verwendet. Für alle Aminosäuren mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan, für die nur ein Kodon existiert, gilt, dass die Kodonen, an deren dritter Position sich entweder ein C- oder ein G-Nukleotid befindet, weniger häufig benutzt werden, als es statistisch gesehen aus der Nukleotidzusammensetzung der Gene abzuleiten wäre. Als Beispiel soll die Kodonhäufigkeit für Tyrosin betrachtet werden. Tyrosin kann aufgrund seiner polaren Hydroxylgruppe an einer aromatischen Struktur sowohl im Innern als auch nahe der Oberfläche von Proteinen eingebaut werden, ist also in Proteinen annähernd gleichmässig vertreten. Das TAC-Kodon wird jedoch nur mit einer Häufigkeit von rund 21% in den *Oenothera*-Plastomen (20,8%-21,6%) benutzt.

	557	30.3%	356	30.2%	958	74.5%	402	27.7%	A
	523	100.0%	147	12.5%	328	25.5%	189	13.0%	G
G	448	34.7%	572	41.3%	716	74.4%	513	31.3%	T
	182	14.1%	244	17.6%	247	25.6%	200	12.2%	C
	465	36.0%	348	25.1%	958	70.6%	590	36.0%	A
	196	15.2%	220	15.9%	399	29.4%	335	20.5%	G

E

Plastom V	T		C		A		G		
T	823	64.1%	482	28.5%	646	79.2%	182	74.0%	T
	460	35.9%	281	16.6%	170	20.8%	64	26.0%	C
	769	30.8%	285	16.9%	40	51.3%	17	21.8%	A
	486	19.4%	179	10.6%	21	26.9%	404	100.0%	G
C	536	21.4%	362	35.3%	382	71.8%	325	22.4%	T
	194	7.8%	231	22.5%	150	28.2%	112	7.7%	C
	338	13.5%	266	25.9%	636	74.7%	318	21.9%	A
	176	7.0%	167	16.3%	215	25.3%	104	7.2%	G
A	912	49.4%	441	37.2%	754	75.2%	331	19.6%	T
	374	20.3%	232	19.6%	249	24.8%	133	7.9%	C
	559	30.3%	364	30.7%	969	73.1%	409	28.1%	A
	523	100.0%	148	12.5%	356	26.9%	186	12.8%	G
G	454	34.5%	574	41.1%	759	75.2%	525	31.7%	T
	198	15.1%	246	17.6%	250	24.8%	195	11.8%	C
	470	35.7%	351	25.2%	1034	70.1%	591	35.7%	A
	193	14.7%	224	16.1%	442	29.9%	344	20.8%	G

Tabelle 3.7: Häufigkeit der Start- und Stoppkodonen in den fünf Plastomen

	Plastom I	Plastom II	Plastom III	Plastom IV	Plastom V
ATG	77	77	77	77	77
ACG	1	1	1	1	1
TAA	41	41	40	40	40
TAG	24	24	25	25	25
TGA	13	13	13	13	13

3.3.9 Proteine und abgeleitete Struktur

Eine Ursache für die Inkompatibilität zwischen nukleären Genomen und Plastomen kann regulatorischer und/oder struktureller Natur sein und z. B. aus der fehlenden oder verminderten Interaktion zwischen Untereinheiten von Proteinkomplexen oder von Proteinen mit Nukleinsäuren resultieren. Auf der Basis multipler Aminosäuresequenzvergleiche wurden alle plastomkodierte Proteine analysiert. Von der Analyse werden die beiden grossen Leseraster *ycf1* und *ycf2* aus den bereits oben unter Abschnitt 3.3.5 genannten Gründen ausgeschlossen. Die Unterschiede in den Leserastern zwischen den *Oenothera*-Plastomen untereinander und mit den Proteinen anderer Spezies erfolgte, wenn möglich, detailliert auf der Basis von hochaufgelösten Röntgenkristall- oder NMR-Strukturdaten (Berman *et al.* 2000). Waren diese nicht verfügbar, so wurde die Analyse auf die wichtigsten Aminosäure-

sequenzunterschiede beschränkt. Im Folgenden werden die Substitutionen immer auf die Majorität der Plastome bezogen, d. h. die Notation des Aminosäureaustauschs I64V in *Ycf3* beispielsweise gibt an, dass in der Mehrheit der fünf Plastome (hier: die Plastome II, III, IV und V) ein Isoleucin kodiert ist und nur in dem Plastom, das ein anderes Aminosäurekodon aufweist (in diesem Fall Plastom I) ein Valinrest im Protein vorhanden ist. Das Vorhandensein einer bestimmten Aminosäure ist aus der DNA-Sequenz bzw. in besonders beschriebenen Fällen der cDNA-Sequenz abgeleitet.

3.3.9.1.1 *Ribosomale Proteine*

Die 21 ribosomalen Proteine weisen insgesamt 61 Substitutionen in mindestens einem Plastom auf. 24 davon sind nach der BLOSUM62-Matrix (Henikoff und Henikoff 1992) als konservativ und 47 als nicht-konservativ einzustufen. Daneben werden 3 Insertionen/Deletionen vorgefunden. Die Substitutionen erfolgen mit wenigen Ausnahmen an Positionen, die unter den Landpflanzen eine geringe Konservierung zeigen, oder bei denen in anderen Spezies ein ähnlicher Wechsel der Aminosäure an der gleichen Position erfolgt ist. Von den vier Austauschen, die hochkonservierte Aminosäuren in *rps2*, *rps3*, *rps8* und *rpl2* betreffen, wird in drei Fällen die Nettoladung des entsprechenden Proteins durch einen Austausch einer sauren Aminosäure durch eine neutrale oder basische (bzw. umgekehrt) verändert. Für ribosomale Proteine sind Substitutionen dieser Art möglicherweise weniger kritisch, da ihre Funktion vorwiegend in der Stabilisierung und Orientierung der ribosomalen RNAs liegt. Die Substitution in *rps8* könnte im Plastom I durch ein Edierungsereignis (siehe Abschnitt 3.3.10) der mRNA in die Sequenzen der Plastome II und III an dieser Stelle verändert werden (Veränderung eines Serinkodons in ein Phenylalaninkodon). Die Sequenzen der Plastome IV und V beinhalten ein Isoleucinkodon, das nicht in ein Phenylalaninkodon ediert werden kann. Die Insertionen/Deletionen sind ausschliesslich an den C-Termini von *rps18* und *rpl20* lokalisiert. In diesen Proteinen sind die C-Termini bei allen Landpflanzen sehr stark variabel, so dass anzunehmen ist, dass die zusätzlichen Aminosäurereste die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigen.

3.3.9.1.2 *Die ATP-Synthase*

Die in den Photosyntheseprozess eingebundenen Multiproteinkomplexe von Photosystem I und II, dem Cytochrom *b₆f*-Komplex, ATP-Synthase und Ribulose-1,6-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase zeigen ähnlich hohe Substitutionsraten wie die ribosomalen Proteine. Fünf der sechs plastomkodierten Untereinheiten der CF₀F₁-ATP-Synthase weisen 34 Substitutionen und eine C-terminale Insertion/Deletion in der CF₁-Untereinheit α auf. Von den Substitu-

tionen sind im Gegensatz zu den ribosomalen Proteinen die Mehrzahl (19 Positionen) konservative Aminosäureaustausche, nur 15 betreffen Austausch von nicht konservativen Aminosäuren.

In CF₀-IV, kodiert von *atpI*, könnte durch ein mögliches Edierungsereignis in Plastom IV an Position 204 der in allen Landpflanzen konservierte Leucinrest wiederhergestellt werden. Zwei der im Sinne der BLOSUM62-Matrix konservativen Austauschen verändern in CF₁- α die Nettoladung um -2 durch eine Lysin-durch-Glutamat-Substitution (K90E) in Plastom V und in CF₀-I um $+2$ durch eine Glutamat-durch-Lysin-Substitution (E72K) in Plastom III.

Die Substitution an Position 72 innerhalb CF₀-I ist auch in den monokotylen Pflanzen sowie in den *Pinaceae* und den Lebermoosen vorhanden. An allen anderen Positionen sind die Aminosäuren in den Landpflanzen nicht konserviert. Einzig die Substitution in Plastom I an Position 43 (F43C) ist nicht konservativ, sie ist innerhalb einer α -Helix lokalisiert. Die Substitution eines Phenylalaninrests durch einen Cysteinrest sollte allerdings die Struktur der Helix nicht stören.

Die α -Untereinheit der ATP-Synthase der fünf Plastome, kodiert von *atpA*, unterscheidet sich an acht Positionen untereinander. Zusätzlich existiert am C-terminalen Ende eine kurze Deletion. Die Substitutionen liegen zum Grossteil an der Oberfläche des Proteins; die gemeinsame Grenzfläche mit der β -Untereinheit ist zu 100% konserviert. Der einzige grössere Unterschied zeigt sich in Plastom V an Position 90. Die Substitution K90E verändert die Nettoladung des Proteins um -2 , der betroffene Aminosäurerest ist jedoch, soweit aus den Kristallstrukturen ersichtlich ist, in eine elektrostatische Wechselwirkung eingebunden. Die Verkürzung des C-Terminus von CF₁- α durch eine Deletion von zwei Aminosäuren in den Plastomen I, II, IV und V ist für die Angiospermen untypisch, tritt hingegen bei der Gymnospermen *Pinus thunbergii* in grösserem Umfang auf. Hier sind im Vergleich zu den anderen Landpflanzen 13 Aminosäurereste deletiert.

3.3.9.1.3 Der Cytochrom *b₆f*-Komplex

Die Untereinheiten des Cytochrom *b₆f*-Komplexes sind in allen Landpflanzen hoch konserviert. In den fünf *Oenothera*-Plastomen treten nur in den drei höhermolekularen Proteinen, Cytochrom *f*, Cytochrom *b₆* und Untereinheit IV, Substitutionen auf. Insgesamt ist ein konservativer Aminosäureaustausch gegenüber acht nicht-konservativen Substitutionen zu verzeichnen. Alle Substitutionen befinden sich in Bereichen, die nach den verfügbaren Kristallstrukturen von Cytochrom *f* und des homologen Cytochrom *bc₁*-Komplexes aus Rindermitchondrien für die Funktion nicht wichtig sind. Die Aminosäuren von Cytochrom *f*,

die die prosthetische Gruppe koordinieren, sind in den Plastomen konserviert. Im Cytochrom *f* von Plastom IV tritt eine einzige Substitution an Position 94 des maturen Proteins, von Lysin nach Asparagin, auf. In dreidimensionalen Modellierungen verursacht die Substitution keine Störung der Gesamtstruktur. Diese Aminosäure ist ungefähr 25 Å vom Eisenion der Hämgruppe entfernt. Der Verbindungsachse zwischen der Hämgruppe und dem Kupferion des Plastocyanins, entlang derer die Elektronen transferiert werden müssen, verläuft in den Modellierungen rund 24 Å entfernt. Die Oberfläche, an die das Plastocyanin an das Cytochrom *f* bindet, ist auf der entgegengesetzten Seite des Moleküls.

Zwei der Substitutionen in Cytochrom *b*₆ (Q70P und M73K) aus Plastom I befinden sich am Ende einer Helix, die, entsprechend den Strukturdaten des homologen mitochondrialen Cytochrom *bc*₁-Komplexes, entlang der gemeinsamen Oberfläche zwischen Cytochrom *f* und Cytochrom *b*₆ verläuft. Die Aminosäuren an Position 67 und 70 wechselwirken ausschliesslich mit Resten innerhalb des Cytochroms *b*₆. Aufgrund der relativ geringen Ähnlichkeit zwischen dem mitochondrialen Cytochrom *b* aus *Bos taurus* und dem plastidären Cytochrom *b*₆ lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf die Auswirkungen der entsprechenden Substitutionen machen. Die dritte Substitution im Cytochrom *b*₆ von Plastom I, L106H, befindet sich am entgegengesetzten Ende des Proteins am Ende einer α -Helix. Der eingeführte Histidinrest fügt sich in die Sekundärstruktur ein; innerhalb der modellierten Struktur wird die Helix nicht gebrochen. Keiner der drei Reste wechselwirkt direkt mit den beiden Hämgruppen oder mit Resten, die an die Hämgruppen assoziiert sind. In der plastidären Untereinheit IV des Komplexes, die dem C-Terminus des mitochondrialen Cytochroms *b* entspricht, sind die Substitutionen in den verschiedenen Plastomen ebenfalls entweder am Ende von Helices oder in Schleifen bzw. Bereichen nicht-repetitiver Sekundärstruktur ("coil") lokalisiert. Keine der ausgetauschten Aminosäuren konnte in entsprechenden Modellierungen die Strukturen signifikant beeinträchtigen. Die Bindungstasche für Plastochinon, Q₀, mit dem hoch konservierten PEWY-Motiv ist von den Substitutionen nicht betroffen.

3.3.9.1.4 Das Photosystem I (PS I)

Insgesamt kodieren sieben plastidäre Gene für Untereinheiten des Photosystems I, fünf davon sind im funktionellen Komplex enthalten, zwei weitere (*Ycf3* und *Ycf4*) sind an der Assemblierung des Photosystems beteiligt (Boudreau *et al.* 1997; Ruf *et al.* 1997). In *Ycf3* tritt nur eine Substitution an Position 64 der von Plastom I abgeleiteten Proteinsequenz auf. Ein in den Landpflanzen konservierter Isoleucinrest an Position 64 ist hier durch Valin ersetzt. Der Aminosäureaustausch ist innerhalb eines der sechs Tetratricopeptid-Wiederholungen (TPR-Moti-

ve) lokalisiert. Der konservative Austausch eines hydrophoben Restes durch einen anderen mit kürzerer Seitenkette sollte die Funktion der TPR-Wiederholungen, Protein-Protein-Interaktion, nicht beeinträchtigen. Das von Plastom I abgeleitete Protein ist N-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt. Diese Deletion sollte die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigen, da in Spinat in diesem Bereich einige Aminosäuren fehlen und darüberhinaus in *Lotus japonicus* 42 Aminosäuren am N-Terminus deletiert sind. In beiden Fällen werden die Proteine als funktionell angenommen.

Ycf4 ist ein Protein, das bei der Akkumulation und Assemblierung des Photosystems I (Boudreau *et al.* 1997) in *Chlamydomonas* eine Rolle spielt. In den fünf *Oenothera*-Plastomen treten fünf konservative Substitutionen auf, von denen eine (E182K in Plastom I) wiederum die Veränderung der Nettoladung bewirkt. Die restlichen vier Substitutionen sind ausschliesslich konservative Aminosäureaustausche, die die Seitenkette oder Polarität der Reste in ihrer Länge nur minimal verändert (F26I, N47S, L80M und I181L). Schliesslich ist der C-Terminus des von Plastom I kodierten Proteins um zwei Aminosäuren länger, was im Vergleich mit den Proteinen anderer Landpflanzen ungewöhnlich ist. Jedoch zeigt beispielsweise das Protein aus *Lotus japonicus* nahe dem C-terminalen Ende über annähernd 20 Aminosäuren eine vollständig andere Sequenz.

Die beiden Proteine, die das Reaktionszentrum von PS I bilden, weisen zusammen 23 Substitutionen auf, 6 davon im P700-Apoprotein A1 (von *psaA* kodiert) und 17 im P700-Apoprotein A2 (von *psaB* kodiert). Die Substitution, die in Plastom I an Position 71 des P700-Apoproteins A1 abgeleitet werden kann (F71S), liegt innerhalb einer hochkonservierten Region. Das Serin-Kodon könnte posttranskriptional durch Edierung in ein Phenylalanin-Kodon verändert werden (siehe Abschnitt 3.3.10). Der Aminosäurerest 176 in Plastom IV (F176S) liegt in der benachbarten α -Helix des P700-Apoproteins A1 an der stromalen Seite. Hier könnte das Serin-Kodon ebenfalls durch ein posttranskriptionelles Edierungsereignis in ein Phenylalanin-Kodon umgewandelt werden, die Struktur der Transmembranhelix ist davon aber nicht gestört. In Plastom V ist an Position 143 ein Glutaminrest durch einen Histidinrest ersetzt. Die α -Helix, in der der Austausch lokalisiert ist, liegt auf der lumenalen Seite des Proteins. Das Histidin wird jedoch in eine bestimmte Konformation gezwungen, in der es nicht mit den umliegenden Resten kollidiert. Alle anderen denkbaren Konformationen resultieren in einer Wechselwirkung mit den Aminosäureseitenketten der benachbarten Reste, was mit einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur der α -Helix einhergeht. Innerhalb einer weiteren Transmembranhelix liegen nahe der lumenalen Seite die beiden Aminosäuren an Position 363 und 365. Im Plastom II sind die Reste durch Glycin bzw. Threonin ersetzt

(V363G bzw. A365T). Im Vergleich mit dem entsprechenden Protein anderer Landpflanzen zeigt sich, dass die Aminosäure an Position 363 nicht konserviert ist. Hingegen ist im Aminosäurevergleich der Rest an Position 365 hochkonserviert. Bei allen Substitutionen bleibt die Ladung des Proteins konstant. Die durch die Substitutionen betroffenen Aminosäuren sind mit Ausnahme der gleich zu besprechenden Substitution maximal 4 Å von Chlorophyllmolekülen entfernt. In Proteininteraktionen sind diese Reste nicht involviert.

In der Kristallstruktur von PS I aus *Synechococcus* ist an der homologen Position, die in Plastom V die Substitution G509V enthält, eine Schleife mit zwei aufeinanderfolgenden Glycinresten. In den höheren Pflanzen sind an dieser Stelle drei aufeinanderfolgende Glycinreste, von denen einer, wie bereits erwähnt, durch Valin ersetzt ist. Die Schleife befindet sich auf der lumenalen Seite des Photosystems und ist frei zugänglich. Wird eine zusätzliche Aminosäure in die Kristallstruktur einmodelliert, so stellt diese keine strukturelle Hinderung dar.

Das P700-Apoprotein A2, kodiert von *psaB*, weist zwischen den fünf *Oenothera*-Plastomen an 17 Stellen Substitutionen auf. An acht Stellen wurden die Aminosäuren durch andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt, an den restlichen neun Positionen durch Aminosäuren mit anderen Eigenschaften. Der Histidinrest an Position 43 des von Plastom I kodierten Apoproteins A2 liegt an der stromalen Seite des Proteins. In allen anderen Plastomen ist an dieser Stelle ein Tyrosin kodiert. Durch Edierung könnte hier diese konservierte Aminosäure wiederhergestellt werden, obwohl keine offensichtliche sterische Notwendigkeit dafür besteht. Proteinmodellierungen zeigen keine Interaktionen mit anderen Resten. Die weiteren Substitutionen in Plastom I, K415I, I463R, G489V, L527S, F553L, V590A, F592L, N605F, S607A, V635F und M640L, sind ebenfalls in der dreidimensionalen Struktur potentiell nicht hinderlich. Die beiden Aminosäuren an den Positionen 527 und 553 könnten ebenfalls durch Edierung in die hochkonservierten Reste umgewandelt werden. Aus der Kristallstruktur geht hervor, dass die Aminosäure L553 (bzw. deren Homologe in *PsaB* des cyanobakteriellen Reaktionszentrums an Position 559) Kontakte zu den peripheren Untereinheiten auf der Stromaseite *PsaC* ausbildet. Diese Untereinheit befindet sich in einem Abstand von weniger als 4 Å vom Reaktionszentrum entfernt. Weitere Protein-Protein-Kontakte werden von den Aminosäuren I415 und A607 des Apoproteins A2 zu Untereinheit III des Photosystems I (kodiert von *psaF*) sowie von F635 und L640 zum Apoprotein A1 ausgebildet.

In den Plastomen II und V wird jeweils nur eine Substitution in *psaB* vorgefunden: in Plastom II F168V und in Plastom V P311T. An beiden Positionen haben die Aminosäuren in der

cyanobakteriellen Struktur maximal 4 Å Abstand zu den Chlorophyll *a*-Pigmenten. Die Modellierung der Substitution stört diese Protein-Pigment-Interaktionen offenbar nicht.

Jeweils zwei Substitutionen treten in den Plastomen III und IV auf. Im Plastom III ist neben der bereits oben erwähnten Substitution K415I auch der ebenfalls hochkonservierte Rest R564 gegen Prolin substituiert. Diese Aminosäure ist auch etwa 4 Å von *PsaC* und *PsaE*, einer weiteren peripheren Untereinheit auf der Stromaseite von PS I, entfernt. Im Plastom IV schliesslich ist neben R410G, das etwa 4 Å von Chlorophyll *a* entfernt ist, noch das Glutamin Q452 durch Histidin ausgetauscht. Diese Substitution lässt sich nicht in die cyanobakterielle Struktur modellieren, ohne benachbarte Aminosäuren in ihrer Orientierung zu verändern. Innerhalb von 4 Å bestehen keine Kontakte, weder mit Proteinuntereinheiten noch mit Pigmenten, zwischen 4 und 8 Å jedoch treten mindestens 8 Interaktionen mit Resten von PS I-III, mit *PsaJ*, mit Chlorophyll *a* und β -Karotin auf. Wird die Substitution in die Kristallstruktur modelliert und mit den benachbarten Aminosäuren eingepasst, so ergibt sich keine Änderung der Moleküloberfläche.

3.3.9.1.5 Das Photosystem II (PS II)

Das Reaktionszentrum des PS II besteht aus den beiden Proteinen D1 und D2, die von *psbA* und *psbD* kodiert werden, aus den beiden Untereinheiten für das Cytochrom *b*₅₅₉ (*psbE* bzw. *psbF*) sowie dem kleinen *PsbI*-Protein, dessen Funktion im Komplex nicht bekannt ist. Von diesen fünf Proteinen weisen drei Unterschiede zwischen den fünf Plastomen auf: D2, die α -Untereinheit des Cytochroms *b*₅₅₉ und das *PsbI*-Protein. Hierbei stehen sechs konservativen zwei nicht-konservative Substitutionen gegenüber. Im Gegensatz zu PS I, bei dem aus dem funktionellen Komplex nur die beiden Proteine des Reaktionszentrums Unterschiede aufweisen (siehe oben), zeigen bei PS II auch die proximalen Antennenproteine CP43 und CP47 sowie die kleinen Untereinheiten *PsbJ*, *PsbK* und *PsbM* Differenzen zwischen den Plastomen. In diesen fünf Proteinen stehen 15 konservative 9 nicht-konservativen Substitutionen gegenüber, die meisten davon in CP47 (10 konservative und nur 4 nicht-konservative Austausche). Leider stehen für eine ähnlich detaillierte Beurteilung der Substitutionen wie bei Photosystem I keine hochaufgelösten Kristall- oder NMR-Strukturdaten zur Verfügung.

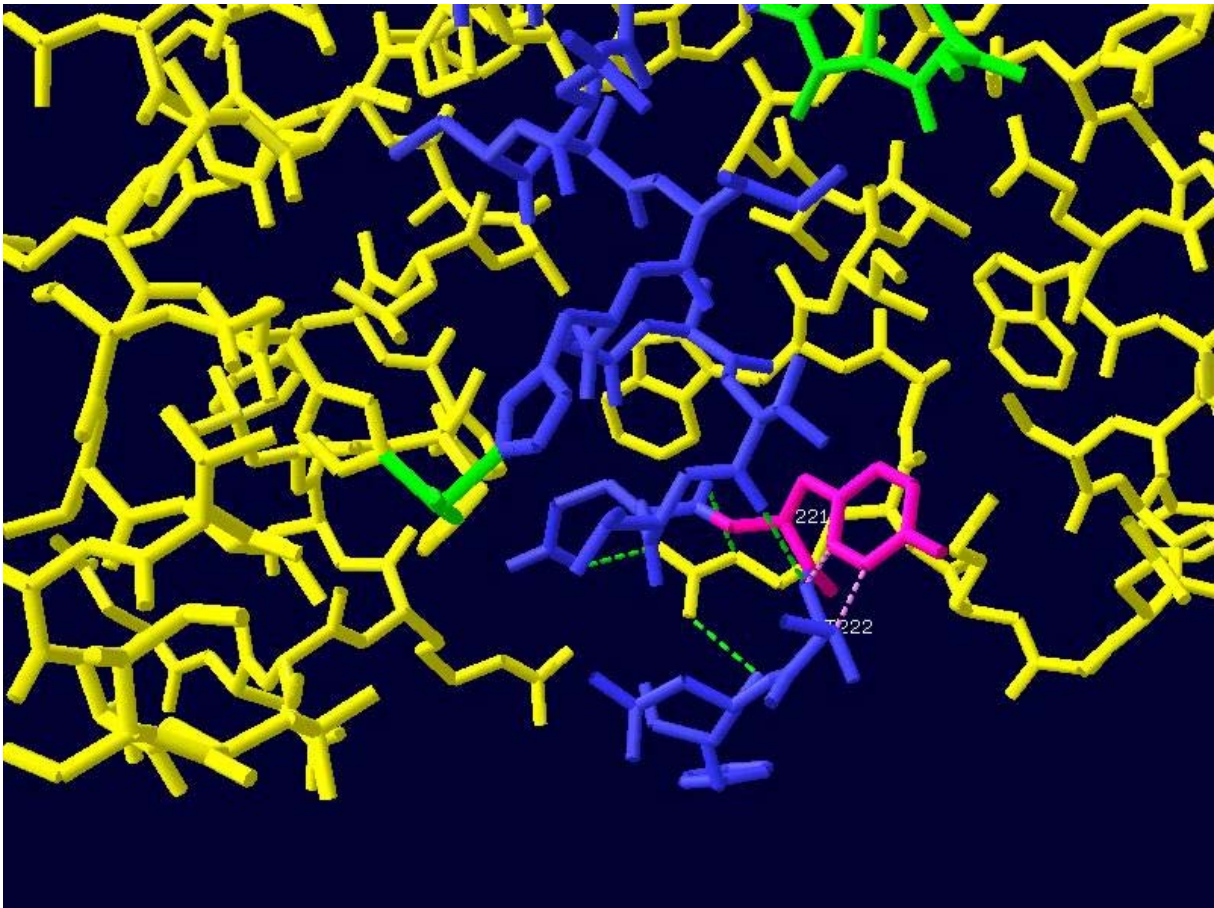


Abbildung 3.12: Sterische Hinderung innerhalb des D2-Proteins durch die Substitution N221Y in Plastom I. Die Interaktionen mit dem benachbarten Threoninrest ist durch die pinkfarbenen gestrichelten Linien dargestellt. Die grünen Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen an.

Im D2-Protein sind zwei der vier Substitutionen an der Grenzfläche zwischen beiden Reaktionszentrumsproteinen lokalisiert. Die Substitution V202I in Plastom I bewirkt keine Änderung in der Interaktion mit den gebundenen Chlorophyllmolekülen. Die Verlängerung der Seitenkette ist an dieser Stelle ohne Einfluss. Hingegen hat die Substitution des Asparaginrests an Position 221 durch Tyrosin eine Störung der benachbarten Seitenketten zur Folge. In der energieminierten Modellierung bleibt eine Interaktion mit der benachbarten Seitenkette von Threonin 222 erhalten. Die in den anderen Landplastomen vorhandene Asparaginseitenkette ist in einem Abstand von weniger als 4 Å von den Aminosäuren M139, R140 und W142 des D1-Proteins. Diese Interaktionen können durch den Austausch von Asparagin gegen Tyrosin nicht mehr ausgebildet werden, da die sterische Hinderung anderer Aminosäuren den aromatischen Ring in die Konformation zwingt, die in Abbildung 3.12 dargestellt ist. Die Störung kann möglicherweise in Plastom I durch Substitutionen in anderen, kernkodierten Untereinheiten des Photosystems II ausgeglichen werden, da die Funktionalität des Proteinkomplexes

im Wildtyp gegeben ist. Inwieweit diese Substitution bedeutsam für die Ausprägung der Kern/Plastom-Inkompatibilität ist, müssen Proteinuntersuchungen im Detail zeigen. Möglicherweise ist es hierfür auch notwendig, Röntgenkristalluntersuchungen an den Proteinen der verschiedenen inkompatiblen Kern/Plastom-Kombinationen vorzunehmen.

Die Substitution an Position 75 (L75F) in Plastom V kann aufgrund fehlender Strukturdaten nicht beurteilt werden. Die Aminosäure sollte nach Berechnungen des Hydrophobizitätsprofils nach Kyte und Doolittle (1982) in einem Bereich des Proteins liegen, der keine Transmembranhelix ausbildet. Ebenso fehlen Strukturdaten für die Aminosäure an Position 344. In Plastom IV ist das hochkonservierte Glutamat durch Aspartat ersetzt. Beide Aminosäuren besitzen vergleichbare Eigenschaften (Tanford 1962), können also einander ersetzen, sofern keine sterische Behinderung der dreidimensionalen Struktur des Proteins auftritt. Die Substitution E344D sollte also, wenn überhaupt, nur geringe Auswirkung bezüglich der Funktion des Proteins haben.

Die α -Untereinheit von Cytochrom b_{559} aus dem Plastom I unterscheidet sich an Position 34 von den Proteinen anderer Landpflanzen, die an dieser Stelle statt des Valinrests einen konservierten Glycinrest besitzen. Die Substitution ist innerhalb einer möglichen Transmembranhelix lokalisiert, so dass an die Geometrie der Aminosäure keine besonderen Anforderungen gestellt werden. Daher ist das Vorkommen von Valin anstelle von Glycin wohl nicht mit einer Destabilisierung des Proteins verbunden.

Das *PsbI*-Protein kodiert durch Plastom IV unterscheidet sich an drei Positionen von den anderen *Oenothera-PsbI*-Proteinen. Das Protein bildet eine Transmembranhelix aus, die im PS II-Komplex nahe dem D2-Protein sitzt. Die drei Substitutionen liegen innerhalb der Helix bzw. an der stromalen Aussenseite der Membran innerhalb der helikalen Struktur. Auch hier gilt, dass die sterischen Anforderungen an Aminosäuren innerhalb einer Helix gering sind und deshalb die Reste austauschbar sind.

Die Antennenproteine CP47 und CP43, kodiert von *psbB* und *psbC*, zeigen mit zwei Ausnahmen nur konservative Substitutionen, wie den Austausch von Isoleucin und Valin oder Serin und Asparagin. Alle Substitutionen in CP43 sowie 12 der 14 Aminosäureaustausche sollten die Strukturen funktionell nicht beeinträchtigen. Auch die Substitutionen T502D und T503P in Plastom II sind, obwohl nicht konservativ, nur auf den ersten Blick von Interesse, da sie sehr nahe am C-Terminus des CP47-Proteins lokalisiert sind. Weitere Aussagen über die Auswirkung der Substitutionen können nicht getroffen werden, da hochauflösende Strukturen

von PS II nicht verfügbar sind. Die Substitution F462L in Plastom IV könnte durch ein mögliches Edierungsereignis schon auf posttranskriptionaler Ebene aufgelöst werden.

Auch für die kleinen peripheren Untereinheiten des Photosystems II gilt, dass die Substitutionen innerhalb von α -Helices liegen und somit wenig Notwendigkeit vorhanden ist, diese Austausche rückgängig zu machen. Die Proteine sind in ihrer Struktur nicht beeinträchtigt; da deren Funktion von der Struktur abzuhängen scheint, bleibt ein funktioneller PS II-Komplex erhalten. Im *PsbK*-Protein könnte darüber hinaus ein in Plastom V kodierter Aminosäureaustausch schon durch Edierung rückgängig gemacht werden (F50L).

3.3.9.1.6 *Der Ndh-Komplex*

Die elf plastomkodierte Proteine des *Ndh*-Komplexes (NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase-Komplexes) sind an der Chlororespiration sowie der im Dunkeln stattfindenden Reduktion von Plastochinon als Folgeeffekt des zyklischen Elektronenflusses um das Photosystem I beteiligt (Joët 2001; Sazanov 1998). Von diesem stark hydrophoben Komplex existieren keinerlei Strukturinformationen, stattdessen können durch Motivvergleiche nur Informationen über wichtige Aminosäuren für mögliche Chinon-Bindungsstellen abgeleitet werden. In Homologie zum mitochondrialen Komplex I sollten die Bindungsstellen in *NdhD* etwa zwischen Aminosäure 269-278 und in *NdhF* zwischen den Positionen 341-350 und 410-420 lokalisiert sein (Fisher und Rich 2000).

In allen elf Proteinen treten insgesamt zwischen den fünf Plastomen 67 Substitutionen und 3 Insertionen/Deletionen in den Proteinen *NdhD* und *NdhF* auf. Von diesen Unterschieden sind die Substitutionen an den Positionen 132, 284 und 309 in *NdhA* (F132S in Plastom II, S284P in den Plastomen IV und V, I309T in den Plastomen I und II), 230 in *NdhD* (F230L in den Plastomen I, IV und V) sowie an Position 76 von *NdhG* (F76S in Plastom IV) interessant. An diesen Positionen könnten die konservierten Aminosäuren durch Edierung auf der mRNA-Ebene wieder hergestellt werden (siehe unten).

Die von Fisher und Rich (2000) beschriebenen potentiellen Chinon-Bindungsmotive sowie deren nähere Sequenzumgebung sind hoch konserviert.

3.3.9.1.7 *Die RNA-Polymerase*

In den vier plastom-kodierten Genen für die Untereinheiten der RNA-Polymerase (PEP) treten insgesamt 65 Substitutionen auf. Davon sind 28 konservativ. Es liegt zwar aus *Thermus aquaticus* eine Kristallstruktur vor (Murakami *et al.* 2002), die jedoch zur detaillierten Analyse einzelner Aminosäuren nicht geeignet ist. Die Untereinheiten aus verschiedenen

Landpflanzen weisen bereits eine hohe Variation auf; vergleicht man jedoch deren Aminosäuresequenzen mit den Sequenzen aus *Thermus aquaticus*, so liegt die Ähnlichkeit unter 50%, was für den gewünschten Zweck nicht ausreichend ist. Innerhalb hoch konservierter Regionen tritt zudem nur eine Substitution auf, an Position 149 in der β'' -Untereinheit aus Plastom IV (M149I). Diese homologe Aminosäure ist in der Kristallstruktur innerhalb einer α -Helix zu finden, die Modellierung der Substitution führt zu keiner nennenswerten Veränderung der Sekundärstruktur.

3.3.9.1.8 Die Ribulose-1,6-Bisphosphat-Carboxylase

In der grossen Untereinheit der Ribulose-1,6-Bisphosphat-Carboxylase treten zwischen den *Oenothera*-Plastomen fünf Unterschiede auf. Alle Substitutionen befinden sich im Innern des Proteins, wirken sich jedoch nicht auf die Proteinstruktur aus, wie aus den Modellierungen hervorgeht.

3.3.9.1.9 *CemA*, *ClpP-Protease*, *CcsA*, *MatK*

CemA (bzw. *Ycf10*) ist ein Protein, das nach funktionellen Studien in *Chlamydomonas* für die Aufnahme von Hydrogencarbonat benötigt wird (Rolland *et al.* 1997). Die Proteinsequenz ist unter Landpflanzen konserviert, die Ähnlichkeit zwischen *Oenothera* und Tabak liegt bei etwa 80%. In Plastom II ist das Protein aufgrund einer Rasterschubinsertion in einer verkürzten Variante kodiert, daher fehlen die ersten 50 Aminosäuren, die jedoch nur zu etwa 70% zwischen den beiden oben genannten Spezies konserviert sind. Verlängerte Gene finden sich in *Pinus* und *Marchantia*, hier sind die N-Termini um etwa 30 bzw. 200 Aminosäuren verlängert, jedoch ist bisher keine verkürzte Genvariante unter den Landpflanzen bekannt. Am N-Terminus des von Plastom V kodierten Proteins sind nach der dritten Aminosäure zwei weitere Reste eingeschoben. Der Glutamatrest an Position 6 ist in Plastom I durch Lysin, in Plastom V durch Arginin ersetzt. Die Nettoladung dieser Region verändert sich also um +2. Weiterhin ist in Plastom V die Aminosäure 7 von Phenylalanin durch Isoleucin ersetzt. An dieser Position beginnt vermutlich eine Transmembranhelix, so dass die benötigte Hydrophobizität erhalten bleibt. Die Substitution R85G in Plastom I tritt ebenso in den Proteinen von *Arabidopsis* und *Lotus japonicus* auf. In Plastom II treten schliesslich noch zwei weitere Substitutionen auf, von denen D97Y möglicherweise die dreidimensionale Struktur verändert. Der Aspartatrest ist in allen vollständig sequenzierten Landpflanzenplastomen an dieser Position konserviert.

Ähnlich wie bei *CemA* verhält es sich bei der *ClpP*-Protease, bei *CcsA*, einem an der Biosynthese von Cytochrom *c* beteiligten Protein, und bei dem zu mitochondrialen Intronmaturasen

homologen Protein *MatK*. Alle drei Proteine zeigen zum Teil zahlreiche Substitutionen (in *ClpP* insgesamt 30) an schwach konservierten Positionen. Die Proteinfunktion sollte daher nicht beeinträchtigt sein. Eine Ausnahme betrifft Position 183 der *ClpP*-Protease (in Plastom III 184, in Plastom V 185). Der in allen Landpflanzen konservierte Aspartatrest der katalytischen Triade ist durch Asparagin ersetzt. Der Wegfall dieses Restes des aktiven Zentrums könnte den Verlust der proteolytischen Aktivität des Proteins bedeuten. Somit würde *ClpP* eine inaktive Untereinheit der *Clp*-Protease darstellen.

3.3.9.1.10 *Acetyl-CoA-Carboxylase*

Auch die katalytische Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase, einem Enzym des Fettsäure-Stoffwechsels, weist in der N-terminalen Region zahlreiche Substitutionen auf. Diese sind aufgrund der massiven Repetitionen (siehe Abschnitt 3.3.5) in diesem Bereich des Genoms entstanden. Im C-terminalen Bereich ist das Protein, verglichen mit dem Protein aus anderen Spezies, gut konserviert. Somit ist die Situation in *Oenothera* mit der in *Pisum sativum* vergleichbar; auch dort ist das Protein durch zahlreiche kurze Repetitionen im N-terminalen Bereich stark negativ geladen. Die hohe Nettoladung beeinträchtigt dessen Funktion jedoch nicht, wie der Vergleich mit anderen Spezies zeigt (Sasaki *et al.* 1989; Nagano *et al.* 1991; Smith *et al.* 1991).

Alle Proteinsequenzen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren aus, die Sequenzen aus den Plastomen I, II, III und V heben sich insofern noch von der des Plastoms IV ab, als hier das Verhältnis zwischen sauren und basischen Aminosäuren mindestens 1,5 beträgt, bei der aus Plastom IV abgeleiteten hingegen nur 0,67. Diesen Unterschied in zwischen positiv und negativ geladenen Aminosäuren reflektiert auch die Nettoladung der Proteine. In *AccD* aus den Plastomen I, II, III und V beträgt diese jeweils – 27, –38, –33 sowie –77 gegenüber +17 aus Plastom IV. Bei der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Plastom V sind mehr als 40% der Aminosäuren geladen, davon mehr als 25% entweder Aspartat oder Glutamat. Trotz der grossen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung ist der Teil des Proteins, der ein Metallionen-Bindungsmotiv enthält, bemerkenswert konserviert. Dieser Teil des Proteins ist für seine Funktion wichtig, während der N-Terminus möglicherweise die Domäne darstellt, die für die Interaktion mit den kernkodierten, regulatorischen Untereinheiten sorgt.

3.3.10 Edierungsmuster

Die Plastome der höheren Pflanzen sind einer natürlichen Mutagenese etwa durch UV-Strahlung oder freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt, die strukturell oder funktionell benötigte

Aminosäuren durch Veränderung der sie kodierenden Basentriplets beeinträchtigt. Im Laufe der Evolution hat sich die Edierungsmaschinerie gebildet, möglicherweise um an schnell evolvierenden Positionen Transitionen von Thyminbasen zu Cytosinbasen posttranskriptionell zu revertieren. Die Restauration von Kodonen konservierter Aminosäuren und somit die Wiederherstellung intakter Proteine erzeugt gleichzeitig eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit während der Reifung der mRNA (Bock 2000). Um die mögliche Inkompatibilität bestimmter Kern-Plastom-Kombinationen zu erklären, wurde der Status der 31, aus Tabak bekannten Edierungsstellen in den Kombinationen AA-I *Johansen*, AA-IV sowie BC-IV bestimmt. Tabelle 3.8 gibt einen Überblick über den Edierungsstatus dieser Positionen. In den anderen Kombinationen, d. h. in den Plastomen II, III und V sind die zu Tabak homologen Edierungsstellen identisch.

Tabelle 3.8: Edierungsstatus der 31 zu Tabak homologen Stellen

Gen	Position in Tabak	Status in <i>Oenothera</i>
<i>rpoA</i>	277	p
<i>rpoB</i>	113	-
	158	p
	184	-
	667	p
<i>rpoC1</i>	21	+
<i>rpoC2</i>	1248	p
<i>rps2</i>	83	p
<i>rps14</i>	27	+
	50	+
<i>atpA</i>	264	+
	265	-
<i>atpF</i>	31	+°
<i>psbE</i>	72	p
<i>psbL</i>	1	p
<i>ndhA</i>	114	-

	358	+
<i>ndhB</i>	50	+
	156	+
	196	+
	204	+
	246	+
	249	+
	277	+
	279	+
	494	+
<i>ndhD</i>	1	+
	128	+
<i>ndhF</i>	97	p

p An der homologen Stelle ist auf DNA-Ebene bereits ein Thymin kodiert („prä-ediert“).

° Die Stelle erscheint in der Sequenzierung der cDNA nur zu 50% ediert.

Der Edierungsstatus für diese 31 Positionen ist in allen drei untersuchten Genom-/Plastomkombinationen identisch.

Daneben hinaus wurden weitere 31 potentielle Edierungsstellen überprüft. Diese Positionen wurden aus Vergleichen mit anderen Proteinen selektiert, wobei ein möglicher C-zu-U-Austausch zur Wiederherstellung eines Kodons für die in *Marchantia polymorpha* kodierte Aminosäure führen sollte. An 28 Positionen ist der C-zu-U-Austausch in den 5 untersuchten Kombinationen möglich. Die restlichen drei Edierungsstellen sind spezifisch für Plastom I *Johansen*. Die systematische Untersuchung der potentiellen Edierungsstellen aller Plastome von *Oenothera* ist noch nicht abgeschlossen. Von den bisher untersuchten 31 Positionen konnte nur bei 3, der für Plastom I *Johansen* spezifischen Edierungspositionen tatsächlich die Konversion in der mRNA von C zu U nachgewiesen werden. An den restlichen 28 Positionen sind die Sequenzen von DNA und RNA identisch. Tabelle 3.9 zeigt die plastomspezifischen Edierungsstellen.

Tabelle 3.9: Plastom-spezifische Edierungsstellen

Gen	Position	Plastom	Aminosäuretausch
<i>ndhA</i>	309	I <i>Johansen</i>	T → I
<i>psaA</i>	71	I <i>Johansen</i>	S → L
<i>rpoB</i>	183	I <i>Johansen</i>	V → V

Bei der Edierungsstelle an Position 183 in *rpoB* handelt es sich um eine sogenannte „stille“ Edierung, die die kodierende Aminosäure nicht verändert. Bisher ist dies nur aus Tabak für die Position 265 in *atpA* bekannt (Hirose *et al.* 1996), an der ein UCC-Kodon (Serin) zu UCU (Serin) verändert wird.

3.4 Die Plastommutante *II_γ*

Die Inkompatibilität von Genom und Plastom bzw. das Zusammenwirken von genom- und plastomkodierten Strukturen kann am besten mit Hilfe von Mutanten untersucht werden.

In *Oenothera*-Populationen treten mit bestimmter Häufigkeit spontane Mutanten auf. Die Mutationen betreffen im Allgemeinen nur einen Teil einer Pflanze. Mutanten, die Defekte in der Pigmentierung zeigen, sind in ihrer Chloroplastenentwicklung betroffen. Da die Chloroplastenentwicklung sowohl von nukleären als auch von plastidären Genen reguliert wird, sind unter diesen Mutanten auch plastidäre Mutanten. Im Folgenden werden verschiedene *Oenothera*-Mutanten molekular charakterisiert.

3.4.1 Phänotyp der Mutante

Die Plastommutante *II_γ* wurde von Prof. Stubbe aus einer Population von *Oenothera biennis* als spontan auftretende Mutante isoliert. Aufgrund des genetischen Verhaltens wurde sie als Plastommutante erkannt und physiologisch (Stubbe 1959; Kutzelnigg und Stubbe 1974) sowie spektroskopisch (Fork und Heber 1968) charakterisiert. Unter autotrophen Bedingungen ist sie nur in heteroplastomischen Zustand zu kultivieren. Die Blätter sind grün/weiss-panaschiert, abhängig davon wie die ursprünglich in der Zygote vorhandenen Wildtyp- und mutierten Plastiden der Eltern segregieren. In Gewebekultur kann die Mutante unter heterotrophen Bedingungen auf NT-Medium auch homoplastomisch kultiviert werden. Junge Blätter zeigen noch schwach grüne Färbung. Die Blätter älterer Blätter sind jedoch aufgrund des fehlenden Chlorophylls durch die Karotinoide gelblich-weiss gefärbt (Hallier 1968; Kutzelnigg *et al.* 1975).

3.4.2 Ultrastruktur der Plastiden

Erste Untersuchungen der Ultrastruktur der mutierten Plastiden gehen auf Kutzelnigg *et al.* (1975a, 1975b) zurück. Die Strukturen werden hiernach in verschiedene Kategorien eingeteilt. Das Thylakoidmembransystem ist in 8 Wochen alten Blättern zum Teil noch zu Grana gestapelt und vom Wildtyp nicht zu unterscheiden (Abbildung 3.13 links). Nach der Klassifizierung nach Kutzelnigg *et al.* entspricht dies den Kategorien T₃ und G₃. In älteren Blättern sind die Granastapel der Thylakoide aufgebläht, so dass schliesslich die gesamte Plastide mit degenerierten Thylakoiden ausgefüllt ist. Vereinzelt treten Plastoglobuli auf (Abbildung 3.13 rechts). Dies entspricht den Kategorien A_T und A_G.

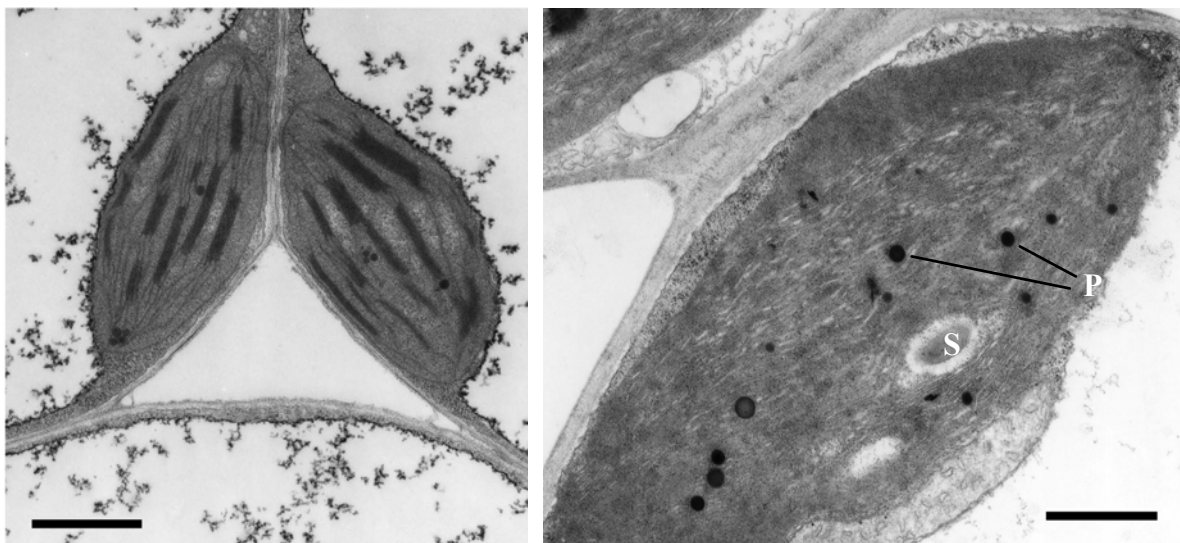
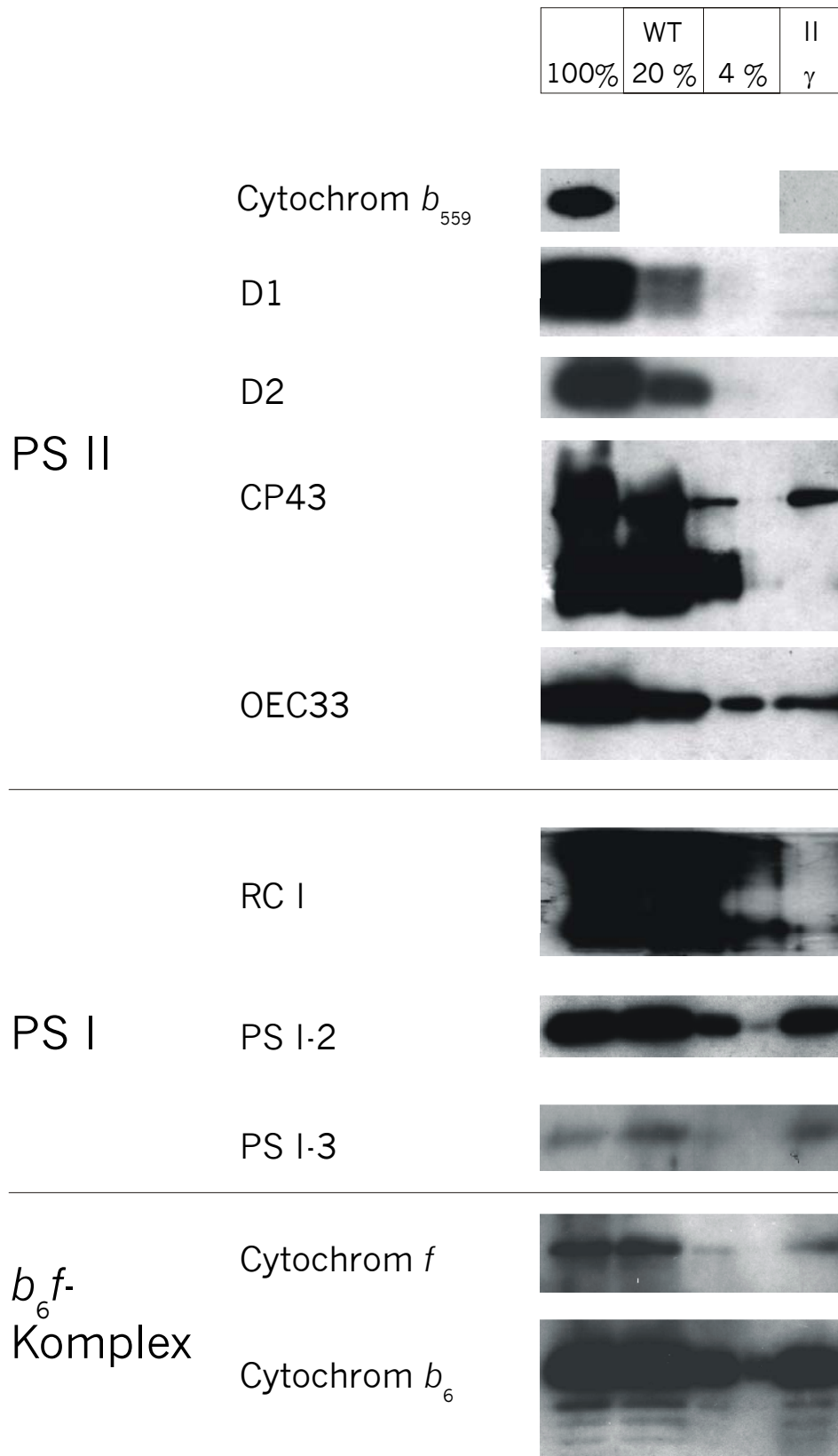


Abbildung 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plastiden der Mutante II γ aus jüngeren (links) und älteren (rechts) Blättern. S, Stärkeeinlagerungen; P, Plastoglobuli. Der im Bild eingeblendete Größenmassstab beträgt jeweils 1 μm .

3.4.3 Immunochemische Analysen

Aufgrund der spektroskopischen Untersuchungen von Fork und Heber (1968) konnte bei der *Oenothera*-Mutante II γ auf einen Defekt im Photosystem II geschlossen werden (Stubbe und Herrmann 1982). Weitere Hinweise auf die genaue Lokalisation der Mutation wurde von immunologischen Analysen mit Antiseren gegen Untereinheiten von drei der vier Thylakoidmembran-Komplexe (Cytochrom *b₆f*, Photosystem I und II) erwartet. Die Western-Analysen zeigen, dass die plastidär kodierten Untereinheiten *PsaA/B* fast vollständig fehlen, die nukleär kodierten Untereinheiten *PsaD* und *PsaF* jedoch zu annähernd 100% der im Wildtyp vorhandenen Menge akkumulieren (Abbildung 3.14). Ebenso sind 100% der Wildtypmenge der Cytochrome *b₆* und *f* in der Thylakoidmembranfraktion der Mutante vorhanden (Abbildung 3.14). Das nukleär kodierte 33 kD-Protein des Wasserspaltungsapparates des Photosystem II

(*PsbO*) ist ebenfalls in Wildtypmengen vorhanden, jedoch sind alle plastidär kodierten Komponenten von PS II reduziert. Die Proteine des innersten Reaktionszentrums D1, D2 und das CP43-Protein *PsbC* sind auf unter 4% bzw. im Falle des CP43-Proteins auf etwa 20% der Wildtypmenge vermindert. Die α -Untereinheit des Cytochroms *b₅₅₉* fehlt vollständig (Abbildung 3.14).

Abbildung 3.14: Immunologische Analysen der *Oenothera*-Mutante II γ .

3.4.4 Lokalisation der Mutation

Die immunologischen Untersuchungen weisen auf einen Defekt in den Genen *psbE* und/oder *psbF*, die für die α - bzw. die β -Untereinheit von Cytochrom b_{559} kodieren. Die Amplifikation der beiden Gene und die anschließende Sequenzierung sollte schliesslich den Defekt enthüllen. Die Sequenz von *psbE* ist an Position 42 des Gens durch die Duplikation der vorangegangenen fünf Basen ATTAT unterbrochen. Diese Mutation verändert das Leseraster, in dem nach weiteren 83 Basen ein Stoppkodon auftritt (Abbildung 3.15). Das Gen *psbF* ist gegenüber dem Wildtyp unverändert.

```

II  $\gamma$       ATGTGGAGCT CAGCATGCTCT GGAAGCACAG GAGAACGTC TTTTGCTGAT ATTATATTAT
                M S G S T G E R S F A D I I L
                M S G S T G E R S F A D I I
II WT       ATGTGGAGCT CAGCATGCTCT GGAAGCACAG GAGAACGTC TTTTGCTGAT ATTAT-----
                *****
II  $\gamma$       TACCAGTATT CGATACTGGG TTATTCATAG CATTACTATA CCCTCCCTAT TCATTGCGGG
                L P V F D T G L F I A L L Y P P Y S L R
                T S I R Y W V I H S I T I P S L F I A G
II WT       TACCAGTATT CGATACTGGG TTATTCATAG CATTACTATA CCCTCCCTAT TCATTGCGGG
                *****
II  $\gamma$       TTGGTTATTC GTCAGCACGG GTTTAGCTTA CGATGTGTTT GGAAGCCCTC GTCCAAACGA
                V G Y S S A R V *
                W L F V S T G L A Y D V F G S P R P N E
II WT       TTGGTTATTC GTCAGCACGG GTTTAGCTTA CGATGTGTTT GGAAGCCCTC GTCCAAACGA
                *****

```

Abbildung 3.15: Sequenzvergleich des 5'-Teils des *psbE*-Gens sowie des zugehörigen Proteins der Mutante II γ mit dem Wildtyp. Die Startkodonen sowie das aus der Insertion von fünf Basen (kursiv) resultierende vorzeitige Stoppkodon sind unterstrichen.

Aufgrund der Insertion führt die Translation des veränderten *psbE*-Gens zur Entstehung eines nicht-funktionellen Proteins. Der Histidinrest an Position 23 des Wildtypproteins, der mit dem Cytochrom verknüpft ist, ist im veränderten Protein der Mutante überhaupt nicht kodiert.

3.5 Die Plastommutante II θ

3.5.1 Phänotyp der Mutante

Die Plastommutante II θ wurde aus der Population von *Oenothera biennis* ebenfalls von Prof. Stubbe als spontan auftretende Mutante isoliert. Aufgrund des genetischen Verhaltens wurde sie als Plastommutante erkannt und physiologisch (Stubbe 1959; Kutzelnigg und Stubbe 1974) charakterisiert. Unter autotrophen Bedingungen ist sie nur in heteroplastomischen Zustand zu kultivieren. Die Blätter sind grün/weiss-panaschiert, abhängig von der Segregation der ursprünglich in der Zygote vorhandenen Wildtyp- und mutierten Plastiden der Eltern. Unter heterotrophen Bedingungen kann die Mutante auf NT-Medium auch homoplastomisch kultiviert werden. Junge Blätter sind noch schwach grün gefärbt. Die Blätter älterer Blätter sind jedoch aufgrund des Chlorophylldefekts weiss gefärbt (Kutzelnigg *et al.* 1975a).

3.5.2 Ultrastruktur der Plastiden

In jungen Blättern sind die Thylakoide als ungestapelte „Lamellen“ ausgebildet, die sich teilweise über die gesamte Länge erstrecken. Zusätzlich treten zahlreiche Plastoglobuli auf (Abbildung 3.16, links). Nach der Klasifizierung nach Kutzelnigg *et al.* entspricht dies der Kategorie T₁. In den Blättern älterer Pflanzen sind die fadenförmigen Thylakoide desintegriert; teilweise sind zwei bis vier der sehr kurzen Bruchstücke gestapelt. Andere Membranbruchstücke sind vesikuliert (Kategorie V nach Kutzelnigg *et al.*). Auch in den älteren Stadien der Plastidenentwicklung sind noch viele Plastoglobuli vorhanden (Abbildung 3.16, rechts).

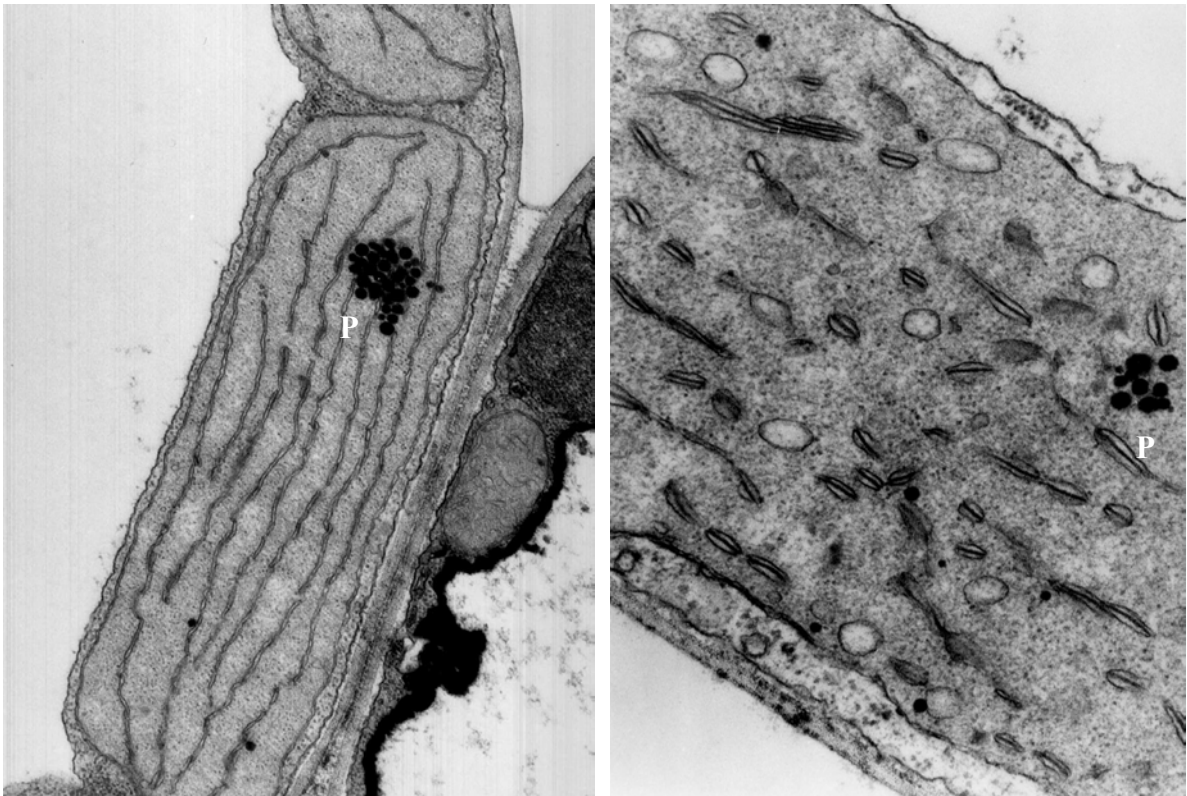


Abbildung 3.16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Ultrastruktur von Plastiden der Mutante II θ aus jüngeren (links) und älteren (rechts) Blättern. P, Plastoglobuli.

3.5.3 Fluoreszenzanalysen

Spektroskopische Untersuchungen sollten genaueren Aufschluss über die Natur der Mutation in der Mutante II θ geben. Die Reduktion der Q_A -Stelle des Photosystems II wurde mit gepulstem Licht erreicht. Nach maximaler Anregung der Chlorophyll-Fluoreszenz mittels eines sättigenden Weisslichtpulses relaxierte die Fluoreszenz im Wildtyp, während in der Mutante die Reoxidation von Q_A nicht erfolgte (Abbildung 3.17). Die Funktion des Photosystems II scheint nicht beeinträchtigt, die Mutation muss also später in der Elektronentransportkette liegen.

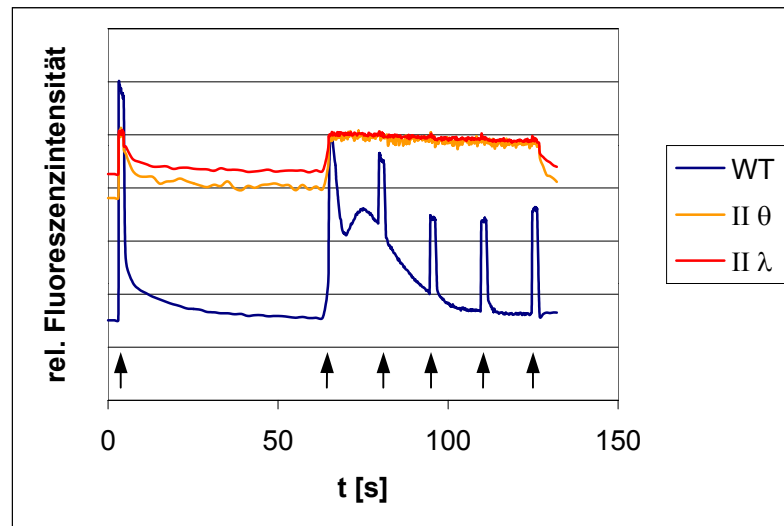
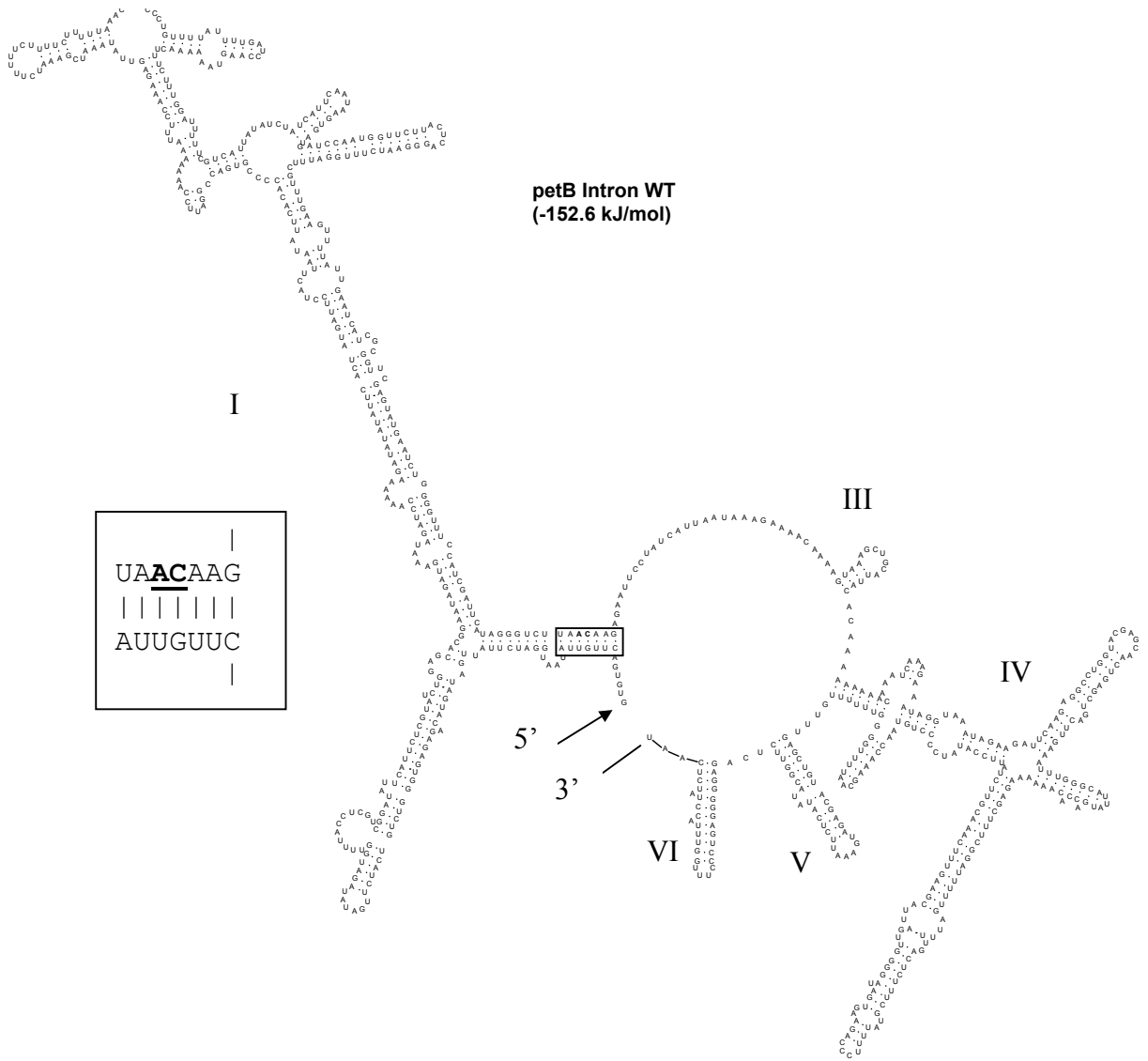


Abbildung 3.17: Reoxidationskinetik der Q_A -Stelle in den Plasmommutanten $II\theta$ und $II\lambda$. Saturierende Lichtpulse sind mit Pfeilspitzen markiert.

3.5.4 Lokalisation der Mutation

Zur Lokalisation der Mutation $II\theta$ wurden die Gene für die Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes aus der Mutante und dem Wildtyp mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Alle Gene mit Ausnahme von *petB*, das Cytochrom b_6 kodiert, sind unverändert. Der für das Protein kodierende Teil von *petB* ist ebenfalls gegenüber dem Wildtyp nicht verändert, jedoch zeigt sich im Intron des Gens eine Deletion zweier hochkonservierter Basenpaare. Die genaue Analyse der Intronstruktur ergab (Abbildung 3.18), dass die Mutation für die Stabilisierung der Introndomäne I (Schmelzer *et al.* 1983; Michel *et al.* 1989) und somit zur korrekten Positionierung des 5'-Endes zum 3'-Ende des Intron wichtig ist. Der Schluss liegt nahe, dass in der Mutante das Intron nicht gespleißt werden kann.

A



B

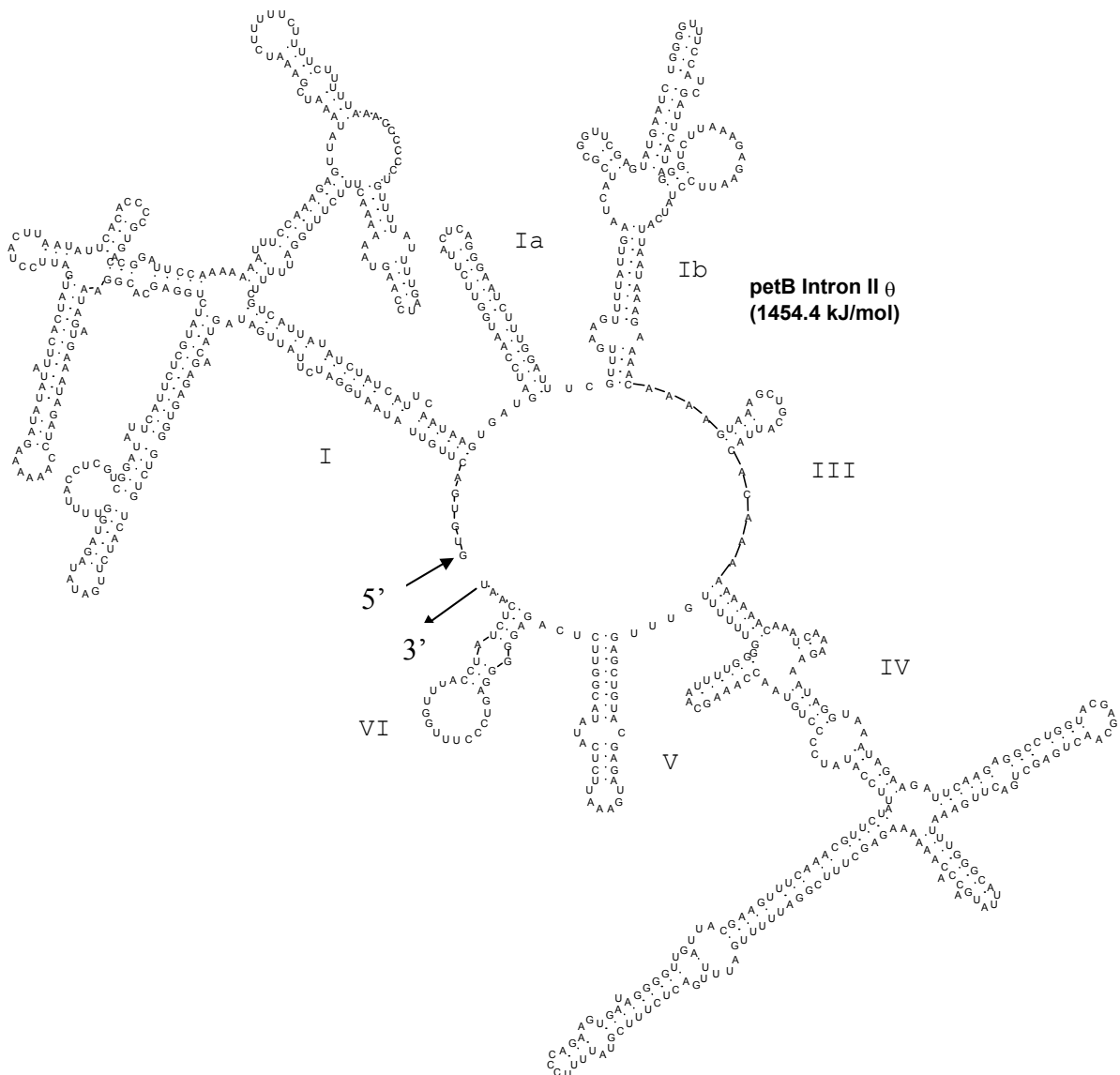


Abbildung 3.18 (diese und vorgehende Seite): Struktur des *petB*-Introns aus *Oenothera suaveolens* sowie der *Oenothera*-Mutante II θ . Die beiden Pfeile zeigen jeweils das 5'- bzw. 3'-Ende des Introns an. Die Strukturen wurden mit Hilfe des Programms RNAstructure 2.5 erstellt (Walter *et al.* 1994). (A) Gegenüberliegende Seite: Wildtyp. Die in der Vergrößerung des Stammes von Domäne I (Kasten) fettgedruckten und unterstrichenen Basen sind in der Mutante II θ deletiert. (B) Diese Seite: Mutante II θ . Im Vergleich mit dem Wildtyp ist die Domäne I aufgrund der Mutation in drei Teile aufgeteilt (I, Ia und Ib), wodurch die Sekundärstruktur des Introns stark destabilisiert wird (+1454,4 kJ/mol gegenüber -152,6 kJ/mol im Wildtyp).

3.5.5 Expression von *petB*

Das Expressionsmuster von *petB* wurde mit Hilfe von radioaktiv-markierten *in vitro*-Transkripten von PCR-Produkten, die unter Einsatz eines Oligonukleotids mit der Sequenz des T7-Promotors hergestellt wurden, untersucht. Die PCR-Produkte wurden aus dem Intron bzw. dem zweiten Exon des Gens amplifiziert. Als Kontrolle wurde zusätzlich *rps12* untersucht, um die Fähigkeit der Mutante, Klasse IIB-Introne zu spleißen, zu überprüfen. *In vivo* muss dabei der 3'-Teil an den 5'-Teil des Gens *in trans* gespleißt werden. Das Ergebnis der RT-PCR ist in der nachfolgenden Abbildung 3.19 dargestellt.

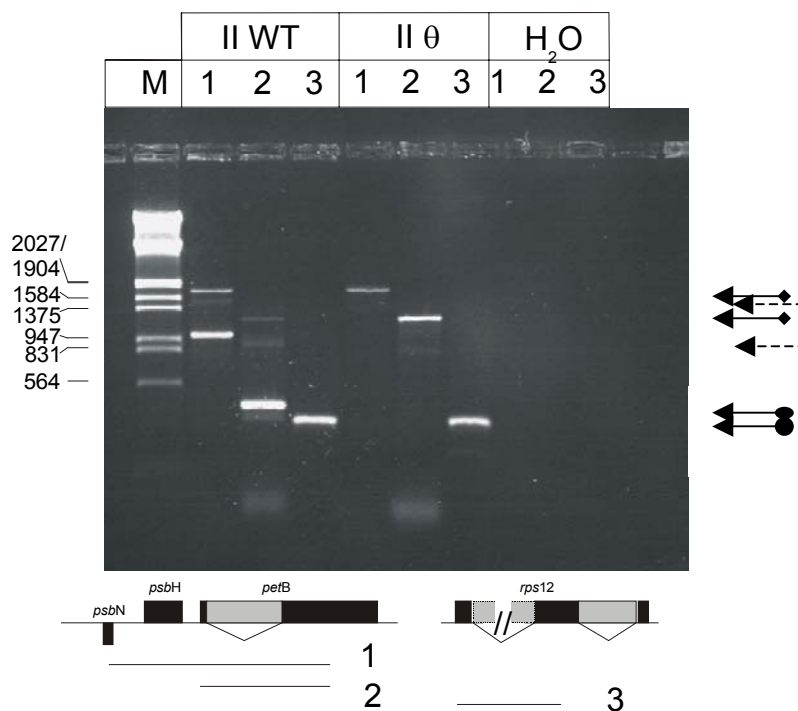


Abbildung 3.19: Reverse Transkription von Gesamt-RNA aus der *Oenothera*-Mutante IIθ und *O. biennis* (II WT) und anschliessende PCR mit Oligonukleotiden aus den angegebenen Genen. In Spur 3 ist jeweils die Spleißkontrolle (*rps12*, trans-gespleißte RNA) dargestellt. Die Banden der RT-PCR-Produkte des Wildtyps repräsentieren jeweils das ungespleißte (◆) und das gespleißte (●) Transkript sowie dazwischen liegend die Heteroduplex (gestrichelte Pfeile) aus beiden.

Die Mutante IIθ kann Klasse II-Introne richtig spleißen, wie die Kontrollreaktion in Abbildung 3.19 (Spur 3) zeigt. Jedoch akkumulieren die *petB*-cDNAs, wie durch die Amplifikation des *petB*-Gens alleine (Spur 2) als auch der Region von *psbN* (auf dem Gegenstrang kodiert) nach *petB* (Spur 1) gezeigt werden kann. Im Wildtyp sind diese cDNA-

Amplifikate, die von den Vorläufertranskripten stammen, ebenfalls sichtbar, jedoch stark reduziert. Im Gegensatz zur Mutante sind jedoch die gespleißten Moleküle dominant.

Durch Northern-Analysen mit exon- und intronspezifischen Sonden konnte dies bestätigt werden. In die Untersuchungen wurde ausserdem die Mutante II λ , die ebenfalls als Cytochrom *b₆f*-Mutante charakterisiert wurde (unveröffentlicht), eingeschlossen.

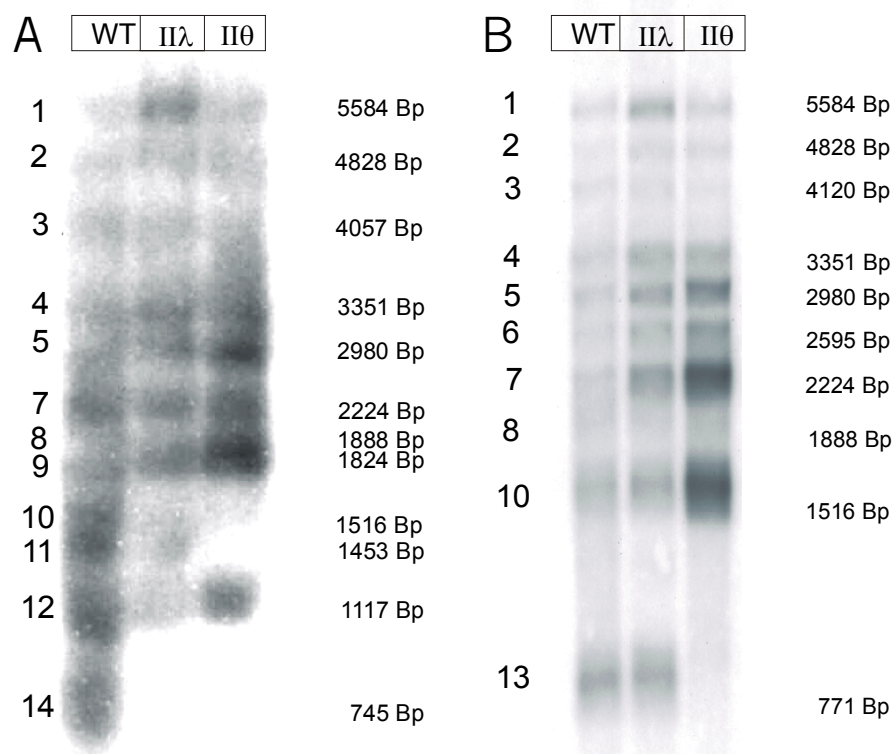


Abbildung 3.20: Expressionsmuster von *petB*. Als Sonden wurden das zweite Exon (A) und ein Stück des Introns von *petB* (B) verwendet. In der Mutante II θ akkumulieren die Transkripte, die das *petB*-Intron enthalten, während das gespleißte Intron (771 Bp; 13) nicht zu detektieren ist.

- | | |
|--|----------------------------|
| 1 <i>psbB-psbT-psbH-petB(I)-petD(II)</i> | 8 <i>psbH-petB(I)</i> |
| 2 <i>psbB-psbT-psbH-petB(I)-petD</i> | 9 <i>psbH-petB-petD</i> |
| 3 <i>psbB-psbT-psbH-petB(I)</i> | 10 <i>petB(I)</i> |
| 4 <i>psbB-psbT-psbH-petB-petD</i> | 11 <i>petB-petD</i> |
| 5 <i>petB(I)-petD(II)</i> | 12 <i>psbH-petB</i> |
| 6 <i>psbH-petB(I)-petD</i> | 13 <i>petB</i> -Intron (I) |
| 7 <i>petB(I)-petD</i> | 14 <i>petB</i> |

In der Mutante II θ können im Gegensatz zum Wildtyp mit der Exonsonde keine Signale bei 1453 Bp und 745 Bp (Abbildung 3.20 A) detektiert werden. Beide RNAs enthalten das gespleißte *petB*-Gen. Die RNA mit 1453 Basenpaaren Länge repräsentiert das dicistronische *petB-petD*-Transkript, wohingegen die RNA mit 745 Bp Länge dem gespleißten *petB* entspricht. Mit der exon-spezifischen Sonde ist eine RNA von 1516 Bp nur sehr schwach in der Mutante II θ nachzuweisen. Hingegen ist in Abbildung 3.20 B deutlich zu erkennen, dass die das Intron enthaltenden Transkripte mit Längen von 1516, 2224, 2595 und 2980 Bp im Vergleich zum Wildtyp akkumulieren. Diese Transkripte sind das ungespleißte *petB* (1516 Bp), sowie die dicistronischen Transkripte *petB(I)-petD* (2224 Bp) und *petB(I)-petD(II)* (enthält die Intronen in *petB* und *petD*; 2980 Bp) als auch das tricistronische *psbH-petB(I)-petD* (mit 2595 Bp). Das *petB*-Intron (771 Bp; im Folgenden als *petB(I)* bezeichnet) ist mit der intron-spezifischen Sonde auf dem Filter nicht nachweisbar.

In der Mutante II λ fehlen sowohl das dicistronische *petB-petD*-Transkript (1453 Bp) als auch das gespleißte *petB* (745 Bp), wohingegen das freie *petB*-Intron (771 Bp) in der Northernanalyse nachweisbar ist.

3.5.6 Immunologische Analysen

Das Expressionsmuster von *petB* lässt vermuten, dass sich in Thylakoidmembranen der Mutante II θ kein Cytochrom *b₆* anreichern kann. Im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Stefanie Bucher wurden isolierte Thylakoidmembranen der Mutante mit Antikörpern gegen Untereinheiten der vier grossen Multiproteinkomplexe der Elektronentransportkette inkubiert. Das Genprodukt des direkt durch die Mutation betroffenen Gens ist nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu bleibt auch das Cytochrom *f*, eine weitere Untereinheit des gleichen Komplexes, ist in Spuren noch nachweisbar, ebenso wie die Reaktionszentrumsproteine des Photosystems I und die PS II-Untereinheiten D2 und die α -Untereinheit des Cytochroms *b₅₅₉*. Im Vergleich zum Wildtyp sind die beiden Untereinheiten der RuBisCO und die β -Untereinheit der ATP-Synthase nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.21).

Im Gegensatz dazu fehlen in der Mutante II λ Untereinheiten der photosynthetischen Membrankomplexe. Die Reaktionszentrumsproteine des Photosystems I, die α -Untereinheit des Cytochroms *b₅₅₉* und die Cytochrome *b₆* und *f* sind nicht nachweisbar. Die β -Untereinheit der ATP-Synthase ist stark reduziert.

3.6 Weitere Plastommutanten

3.6.1 Weitere *Oenothera*-Mutanten

Die Mutationen weiterer *Oenothera*-Plastommutanten wurden lokalisiert und molekular charakterisiert.

Darüber hinaus wurden definierte Punktmutationen im Gen für Cytochrom *f* (*petA*) des Tabaks hergestellt. Mit dem definierten Austausch einzelner Aminosäurepositionen sollte deren Beitrag zur Funktion im Elektronentransport des Proteins im Photosystem detaillierter erforscht werden.

Die untersuchten Spontanmutanten von *Oenothera* sind in der ATP-Synthase (I_t) sowie dem Photosystem II (I_ε) betroffen. Beide Mutationen wurden ebenfalls in der Kollektion von Prof. Stubbe identifiziert. In Gewebekultur wurden die beiden Mutanten auf PCOe-Medium kultiviert, da die Mutationen unter autotrophen Bedingungen in homoplastomischen Pflanzen letal sind. Die ATP-Synthase-Mutante I_t zeigt die Insertion eines Adenosinrestes nach 58 Basenpaaren des Gens *atpB*, was zu einem Leserasterschub in der mRNA mit vorzeitiger Termination der Translation und der Produktion eines verkürzten Proteins führt.

Die Insertion eines Nukleotids ist ebenfalls die Ursache für die Mutation in der Mutante I_ε. Im überlappenden Bereich der beiden Gene *psbD* und *psbC* ist ein Guanosinrest an Position 1022 von *psbD* (entspricht Position 13 von *psbC*) eingefügt, der zu einem Leserasterschub in der mRNA, vorzeitiger Termination der Translation und der Produktion von zwei verkürzten Proteinen führt. Das Genprodukt von *psbD*, das D2-Protein, ist um 10 Aminosäuren, das Genprodukt von *psbC*, CP43, ist um 456 Aminosäuren verkürzt. Immunologische Analysen der genannten *Oenothera*-Mutationen wurden im Rahmen der genannten Diplomarbeit von Frau Bucher durchgeführt und sind in Abbildung 3.21 dargestellt. In der Mutante sind Untereinheiten aller untersuchten Proteinkomplexe mit Ausnahme des Photosystems II vorhanden. Allerdings ist das verkürzte D2-Protein des Photosystems II nachweisbar. Es fehlt jedoch die α -Untereinheit des Cytochroms *b*₅₅₉. Außerdem ist die kleine Untereinheit der RuBisCO stark reduziert.

Außerdem wurden Mutanten der großen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) I_σ immunologisch untersucht, die mit der Wildtyp-Kopie des mutierten Gens transformiert wurden. Die vier unabhängigen Transformanten wurden daraufhin untersucht, ob der Gendefekt revertiert wurde. Von den untersuchten Proteinen sind

in allen Transformanten nur die beiden RuBisCO-Untereinheiten nicht nachweisbar (Abbildung 3.21).

3.6.2 Punktmutanten von *petA* in Tabak

Die gerichtete Mutagenese von *petA* in Tabak wurde durch PCR-Amplifikation (Marini *et al.* 1993) mit mutierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Nutzung von Tabak als Untersuchungsobjekt ist durch die Notwendigkeit der Einbringung der *in vitro* produzierten Genfragmente durch Beschuss von Pflanzenmaterial mit DNA-beschichteten Goldpartikeln gegeben, was in *Oenothera* noch immer keine Routine darstellt. Die diese Mutationen enthaltenden transgenen Pflanzen werden nach Erreichen des homoplastomischen Zustands, d. h. nach der Eliminierung der Wildtypkopien des Gens, weiter untersucht werden.

Mutante	Mutation	eingeführte Restriktionsschnittstelle
cyfY1L	Y1F	<i>Alw44I</i>
cyfY1Q	Y1L	<i>Alw44I</i>
cyfF4I	F4I	<i>TasI</i>
cyfF4Q	F4Q	<i>TasI</i>
cyfY9Q	Y9Q	<i>HaeIII</i>
cyfN11D	N11D	<i>BamHI</i>
cyfN23D	N23D	<i>CviRI</i>
cyfN23Y	N23Y	<i>CviRI</i>
cyfK58Q	K58Q	<i>PstI</i>
cyfA62D	A62D	<i>TaqI</i>
cyfA62F	A62F	<i>ScaI</i>
cyfA62K	A62K	<i>AflIII</i>
cyfK65E	K65E	<i>TruI</i>
cyfK65L	K65L	<i>TruI</i>
cyfK65Q	K65Q	<i>BsuRI</i>
cyfR66Q	R66Q	<i>DraI</i>
cyfR154Q	R154Q	<i>EcoRII</i>
cyfR156Q	R156Q	<i>EcoRII</i>
cyfY160L	Y160L	<i>BglII</i>
cyfK185Q	K185Q	<i>TaiI</i>
cyfK187E	K187E	<i>SnaBI</i>
cyfK187Q	K187Q	<i>SnaBI</i>
cyfP209R	P209R	<i>SacII</i>
cyfK58Q/K65Q	K58Q/K65Q	<i>PstI</i>
cyfK58Q/R66Q	K58Q/R66Q	<i>PstI</i>
cyfK65E/R66Q	K65E/R66Q	<i>DraI</i>
cyfK65Q/R66Q	K65Q/R66Q	<i>Ball</i>
cyfK58Q/K65Q/R66Q	K58Q/K65Q/R66Q	<i>PstI</i>

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch RFLP-Analysen der eingeführten Restriktionsschnittstelle überprüft.

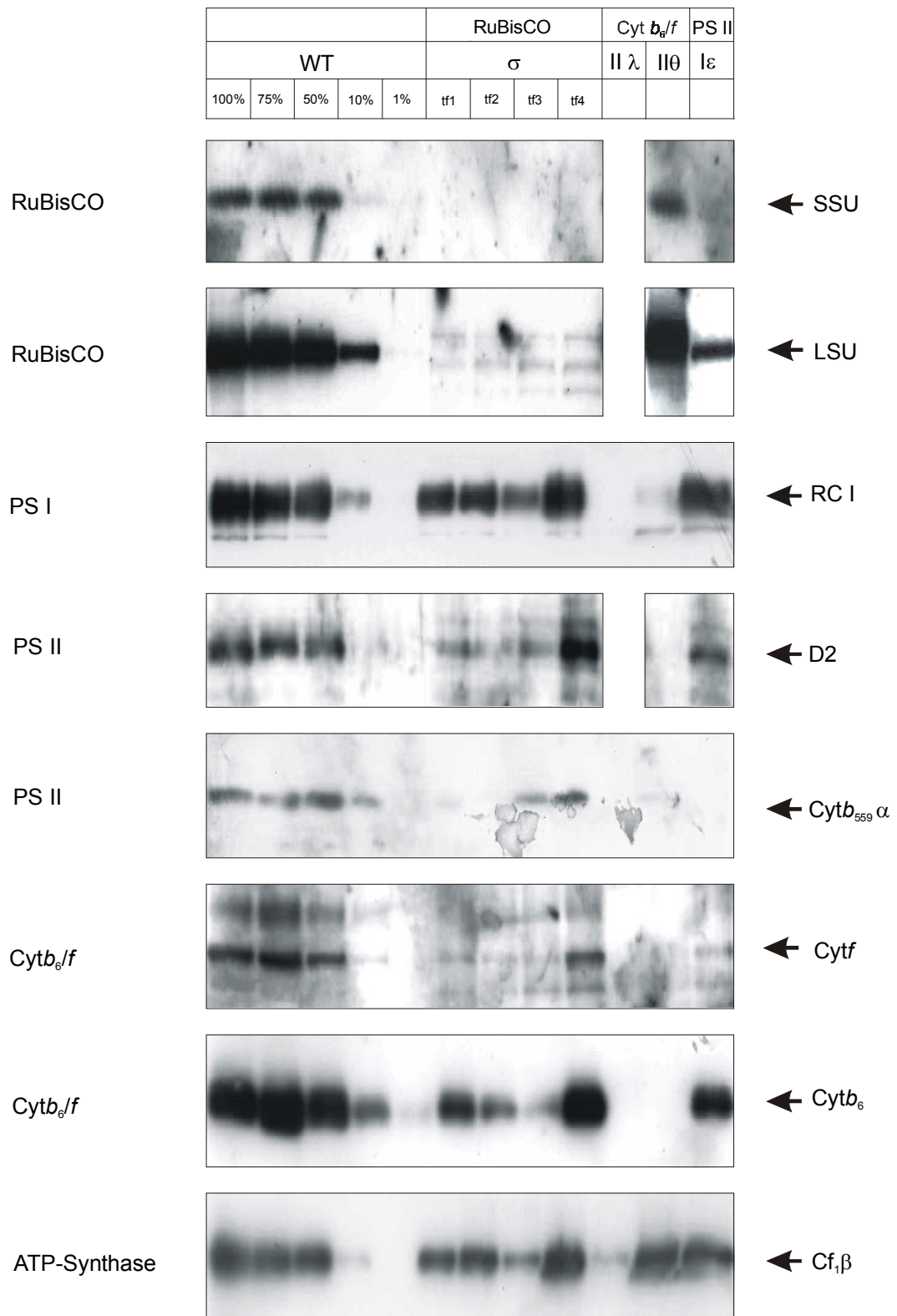


Abbildung 3.21: Immunologische Analyse der Plastommutante IIθ aus *Oenothera*.

4 Diskussion

Zwei Ziele wurden mit der vorliegenden Arbeit verfolgt. Mit Hilfe der Totalsequenzierung der fünf genetisch unterscheidbaren Plastidengenome (Plastome) der Subsektion *Oenothera* der Gattung *Oenothera* sollten unterscheidbare plastidäre Determinanten gefunden werden, die an der Ausprägung der Inkompatibilität in einigen Kombinationen bestimmter nukleärer Genotypen mit einem der hier untersuchten Plastome beteiligt sein könnten. Darüberhinaus sollten spontan aufgetretene Plastommutanten charakterisiert bzw. definierte Mutanten des Cytochroms *f* erstellt werden, um den Elektronenübergang von Cytochrom *f* auf Plastocyanin studieren zu können.

Die funktionelle Integrität des Plastoms ist die Voraussetzung für die funktionelle Integrität der Plastiden. Ist hingegen das Plastom auf irgend eine Art in seiner Integrität beeinträchtigt, wie z. B. durch die Vereinigung mit einem nicht-kompatiblen Genom in interspezifischen Artbastarden oder durch Mutation, so treten die geschilderten Defekte auf: Bleichheit, Entwicklungsstörungen, usw. Die Untersuchung von spontanen bzw. gezielt hergestellten Mutanten kann helfen, die Funktionsweise des komplexen photosynthetischen Systems der Pflanzenzelle zu verstehen. Zu diesem Zweck wurden spontan entstandene Plastommutanten aus *Oenothera* charakterisiert sowie gerichtete Cytochrom *f*-Mutanten in Tabak hergestellt, die auf den Elektronenübergang von Cytochrom *f* auf Plastocyanin untersucht werden sollen.

Angesichts der Vielzahl der Gattungen der Landpflanzen ist das fehlerhafte oder gestörte Zusammenwirken von Genom und Plastom ein wenig verbreitetes Phänomen. Renner bemerkte in den 20er Jahren des vorigen Jahrhunderts, dass bei Kreuzungen von *Oenothera elata* ssp. *hookeri* (= *O. hookeri* de Vries) und *O. glazioviana* Micheli (= *O. lamarckiana* de Vries) in Abhängigkeit von der Wahl der Mutter und des Vaters entweder grüne, vitale Pflanzen oder weisse bis gelbliche, kaum überlebensfähige Keimlinge entstanden (Renner 1922, 1936). Schnell wurde klar, dass der Grund für den genetischen Unterschied, der bei den reziproken Kreuzungen zu diesen Ergebnissen führte, in den Plastiden liegen musste (Renner 1922, 1924). Wenige Jahre später (1934) wurde von ihnen der genetische Unterschied als „Plastom“ bezeichnet. Genom/Plastom-Inkompatibilität ist bisher in einer Reihe von Gattungen beobachtet und auch näher untersucht worden (Zusammenfassung in Kirk und Tilney-Bassett 1978). Dazu zählen neben *Oenothera* auch *Pelargonium* (Metzlaff *et al.* 1982), *Trifolium* (Pandey *et al.* 1987; Przywara *et al.* 1989), *Impatiens* (Arisumi 1985) und *Zantedeschia* (Yao *et al.* 1994, 1995; Yao und Cohen 2000).

Die Ursachen für dieses Phänomen sind bisher nicht aufgeklärt. Möglicherweise führen in den verschiedenen Gattungen auch verschiedene Ursachen zu dem gleichen, jedoch makroskopisch nicht unterscheidbaren Phänotypen. Prinzipiell kann die Unverträglichkeit zweier genetischer Einheiten auf regulatorischer Ebene, z. B. der Transkription, Transkriptreifung, Translation oder Replikation, begründet sein. Ebenso kann Inkompatibilität struktureller Natur sein, z. B. durch unterschiedliches Kodierungspotenzial oder beeinträchtigte Protein-Nukleinsäure- bzw. Protein-Protein-Interaktion. Nachfolgend werden mögliche Ursachen auf allen regulatorischen und strukturellen Ebenen diskutiert.

4.1 Jedes *Oenothera*-Plastom kodiert für 78 Proteine und 34 RNAs

Die Gesamtsequenzen der fünf genetisch unterscheidbaren Plastidengenome der Subsektion *Oenothera* der Gattung *Oenothera* unterscheiden sich in ihrer Organisation nicht voneinander. Jedoch ist das für *Oenothera* charakteristische Vorhandensein von repetitiven Sequenzmotiven für die Längenunterschiede von bis zu 1,3 kBp verantwortlich, die trotz aller Gemeinsamkeiten zwischen den fünf Plastomen auftreten. Alle Plastome besitzen die für Angiospermen typische, in Abbildung 1 dargestellte, quatripartite Struktur (z. B. Shinozaki *et al.* 1986; Hiratsuka *et al.* 1989; Maier *et al.* 1995; Schmitz-Linneweber *et al.* 2001). Darüberhinaus kodieren alle Plastome den identischen Gensatz, 78 Gene für Proteine, 4 Gene für die ribosomalen RNAs sowie 30 Gene für tRNAs. Die Anzahl der intronhaltigen Gene sowie die Positionen der Intronen variieren nicht, hingegen ist in einigen Fällen die Intronsequenz nahe der 5'-Spleißstellen verändert. Einige Gene, wie z. B. *accD*, *cemA* und die beiden längsten Leseraster, *ycf1* und *ycf2*, weisen Längenunterschiede auf.

4.2 Repetitionsbedingte Längenvarianzen zwischen den Plastomen betreffen keine konservierten Regionen einzelner Gene

Die Längenunterschiede in den genannten Genen sind mit Ausnahme von *cemA* und in Teilen von *ycf2* auf das Vorhandensein von repetitiven Sequenzen zurückzuführen. In den beiden grössten Leserastern *ycf1* und *ycf2* sind die meisten Längendifferenzen zwischen den einzelnen *Oenothera*-Plastomen mit kurzen Sequenzmotiven von 6 - 24 Bp assoziiert. Die Sequenzwiederholungen sind nicht in mit anderen Landpflanzenplastomen konservierten Regionen der Gene lokalisiert. Inwiefern funktionell relevante Bereiche des Proteins durch die Repetitionen innerhalb des Gens betroffen sind, kann aufgrund der fehlenden funktionellen Charakterisierung von *ycf1* und *ycf2* nicht abgeschätzt werden (Drescher *et al.* 2000).

4.3 Genlokaliserte Deletionen können die Funktionalität der Genprodukte beeinträchtigen

Neben den Längenunterschieden aufgrund einfacher Tandemrepetitionen sind im 5'-Bereich von *ycf2* in den Plastomen II-V im Vergleich zu Plastom I sowie den weiteren Landpflanzenplastomen an mehreren Stellen des Gens zwischen 6 und 600 Bp deletiert. Obwohl diese Deletion in einer hochkonservierten Region des Gens lokalisiert ist, fehlt im Parasiten *Cuscuta reflexa* ebenfalls diese Region (Bommer *et al.* 1993). Davon ausgehend, dass im Plastom von parasitisch lebenden Pflanzen alle nicht benötigten Leseraster entweder eliminiert sind oder in Pseudogene umgewandelt wurden (dePamphilis und Palmer 1990; dePamphilis *et al.* 1997; Haberhausen *et al.* 1992; Wolfe *et al.* 1992), muss *ycf2* als funktionelles Gen angesehen werden. Somit wäre der 5'-Bereich des Gens für die Funktion verzichtbar und die Deletion in den vier oben genannten Plastomen (II-V) würde die Funktion nicht beeinträchtigen.

Am 5'-Ende von *cemA* fehlen im Plastom II 150 Bp. Studien an Deletionsmutanten des Gens in *Synechocystis*, *Chlamydomonas* und Tabak weisen auf die Beteiligung des *CemA*-Proteins an der Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff in Form von Hydrogenkarbonat (HCO_3^-) hin (Kato *et al.* 1996; Rolland *et al.* 1997). Das Protein ist dabei in der inneren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert. In den Plastomen von *Pinus thunbergii* und *Marchantia polymorpha* ist der 5'-Terminus um 96 bzw. rund 600 Bp verlängert. Alle anderen vollständig sequenzierten Plastome weisen die annähernd gleiche Genlänge wie die vier weiteren *Oenothera*-Plastome auf. In Plastom V ist darüberhinaus eine kurze 6 Bp lange Insertion vorhanden, die in Spinat an der gleichen Stelle lokalisiert ist. Die Beeinträchtigung der Funktion des Genprodukts ist weder in *Pinus* noch in *Marchantia* bekannt, so dass die Verlängerung des Gens am 5'-Ende unkritisch zu sein scheint. Die Verkürzung des Gens jedoch, wie in Plastom II, könnte aufgrund der Lokalisation einer möglichen Transmembranhelix sowie des Vorhandenseins zweier hoch konservierter WW-Motive am N-Terminus könnte im verkürzten Protein die Lokalisation in der Membran und somit die Effizienz der Aufnahme von Hydrogenkarbonationen stören.

4.4 Die regulatorischen Sequenzen sind zwischen den fünf Plastomen hoch konserviert

Die regulatorischen Elemente in den Plastomen, also die Promotoren und Prozessierstellen, wurden aufgrund der Sequenzähnlichkeit mit bekannten Elementen aus anderen Pflanzen verglichen und zeigten eine überraschend hohe Konservierung zwischen den fünf

Oenothera-Plastomen. Alle identifizierten, potentiellen Transkriptionsstartpunkte sind, mit Ausnahme des Promotors für *atpH* in Plastom I und für *psbK* in den Plastomen IV und V, in allen Plastomen identisch. Der *atpH*-Promotor wird zusätzlich zu Transkriptionsinitiationsstellen vor dem *atpI*-Gen verwendet, um die Expression vor allem der ATP-Synthaseuntereinheiten CF₀-I und -III im benötigten stöchiometrischen Verhältnis mit den Genprodukten des *atpBE*-Operons zu gewährleisten (Hennig und Herrmann 1986; Hotchkiss und Hollingsworth 1997). Somit ist die Assemblierung dieses Membrankomplexes gewährleistet. In Plastom I ist in die „-35“-Region durch die Insertion von drei Basenpaaren (CAC) verändert. Die Abweichung von der Konsensussequenz für die „-35“-Region der prokaryotischen Promotoren (TTGACA) ist möglicherweise unkritisch, da in Plastiden das „-35“-Element variabel in seiner Sequenz ist, manchmal sogar komplett fehlt (Stern *et al.* 1997).

In den Plastomen IV und V ist die „-10“-Region des *psbK*-Promotors durch eine Substitution gegenüber den Plastomen I, II und III von TAGAAT zu TAGAAA abgewandelt. In den plastidären Promotoren für die *E. coli*-ähnliche RNA-Polymerase ist die Pribnow-Box-ähnliche Sequenz deutlich stärker konserviert als die „-35“-Region. Die Wichtigkeit dieses Motivs wird beispielsweise bei *rps16* in *Sinapis alba* (Neuhaus *et al.* 1989) oder im Plastom von *Chlamydomonas* deutlich, wo das Gen *atpB* nur über die „-10“-Region verfügt (Stern *et al.* 1997). Mutationen in den beiden konservierten Promotorelementen resultieren häufig in deutlicher Reduktion der Effizienz oder dem vollständigen Verlust der Transkription (Chen *et al.* 1990; Gruissem und Zurawski 1985a, 1985b). Obwohl im *psbK*-Promotor der Plastome IV und V jeweils nur das letzte Nukleotid der Pribnow-Box-homologen Sequenz verändert ist, kann dies die Effizienz der Translation in Kombination mit einem anderen Kerngenom unter Umständen vermindern. Jedoch wäre somit aufgrund der typischen polycistronischen Operonstruktur in den Plastidengenomen von Landpflanzen (Westhoff und Herrmann 1988) nicht nur *psbK* betroffen, sondern auch die weiteren, in dieser Transkriptionseinheit lokalisierten Gene, *psbI* und *trnG*^{UCC}, würden weniger effizient transkribiert (Meng *et al.* 1991).

Die Gene für alle anderen tRNAs werden wahrscheinlich durch Initiation an geninternen Promotoren transkribiert. In den Plastiden von Spinat und *Chlamydomonas* sind für einige tRNA-Gene keine typischen „-35“/-10“- Promotoren beschrieben (Cheng *et al.* 1997). Jedoch konnten einzelne Elemente, Box A und B genannt, in den Genen als ausreichend für die Initiation der Transkription identifiziert werden. Auch in *Xenopus laevis* und *Drosophila melanogaster* sind diese Elemente für die Expression der meisten cytosolischen tRNAs notwendig (Galli *et al.* 1981; Sharp *et al.* 1981, 1982). Diese Elemente sind im Bereich der späteren basengepaarten Stämme der Dihydrouridin- (D-Kontrollregion) und der

Pseudouridinschleife (T ψ C-Kontrollregion) gelegen. Die tRNA-Gene in *Oenothera* sind in diesen Teilen zwischen den Plastomen unverändert. Somit ist auch hier keine differenzierte Transkription der Gene zu erwarten.

Die Prozessierungsstellen für die Reifung der polycistronischen Transkripte in translatierbare RNAs wurden ebenfalls über die Sequenzähnlichkeit mit bereits bekannten Sequenzen analysiert. Hier konnte zwischen den Plastomen kein Unterschied festgestellt werden. Die Unverträglichkeit eines Plastoms mit einem bestimmten Kerngenom scheint also nicht durch die fehlerhafte Prozessierung der plastidären Transkripte ausgelöst zu werden. In einigen Fällen konnte aufgrund der geringen Übereinstimmung der intergenischen Bereiche die potentielle Prozessierungsstelle jedoch nicht zweifelsfrei vorhergesagt werden. Doch auch in diesen Bereichen sind keine interplastomischen Unterschiede zu finden.

4.5 Die Integration eines *trnV^{GAC}*-Pseudogens in Plastom I hat keinen Einfluss auf das Transkriptmuster des *rRNA*-Operons

Im Plastom I ist im Vergleich mit den restlichen vier Plastomen ein zusätzliches Pseudogen zu finden. In der invertierten Sequenzwiederholung (IR_B) ist vor dem Operon der ribosomalen RNA-Gene eine weitere, verkürzte Kopie von *trnV^{GAC}* kodiert.

Durch RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass in Blättern das Gen für die Valyl-tRNA^{GAC} mit den Genen für die rRNAs kotranskribiert wird

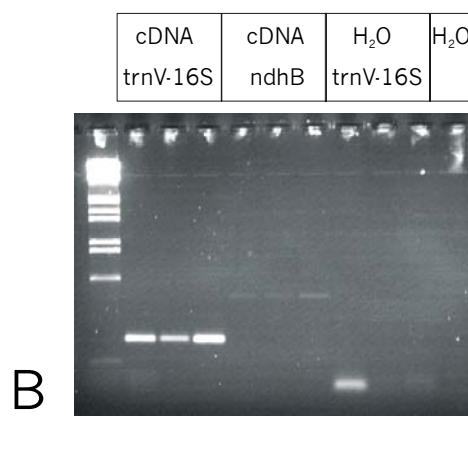


Abbildung 3.10). In *Daucus carota* konnte die Kotranskription von *trnV* mit dem rDNA-Operon ebenfalls gezeigt werden (Manna *et al.* 1994). Die Kotranskription von rDNA und tRNA^{GAC} findet hier jedoch nur in späteren Embryonalstadien (ab dem Stadium herzförmiger Embryos) oder danach statt. Im frühen Embryonalstadium ist die Expression der tRNA^{GAC} von der Expression der ribosomalen RNAs abgekoppelt.

Auch in *Oenothera* ist die Expression der Valyl-tRNA^{GAC} mit der Expression der rRNAs gekoppelt. Jedoch unterscheidet sich das Expressionsmuster von Plastom I nicht von dem von Plastom IV. Die Anwesenheit des Pseudogens ist also nicht für die Inkompatibilität von Genom und Plastom von Bedeutung.

4.6 Die Unterschiede an den Exon/Intron-Grenzen beeinflussen den korrekten Spleißvorgang nicht

In den Intronen der Gene *ndhA*, *ndhB*, *rps16* und *trnI*^{G^{AU}} sind die Sequenzen um die 5'-Spleißstelle nicht in allen fünf *Oenothera*-Plastomen konserviert. In den drei Klasse IIB-Intronen ist jeweils an der vierten Position des Introns ein Cytosin durch ein Thyminid ausgetauscht. Jedoch wird dadurch die erweiterte Konsensussequenz am 5'-Ende plastidärer Introne, GYGYG, noch immer erfüllt (Michel *et al.* 1989). Somit war es auch nicht verwunderlich, dass in Plastom I das Gen immer noch korrekt und effizient gespleißt werden kann. Auch die Spleißstelle wird korrekt benutzt, wie durch die Sequenzierung der entsprechenden cDNA im Vergleich mit Plastom IV gezeigt werden konnte.

Den gleichen Basenaustausch zeigen die Intronen von *ndhA* (II) und *rps16* (IV). Auch hier ist keine Änderung der Prozessierung aufgrund der veränderten vierten Base der Intronen zu erwarten. Die Bildung veränderter Proteine durch Leserasterwechsel aufgrund eines möglicherweise inkorrekten Spleißens der mRNA ist somit auszuschließen.

Im Klasse IIA-Intron von *trnI* ist in Plastom I an der ersten Intronposition zusätzlich ein Adenosinrest vorhanden. Das Intron ist in der Antikodonschleife der reifen tRNA insertiert, so dass die unpräzise Exzision des Introns die Verschiebung des Antikodons in der tRNA bewirken würde. RT-PCR-Experimente zeigten jedoch, dass sowohl in Plastom I als auch in der Kombination AA-IV, die den Kernhintergrund des Plastoms I mit der korrekten Intronsequenz vereinigt, das Intron korrekt aus dem Transkript entfernt wird. Die Veränderungen der 5'-Intronsequenzen scheinen die Effizienz und Präzision des Spleißvorgangs also nicht zu beeinflussen. Es ist daher ebenfalls nicht zu erwarten, dass sich hieraus ein Beitrag zur Inkompatibilität zwischen Genom und Plastom ergibt.

An den Verzweigungspunkten der Intronen existiert nur ein Unterschied: die Base direkt vor dem Adenosinrest des *trnG*^{UCC}-Introns, mit dem das 5'-Ende des Introns verknüpft wird, ist in Plastom IV deletiert. Die korrekte Positionierung des Verzweigungspunkts sollte dadurch jedoch nicht beeinträchtigt sein, da diese Deletion im Stamm der Introndomäne VI oberhalb des Adenosins liegt und somit die Distanz zwischen dem 5'- und 3'-Ende des Introns nicht verändert wird (Michel *et al.* 1989). Die konservierten und wichtigen Elemente der Intron-

sequenzen, wie die erste Intronbase, der γ - γ' -Tertiärinteraktion oder die konservierten Domänen V oder VI, sind von Veränderungen nicht betroffen. Solche Mutationen wurden in *E. coli* hergestellt. In diesen Mutanten konnte im Gegensatz zum Wildtyp das untersuchte Intron nicht mehr korrekt gespleißt werden (Holländer und Kück 1999).

4.7 Die Variation der Start-/Stoppkodonen beeinflusst die Genexpression nicht

Alle 78 proteinkodierenden Gene verfügen mit einer Ausnahme über ein ATG-Startkodon. Nur *ndhD* beginnt in allen Plastomen mit einem ACG-Kodon, was die Translatierbarkeit der mRNA, wie in Spinat beschrieben, herabsetzt (Neckermann *et al.* 1994). Durch Edierung wird dieses Kodon in allen bisher untersuchten Fällen, einschliesslich *Oenothera*, ein ATG-Kodon wiederhergestellt. In allen untersuchten Landpflanzen ist entweder ein ATG in der DNA kodiert oder das Kodon wird durch Edierung restauriert (Neckermann *et al.* 1994, Legen *et al.* 2001). Somit sollten alle proteinkodierenden Gene in den fünf Plastomen exprimiert werden können.

Ebensowenig sollte die Exprimierbarkeit durch die Veränderungen der Stoppkodonen in vier der fünf Plastome beeinträchtigt werden. Die beiden Freisetzungsfaktoren RF-1 und RF-2 binden jeweils an unterschiedliche Stoppkodonen (RF-1 erkennt TAA und TAG, RF-2 erkennt TAA und TGA), setzen die naszierende Proteinkette frei und ermöglichen die Wiederverwendung der ribosomalen Subpartikel. In sieben Fällen ist ein TAA-Kodon in TAG bzw. TAG in TAA durch einen Basenaustausch verändert. Die Regulation der translationellen Termination ist somit nicht beeinflusst, da beide Kodonen jeweils vom gleichen Freisetzungsfaktor erkannt werden.

Im Gegensatz zu *Chlamydomonas* werden in allen *Oenothera*-Plastomen auch TGA-Stoppkodonen benutzt (Lee *et al.* 1996), was für die Existenz von beiden Freisetzungsfaktoren spricht, wie es für dikotyle Pflanzen der Unterklasse *Rosidae* auch aufgrund der Gesamtsequenz von *Arabidopsis* zu erwarten ist (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Somit ist die Möglichkeit ausgeschlossen, dass ein Plastom in Kombination mit einem anderen als dem natürlich vergesellschafteten Kerngenom aufgrund fehlender oder ineffektiver Dekodierung der TGA-Stoppkodonen inkompabile Reaktion zeigt. Daneben ist auch durch Untersuchungen an transplastomischen Mutanten gezeigt, dass obwohl *Chlamydomonas* keine TGA-Kodonen in bekannten Genen nutzt, die Termination der Translation nach der Einführung von TGA-Stoppkodonen sehr effizient möglich ist (Lee *et al.* 1996).

4.8 In allen fünf *Oenothera*-Plastomen werden die Aminosäurekodonen mit gleicher Häufigkeit benutzt

Die Effizienz der Translation einer mRNA ist neben anderen Faktoren auch durch die Verfügbarkeit der aminoacylierten tRNAs bestimmt. Ebenso spielt bei der Verwendung seltener Aminosäurekodonen die Transkriptionsrate eine Rolle. Die Analyse der *Oenothera*-Plastome ergab keine signifikante Änderung der Kodonhäufigkeit, mit der diese in proteinkodierenden Genen verwendet werden. Alle Gene enthalten mit hoher Präferenz AT-reiche Kodonen für Aminosäuren, die von mehr als einem Basentriplett kodiert werden. Die absolute Zahl der Kodonen unterscheidet sich zwar vorwiegend aufgrund der repetitiven Elemente und weiterer kleinerer Insertionen/Deletionen (siehe Abschnitt 3.3.7), der prozentuale Anteil jedes Kodons an der Gesamtzahl ist jedoch für jede der kodierten Aminosäuren bemerkenswert stabil. Mit den wenig veränderten Promotoren der tRNA-Gene zusammen ergibt sich somit eine Situation, in der durch den Austausch zweier Plastome die Effizienz der Translation nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt wird. Somit ist eine unterschiedliche Verwendung von Aminosäurekodonen als Ursache für die Inkompatibilität sehr unwahrscheinlich.

4.9 Von den beiden Genen für Initiator-tRNAs ist nur eine Variante unter dikotylen Pflanzen konserviert

Die beiden Gene für Initiator-tRNAs in den Plastomen der *Euoenotheren* unterscheiden sich mit der Ausnahme in Plastom V innerhalb eines Plastoms voneinander nur an einer Position. Die aus der Gensequenz des *trnfM* II-Gens abgeleitete tRNA entspricht in der Sequenz derer anderer Dikotyledonen. An den Positionen 57-59 lautet die Sequenz in dikotylen Pflanzen 5'-AAA-3' (Canaday *et al.* 1980; Lehmbeck *et al.* 1987; Shinozaki *et al.* 1986; Schmitz-Linneweber *et al.* 2001), aus dem Gen *trnfM* I lässt sich an diesen Positionen die Sequenz 5'-GAA-3' ableiten, die bisher bei keiner dikotylen Art in der T ψ C-Schleife der Initiator-tRNA gefunden wurde. Auch in Monokotyledonen ist diese Signatursequenz nicht bekannt, hier lautet die Sequenz zumeist 5'-GAT-3' (Maier *et al.* 1995). Geht man davon aus, dass die aus dem ersten Gen (*trnfM* I) resultierende tRNA nicht funktionell ist, dann könnte aus dem Plastom V in AA-, AB- oder BB-Kernhintergründen keine funktionelle Initiator-tRNA dekodiert werden, da hier beide Gene identisch sind und die Signatursequenz 5'-GAA-3' in der T ψ C-Schleife enthalten (Abbildung 3.6). Somit könnte die Inkompatibilität des Plastoms V mit dem A- oder B-Genom teilweise erklärt werden. Wie Abbildung 1.4 zeigt, ist Plastom V in den Kombinationen AA-V, AB-V und BB-V nicht überlebensfähig (Stubbe 1959).

4.10 Aminosäureunterschiede der plastidär kodierten Proteine können die Interaktion mit nukleär kodierten Proteinuntereinheiten beeinträchtigen

In homologen Proteinen, die von den verschiedenen Plastomen kodiert werden, sind mit unterschiedlicher Häufigkeit Aminosäureaustausche zu beobachten. Die Proteine der Photosysteme sind im Vergleich mit den Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase stark konserviert. Ausgesprochen variable Proteine sind die *ClpP*-Protease-Untereinheit und die Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit *accD*. In diesen beiden Proteinen finden sich bezogen auf die Länge der Sequenz die meisten Aminosäureaustausche. Die Analyse dieser Mutationen mit Hilfe der verfügbaren dreidimensionalen Strukturen homologer Proteine und Proteinkomplexe ergibt nur für wenige Positionen einen Einfluss auf die Tertiärstruktur. Für Proteine, deren Strukturen bisher nicht in atomarer Auflösung geklärt sind, wurden dabei Vergleiche mit natürlich vorkommenden oder künstlich hergestellten Mutanten (Hahn und Strauss 1990; Hwang *et al.* 2000; Rolland *et al.* 1997; Stratton *et al.* 2001) vorgenommen.

4.10.1 Die plastidär-kodierte P-Untereinheit der *Clp*-Protease ist möglicherweise nicht proteolytisch aktiv

Auffallend in den Genen für die Proteaseuntereinheit *ClpP* ist, dass das Kodon für einen der drei katalytischen Aminosäurereste verändert ist. In allen fünf Plastomen ist anstelle des für Serinproteasen essentiellen Aspartatrestes ein Asparaginrest kodiert (D183N in Plastom I, II und IV, D184N in Plastom III, D185N in Plastom V). Diese Aminosäure ist notwendig, um innerhalb der katalytischen Triade (Ser-His-Asp) über den Histidinrest das Proton des Serinrestes zu polarisieren. Somit kann schliesslich der nukleophile Angriff des Serinrest auf das Substrat erfolgen. Die Mutation des Aspartatrestes resultiert in den meisten Fällen mit dem Verlust der katalytischen Aktivität (Carter und Wells 1988; Craik *et al.* 1987; Hwang *et al.* 2000; Sprang *et al.* 1987). Wenige Ausnahmen sind beschrieben, in denen der Verlust des aktiven Aspartats nicht mit dem vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität verbunden ist (Dodson und Wlodawer 1998; Hahn und Strauss 1990; Halperin *et al.* 2001; Stratton *et al.* 2001). Inwieweit der Austausch des Aspartats gegen Asparagin zum Aktivitätsverlust führt, ist offenbar von Protease zu Protease unterschiedlich. Die Mutation D81N der NIa-Protease des Tabakvenenfleckenvirus (TVMV), einer Cysteinprotease, resultiert im vollständigen Aktivitätsverlust, wohingegen der Austausch gegen Glutamat nur geringen Einfluss auf die enzymatischen Parameter k_{cat} und K_M hat (Hwang *et al.* 2000). Im Sindbis-Virus hat der Austausch der beiden Aspartatreste in der Capsidautoprotease *in vitro* kaum Einfluss auf die Proteinaktivität. *In vivo* jedoch sind alle Mutationen mit Ausnahme von

D163N letal, das Virus verliert dadurch seine Infektiosität (Hahn und Strauss 1990). Auch der nukleär kodierte Untereinheit *ClpP2*, die in den Mitochondrien höherer Pflanzen lokalisiert ist, fehlt der Aspartatrest der katalytischen Triade (Peltier *et al.* 2001). Jedoch ist in diesem Fall das Enzym noch proteolytisch aktiv (Dodson und Wlodawer 1998). In den plastidären *Clp*-Komplexen höherer Pflanzen ist aber keine katalytisch aktive *Clp*-Untereinheit beschrieben, in der ein Rest der katalytischen Triade verändert ist.

Die Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität wäre durch eine post-translationale Desaminierung des Asparaginrests möglich. Dies ist bisher nur für eine Asparagin-Mutante der Haloalkan-Dehalogenase beschrieben (Pries *et al.* 1995).

Somit erscheint diese Alternative zur Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität der Untereinheit wenig wahrscheinlich.

4.10.2 Der durch Plastom II kodierte N-Terminus des *CemA*-Proteins der Plastidenhüllmembran liegt auf der „falschen“ Membranseite

Das *cemA*-Genprodukt ist in *Chlamydomonas* unter phototrophen Bedingungen notwendig, unter heterotrophen Wachstumsbedingungen hingegen kann darauf verzichtet werden. Das Protein ist an der Aufnahme von HCO_3^- beteiligt, es ist Teil des Konzentrationsmechanismus für CO_2 , der in allen Grünalgen den Kohlendioxidpartialdruck in den Zellen erhöht (Rolland *et al.* 1997). Somit wird die unerwünschte Oxygenase-Reaktion der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase unterdrückt. In höheren Pflanzen wurde ein solcher Mechanismus bisher nicht entdeckt. Das homologe Protein *CotA* in Cyanobakterien ist ebenfalls an der CO_2 -Aufnahme und dem Protoneneinfluss in die Zellen beteiligt (Kato *et al.* 1996).

Das homologe Protein der Gefäßpflanzen besitzt eine Länge von rund 230 Aminosäuren. In den *Oenothera*-Plastomen trifft dies mit Ausnahme von Plastom II ebenfalls zu (179 Aminosäuren). Die A-reiche Region am Beginn des Gens führt zu einem Rasterschub, so dass ausgehend von dem Startkodon kein Protein produziert werden kann. Ein alternatives Startkodon führt zur Verkürzung des Proteins um 50 Aminosäuren. Diese Deletion am N-Terminus eliminiert eine mögliche Transmembranhelix in einer selbst zwischen Landpflanzen und Algen hoch konservierten Region. Somit würde, ungeachtet welche Funktion das Protein in Pflanzen hat, der N-Terminus auf der anderen Membranseite lokalisiert sein. Die Kombination des Plastoms II mit dem B- oder C- Genom könnte somit dazu führen, dass die Plastiden ungenügend mit CO_2 versorgt werden und sich langsamer entwickeln. Das Plastom II ist natürlicherweise mit dem A-Genom assoziiert, das möglicherweise eine Genkopie im Zellkern besitzt, die die fehlende Funktion von *CemA* komplementieren kann.

4.10.3 Einzelne Aminosäureautausche können durch Edierung kompensiert werden

Im Plastom I treten einige Veränderungen in den kodierenden Bereichen auf, die durch Edierung der mRNA, d. h. in Plastiden durch die Desaminierung eines Cytosins in ein Uridin-nukleotid in den entsprechenden Kodonen, revertiert werden können. In den Plastiden von Hornmoosen und Farnen und in Mitochondrien tritt auch der umgekehrte Fall auf, d. h. die Aminierung eines Uridins (Malek *et al.* 1996). Edierung in den pflanzlichen Organellen ist in den meisten Fällen ein Prozess, der zur Wiederherstellung hochkonservierter Kodonen benutzt wird. So werden neben internen Kodonen auch Start- und Stoppkodonen wiederhergestellt (Neckermann *et al.* 1994; Wakasugi *et al.* 1996). Ausserdem wird somit wohl eine weitere Regulationsebene geschaffen, um die Expression von Genen noch feiner an unterschiedliche Lebensbedingungen anzupassen (Maier *et al.* 1996; Neckermann *et al.* 1994).

In den Plastomen I und IV wurden Kodonen auf mögliche Edierungsereignisse hin untersucht, deren homologe Kodonen in anderen Angiospermen ediert werden (Corneille *et al.* 2000; Hirose *et al.* 1999; Maier *et al.* 1995; Tsudzuki *et al.* 2001). So konnte auch in *Oenothera* die Edierung als weitere Regulationsmöglichkeit in der Genexpression gezeigt werden; in Mitochondrien von Spezies der Subsektion *Raimannia* ist dies seit längerer Zeit schon bekannt (Malek *et al.* 1996). Die Untersuchung der bekannten Edierungsstellen zeigt ein typisches Muster für dikotyle Angiospermen. Nukleotide an spezifischen Edierungspositionen von Gymnospermen oder monokotylen Angiospermen werden, sofern an diesen Stellen homologe Kodonen vorhanden sind, entweder nicht konvertiert oder kodieren bereits in der DNA-Sequenz ein Thymidin.

Auffallend ist der fast vollständige Verlust der Edierungskapazität für das *rpoB*-Transkript. Alle bekannten Edierungsstellen aus Angiospermen bleiben unverändert, stattdessen wird im Plastom I ein Cytidin an der dritten Kodonposition eines Valinkodons in ein Thymidin konvertiert. Die in das Protein an dieser Stelle eingebaute Aminosäure bleibt gleich, jedoch ist hier möglicherweise ein „schnelles“ Kodon während der Translation nötig, um das Protein effizient zu synthetisieren. In allen anderen *Oenothera*-Plastomen ist bereits ein häufig verwendetes GTT-Kodon in der DNA-Sequenz enthalten. Möglicherweise ist der Spezifitätsfaktor für diese Edierungsstelle somit nur im A-Genom, nicht aber im B- und C-Genom kodiert.

Ebenfalls nur im A-Genom kodiert sind möglicherweise die Spezifitätsfaktoren für zwei weitere Plastom I-spezifische Edierungsstellen: an Kodon 309 von *ndhA* (Threonin zu Isoleucin) und Kodon 71 von *psaA* (Serin zu Leucin). Beide Edierungsstellen restaurieren

Kodonen für in den Landpflanzen konservierte Aminosäuren. Die systematische Überprüfung der fünf Plastome wird wohl noch weitere plastom-spezifische Edierungsstellen enthüllen, deren Spezifitätsfaktoren, die in einzelnen Kerngenomen nicht kodiert sein müssen, eine mögliche Ursache für die Inkompatibilität einzelner Kern/Plastom-Kombinationen sind. In Tabak konnte nachgewiesen werden, dass vorhandene Spezifitätsfaktoren über einen langen Zeitraum im Genom erhalten bleiben können, auch wenn die zu edierende Stelle nicht mehr im Plastom vorhanden ist (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Der Erwerb und Verlust von Edierungsstellen ist in den Organellengenomen ein stark fluktuierender Prozess (Drescher *et al.* 2002; Malek *et al.* 1996). Der Erwerb einer Edierungsstelle ist dabei notwendigerweise mit dem Erwerb eines Proteinfaktors verbunden, um die „richtige“ Aminosäuresequenz wiederherzustellen. Der Verlust einer Edierungsstelle bzw. der Verlust der Edierungsfähigkeit an einer bestimmten Edierungsstelle kann sowohl auf die Veränderung der DNA an dieser Position durch (Rück-)Mutation, die Mutation der umgebenden DNA-Sequenz (*cis*-Sequenz) oder auch auf den Verlust des Proteingens für den Spezifitätsfaktor zurückzuführen sein. In einer Untergruppe der Gräser tritt beispielsweise eine Edierungsstelle im intergenischen Bereich zwischen den Genen *ndhI* und *ndhG* auf. In *Sorghum bicolor* ist an der homologen Stelle immer noch ein Cytidin kodiert, das allerdings nicht mehr in ein Thyminid konvertiert wird (Drescher *et al.* 2002). Auch hier ist möglicherweise der Spezifitätsfaktor verloren gegangen, so dass sich im Laufe der Evolution auch weitere Mutationen in der *cis*-Sequenz anhäufen konnten.

4.11 Die unterschiedlichen Vermehrungsgeschwindigkeiten sind möglicherweise mit einer Struktur nahe der Initiator-tRNA-Gene assoziiert

Stubbe hat 1959 die genetische Unterscheidbarkeit der fünf *Oenothera*-Plastome beschrieben. Dabei ist unter anderem auch die unterschiedliche Vermehrungsgeschwindigkeit mit in die Differenzierung eingeflossen (siehe auch Stubbe 1989). So gilt Plastom IV als das „langsamste“ Plastom, das von allen anderen Plastomen in Hybriden, die neben einem normalgrünen zusätzlich ein anderes der Plastome der *Euoenotheren* enthalten, verdrängt werden kann. Plastom I als ein „schnelles“ Plastom hingegen repliziert sich nach diesen Analysen am schnellsten. Die Ursache für diese Unterschiede liegen in den Plastiden selbst (Chiu und Sears 1993; Schötz 1975). Entsprechende Untersuchungen an Mais und Gerste deuten auf einen nicht-kodierenden Bereich der Plastiden-DNA hin (Börner *et al.* 1976; Han *et al.* 1992; Walbot und Coe 1979). Voruntersuchungen in *Oenothera* konzentrierten sich auf den möglichen Replikationsursprung *oriB* (Hornung *et al.* 1996; Sears *et al.* 1996), der zwischen *rrn16* und *trnI-GAU* in der invertierten Sequenzwiederholung (IR-Region)

lokalisiert ist. In diesem Bereich sind die Plastome hochrepetitiv und variabel, so dass komplexe Sekundärstrukturen ausgebildet werden können. Die Unterschiede in den Vermehrungsgeschwindigkeiten korrelieren nicht mit den Längen der Sequenzen in diesem Bereich. Jedoch scheint die Existenz von spezifischen Stammschleifenstrukturen mit der Funktion der Replikationsursprünge verknüpft zu sein (Nielsen *et al.* 1993).

Eine weitere auffällige Sekundärstruktur kann zwischen *trnM* II und *trnG*-GCC ausgebildet werden. Hierbei handelt es sich um eine einzelne Stammschleifenstruktur, die sich – vergleichbar mit dem *oriB* – in allen fünf Plastomen unterscheidet. Untersuchungen an Hepatitis B-Viren haben eine Sekundärstruktur identifiziert, die notwendig für die korrekte Replikation der viralen RNA ist. Mutationen an dieser Stammschleifen-Struktur, die entweder die Struktur des Stammes oder die Grösse und Sequenz der Schleife verändern, haben sich als kritisch für die Replikation und Verpackung der viralen (c)DNA in neue Capside erwiesen (Beck und Nassal 1997; Beck *et al.* 1997; Fallows und Goff 1995). Die ϵ -Struktur enthält Sequenzmotive für Proteine, die an der Initiation der reversen Transkription beteiligt sind, als auch für Capsidproteine, die die Hülle des reifen Viruspartikels ausmachen. Diese Sequenzmotive sind nicht notwendigerweise identisch (Beck und Nassal 1997).

Im Falle der fünf Plastome ist an der Stammschleifenstruktur zwischen den Genen für die Initiator-tRNAs und der nachfolgenden $tRNA^{Gly}$ -Gen ebenso auf DNA-Ebene eine Diskriminierung durch Nukleinsäure-bindende Proteine denkbar. Zusammen mit der möglichen Regulation der Replikation durch die *oriB*-Bereiche könnte die Replikation von fremden Plastomen in einem definierten nukleären Hintergrund verändert sein. Die Sequenzen der einzelnen Plastome in diesem Bereich dienen möglicherweise noch stärker als die Sekundärstruktur, die nur eine relativ einfache Konformation annimmt, als Diskriminatoren. Die Stammschleifen sind energetisch relativ stabil. Bei 37 °C ergibt sich eine berechnete Enthalpiedifferenz von $\Delta G = -15,3$ kJ/mol bis $-11,6$ kJ/mol (in der Reihenfolge I<II<III<IV<V). Die Stabilität der Sekundärstruktur erniedrigt sich somit in der Reihenfolge der Replikationsgeschwindigkeiten der einzelnen Plastidentypen I>II>III>IV (Stubbe 1959). Diese Korrelation der relativen Geschwindigkeiten zur Replikation im Vergleich zu den gesamten *oriB*-Regionen ist nicht möglich (Chiu und Sears 1993).

4.12 Mögliche Beteiligung der Stammschleifenstruktur im intergenischen Bereich zwischen *trnFM* und *trnG* an der Stabilisierung des *trnFM*-Transkripts und Gewährleistung der Verfügbarkeit der Initiator-tRNA

Die in Abschnitt 3.3.5 beschriebene Sekundärstruktur kann sich ebenso nach der Transkription ausbilden. Durch die in Abbildung 3.9 gezeigte G-U- und U-U-Wechselwirkungen ist die vorhergesagte RNA-Struktur bedeutend stabiler als die auf DNA-Ebene ausgebildete Struktur. Die Stabilität variiert bei den RNAs von $-21,9$ kJ/mol bis $-17,1$ kJ/mol in der Reihenfolge I<II<IV<<III<V. Die Struktur weist entfernt sequenzielle Ähnlichkeit mit dem Akzeptorstamm der Alanyl-tRNA auf, die dort als wichtigstes Identitätsmerkmal ein G-U-Basenpaar besitzt (McClain *et al.* 1991; Ramos und Varani 1997). In verschiedenen Organismen dient das G-U-Basenpaar in Ribonukleinsäuren aufgrund seiner einzigartigen chemischen und strukturellen Eigenschaften als Identitätselement (Varani und McClain 2000). In vielen Fällen nutzen Proteine wie tRNA-Synthetasen oder ribosomale Proteine diese Eigenschaften als Erkennungsmerkmal aus.

Transkriptstudien haben die Existenz von Stammschleifenstrukturen an den Enden plastidärer oder prokaryotischer Transkripte als Stabilisatoren unterstrichen (Sugita und Sugiura 1996; Sugiura *et al.* 1998). Durch die Bindung und Aktion von Proteinen können Transkripte trotz niedriger Expressionsraten hohe Halbwertszeiten besitzen und trotz „schwacher“ Sekundärstrukturen an den Enden der RNA langlebig sein (Fournier *et al.* 2001). RNA-bindende Proteine könnten die Stammschleifenstruktur des Transkripts als Ziel für ihre Bindung nutzen. In verschiedenen Kernhintergründen könnte dadurch ein verhältnismässig instabiles Transkript stabilisiert werden. Im Falle der Sekundärstruktur in *Oenothera* würde die Stabilität des *trnFM*-Transkripts, und auch des möglichen *psaAB-rps14-trnFM*-Transkripts moduliert. Das ribosomale Protein S14 ist wahrscheinlich in die Positionierung der mRNA innerhalb der 30S-Untereinheit des Ribosoms eingebunden (Müller und Brimacombe 1997) oder stabilisiert zusammen mit anderen ribosomalen Proteinen die Gesamtstruktur des Ribosoms (Wimberley *et al.* 2000). Fehlende Stabilität der *rps14*-mRNA könnte somit zur Destabilisierung der Translationsmaschinerie führen, was gleichbedeutend mit der reduzierten Expression der plastidär kodierten Proteine und einem inkompatiblen Phänotyp wäre. Ebenso würde die verminderte Stabilität des *trnFM*-Transkripts die Expression der plastidär kodierten Proteine aufgrund der geringeren Verfügbarkeit der Initiator-tRNA negativ beeinflussen.

4.13 Die Determinaten für Genom/Plastom-Inkompatibilität in *Oenothera* sind sehr wahrscheinlich für jede Kombination verschieden

Die hier gezeigten molekularen Daten ermöglichen einen tieferen Einblick auf das Wesen der Genom/Plastom-Inkompatibilität in *Oenothera* als es bisher möglich war. Schmitz-Linneweber *et al.* (2002) haben kürzlich gezeigt, dass in interspezifischen Cybriden zwischen Tabak und Tollkirsche (*Atropa belladonna*) ein möglicher Mechanismus, die in diesem System auftretende Inkompatibilität zu erklären, der Unterschied im Edierungsmuster sein kann. Tabak und Tollkirsche unterscheiden sich an drei Positionen, die, um eine hochkonservierte Aminosäure wiederherzustellen, notwendigerweise ediert werden müssen. Die chlorophylllosen Cybriden besitzen in diesem System den Zellkern von *Atropa* und die Plastiden von Tabak. Fehlende Edierung an Tabak-spezifischen Positionen in den mRNAs von *rps14* und *rpoB* könnte unter anderem zu dem beobachteten Phänotyp führen.

Im Formenkreis *Oenothera* jedoch scheint Edierung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zwar existieren auch hier spezie-spezifische Edierungsstellen (bisher nur in Plastom I gefunden), eine wichtigere Rolle scheinen allerdings die auffallenden Insertionen/Deletionen in protein-kodierenden Genen und der Beitrag regulatorischer Bereiche in intergenischen Regionen zu spielen. Es zeichnet sich ein Bild ab, in dem jede inkompatible Genom/Plastom-Kombination auf andere Ursachen zurückzuführen ist. Im Folgenden werden die plastidären Determinanten in Kombination mit verschiedenen Genomen kurz diskutiert.

Plastom I-*Johansen* ist mit allen anderen als dem natürlichen Genotyp inkompatibel. Dies könnte u. a. mit der Existenz von spezifischen Edierungsstellen zusammenhängen. Bei der konzertierten Expression der Thylakoidmembranproteine durch das nukleäre und das plastidäre Genom entstehen somit möglicherweise in inkompatiblen Kombinationen nicht-edierte mRNAs, die zur Synthese reduziert-funktioneller oder nicht-funktioneller Proteineinheiten führen können. Die Kombination von Plastom I mit anderen A₍₁₎-Genomen sowie den B- und C-Genomen lässt darauf schliessen, dass der für die Edierung der Plastom I-spezifischen Positionen nötige Faktor nur im A₍₂₎-Genom vorhanden ist. Somit gleicht die Situation hier möglicherweise der in *Atropa*/Tabak-Cybriden beschriebenen (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002).

Die verminderte Grünfärbung von Plastom II in Kombination mit den Genotyp A₂A₂-*Johansen* ist möglicherweise in einer Deletion am N-Terminus des für die HCO₃⁻-Aufnahme nötigen *CemA*-Proteins mitbegründet. Plastom II ist in natürlich vorkommenden Arten mit dem Genotyp AB verbunden, wobei das A₁-Genom möglicherweise über ein nukleär kodiertes

Protein diese Beeinträchtigung besser kompensieren kann. Mit nicht-A-haltigen Genotypen zeigt das Plastom II deutliche Ergrünungs- und Entwicklungsdefekte.

Die Kombination von Plastom III aus *O. glazioviana* mit dem A₂A₂-Genom von *O. elata* ssp. *hookeri* zeigt periodisches Ausbleichen der jungen Blätter. Die Ursache hierfür kann u. a. entweder in der Chlorophyllbiosynthese, der Chlorophyllbindung durch Proteine der beiden Photosysteme oder einem nicht ausreichenden Schutz vor Photooxidation liegen. In Plastom III sind im Vergleich zu den anderen Plastomen in den Genen *psaB*, *ndhJ* und *ndhK* jeweils Aminosäurekodons verändert, die in der Proteinanalyse (siehe Abschnitt 3.3.9) als nicht kritisch für die Funktion der jeweiligen Proteine eingestuft wurden. Möglicherweise haben die Aminosäureunterschiede in den beiden Untereinheiten für die NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase jedoch einen Einfluss auf den Schutz vor Photooxidation. Das periodische Ausbleichen am Beginn der Morphogenese deutet daraufhin, dass nicht genug andere Schutzmechanismen in den Plastiden verfügbar sind. Diese Mechanismen (SOS-Antwort?) werden möglicherweise immer dann aktiviert, wenn die Pflanzen aufgrund der Schädigung der Plastiden zugrunde zu gehen drohen. Ab einer gewissen Menge an Protektoren, unabhängig davon, ob cytosolischen oder plastidären Ursprungs, bleiben die Blätter dann grün und zeigen leichte Schwankungen in der Intensität der Färbung. Die B-Genome scheinen von Anfang der Entwicklung der Pflanze an schon ein höheres Niveau an Protektoren in den Plastiden zu akkumulieren. In allen Genotypen mit Beteiligung der B-Genome, mit Ausnahme der Kombination BC tritt keine Beeinträchtigung der Ergrünung auf.

Plastom IV ist mit allen Genotypen kompatibel. Diese Beobachtung hat Stubbe so interpretiert, dass Plastom IV das primitivste und älteste Plastom sein müsste (Stubbe 1959). Nach den vorliegenden Daten konnte in Plastom IV kein Merkmal identifiziert werden, das Plastom IV eindeutig als „ursprünglich“ kennzeichnet. Vielmehr sind die durchgeführten phylogenetischen Rekonstruktionen nicht aussagekräftig, da es, je nachdem, welches Gen oder Protein betrachtet wird, gegensätzliche Resultate ergibt (Daten nicht gezeigt). In vielen Elementen sind sich die Plastome IV und V ähnlich, und grenzen sich deutlich von den restlichen Plastomtypen ab. Die Rekonstruktion aufgrund des *oriB* enthaltenden intergenischen Bereichs zwischen *rrn16* und *trnI*^{GAU} zeigt, dass eventuell Plastom V das ältere der beiden Plastome ist (Hornung *et al.* 1996).

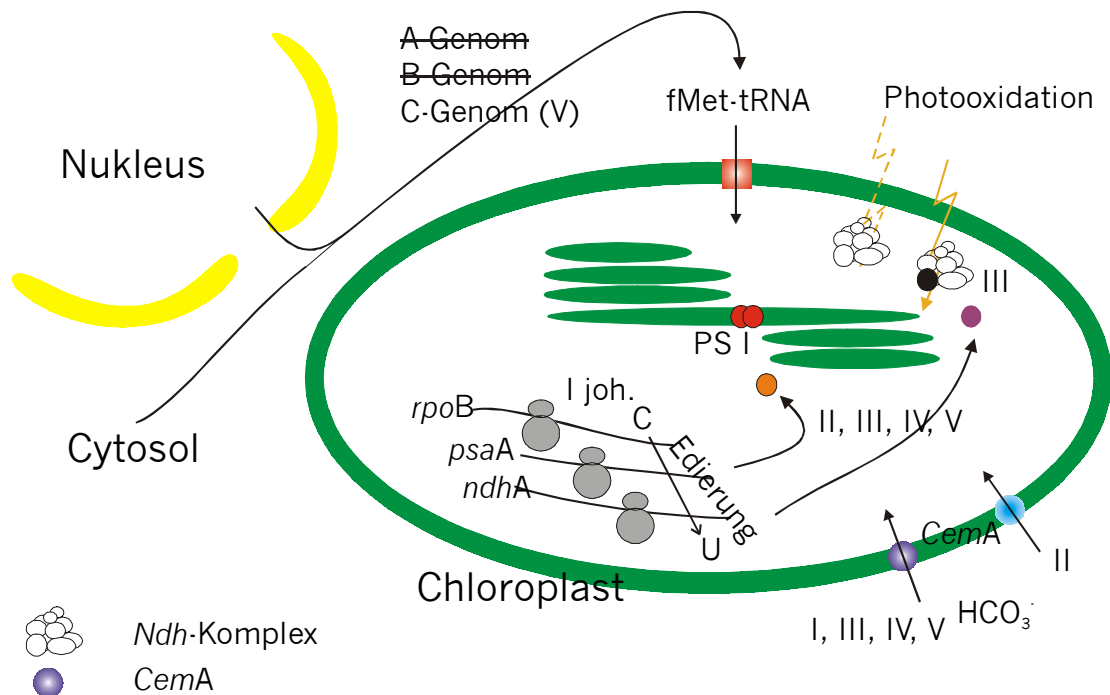


Abbildung 4.1: Modell möglicher Inkompatibilitätsmechanismen im Formenkreis *Oenothera*.

Plastom V unterscheidet sich von allen anderen Plastomen, da es nur in genetischen Kernhintergründen, die das C-Genom enthalten, überlebensfähig ist. Eines der Hauptmerkmale von Plastom V ist die Existenz des *trnFM*-Gens in zwei identischen Kopien. Die Inkompatibilität könnte nun darauf beruhen, dass keine funktionelle Initiator-tRNA in den Plastiden vorhanden ist. Im C-Genom könnte ein Transportprotein kodiert sein, das es erlaubt Initiator-tRNA in die Plastiden zu importieren. Weder die A- noch die B-Genome besitzen dieses Protein, so dass das Plastom V in Kombination mit diesen Genomen nicht exprimierbar ist. Von weiteren kleinen Unterschieden sollte nach bisheriger Kenntnis kein Einfluss auf die Kompatibilität mit dem Genom ausgehen.

Alle genannten Mechanismen, die zum Teil auch auf Spekulation beruhen, sind in Abbildung 4.1 noch einmal grafisch zusammengefasst. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Faktoren an der genetischen Interaktion zwischen Genom und Plastom beteiligt sind, diese könnten durch weitere cytologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen im Einzelnen überprüft werden.

4.14 Die Plastommutante II γ besitzt ein defekte α -Untereinheit des Cytochroms

b₅₅₉

Bei der Aufklärung der kompatiblen Genom/Plastom-Kombinationen wurden von Stubbe mutierte Plastiden, das heisst chlorophyll-defiziente Plastiden als Markierung für die Vererbung der Plastiden eingesetzt. Eine der verwendeten Mutanten war die Plastommutante II γ (Stubbe 1955). In Voruntersuchungen wurden spektroskopische sowie ultrastrukturelle Analysen durchgeführt (Fork und Heber 1968; Kutzelnigg *et al.* 1975a, 1975b). Durch immunologische Untersuchungen konnte der Defekt auf das Cytochrom *b₅₅₉* eingengt werden. Durch Sequenzierung des *psbEFLJ*-Operons konnte eine Duplikation von fünf Basenpaaren im Gen *psbE* nachgewiesen werden. Alle anderen Gene in dieser Transkriptionseinheit sind unverändert. Die Insertion von fünf Basenpaaren führt zu einem Wechsel des Leserasters, wodurch das Gen vorzeitig terminiert wird. Das entstehende Protein ist offensichtlich nicht stabil und ist aufgrund der Sequenz auch nicht in der Lage, eine Hämgruppe zu binden. Aus Untersuchungen an *Chlamydomonas reinhardtii* ist bekannt, dass das gesamte Photosystem II nicht funktionell ist und schnell degradiert wird, wenn das Cytochrom *b₅₅₉* nicht in das minimale Reaktionszentrum integrieren kann (Morais *et al.* 1998; Wollman *et al.* 1999). Dieses als CES-Prozess (*control of epistatic synthesis*) beschriebene Phänomen ist auch in den Plastiden höherer Pflanzen gültig. Die immunologischen Analysen der Mutante II γ zeigen, dass alle plastidär kodierten Untereinheiten des mutierten Membrankomplexes reduziert sind oder fehlen (Wollman *et al.* 1999). Somit kann die spontan aufgetretene Plastommutante ebenso wie die künstlich hergestellten Nullmutanten in *Chlamydomonas* oder Tabak als Modell für die Biogenese der Thyakoidmembran dienen.

4.15 Die Plastommutante II θ kann aufgrund einer Deletion zweier Basenpaare das *petB*-Transkript nicht mehr spleißen

Eine weitere spontan aufgetretene Plastommutante ist II θ . Auch diese Mutante wurde bereits ultrastrukturell charakterisiert (Kutzelnigg *et al.* 1975a). Fluoreszenzmessungen sowie immunologische Untersuchungen deuteten auf einen Defekt in der Elektronentransportkette zwischen den beiden Photosystemen hin. Die Sequenzierung der Gene für die Untereinheiten des Cytochrom *b_{6f}*-Komplex ergab eine Deletion von zwei Basenpaaren im Intron von *petB*. Weitere Untersuchungen führten zur Schlussfolgerung, dass aufgrund dieser Deletion das Intron nicht mehr in der Sekundärstruktur stabilisiert ist und somit nicht gespleißt werden kann. Dies bestätigen die *in silico* durchgeführten RNA-Sekundärstrukturvorhersagen. In dieser Mutante sind neben dem Cytochrom-Komplex auch beide Photosysteme betroffen, was

für die zentrale Rolle des Cytochrom-Komplexes in der Koordinierung der Thylakoidmembran-Ontogenese spricht (Oswald *et al.* 2001; Pfannschmidt *et al.* 2001). Auch diese Mutante kann wie die Mutante $II\gamma$ als Modell für das Studium des CES-Prozesses und der funktionellen Integration des Plastoms in die Regulation der Expression in höheren Pflanzen dienen.

5 Zusammenfassung

Plastiden nehmen verschiedene, für die Pflanze essentielle anabolische Funktionen wahr, z. B. Photosynthese, ATP-Synthese oder Fettsäuresynthese. Die Untereinheiten für die hierfür notwendigen Enzyme werden teilweise vom Nukleus kodiert, zum anderen Teil aber auch vom plastidären Genom. Das richtige Zusammenspiel des nukleären und des plastidären Genoms ist für die korrekte Funktion der Plastiden essentiell. In einigen Gattungen der höheren Pflanzen existieren sowohl Varianten des nukleären als auch des plastidären Genoms. Im Formenkreis *Oenothera* existieren neben drei verschiedenen nukleären Genomen (A, B, C) fünf genetisch unterscheidbare plastidäre Genome (I, II, III, IV, V). Innerhalb dieses Formenkreises ist es möglich, interspezifische Genom/Plastom-Hybriden zu erzeugen und somit die Interaktion jedes nukleären Genoms mit jedem plastidären Genom zu untersuchen. Etwa die Hälfte der 30 möglichen Kombinationen zeigt Defekte in der Pigmentierung oder ist letal.

1. Genomanalyse der fünf genetisch unterscheidbaren Plastidengnome (Plastome)

Zur Bestimmung plastidärer Determinanten für die Kompatibilität zwischen dem nukleären Genom und dem Plastom, das diese Determinanten kodiert, wurden die Gesamtsequenzen der fünf genetisch unterscheidbaren Plastome bestimmt. Die Längen liegen dabei zwischen 163642 Bp und 164977 Bp. Alle fünf Plastome kodieren 110 bekannte Gene sowie zwei offene Leseraster, die zwischen allen bisher bekannten Plastomen dikotyler Pflanzen konserviert sind. In jedem Plastom sind Gene für 76 Proteine, 30 tRNAs und 4 rRNAs kodiert. Das Gen für die Initiator-tRNA ist dupliziert und weist mit Ausnahme vom Plastom V einen Basenunterschied auf. 17 der 110 bekannten Gene enthalten Intronen, die vor der Translation aus der mRNA gespleißt werden müssen. Die Positionen der Intronen sind im Vergleich zu anderen höheren Pflanzen konserviert. Anhand des aus Tabak bekannten Satzes von Edierungsstellen wurde die Möglichkeit einer differentiellen Edierung in den Einzelgenomen untersucht. Von den 31 aus Tabak bekannten Edierungsstellen wurden 17 ediert, 4 wurden nicht ediert und an 10 Positionen war bereits in der DNA ein T-Nukleotid kodiert. Alle untersuchten Plastome zeigten an diesen Stellen das gleiche Edierungsmuster.

2. Mögliche plastidäre Determinanten für die Genom/Plastom-Inkompatibilität

Es wurden einige mögliche plastidäre Determinanten, die die Ausprägungen der Genom/Plastom-Inkompatibilität erklären können, identifiziert. Es handelt sich dabei jeweils um geringfügige Veränderungen, die auf den ersten Blick ohne Funktion erscheinen. Im

Plastom I-*Johansen* wurden drei weitere, für dieses Plastom spezifische Edierungsstellen gefunden. Da Plastom I nicht mit anderen Genotypen kompatibel ist, üben diese Edierungsstellen in den Transkripten *ndhA*, *psaA* und *rpoB* möglicherweise einen Einfluß auf die Plastidenfunktion in interspezifischen Kombinationen aus. Eine mögliche Determinante für die Inkompatibilität des Plastoms II mit den Hybridgenomen in interspezifischen Hybriden liegt in der veränderten Proteinsequenz von *CemA*, einem Protein in der Plastidenhüllmembran für die Aufnahme von HCO_3^- . Die verminderte CO_2 -Versorgung kann zu den beobachteten Ergrünungs- und Entwicklungsdefekten führen. Ebenfalls in der Proteinsequenz verändert sind die NADH-Plastochinon-Oxidoreduktase-Untereinheiten *NdhJ* und *NdhK* sowie das P700B-Apoprotein des Photosystems I im Plastom III. Das beobachtete periodische Ausbleichen der jungen Blätter in den AA-III Hybriden deutet auf einen unzureichenden Schutz vor Photooxidation hin. Möglicherweise ist hier der veränderte *Ndh*-Komplex dafür verantwortlich, dass diese Photooxidationsschäden auftreten können und erst durch eine verstärkte (SOS-)Antwort der Pflanze überlebt werden können. Erst mit zunehmendem Alter bleiben die Blätter grün und zeigen lediglich geringe Schwankungen in der Intensität der Grünfärbung. Im Plastom V sind die beiden Kopien der Initiator-tRNA identisch. Jedoch weisen sie eine Sequenz auf, die unüblich für Plastiden höherer Pflanzen ist. Möglicherweise sind beide Formyl-Met-tRNA-Kopien nicht-funktionell, so dass eine funktionelle Initiator-tRNA aus dem nukleären Genom in die Plastiden importiert werden muss. Hierfür ist ein Transportprotein nötig, das nur im C-Genom kodiert sein könnte. Somit wäre auch zu erklären, dass das Plastom V nur in Hybriden mit dem C-Genom lebensfähig ist.

3. Analyse der spontanen Plastommutanten aus *Oenothera* und Herstellung von gerichteten Mutanten von Cytochrom *f* aus Tabak

Die spontanen Plastommutanten I ϵ , II γ und II θ aus *Oenothera* wurden immunologisch und molekular untersucht.

Die Mutante II γ zeigte in der immunologischen Analyse ein defektes Photosystem II. Die plastomkodierte Reaktionszentrumsproteine des PS II waren unter die Nachweisgrenze reduziert, während die nukleär kodierten Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates sowie die integrale Antenne CP43 akkumulierten. Die spektroskopischen Daten deuteten auf eine Mutation in den Komponenten des innersten Reaktionszentrums hin. Die Sequenzierung der entsprechenden Gene ergab eine Duplikation von fünf Basenpaaren in *psbE*, was zu einem Leserasterwechsel führt. Das verkürzte Protein ist nicht stabil wodurch auch die restlichen Komponenten des PS II nicht assembliert werden können.

Die Mutante Iε ist ebenfalls im Photosystem II betroffen. Hier konnte eine Insertion eines Nukleotids im überlappenden Bereiche der Gene *psbD* und *psbC* nachgewiesen werden. Somit entstehen eine um 10 Aminosäuren verkürzte Variante des D2-Proteins und eine um 456 Aminosäuren verkürzte Variante des CP43 Proteins. Alle anderen Komplexe akkumulieren in normalen Mengen.

In der Mutante IIθ zeigte sich in der immunologischen Analyse eine fast vollständige Reduktion von Untereinheiten aller Thylakoidmembrankomplexe. Die Fluoreszenzanalyse deutete auf einen Defekt im Cytochrom *b₆f*-Komplex hin. Die Sequenzierung aller bekannten Gene dieses Komplexes ergab eine Deletion von zwei Basenpaaren im Intron des *petB*-Gens, welches für Cytochrom *b₆* kodiert. Eine Sekundärstruktur-Analyse des Introns ergab eine starke Destabilisierung des Introns, so dass der Spleißvorgang nicht korrekt ablaufen kann. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle des Cytochrom *b₆f*-Komplexes für die Biogenese der photosynthetischen Membran. Die Mutante IIθ ist somit ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Biogenese der Thylakoidmembran.

Die vorstehenden Mutanten können aufgrund der definierten Defekte gut als Modelle für die Beteiligung der einzelnen Komplexe an der Biogenese der Thylakoidmembran dienen. Um zusätzlich noch die Funktionsweise des Cytochrom *b₆f*-Komplexes untersuchen zu können, ist es wichtig, Mutationen einzelner Aminosäuren zu erzeugen. Es wurden hierfür Aminosäuren ausgewählt, die vermutlich an der Elektronenübertragung auf das Plastocyanin beteiligt sind. Die Mutanten können nach dem Erreichen des homoplastomischen Zustands für Messungen der Übertragungsraten und -dynamik mit überexprimiertem Plastocyanin und synthetischen Elektronendonoren und -akzeptoren komplexiert werden. Die Messungen werden anschließend mit Hilfe der Elektronenspinresonanz oder Laserblitzlicht-Absorptionsspektroskopie durchgeführt.

6 Literatur

- Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., VAllon, O., Rodermel, S. R., Shinozaki, K. und Clarke, A. K. (2001). Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature. *Plant Physiol.* **125**: 1912-1918.
- Allen, J. F. und Raven, J. A. (1996). Free-radical-induced mutation vs. redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J. Mol. Evol.* **42**: 482-492.
- Altling-Mees, M. A. und Short, J. M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* **17**: 9494.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Anderson, C. M. und Gray, J. C. (1991). Effect of gabaculine on the synthesis of heme and cytochrome *f* in etiolated wheat seedlings. *Plant Physiol.* **96**: 584-587.
- Arisumi, T. (1985). Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. *J. Am. Hortic. Sci.* **110**: 273-276.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K., (Herausg.) (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Beck, J. und Nassal, M. (1997). Sequence- and Structure-Specific Determinants in the Interaction between the RNA Encapsidation Signal and Reverse Transcriptase of Avian Hepatitis B Viruses. *J. Virol.* **71**: 4971-4980.
- Beck, J., Bartos, H. und Nassal, M. (1997). Experimental Confirmation of a Hepatitis B Virus (HBV) ϵ -like Bulge-and-Loop Structure in Avian HBV RNA Encapsidation Signals. *Virology* **227**: 500-504.
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**: 573-580.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**: 235-242.
- Bhattacharya, D. und Medlin, L. (1998). Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiol.* **116**: 9-15.
- Birky, C. W. Jr. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms

- and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11331-11338.
- Birky, C. W. Jr. (2001). The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 125-148.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1524.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bock, R. (2000). Sense from nonsense: How the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie* **82**: 549-557.
- 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.
- Börner, T. (1986). Chloroplast control of nuclear gene function. *Endocytobios. Cell Res.* **3**: 265-274.
- Börner, T., Knoth, R., Herrmann, F. und Hagemann, R. (1972). Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. V. Das Fehlen von ribosomaler RNS in den Plastiden der Plastommutante "Mrs. Parker" von *Pelargonium zonale*. *Theor. Appl. Genet.* **42**: 3-11.
- Börner, T., Schumann, B. und Hagemann, R. (1976). Biochemical studies on a plastid ribosome deficient mutant of *Hordeum vulgare*. In: Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W. und Werner, S. (Herausg.) *Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 41-48.
- Bommer, D., Haberhausen, G. und Zetsche, K. (1993). A large deletion in the plastid DNA of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa* concerning two ribosomal proteins (*rpl2*, *rpl23*), one transfer RNA (*trnI*) and an ORF2280 homologue. *Curr. Genet.* **24**: 171-176.
- Bonnema, A. B., Castillo, C., Reiter, N., Cunningham, M., Adams, H. P. und O'Connell, M. (1995). Molecular and Ultrastructural Analysis of a Nonchromosomal Variegated Mutant. *Plant Physiol.* **109**: 385-392.
- Boudreau, E., Takahshi, Y., Lemieux, C., Turmel, M. und Rochaix, J. D. (1997). The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J.* **16**: 6095-6104.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. und Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3746-3750.
- Bui, E. T. N., Bradley, P. J. und Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9651-9656.

- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378.
- Byrne, M., MacDonald, B. und Coates, D. (1999). Divergence in the chloroplast genome and nuclear rDNA of the rare western australian plant *Lambertia orbifolia* gardner (*Proteaceae*). *Mol. Ecol.* **8**: 1789-96.
- Campbell, D., Eriksson, M.-J., Öquist, G., Gustafsson, P. und Clarke, A. K. (1998). The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 364-369.
- Canaday, J., Guillemaut, P. und Weil, J. H. (1980). The nucleotide sequences of the initiator transfer RNAs from bean cytoplasm and chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* **8**: 999-1008.
- Carter, P. und Wells, J. A. (1988). Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* **332**: 564-568.
- Casano, L. M., Zapata, J. M., Martín, M. und Sabater, B. (2000). Chlororespiration and Poising of Cyclic Electron Transport. *J. Biol. Chem.* **275**: 942-948.
- Chen, L.-J., Rogers, S. A., Bennett, D. C., Hu, M.-C. und Orozco, E. M. (1990). An *in vitro* transcription termination system to analyze chloroplast promoters: identification of multiple promoters for the spinach *atpB* gene. *Curr. Genet.* **17**: 55-64.
- Cheng, Y.-S., Lin, C.-H. und Chen, L.-J. (1997). Transcription and Processing of the Gene for Spinach Chloroplast Threonine tRNA in a Homologous *in Vitro* System. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **233**: 380-385.
- Chiu, W.-L. und Sears, B. B. (1993). Plastome-genome interactions affect plastid transmission in *Oenothera*. *Genetics* **133**: 989-997.
- Choquet, Y., Stern, D. B., Wostrikoff, K., Kuras, R., Girard-Bascou, J. und Wollman, F.-A. (1998). Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4380-4385.
- Cleland, R. E. (1972). *Oenothera – Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, London, New York.
- 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.
- Cosner, M. E., Jansen, R. K., Palmer, J. D. und Downie, S. R. (1997). The highly rearranged chloroplast genome of *Trachelium caeruleum* (Campanulaceae): multiple inversions, inverted repeat expansion and contraction, transposition, insertions/deletions, and several repeat families. *Curr. Genet.* **31**: 419-429.
- Craik, C. S., Rocznik, S., Largman, C. und Rutter, W. J. (1987). The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* **237**: 909-913.

- Cramer, W. A., Soriano, G. M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H., Martinez, S. E. und Smith, J. L. (1996). Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 477-508.
- Delavault, P., Sakanyan, V. und Thalouarn, P. (1995). Divergent evolution of two plastid genes, *rbcl* and *atpB*, in a non-photosynthetic parasitic plant. *Plant Mol. Biol.* **29**: 1071-1079.
- Delwiche, C. F. und Palmer, J. D. (1996). Rampant Horizontal Transfer and Duplication of Rubisco Genes in Eubacteria and Plastids. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 873-882.
- dePamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1990). Loss of photosynthetic genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* **348**: 337-339.
- dePamphilis, C. W., Young, N. D. und Wolfe, A. D. (1997). Evolution of plastid *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: Many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7367-7372.
- Dietrich, W., Wagner, W. L. und Raven, P. H. (1997). Systematics of *Oenothera* section *Oenothera* subsection *Oenothera* (*Onagraceae*). *Syst. Bot. Monogr.* **50**: 1-234.
- Dodson, G. und Wlodawer, A. (1998). Catalytic triades and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 347-352.
- Douglas, S. E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 655-661.
- Douglas, S. E. and Penny, S. L. (1998). The plastid genome from the cryptomonad alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.* **48**: 236-244.
- Doyle, J. J. und Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Ballenger, J. A. und Palmer, J. D. (1996). The distribution and phylogenetic significance of a 50-kb chloroplast DNA inversion in the flowering plant family *Leguminosae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **5**: 429-438.
- Drapier, D., Suzuki, H., Levy, H., Rimbault, B., Kindle, K. L., Stern, D. B. und Wollman, F.-A. (1998). The Chloroplast *atpA* Gene Cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*: Functional Analysis of a Polycistronic Transcription Unit. *Plant Physiol.* **117**: 629-641.
- Drescher, A., Hupfer, H., Nickel, C., Albertazzi, F., Hohmann, U., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2002). C-to-U conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame?. *Mol. Gen. Genet.* (in Druck).
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., 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.
- Dyall, S. D. und Johnson, P. J. (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and

- organelle biogenesis. *Curr. Opinion Microbiol.* **3**: 404-411.
- Ems, S. C., Morden, C. W., Dixon, C. K., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. und Palmer, J. D. (1995). Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 721-733.
- Epp, M. D., Erion, J. L., Sears, B. B. und Stubbe, W. (1987). The *plastome mutator* of *Oenothera* continues to function as originally described. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 515-518.
- Fallows, D. A. und Goff, S. P. (1995). Mutations in the ϵ Sequences of Human Hepatitis B Virus Affect both RNA Encapsidation and Reverse Transcription. *J. Virol.* **69**: 3067-3073.
- Fisher, N. und Rich, P. R. (2000). A Motif for Quinone Binding Sites in Respiratory and Photosynthetic Systems. *J. Mol. Biol.* **296**: 1153-1162.
- Fork, D. C. und Heber, U. W. (1968). Studies on Electron-Transport Reactions of Photosynthesis in Plastome Mutants of *Oenothera*. *Plant Physiol.* **43**: 606-612.
- Fournier, B., Truong-Bolduc, Q. C., Zhang, X. und Hooper, D. C. (2001). A Mutation in the 5' Untranslated Region Increases Stability of *norA* mRNA, Encoding a Multidrug Resistance Transporter of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**: 2367-2371.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988). Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002.
- Galli, G., Hofstetter, H. und Birnstiel, M. L. (1981). Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* **294**: 626-631.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. und Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspensions of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* **50**: 151-158.
- Genty, B., Wonders, J. und Baker, N. R. (1989). Non-photochemical quenching of F_0 in leaves is emission wavelength dependent: consequences for quenching analysis and its interpretation. *Photosyn. Res.* **26**: 133-139.
- Glick, R. E. und Sears, B. (1994). Genetically programmed chloroplast dedifferentiation as a consequence of plastome-genome incompatibility in *Oenothera*. *Plant Physiol.* **106**: 367-373.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable Marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4083-4089.
- Gordon, K. H. J., Crouse, E. J., Bohnert, H. J. und Herrmann, R. G. (1982). Physical mapping of differences in chloroplast DNA of the five wild-type plastomes in *Oenothera* subsection *Euoenothera*. *Theor. Appl. Genet.* **61**: 373-384.
- Gotoh, O. (1982). An improved algorithm for matching biological sequences. *J. Mol. Biol.* **162**: 705-708.

- Gray, M. W. (1989). The evolutionary origin of organelles. *Trends Genet.* **13**: 83-89.
- Gray, M. W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 678-687.
- Gray, M. W. und Doolittle, W. F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev.* **46**: 1-42.
- Gruissem, W. und Zurawski, G. (1985a). Identification and mutational analysis of the promoter for a spinach chloroplast transfer RNA gene. *EMBO J.* **4**: 1637-1644.
- Gruissem, W. und Zurawski, G. (1985b). Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpB* and *psbA* genes. *EMBO J.* **4**: 3375-3383.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Haberhausen, G., Valentin, K. und Zetsche, K. (1992). Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Mol. Gen. Genet.* **232**: 154-161.
- Hachtel, W., Neuss, A. und vom Stein, J. (1991). A chloroplast DNA inversion marks an evolutionary split in the genus *Oenothera*. *Evolution* **45**: 1050-1052.
- Haehnel, W., Jansen, T., Gause, K., Klösgen, R. B., Stahl, B., Michl, D., Huvermann, B., Karas, M. und Herrmann, R. G. (1994). Electron transfer from plastocyanin to photosystem I. *EMBO J.* **13**: 1028-1038.
- Hahn, C. S. und Strauss, J. H. (1990). Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. *J. Virol.* **64**: 3069-3073.
- Hall, T. A (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hallick, R. B., Hong, L., Drager, R. G., Favreau, M. R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A. and Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3537-3544.
- Hallier, U. W. (1968). Photosynthesereaktionen einiger Plastom-Mutanten von *Oenothera*. II. Die Bildung von ATP und NADPH. *Z. Pflanzenphysiol.* **58**: 289-299.
- Halperin, T., Zheng, B., Itzhaki, H., Clarke, A. K. und Adam, Z. (2001). Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent *Cip* protease. *Plant Mol. Biol.* **45**: 461-468.
- Han, C.-D., Coe Jr., E. H. und Martienssen, R. A. (1992). Molecular cloning and characterization of *iojap* (ij), a pattern striping gene of maize. *EMBO J.* **11**: 4037-4046.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harbinson, J. und Woodward, F. I. (1987). The use of light-induced absorbance changes at 820 nm to

- monitor the oxidation state of P700 in leaves. *Plant Cell Env.* **10**: 131-140.
- Henikoff, S. und Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10915-10919.
- Hennig, J. und Herrmann, R. G. (1986). Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two operons in a phylogenetically conserved arrangement. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 117-128.
- Herrmann, F. H. (1971). Genetic control of pigment-protein complexes I and Ia of the plastid mutant *en: alba-1* of *Antirrhinum majus*. *FEBS Lett.* **19**: 267-269.
- Herrmann, F. H., Schumann, B., Börner, T. und Knöth, R. (1976). Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden XII: Die plastidalen Lamellarproteine der photosynthesedefekten Plastidmutante *en: gil-1* ("Mrs. Pollock") und der Genmutante "Cloth of Gold" von *Pelargonium zonale* AIT. *Photosynthetica* **10**: 164-171.
- Herrmann, R. G. (1997). Eukaryotism – Towards A New Interpretation. In: Schenk, H. E. A., Herrmann, R. G., Jeon, K. W. und Schwemmler, W. (Herausg.) *Eukaryotism and Symbiosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 73-118.
- Herrmann, R. G., Seyer, P., Schedel, R., Gordon, K., Bisanz, C., Winter, P., Hildebrandt, J. W., Wlaschek, M., Alt, J., Driesel, A. J. und Sears, B. B. (1980). The Plastid Chromosomes of Several Dicotyledons. In: Bücher, T., Sebald, W. und Weiss, H. (Herausg.) *Biological Chemistry of Organelle Formation*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 97-112.
- Herrmann, R. G. und Westhoff, P. (2001). Thylakoid Biogenesis and Dynamics: The Result of a Complex Phylogenetic Puzzle. In: Anderson, B. und Aro, E. M. (Herausg.) *Regulatory Aspects in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Herrmann, R. G., Westhoff, P., Alt, J., Winter, P., Tittgen, J., Bisanz, C., Sears, B. B., Nelson, N., Hurt, E., Hauska, G., Viebrock, A. und Sebald, W. (1983). Identification and characterization of genes for polypeptides of the thylakoid membrane. In: Ciferri, O. und Dure III, L. (Herausg.) *Structure and Function of Plant Genomes*. Plenum Press, New York, 143-153.
- Hess, W. R., Hoch, B., Zeltz, P., Hübschmann, T., Kössel, H. und Börner, T. (1994). Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* **6**: 1455-1465.
- Hess, W. R., Linke, B. und Börner, T. (1997). Impact of plastid differentiation on transcription of nuclear and mitochondrial genes. In: Schenk, H. E. A., Herrmann, R. G., Jeon, K. W. und Schwemmler, W. (Herausg.) *Eukaryotism and Symbiosis*. Springer Verlag, Heidelberg, 233-242.
- Hildebrandt, J. W., Bottomley, W., Moser, J. und Herrmann, R. G. (1984). A plastome mutant of *Oenothera hookeri* has a lesion in the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **783**: 67-73.
- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y.,

- Sun, C. R., Meng, B. Y., Li Y. Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 185-194.
- Hirose, T., Fan, H., Suzuki, J. Y., Wakasugi, T., Tsudzuki, T., Kössel, 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.
- 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.
- Holländer, V. und Kück, U. (1999). Group II intron splicing in *Escherichia coli*: phenotypes of *cis*-acting mutations resemble splicing defects observed in organelle processing. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2339-2344.
- Hornung, S., Fulgosi, H., Dörfel, P. und Herrmann, R. G. (1996). Sequence variation in the putative replication origins of the five genetically distinct basic *Euoenothera* plastid chromosomes (plastomes). *Mol. Gen. Genet.* **251**: 609-612.
- Hotchkiss, T. und Hollingsworth, M. J. (1997). RNA processing alters open reading frame stoichiometry from the large ATP synthase gene cluster of spinach chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **33**: 635-640.
- Howe, C. J. (1985). The endpoints of an inversion in wheat chloroplast DNA are associated with short repeated sequences containing homology to *att*-lambda. *Curr. Genet.* **10**:139-145.
- Howe, C. J., Barker, R. F., Bowman, C. M. und Dyer, T. A. (1988). Common features of three inversions in wheat chloroplast DNA. *Curr. Genet.* **13**: 343-349.
- Howe, G., Mets, L. und Merchant, S. (1995). Biosynthesis of cytochrome *f* in *Chlamydomonas reinhardtii*: analysis of the pathway in gabaculine-treated cells and the heme attachment mutant B6. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 156-65.
- Hübschmann, T., Hess, W. R. und Börner, T. (1996). Impaired splicing of the *rps12* transcript in ribosome-deficient plastids. *Plant Mol. Biol.* **30**: 109-123.
- Hwang, D. C., Kim, D. H., Lee, J. S., Kang, B. H., Han, J., Kim, W., Song, B. D. und Choi, K. Y. (2000). Characterization of active-site residues of the NIa protease from tobacco vein mottling virus. *Mol. Cells* **10**: 505-511.
- Illerhaus, J., Altschmied, L., Reichert, J., Zak, E., Herrmann, R. G. und Haehnel, W. (2000). Dynamic interaction of plastocyanin with the cytochrome *bf* complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 17590-17595.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (Herausg.) (1990). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., London.
- Joët, T., Cournac, L., Horvath, E. M., 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.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asumizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Susamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136.
- Kanevski, I., Maliga, P., Rhoades, D. F. und Gutteridge, S. (1999). Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid. *Plant Physiol.* **119**: 133-142.
- Kapoor, S. und Sugiura, M. (1999). Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II *PatpB*-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **11**: 1799-1810.
- Katayama, H. und Ogihara, Y. (1996). Phylogenetic affinities of the grasses to other monocots as revealed by molecular analysis of chloroplast DNA. *Curr. Genet.* **29**: 572-581.
- Katoh, A., Lee, K.-S., Fukuzawa, H., Ohyama, K. und Ogawa, T. (1996). *cemA* homologue essential to CO₂ transport in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4006-4010.
- Kirby, K. S. (1968). Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Meth. Enzymol.* **12B**: 87.
- Kirk, J. T. O. und Tilney-Bassett, R. A. E. (1978). *The Plastids. Their chemistry, structure, growth and inheritance*. Elsevier Press, Amsterdam.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (1993). Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLP A, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 1214-1220.
- Kochevenko, A. S., Ratushnyak, Y. I., Korneev, D. Y., Stasik, O. O., Shevchenko, V. V., Kochubey, S. M. und Gleba, Y. Y. (1999). Study of the state of photosynthetic apparatus in cybrid tomato plants possessing traits of nuclear-cytoplasmic incompatibility. *Russ. J. Plant Physiol.* **46**: 474-481.
- Kowallik, K. V., Stoebe, B., Schaffran, I., Kroth-Pancic, P. und Freier, U. (1995). The Chloroplast Genome of a chlorophyll *a+c*-containing Alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 336-342.
- Krause, G.H. und Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 313-349.
- Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W. und Beck, C. F. (1997). Chlorophyll precursors are signals of

- chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14168-14172.
- Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W. und Beck, C. F. (2000). Chloroplast signalling in the light induction of nuclear HSP70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/nucleus. *Plant J.* **24**: 523-531.
- Kuras, R. und Wollman, F.-A. (1994). The assembly of cytochrome *b₆/f* complexes: an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* **13**: 1019-1027.
- Kutzelnigg, H. und Stubbe, W. (1974). Investigations on plastome mutants in *Oenothera*. I. General considerations. *Sub-Cell. Biochem.* **3**: 73-89.
- Kutzelnigg, H., Meyer, B. und Schötz, F. (1975a). Untersuchungen an Plastom-Mutanten von *Oenothera*. II. Überblick über die Ultrastruktur der mutierten Plastiden. *Biol. Zbl.* **94**: 513-526.
- Kutzelnigg, H., Meyer, B. und Schötz, F. (1975b). Untersuchungen an Plastom-Mutanten von *Oenothera*. III. Vergleichende ultrastrukturelle Charakterisierung der Mutanten. *Biol. Zbl.* **94**: 527-538.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-142.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 660-685.
- Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Soriano, J. P. und Nazar, R. N. (2000). Cotranscription of 5S rRNA-tRNA^{Arg}(ACG) from *Brassica napus* chloroplasts and processing of their intergenic spacer. *Gene* **253**: 303-311.
- Lee, H., Bingham, S. E. und Webber, A. N. (1996). Function of 3' non-coding sequences and stop codon usage in expression of the chloroplast *psaB* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **31**: 337-354.
- Legen, J., Schmitz-Linneweber, C., Drescher, A., Hupfer, H., Tillich, M., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2001). Decoding of the *ndhH* operon from spinach: an example for the complexity of plastid gene expression in higher plants. *Endocytobiosis Cell Res.* **14**: 11-20.
- Lehmbeck, J., Stummann, B. M. und Henningsen, K. W. (1987). Sequence of two regions of pea chloroplast DNA, one with the genes *rps14*, *trnfM* and *trnG*-GCC, and one with the genes *trnP*-UGG and *trnW*-CCA. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3630.
- Leon, P. und Arroyo, A. (1998). Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 453-480.
- Lerbs-Mache, S. (2000). Regulation of rDNA transcription in plastids of higher plants. *Biochimie* **82**: 525-535.
- 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.
- Lowe, T.M. und Eddy, S. R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**: 955-964.
- Maier, R. M., Hoch, B., Zeltz, P. und Kössel, H. (1992). Internal editing of the Maize Chloroplast *ndhA* Transcript Restores Codons for Conserved Amino Acids. *Plant Cell* **4**: 609-616.
- Maier, R. M., Neckermann, K., Igloi, G. L. 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.
- Maier, R. M., Zeltz, P., Kössel, H., Bonnard, G., Gualberto, J. M. und Grienenberger, J. M. (1996). RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **32**: 343-365.
- Malek, O., Lattig, K., Hiesel, R., Brennicke, A. und Knoop, V. (1996). RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J.* **15**: 1403-1411.
- Manna, F., Massardo, D. R., Wolf, K., Luccarini, G., Carlomagno, M. S., Rivellini, F., Alifano, P. und Del Giudice, L. (1994). A tRNA gene mapping within the chloroplast rDNA cluster is differentially expressed during the development of *Daucus carota*. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1712-1718.
- Margulis, L. (1970). Origin of eucaryotic cells. Yale University Press, New Haven.
- Marienfeld, J. R. und Newton, K. J. (1994). The maize NCS2 abnormal growth has a chimeric *nad4-nad7* mitochondrial gene and is associated with reduced Complex I function. *Genetics* **138**: 855-863.
- Marini, F., Naeem, A. und Lapreya, J.-N. (1993). An efficient 1-tube PCR method for internal site-directed mutagenesis of large amplified molecules. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2277-2278.
- Martin, W. und Herrmann, R. G. (1998). Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiol.* **118**: 9-17.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M. und Kowallik, K. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165.
- Matos, J. A. und Schaal, B. A. (2000). Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: a coalescent approach to hybridization. *Evolution* **54**: 1218-1233.
- Mayfield, S. P. (1990). Chloroplast gene regulation: interaction of the nuclear and chloroplast genomes in the expression of photosynthetic proteins. *Curr. Opinion Cell Biol.* **2**: 509-513.
- McClain, W. H., Foss, K., Jenkins, R. A. und Schneider, J. (1991). Four sites in the acceptor helix and one site in the variable pocket of tRNA^{Ala} determine the molecule's acceptor identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9272-9276.
- Meng, B.-Y., Wakasugi, T. und Sugiura, M. (1991). Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Curr. Genet.* **20**: 259-264.

- Mereschkowsky, C. (1910). Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol. Zentralblatt* **30**: 277-303.
- Metzlaff, M., Pohlheim, F., Börner, T. und Hagemann, R. (1982). Hybrid variegation in the genus *Pelargonium*. *Curr. Genet.* **5**: 245-249.
- Meurer, J., Berger, A. und 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.
- Michalowski, C., Breunig, K. D. und Bohnert, H. J. (1987). Points of rearrangements between plastid chromosomes: location of protein coding regions on broad bean chloroplast DNA. *Curr. Genet.* **11**: 265-274.
- Michel, F., Umesono, K. und Ozeki, H. (1989). Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns – a review. *Gene* **82**: 5-30.
- Millen, R. S., Olmstead, R. G., Adams, K. L., Palmer, J. D., Lao, N. T., Heggie, L., Kavanagh, T. A., Hibberd, J. M., Gray, J. C., Morden, C. W., Calie, P. J., Jermiin, L. S. und Wolfe, K. H. (2001). Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus. *Plant Cell* **13**: 645-653.
- Mochizuki, N., Brusslan, J. A., 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.
- Monde, R.-A., Zito, F., Olive, J., Wollman, F.-A. und Stern, D. B. (2000). Post-transcriptional defects in tobacco mutants lacking the cytochrome *b₆/f* complex. *Plant J.* **21**: 61-72.
- Morais, F., Barber, J. und Nixon, P. J. (1998). The Chloroplast-encoded a Subunit of Cytochrome *b*-559 is required for Assembly of the Photosystem Two Complex in both the Light and the Dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **273**: 29315-29320.
- Mueller, F. und Brimacombe, R. (1997). 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.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2879-2889.
- Murakami, K. S., Masuda, S. und Darst, S. A. (2002). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**: 1280-1284.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Myers, E. W. und Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.* **4**: 11-17.
- Nagano, Y., Matsuno, R. und Sasaki, Y. (1991). Sequence and transcriptional analysis of the gene

- cluster *trnQ-zfpA-psal-ORF231-petA* in pea chloroplasts. *Curr. Genet.* **20**: 431-436.
- Nagata, T. und Takebe, I. (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* **99**: 12-20.
- Neckermann, K., Zeltz, P., Igloi, G. L., Kössel, H. und Maier, R. M. (1994). The role of RNA editing in conservation of start codons in chloroplast genomes. *Gene* **146**: 177-182.
- Needleman, S. B. und Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**: 443-453.
- Neuhaus, H., Scholz, A. und Link, G. (1989). Structure and expression of a split chloroplast gene from mustard (*Sinapis alba*): ribosomal protein gene *rps16* reveals unusual transcriptional features and complex RNA maturation. *Curr. Genet.* **15**: 63-70.
- Newton, K. J., Knudsen, C., Gabay-Laughnan, S. und Laughnan, J. R. (1990). An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell* **2**: 107-113.
- Nielsen, B. L., Lu, Z. und Tewari, K. K. (1993). Characterization of the pea chloroplast DNA *OriA* region. *Plasmid* **30**: 197-211.
- Oswald, O., Martin, T., Dominy, P. J. und Graham, I. A. (2001). Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2047-2052.
- Palmer, J. D. (1985). Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In: MacIntyre, R. J. (Herausg.) *Monographs in evolutionary biology: molecular evolutionary genetics*. Plenum Press, New York, 131-240.
- Palmer, J. D. und Stein, D. B. (1986). Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Curr. Genet.* **10**: 823-833.
- Palmer, J. D. und Thompson, W. F. (1982). Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost. *Cell* **29**: 537-550.
- Palmer, J. D., Nugent, J. M. und Herbon, L. A. (1987a). Unusual structure of geranium chloroplast DNA: A triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 769-773.
- Palmer, J. D., Osorio, B. und Thompson, W. F. (1988). Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNA. *Curr. Genet.* **14**: 65-74.
- Palmer, J. D., Osorio, B., Aldrich, J. und Thompson, W. F. (1987b). Chloroplast DNA evolution among legumes: Loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr. Genet.* **11**: 275-286.
- Pandey, K. K., Grant, J. E. und Williams, E. G. (1987). Interspecific hybridisation between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. *Aust. J. Bot.* **35**: 171-182.

- Peltier, J.-B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P. und van Wijk, K. J. (2001). Identification of a 350-kDa *ClpP* protease complex with 10 different *Clp* isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 16318-16327.
- Pfannschmidt, T., Schütze, K., Brost, M. und Oelmüller, R. (2001). A Novel Mechanism of Nuclear Photosynthesis Gene Regulation by Redox Signals from the Chloroplast during Photosystem Stoichiometry Adjustment. *J. Biol. Chem.* **276**: 36125-36130.
- Pries, F., Kingma, J. und Janssen, D. B. (1995). Activation of an Asp-124-->Asn mutant of haloalkane dehalogenase by hydrolytic deamidation of asparagine. *FEBS Lett.* **358**:171-174.
- Przywara, L., White, D. W. R., Sanders, P. M. und Maher, D. (1989). Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using *in ovulo* embryo and embryo culture. *Ann. Bot.* **64**: 613-624.
- Qiu, Y.-L. und Palmer, J. D. (1999). Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes. *Trends Plant Sci.* **4**: 26-30.
- Race, H. L., Herrmann, R. G. und Martin, W. (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends Genet.* **15**: 364-370.
- Ramos, A. und Varani, G. (1997). Structure of the acceptor stem of *Escherichia coli* tRNA^{Ala}: role of the G3-U70 base pair in synthetase recognition. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2083-2090.
- Raubeson, L. A. und Jansen, R. K. (1990). A Rare Chloroplast-DNA Structural Mutation is Shared by all Conifers. *Biochem. Syst. Ecol.* **20**: 17-24.
- Raven, P. H. (1970). A Multiple Origin for Plastids and Mitochondria. *Science* **169**: 641-646.
- Redei, G. P. und Plurad, S. B. (1973). Hereditary structural alterations of plastids induced by a nuclear mutator gene in *Arabidopsis*. *Protoplasma* **77**: 361-380.
- Reith, M. E. und Munholland, J. (1995). Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 333-335.
- Renner, O. (1917). Versuche über die gametische Konstitution der Oenotheren. *Z. Indukt. Abstammungs. Vererbungslehre*. **18**: 121-294.
- Renner, O. (1922). Eiplasma und Pollenschlauchplasma als Vererbungsträger bei den Oenotheren. *Z. Indukt. Abstammungs. Vererbungslehre* **27**: 235-237.
- Renner, O. (1924). Die Scheckung der Oenotherenbastarde. *Biol. Zentralblatt* **44**: 309-336.
- Renner, O. (1934). Die pflanzlichen Plastiden als selbstständige Elemente der genetischen Konstitution. *Ber. Math.-Phys. Klasse Sächs. Akad. Wiss. Leipzig* **86**: 241-266.
- Renner, O. (1936). Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. *Flora* **30**: 218-290.
- Rolland, N., Doren, A.-J., Amoroso, G., Sültemeyer, D. F., Joyard, J. und Rochaix, J.-D. (1997). Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* **16**: 6713-6726.

- Rotte, C., Henze, K., Müller, M. und Martin, W. (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 481-486.
- Roussel, D. L., Thompson, D. L., Pallardy, S. G., Miles, D. und Newton, K. J. (1991). Chloroplast Structure and Function Is Altered in the NCS2 Maize Mitochondrial Mutant. *Plant Physiol.* **96**: 232-238.
- Ruf, S., Kössel, 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.
- Ryberg, H., Rybert, M. und Sundqvist, C. (1993). Plastid ultrastructure and development. In: Sundqvist, C. und Ryberg, M. (Herausg.) *Pigment-protein complexes in plastid: synthesis and assembly*. Academic Press, San Francisco, 25-62.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- SantaLucia, J. Jr., Allawi, H. T. und Seneviratne, P. A. (1996). Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry* **35**: 3555-3562.
- Sasaki, Y., Konishi, T. und Nagano, Y. (1995). The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiol.* **108**: 445-449.
- Sasaki, Y., Nagano, Y., Morioka, S., Ishikawa, H. und Matsuno, R. (1989). A chloroplast gene encoding a protein with one zinc finger. *Nucl. Acids Res.* **17**: 6217-6227.
- 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.
- Sayle, R. A. und Milner-White, E. J. (1995). RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 374
- Sazanov, L. A., Burrows, P. A. und Nixon, P. J. (1998): The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: Isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1319-1324.
- Schaffner, C., Laasch, H. und Hagemann, R. (1995). Detection of point mutations in chloroplast genes of *Antirrhinum majus* L. I. Identification of a point mutation in the *psaB* gene of a photosystem I plastome mutant. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 533-544.
- Schmelzer, C., Schmidt, C., May, K. K. und Schweyen, R. J. (1983). Determination of functional

- domains in intron b1 of yeast mitochondrial RNA by studies of mitochondrial mutations and a nuclear suppressor. *EMBO J.* **2**: 2047-2052.
- Schmitz-Linneweber, C., Maier, R. M., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Herrmann, R. G. und Mache, R. (2001). The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol. Biol.* **45**: 307-315.
- Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T. G., Hupfer, H., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (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.* (in Druck).
- Schötz, F. (1975). Untersuchungen über die Plastidenkonkurrenz bei *Oenothera*. Die Stabilität der Konkurrenzfähigkeit bei Verwendung verschiedenartiger mutierter Testplastiden. *Biol. Zentralblatt* **94**: 17-26.
- Schreiber, U. (1986). Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* **9**: 261-272.
- Schreiber, U., Klughammer, C. und Neubauer, C. (1988). Measuring P700 absorbance changes around 800 nm with a new type of pulse modulation system. *Z. Naturforsch.* **43C**: 686-698.
- Schreiber, U., Schliwa, U. und Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosyn. Res.* **10**: 51-62.
- Schumacher, E. und Steiner, E. (1993). Cytological analysis of complex-heterozygotes in populations of *Oenothera grandiflora* (*Onagraceae*) in Alabama. *Plant Syst. Evol.* **184**: 77-87.
- Schumacher, E., Steiner, E. und Stubbe, W. (1992). The Complex-Heterozygotes of *Oenothera grandiflora* L'Her. *Bot. Acta* **105**: 375-381.
- Sears, B. B., Stoike, L. L. und Chiu, W.-L. (1996). Proliferation of Direct Repeats near the *Oenothera* Chloroplast DNA Origin of Replication. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 850-863.
- Sharp, S., DeFranco, D., Dingermann, T., Farrell, P. und Söll, D. (1981). Internal control regions for transcription of eukaryotic tRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6657-6661.
- Sharp, S., Dingermann, T. und Söll, D. (1982). The minimum intragenic sequences required for promotion of eukaryotic tRNA gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **25**: 5393-5406.
- Shumway, L. K. und Weier, T. E. (1967). The chloroplast structure of *iojap* maize. *Am. J. Bot.* **54**: 773-780.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada H., und Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**: 2043-2049.

- Short, J.M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. und Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583-7600.
- Smith, A. G., Wilson, R. M., Kaethner, T. M., Willey, D. L. und Gray, J. C. (1991). Pea chloroplast genes encoding a 4 kDa polypeptide of photosystem I and a putative enzyme of C₁ metabolism. *Curr. Genet.* **19**: 403-410.
- Smith, T. F. und Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**: 195-197.
- Sokolenko, A., Lerbs-Mache, S., Altschmied, L. und Herrmann, R. G. (1998). *Cip* protease complexes and their diversity in chloroplasts. *Planta* **207**: 286-295.
- Soriano, G. M., Ponamarev, M. V., Tae, G.-S. und Cramer, W. A. (1996). Effect of the Interdomain Basic Region of Cytochrome *f* on Its Redox Reactions *in Vivo*. *Biochemistry* **35**: 14590-14598.
- Sprang, S., Standing, T., Fletterick, R. J., Stroud, R. M., Finer-Moore, J., Xuong, N. H., Hamlin, R., Rutter, W. J. und Craik, C. S. (1987). The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis. *Science* **237**: 905-909.
- Stern, D. B., Higgs, D. C. und Yang, J. (1997). Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **2**: 308-315.
- Stinson, H. T. Jr (1953). Cytogenetics and phylogeny of *Oenothera argillicola* Mackenz. *Genetics* **38**: 389-406.
- Stirewalt, V. L., Michalowski, C. B., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J. und Bryant, D. A. (1995). Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 327-332.
- Stratton, J. R., Pelton, J. G. und Kirsch, J. F. (2001). A Novel Engineered Subtilisin BPN' Lacking a Low-Barrier Hydrogen Bond in the Catalytic Triad. *Biochemistry* **40**: 10411-10416.
- Stubbe, W. (1955). Erbliche Chlorophylldefekte bei *Oenothera*. *Photo. Wiss.* **4**: 3-8.
- Stubbe, W. (1959). Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. *Z. Vererbungslehre* **90**: 288-298.
- Stubbe, W. (1970). Das *falcifolia*-Syndrom der *Oenothera*. *Mol. Gen. Genet.* **106**: 213-227.
- Stubbe, W. (1989). *Oenothera* – an ideal system for studying the interactions of genome and plastome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**: 245-257.
- Stubbe, W. und Herrmann, R. G. (1982). Selection and maintenance of plastome mutants and interspecific genome/plastome hybride from *Oenothera*. In: Edelman, M., Hallick, R. B. und Chua, N.-H. (Herausg.) *Methods in chloroplast molecular biology*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 149-165.
- Sugita, M. und Sugiura, M. (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 315-326.

- Sugita, M., Sugishita, H., Fujishiro, T., Tsuboi, M., Sugita, C., Endo, T. und Sugiura, M. (1997). Organization of a large gene cluster encoding ribosomal proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301: comparison of gene clusters among cyanobacteria, eubacteria and chloroplast genomes. *Gene* **195**: 73-79.
- 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**: 23-27.
- Sugiura, M., Hirose, T. und Sugita, M. (1998). Evolution and Mechanism of Translation in Chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 437-459.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. und Maliga, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8526-8530.
- Tanford, C. (1962). The interpretation of hydrogen ion titration curves in proteins. *Adv. Protein Chem.* **17**: 69-165.
- Taylor, W. C. (1989). Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 211-233.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Thein, S. L. und Wallace, R. B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnostics of genetic disorders. In: Davis, S. E. (Herausg.) *Human Genetic Diseases: A practical approach*. IRL Press, Herndon, Virginia, USA.
- Tsudzuki, T., Wakasugi, T. und Sugiura, M. (2001). Comparative Analysis of RNA Editing Sites in Higher Plant Chloroplasts. *J. Mol. Evol.* **53**: 327-332.
- Tsumura, Y., Suyama, Y. und Yoshimura, K. (2000). Chloroplast DNA inversion polymorphism in populations of *Abies* and *Tsuga*. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1302-1312.
- van Kooten, O. und Snell, J. F. H. (1990). The use of chlorophyll nomenclature in plant stress physiology. *Photosyn. Res.* **25**: 147-150.
- Varani, G. und McClain, W. H. (2000). The G·U wobble base pair. *EMBO Reports* **1**: 18-23.
- 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**: 2211-2217.
- Veres, G., Gibbs, R. A., Scherer, S. E. und Caskey, C. T. (1987). The molecular basis of the sparse for mouse mutation. *Science* **237**: 415-417.
- Wakasugi, T., Hirose, T., Horihata, M., Tsudzuki, T., Kössel, 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.

- Wakasugi, T., Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Itso, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K. und Sugiura, M. (1997). Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5967-5972.
- Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (1998). Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* **16**: 231-241.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9794-9798.
- Walbot, V. und Coe Jr., E. H. (1979). Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 2760-2764.
- Walter, A.E., Turner, D.H., Kim, J., Lyttle, M.H., Müller, P., Mathews, D.H. und Zuker, M. (1994). Coaxial Stacking of Helices Enhances Binding of Oligoribonucleotides and Improves Predictions of RNA Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9218-9222.
- Westhoff, P. und Herrmann, R. G. (1988). Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur. J. Biochem.* **171**: 551-564.
- Whatley, J. M., John, P. und Whatley, F. R. (1979). From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **204**: 165-187.
- Wimberley, B. T., Brodersen, D. E., Clemons Jr., W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T. und Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327-339.
- Winter, P. und Herrmann, R. G. (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*. *Botan. Acta* **101**: 42-48.
- Woese, C. R. (1977). Endosymbionts and mitochondrial origins. *J. Mol. Evol.* **10**: 93-96.
- Wolfe, K. H., Morden, C. W. und Palmer, J. D. (1992). Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10648-10652.
- Wollman, F. A., Minai, L. und Nechushtai, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**: 21-85.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. und Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478.
- Xiong, J., Fischer, W. M., Inoue, K., Nakahara, M. und Bauer, C. E. (2000). Molecular Evidence for the Early Evolution of Photosynthesis. *Science* **289**: 1724-1730.

- Yao, J.-L. 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.
- Yao, J.-L., Cohen, D. und Rowland, R. E. (1994). Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (*Araceae*). *Theor. Appl. Genet.* **88**: 255-260.
- Yao, J.-L., Cohen, D. und Rowland, R. E. (1995). Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia*. *Plant Sci.* **109**: 199-206.

7 Publikationen

Zeitschriften:

Hupfer, H., Swiatek, M., Hornung, S., Herrmann, R. G., Maier, R. M., Chiu, W.-L. & 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.

Legen, J., Schmitz-Linneweber, C., Drescher, A., **Hupfer, H.**, Tillich, M., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (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**, 11-19.

Drescher, A., **Hupfer, H.**, Nickel, C., Albertazzi, F., Hohmann, U., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2002): C-to-U conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame? *Mol. Gen. Genom.* **267**, 262-269.

Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T. G., **Hupfer, H.**, Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (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.* **19**, 1602-1612.

Posterpräsentationen:

Hupfer, H., Swiatek, M., Maier, R. M. und Herrmann, R. G. (1999): Nukleus/Plastiden-Inkompatibilität in der Gattung *Oenothera*. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Wermelskirchen-Dabringhausen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhold G. Herrmann. Mein Dank gilt ihm für die Bereitstellung der Arbeitsmittel, die wissenschaftliche Betreuung sowie der Möglichkeit zur Dissertation.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Dr. Rainer Maier für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit danken: Anja Drescher, Sabine Kemp, Julia Legen, Rainer Maier, Peter Poltnigg, Christian Schmitz-Linneweber und Michael Tillich. Ihr habt es wahrlich lange mit mir ausgehalten.

Mein Dank gilt auch Claudia Nickel für ihre Unterstützung und Geduld.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meiner Frau, meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre dauernde, vor allem moralische, Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Holger Hupfer
geboren am: 23. August 1971 in Altenplos (Kreis Bayreuth)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, keine Kinder

Schulbildung:

09/77 - 07/81 Grundschule Altenplos-Heinersreuth
09/81 - 07/82 Hauptschule Altenplos
09/82 - 07/91 Staatliches Gymnasium mit Schülerheim Hohenschwangau
07/91 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/91 - 06/92 Wehrdienst

Studium, Beschäftigung:

09/92 – 10/97 Diplomstudiengang Biochemie an der Universität Bayreuth
04/97 mündliche Diplomhauptprüfungen
05/97 – 10/97 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzensystematik der Universität Bayreuth (Prof. Dr. U.-G. Maier)
11/97 – 03/02 Doktorarbeit im Rahmen einer Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Department I Biologie (ehem. Botanisches Institut) der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. R. G. Herrmann/Arbeitsgruppe Dr. habil. R. Maier)
06/02 – 12/02 Sachbearbeiter für Patentanmeldungen im Bereich Biologie, Biotechnologie, Gentechnik und Pharmazie in der Patent- und Rechtsanwaltskanzlei Dr. Volker Vossius, München